



GUÍA PRÁCTICA

**para la
utilización
de muestras
biológicas en
Investigación
Biomédica**



II. EL PROCESO DE UTILIZACIÓN DE LA MUESTRA

1. Origen

2. Obtención

- 2.1. Procedimientos técnicos para la obtención de las muestras biológicas de origen humano
 - 2.1.A. Tumores y tejidos sanos
 - 2.1.B. Células
 - 2.1.C. Fluidos
- 2.2. El respeto de los derechos de los pacientes en la obtención de las muestras
- 2.3. La gratuidad de la donación

3. Preparación de las muestras

- 3.1. Procedimientos técnicos para la preparación de las muestras
 - 3.1.A. Tejidos y tumores
 - 3.1.B. ADN y ARN
 - 3.1.C. Células
 - 3.1.D. Fluidos
- 3.2. El respeto de los derechos del paciente relativos al uso de las muestras

4. Conservación

- 4.1. Procedimientos técnicos para la conservación de las muestras
 - 4.1.A. Tejidos y órganos
 - 4.1.B. ADN y ARN
 - 4.1.C. Células
 - 4.1.D. Fluidos
- 4.2. El respeto de los derechos de los pacientes durante la conservación de las muestras
 - 4.2.A. Diferenciación entre muestras según su relación con un sujeto identificado o identificable
 - 4.2.B. Confidencialidad
 - 4.2.C. Derecho a no saber
 - 4.2.D. Derechos de acceso y rectificación
 - 4.2.E. Periodo de conservación

5. Circulación

- 5.1. Aspectos técnicos del transporte de muestras biológicas
 - 5.1.A. Legislación aplicable
 - 5.1.B. Envío de muestras
 - 5.1.C. Identificación
 - 5.1.D. Clasificación de las muestras para el envío
 - 5.1.E. Empaquetado
 - 5.1.F. Etiquetado
 - 5.1.G. Documentación para el envío de mercancías peligrosas
 - 5.1.H. Aspectos particulares para cada tipo de muestra
- 5.2. La regulación jurídica de la importación y la exportación de muestras
 - 5.2.A. Entrada
 - 5.2.B. Salida
- 5.3. Cautelas sobre el tratamiento de datos de carácter personal en la transferencia internacional de muestras biológicas identificadas o identificables

6. Cesión de muestras para otros investigadores

- 6.1. Usos de las muestras para investigación
- 6.2. Gestión de las peticiones de material
- 6.3. Aplicación de los principios de protección de datos de carácter personal en la cesión de las muestras

7. Procesamiento. Implicaciones jurídicas del uso de la muestra

8. Prácticas de seguridad

- 8.1. Condiciones de trabajo
- 8.2. Protección de las muestras
- 8.3. Tratamiento de residuos
 - 8.3.A. Según el tipo de residuo
- 8.4. Listado de medidas preventivas

9. Explotación de los resultados de la investigación

- 9.1. La relación con el paciente
- 9.2. El marco jurídico aplicable
- 9.3. ¿Se puede patentar un producto derivado de una muestra biológica?
- 9.4. La cuestión del consentimiento como posible requisito de patentabilidad
- 9.5. La propiedad de la patente del producto derivado de la muestra:
la distribución de beneficios económicos
- 9.6. La comercialización de las muestras

10. Recomendaciones para la estructuración y funcionamiento de un biobanco

II. El proceso de utilización de la muestra

1. ORIGEN

La determinación del tipo de muestras que se precisan en la investigación es un primer paso fundamental para que el proceso de utilización posterior sea ágil y racional.

Si se considera que los biobancos deberían ser, de forma ideal, los establecimientos más idóneos para almacenar y distribuir las muestras biológicas obtenidas con fines de investigación, sus características técnicas más idóneas serían las siguientes:

1) En primer lugar, conviene definir el tipo de banco que puede ser independiente o estar asociado con otros bancos; en el segundo caso, cada banco está asociado a una red, con lo que sus procedimientos estarán regulados por los procedimientos consensuados por la red.

2) En segundo lugar, conviene fijar los criterios de selección de las muestras: es recomendable que cada banco establezca, con antelación y basándose en sus objetivos, los criterios de selección de las muestras que tengan interés para su archivo entre aquellas en las que:

- Exista material sobrante de estudios diagnósticos.
- Se cuente con consentimiento informado expreso del paciente.
- El tiempo transcurrido entre la extracción y la conservación se ajuste a los estándares de calidad de cada tipo de muestra.

Estos criterios típicamente se relacionan con el interés y la finalidad del banco o de los grupos que utilizan o que se prevé que utilizarán las muestras almacenadas. Aunque el criterio empleado puede ser en principio almacenar todas las muestras que, cumpliendo los criterios anteriores, lleguen al banco, hay que considerar que el mantenimiento de un archivo con escasa utilización supone un coste variable que, dependiendo de los formatos en los que se archiven las muestras, puede suponer una sobrecarga económica importante para la institución.

En el caso de decidir almacenar indiscriminadamente todas las muestras, habrá ciertamente que contar con una gran capacidad de almacenamiento. Por otro lado, los criterios empleados para que una muestra sea seleccionada para su archivo en el banco

deben ser difundidos de forma clara a todos los que participan en su procesamiento desde la obtención de la muestra hasta el final del procedimiento. Conviene reseñar la conveniencia, siempre que sea posible, de archivar muestras patológicas (por ejemplo, tejido tumoral) y su contrapartida normal, imprescindible para muchos estudios. Cuando esto último no sea posible, puede plantearse la toma de muestras de células de la mucosa bucal del paciente con una torunda y que se laven en un medio adecuado para su posterior almacenamiento.

En resumen, conviene decidir cuanto antes cuál será el objetivo de cada banco y esto determinará el criterio de selección de material:

- Colección indiscriminada de muestras.
- Colección restringida a ciertos tipos de muestras.
- Colección de series limitadas de casos (ensayos clínicos).
- Colección de patologías concretas: cardiovasculares, neurodegenerativas, cáncer, etc.

Cuando se pretenda un almacenamiento restringido de determinadas patologías para investigación, sería recomendable considerar entre ellas aquellos tipos por los que exista un conocido interés en la institución.

2. OBTENCIÓN

A continuación se estudian, en primer lugar, los procedimientos técnicos para la obtención de muestras en función de que se trate de tejidos, células o fluidos; en segundo lugar, se describen los criterios que se deben respetar en relación con los derechos de los sujetos fuente en esta fase.

2.1. Procedimientos técnicos para la obtención de las muestras biológicas de origen humano

2.1.A. Tumores y tejidos sanos

A.1. Rapidez y forma de obtención

La calidad de las muestras depende en gran medida de la rapidez y de la forma de obtención, así como del procesamiento y del tipo de transporte hasta llegar al banco de tejidos. Además, debido a la enorme variabilidad biológica, algunos tipos de tejidos y de tumores pueden necesitar un tratamiento individualizado. Estas variables son especialmente importantes cuando se pretende la extracción y el posterior uso del ARN. Por ello, es recomendable un inmediato traslado de las muestras, en especial las obtenidas por procedimientos quirúrgicos, punciones y biopsias, desde el lugar de obtención hasta el servicio en el que se van a realizar los estudios diagnósticos (por ejemplo, Anatomía Patológica o Hematología) donde se efectuará la toma de la parte de la muestra excedente del diagnóstico para su archivo en el banco de tejidos. Esto requiere la coordinación con el personal que realizará el traslado de las muestras. El envío de las mismas, una vez obtenidas, se debe hacer preferentemente en condiciones de esterilidad y en fresco.

A.2. Tiempos desde la extracción a la conservación

Se debe establecer un máximo de tiempo desde la extracción quirúrgica hasta la congelación a partir del cual el material se rechazará. Este tiempo puede variar con el tipo de tejido y el objetivo para el cual se ha obtenido (extracción de ARN, ADN, proteínas, histología, etc.). Como regla general, toda muestra que haya tardado más de dos horas en este proceso y que haya estado a temperatura ambiente debe ser descartada. En el caso de extraer ARN, el estándar de calidad se sitúa en un tiempo menor de 30 minutos. Estos tiempos varían con el tipo y el tamaño del tejido. La entrada de la muestra en la base de datos debería recoger el tiempo transcurrido desde su extracción hasta su congelación.

A.3. Requisitos de la toma de muestras

La toma de muestras para el archivo en el banco de tejidos debe cumplir los siguientes requisitos:

- 1) No puede interferir ni con el diagnóstico histopatológico, citomorfológico, fenotípico o molecular del caso, ni con el uso para otro tipo de fines primordiales para el paciente, como la evaluación de los parámetros pronósticos; en otras palabras, sólo se podrá utilizar para el archivo el material excedente del utilizado para los fines anteriormente citados.
- 2) Con el objetivo de asegurar lo recogido en el punto anterior, la toma de la muestra para el banco de tejidos la realizará una persona cuya capacitación lo garantice.
- 3) La toma se realizará garantizando la calidad del procedimiento para asegurar su utilidad futura.

En principio, y con el objetivo de que las muestras almacenadas puedan ser estudiadas mediante todos los métodos diagnósticos y de investigación que estén disponibles o que se pudieran aplicar previsiblemente, éstas se deberían recoger y manipular en condiciones de esterilidad y, aunque esto sea deseable, con frecuencia no se puede garantizar, lo que no debe impedir que se tomen las mayores precauciones para evitar la contaminación del tejido de interés. En este apartado se hará referencia específica a las recomendaciones para los diferentes tipos de muestras, según su procedencia, siempre y cuando existan aspectos especiales que se deban resolver.

2.1.B. Células

Si se trata de células, se pueden diferenciar dos tipos de muestras según su origen: células *ex vivo* y líneas celulares derivadas de ellas.

Aunque las células *ex vivo* son, generalmente, más difíciles de obtener que las líneas celulares, en muchos casos son la única opción, por ejemplo, cuando no se dispone de una línea establecida que mimetice las condiciones celulares del organismo o su estado fisiológico, o siempre que se pretenda su utilización con fines diagnósticos.

También, en el caso de estudios sobre patologías, la fuente de la muestra es generalmente *ex vivo*, si bien de muchos tipos celulares, principalmente tumores, de donde se pueden derivar líneas celulares.

En cualquier caso, cuando sea posible y el tipo de ensayo lo permita, la facilidad de manejo y la reproductividad de los resultados aconsejan el empleo de líneas celulares, aunque siempre será una situación no exactamente igual a la condición *ex vivo*.

De hecho, se han realizado importantes avances en la generación de líneas celulares para investigación y, actualmente, es un reto su utilización con fines terapéuticos o regenerativos. De esta forma, se han obtenido líneas tumorales o procedentes de distintas patologías, líneas de células y tejidos sanos y, más recientemente, líneas derivadas de células troncales embrionarias y adultas.

B.1. Aislamiento de células *ex vivo*

Un primer paso para la obtención de células *ex vivo* consiste en obtener una suspensión de células individualizadas. En los casos en los que la muestra proceda de fluidos corporales (sangre, orina, líquido peritoneal, etc.), las células se encuentran ya en suspensión y no es necesaria su preparación.

B.1.1. Preparación de suspensiones de tejidos sólidos

1) Métodos físicos: determinados tipos celulares se encuentran débilmente unidos al resto de las células presentes en los órganos, por ejemplo, las células linfoides. En estos casos, es posible su liberación y la recuperación mediante la simple disgregación mecánica del órgano en un medio o tampón adecuado, por ejemplo el medio de cultivo RPMI 1640 + 5% de FCS. La disgregación mecánica se puede realizar mediante la fragmentación del tejido con pinzas o tijeras, y pasando los fragmentos repetidamente por una pipeta o aguja, o bien mediante el empleo de un homogeneizador.

2) Métodos enzimáticos: en muchos casos, la presencia en el tejido de uniones celulares (tejidos epiteliales) o de una matriz extracelular (tejidos conectivos) hace necesaria una digestión enzimática para liberar las células. Las enzimas utilizadas son: colagenasa, tripsina, elastasa, hialuronidasa, papaína, ADNasa. En líneas generales, el procedimiento a seguir consiste en:

- Fragmentación del tejido en piezas pequeñas.
- Lavado de los fragmentos en el tampón o un medio adecuado.
- Digestión con la mezcla de enzimas elegida en el medio adecuado.
- Disgregación del tejido mediante pipeteo o pasándolo a través de una jeringa.
- Filtrado de la suspensión.
- Lavado de las células.
- Recuento y estimación de la viabilidad celular.

En este tipo de procedimientos, es necesario optimizar las concentraciones de enzimas y el tiempo de digestión, teniendo en cuenta que muchos preparados comerciales varían de lote a lote. La elección de la mezcla de enzimas adecuada depende del

tipo de muestra y, para cada muestra en concreto, es importante remitirse como referencia a métodos previamente utilizados y que aseguran, por lo tanto, cierta reproducibilidad.

Por su parte, la elección del tampón o del medio de digestión debe ser compatible con las diferentes actividades de la mezcla enzimática.

Como consideración general, es primordial tener en cuenta que los preparados enzimáticos comerciales presentan diferentes actividades y grados de toxicidad. Es importante, por consiguiente, evaluar el rendimiento y la viabilidad de las células obtenidas, por ejemplo, mediante la tinción con azul tripán y el recuento en un hemocitómetro.

La suspensión resultante debe quedar lo más libre posible de células muertas, restos celulares y restos de tejido sin digerir. Es una buena medida la incorporación de la ADNasa en la digestión, ya que el ADN liberado densifica el medio, entorpeciendo el procesamiento y disminuyendo su rendimiento. No deben omitirse, por consiguiente, los pasos de filtrado y lavado de la suspensión celular obtenida.

La suspensión resultante debe mantenerse en frío y procesarse para lo que sea menester (análisis, almacenamiento, fijación o aislamiento celular) lo más rápidamente posible.

B.1.2. Aislamiento de tipos celulares

Una vez obtenida la suspensión celular del tejido, existen diferentes aproximaciones para aislar o enriquecer las células de interés.

En primer lugar, se debe decidir la pureza del tipo celular concreto que se necesita para la finalidad perseguida. Es necesario, igualmente, evaluar la relevancia en la muestra final de otros tipos celulares no deseados y presentes en el tejido inicial, que pueden quedar como “contaminantes” y alterar o entorpecer los objetivos. Por ejemplo, para un determinado estudio que parte de una suspensión que contiene células de tipo A, B y C, podría ser importante que la suspensión final contuviera células A pero nunca B, aunque la presencia de células C sea indiferente.

En función de las necesidades concretas se debe decidir, por consiguiente, qué método proporciona un mayor rendimiento con respecto a las células de interés y a la pureza requerida, resultando discriminatorio para las células no deseadas. En este sentido, es importante realizar estudios previos (análisis histológico, citometría de flujo, etc.) que orienten sobre la frecuencia en la muestra de las células de interés frente a las células no deseadas, lo que permitiría una mejor relación pureza-rendimiento.

En función de estos criterios, se puede optar por diferentes técnicas que emplean como parámetro diferencial distintas propiedades de las células objeto del aislamiento:

1) Métodos físicos (centrifugaciones): cuando las diferentes células de la muestra tienen claras diferencias de densidad, la centrifugación en gradiente de densidad es muy útil para su aislamiento. No obstante, es difícil pensar que se pueda obtener una población celular pura por esta técnica, pero puede resultar muy útil para eliminar de la muestra algunas células no deseadas (como los eritrocitos en las muestras de sangre) o para enriquecer la suspensión en las células de interés, por ejemplo, como ocurre en el enriquecimiento en células dendríticas a partir del bazo.

2) Parámetros fisiológicos: en muchas ocasiones, es posible discriminar diferentes tipos de células en función de sus propiedades fisiológicas, como son la adhesión al sustrato o las condiciones de crecimiento en el cultivo. Mediante la incubación de la suspensión celular en plástico u otras superficies, se pueden separar las células adherentes de las no adherentes o las células con distinto grado de adhesión. Existen numerosos ejemplos de esta aplicación, entre ellos:

- La separación de células T de los ganglios linfáticos en la columna de nailon.
- La separación de macrófagos y de células dendríticas de los órganos linfoides.

También es factible separar las células epiteliales de los fibroblastos, en un cultivo primario, mediante la digestión suave con proteasas (por ejemplo, tripsina). Por otra parte, en numerosas ocasiones se puede enriquecer una muestra en un tipo celular concreto mediante el cultivo primario en condiciones que favorezcan su crecimiento o supervivencia frente al resto. Por ejemplo, para cultivos de células tumorales o troncales un procedimiento habitual consiste en cultivar un explante o una suspensión celular total bajo determinadas condiciones en las que las células tumorales o las troncales acaban siendo seleccionadas en el cultivo gracias a su mayor capacidad de supervivencia y proliferación.

3) Utilización de la expresión diferencial de moléculas superficiales (técnicas de inmunomarcaje): actualmente, estas técnicas suelen ofrecer el mayor grado de pureza de la muestra y permiten la exclusión de tipos celulares muy concretos. Implican la discriminación de las células en función de la expresión diferencial de las moléculas superficiales, principalmente las proteínas de membrana, que se pueden detectar con ayuda de un reactivo específico –normalmente un anticuerpo–, y también las lectinas y otras moléculas. Los dos procedimientos principales son:

- El empleo de anticuerpos o reactivos conjugados con sustancias fluorescentes que son analizadas en un citómetro separador que permite la separación de las células en función de este análisis.
- El empleo de anticuerpos unidos a partículas magnéticas que son retenidas en un campo magnético.

Si bien las dos aproximaciones son similares, existen diferencias entre ambas que conviene remarcar. Por su naturaleza, el citómetro separador permite un análisis multiparamétrico al poder analizar diferentes fluorescencias y, por lo tanto, confiere la posibilidad de combinar diferentes marcadores y definir la población deseada con una gran especificidad, mientras que con un procedimiento de retención en el campo magnético solamente se puede distinguir marcado frente a no marcado y, por consiguiente,

te, las posibilidades de definir la población deseada son más restringidas. En general, las células sufren más en el citómetro separador y, en consecuencia, pueden resultar más dañadas o alteradas para posteriores análisis.

En ambos casos, es importante asegurarse de que la expresión de los marcadores utilizados sea verdaderamente diferencial entre las células deseadas y las no deseadas. A este respecto, hay que testar la especificidad y eficacia de los anticuerpos sobre células frescas, evaluándose previamente la muestra y el marcaje por citometría de flujo para determinar tanto la calidad del marcaje como lo discriminatorio que resulta y la frecuencia de células deseadas existente en la muestra.

Se debe tener en cuenta que las células obtenidas tienen unidos el anticuerpo o anticuerpos con los que se han marcado, por lo que siempre que sea posible es preferible utilizar una selección negativa, es decir, marcar las poblaciones no deseadas y dejar libre la fracción no marcada. Esto, sin embargo, no es posible en muchas ocasiones, por lo que se debe considerar cuál será el efecto de la presencia del anticuerpo utilizado en la muestra final. Por ejemplo, muchos anticuerpos activarán en la célula las moléculas a las que se han unido, lo que puede interferir en ensayos funcionales, etc. Existe también la posibilidad de liberar el anticuerpo unido, pero los métodos necesarios para ello implican una mayor manipulación y, por lo tanto, un mayor riesgo de estropear la muestra.

Independientemente del método utilizado, una vez recuperadas las células, se ha de evaluar el rendimiento y la pureza obtenidos en el aislamiento.

4) Aislamiento de células observadas al microscopio (microdissección por láser): determinados estudios de Genómica o Proteómica se pueden llevar a cabo en la actualidad con mínimas cantidades de material. Con respecto a las muestras estudiadas por microscopía, la microdissección mediante láser permite señalar la célula o células de interés directamente en la sección observada y “recortarla/s” con ayuda de un láser, así como extraerla/s de la muestra para su análisis posterior.

B.2. Líneas celulares

Como ya se ha indicado, la obtención de líneas celulares de distinto origen constituye una fuente importante de células con fines de investigación. Aparte de su directa generación, las líneas celulares se pueden obtener de colecciones; entre las más completas se encuentran: *American Type Culture Collection (ATCC)*, *National Cell Culture Center* del NIH o *European Collection of Cell Cultures (ECACC)*. También se pueden obtener mediante la cesión de otro laboratorio, siendo ésta una práctica habitual entre investigadores.

2.1.C. Fluidos

Los procesos que se realizan en los laboratorios deben garantizar la calidad de los resultados. Se sabe que las fases en las que se divide todo proceso analítico son tres: la preanalítica (hasta que la muestra llega a los analizadores o lugares de trabajo), la

analítica (proceso de realización de la determinación) y la postanalítica (desde el momento en el que se tiene el resultado hasta que llega al médico).

En estudios realizados por diversos autores sobre los errores en los resultados de los laboratorios, que se sitúan en un 0,81% de las determinaciones, se ha constatado que proceden en un 70-80% de la fase preanalítica, en un 6-13% de la fase analítica y en un 12-18% de la fase postanalítica. Al analizar las causas más frecuentes de los errores de la fase preanalítica se ha observado que dos de las pruebas que presentan un porcentaje más alto de problemas son los estudios de coagulación y la velocidad de sedimentación globular (VSG).

Es necesario garantizar una adecuada calidad de la fase preanalítica, que va desde la solicitud del análisis hasta la recepción en el laboratorio. Las demás fases carecerán de sentido si no se hace correctamente la primera. En ella intervienen muchos mecanismos, organizaciones y personas que hacen difícil el control total de esta fase.

Los laboratorios clínicos utilizan sistemas de transporte de muestras dado que tienen centros de extracción periféricos o dado que envían algunas determinaciones a otros laboratorios. Dicho transporte debe regirse por una normativa técnica muy bien establecida con el fin de garantizar la estabilidad de las propiedades biológicas de las muestras. Todas las organizaciones y personas que intervengan en el transporte de muestras biológicas deben estar formadas y autorizadas según el material que deban transportar.

Los fluidos o líquidos orgánicos más habituales que se estudian en los laboratorios son:

- Sangre total: plasma y suero.
- Líquido pleural.
- Líquido pericárdico.
- Líquido ascítico.
- Líquido cefalorraquídeo.
- Líquido sinovial.

Cada uno de estos líquidos posee un sistema peculiar de obtención que requiere habilidad y que debe ser realizado por médicos entrenados para ello, pues su incorrecta realización puede poner en peligro la vida de los pacientes.

Respecto de las muestras de sangre periférica (SP) y aspirados de médula ósea (MO):

- Las muestras de SP y/o aspirados de MO se deben recoger en tubos estériles que contengan el anticoagulante suficiente y adecuado para permitir la posterior realización de los estudios de investigación necesarios.
- Es de interés para muchos tipos de investigación biomédica que el biobanco recoja, además del tejido específico patológico de un paciente, plasma y células sanguíneas del mismo.

Puede interesar la recogida de muestras de diferentes líquidos, incluidos orina, líquido cefalorraquídeo (LCR), líquido pleural, peritoneal o sinovial, e incluso de lavados broncoalveolares.

C.1. Rapidez y forma de obtención

Conviene tener en cuenta, en el caso del estudio de parámetros bioquímicos de muestras sanguíneas, que la extracción del espécimen se debe realizar preferiblemente tras un periodo de al menos ocho horas de ayuno, en reposo y, como mínimo, una hora después del ejercicio físico. Las muestras lipémicas, que acontecen tras la ingesta, pueden alterar diversas magnitudes. El estrés, el ejercicio y el tabaco influyen en numerosas magnitudes de la hemostasia. Por este motivo, se debe procurar que la obtención de muestras en las que se vayan a medir las magnitudes de la hemostasia se efectúe en condiciones basales.

Es indispensable, asimismo, evitar las malas extracciones, para lo que se harán siempre a partir de una punción limpia. La extracción se puede efectuar mediante un tubo de vacío, o bien mediante una jeringa con o sin “palomilla”. Es admisible una breve compresión con torniquete. Tiempos de constricción de un minuto seguidos de liberación del torniquete no tienen consecuencias sobre las concentraciones de los componentes del suero y los factores de coagulación del plasma. Cuando se usan múltiples tubos de recolección para obtener las muestras de sangre venosa, el tubo destinado a los exámenes de la coagulación debería ser el segundo o preferiblemente el tercer tubo, a fin de minimizar la contaminación con tromboplastina tisular liberada a raíz de la punción venosa. Cuando se obtiene una muestra de sangre, es imperativo poner atención en asegurar la mezcla completa de la sangre con el anticoagulante; se inclinará suavemente el tubo varias veces y se evitará así la formación de espuma. No deben transcurrir más de dos minutos entre el comienzo de la estasis venosa y la mezcla de la sangre con el anticoagulante.

No se realizarán extracciones a través de vías heparinizadas o catéteres. Si no hubiera más remedio que utilizarlas, la cánula debe enjuagarse con una solución salina isotónica en una cantidad proporcional al volumen del catéter. Se recomienda desechar una cantidad de sangre equivalente a dos veces el volumen del catéter. Habitualmente, los 5-10 mL primeros de sangre se deberán desechar antes de la recolección del espécimen de sangre. La contaminación de la muestra con heparina es uno de los artefactos frecuentemente acontecidos en la práctica diaria.

La contaminación de las muestras de laboratorio por soluciones de infusión intravenosa es la forma de interferencia preanalítica más común y frecuentemente más relevante en los pacientes ingresados.

El tubo que ha de utilizarse para obtener plasma es el de citrato trisódico (0,105 mol/L) (3,2%). Se trata del anticoagulante estándar para la recolección de las muestras destinadas a la realización de exámenes globales de coagulación. Existen tubos con distintas concentraciones de este anticoagulante que conducen a resultados diferentes. Se recomienda el uso de la concentración al 3,2% de 0,105 mol/L. Se prefiere citrato

tamponado a un pH de 5,5, ya que el pH de la mezcla (plasma y citrato) se aproxima más al fisiológico que el del no tamponado.

En los exámenes de coagulación, tales como el tiempo de protrombina (TP) y el tiempo de tromboplastina parcial (TTPA), el pH de la mezcla de reacción se debería mantener preferentemente dentro de un intervalo de pH entre 7,10 y 7,35. La relación nominal de volumen de citrato y sangre es de 1:9. Si esta relación se incrementa, es decir, si se recolecta menos sangre, la concentración efectiva de anticoagulante aumenta. Esto se traduce en un aumento del valor del TTPA, especialmente si la relación baja de 1:7. Por el contrario, se precisa una corrección de la relación anticoagulante/sangre en los casos de poliglobulia cuando el hematocrito del paciente excede del 55%. En estos casos, los valores del TP y del TTPA se ven afectados debido a una reducción del compartimiento plasmático por un aumento en el volumen de los eritrocitos, lo que conduce a un exceso de citrato en el plasma. Este exceso de citrato prolonga el proceso de coagulación por insuficiencia de calcio. Una relación de 1:10 puede ser la adecuada en los casos de poliglobulia.

En la práctica diaria esta corrección de la proporción citrato/sangre no suele ser muy operativa, y, de no hacerse, en el informe analítico se hará constar la posible interferencia de resultados en relación con la poliglobulia.

Para la obtención de los líquidos biológicos se deben efectuar las siguientes punciones:

- **Líquido pleural:** punción pleural.
- **Líquido pericárdico:** punción cardíaca.
- **Líquido ascítico:** punción peritoneal.
- **Líquido cefalorraquídeo:** punción lumbar.
- **Líquido sinovial:** punción articular.

Todas las punciones serán realizadas por personas entrenadas y en las máximas condiciones de asepsia posibles.

C.2. Tratamientos individualizados

La sangre destinada a medir la concentración de productos de degradación de la fibrina (PDF) en el plasma se debería recolectar en una mezcla que contuviese 10 U de trombina y 1.835 U de inhibidor tripsina de soja por mililitro de sangre. La trombina convierte el fibrinógeno residual en fibrina, ya que de otra manera se obtendría una concentración de productos de degradación de la fibrina falsamente elevada. La generación de PDF *in vitro*, después de la recolección de sangre, se impide, bien por el inhibidor tripsina de soja, bien por la aprotinina, que también inhibe la enzima plasmina generadora de productos de degradación de la fibrina. Por el contrario, la medición de la concentración del dímero D, que refleja la acción de la fibrinólisis, se puede realizar utilizando plasma citratado.

Se ha apreciado que, con fines de monitorizar el tratamiento con heparina no fraccionada, el mejor anticoagulante es el citrato asociado a teofilina, adenosina, dipirida-

mol (mezcla CTAD), puesto que previene la pérdida de la heparina contenida en la muestra clínica, merced a una mayor estabilización plaquetaria, limitando la liberación del factor 4 plaquetario, que se observa cuando sólo se utiliza el citrato. No obstante, la Sociedad Internacional de Trombosis y Hemostasia (ISTH) no recomienda por el momento la implantación generalizada de esta nueva mezcla en el laboratorio de coagulación, por sus efectos sobre la razón normalizada internacional (INR), utilizada en la monitorización del tratamiento anticoagulante oral.

C.3. Tiempos desde la extracción a la conservación

La conservación de los especímenes en el tubo primario puede ser a temperatura ambiente (20-25 °C) y en condiciones de refrigeración (4-6 °C). En la Tabla I se señalan las temperaturas aconsejables para cada magnitud. Las condiciones de estabilidad de algunas magnitudes biológicas en espécimen y muestra han sido sorprendentes, muestran una aparente mayor estabilidad de la que se les venía adscribiendo. En la Tabla II se especifican los datos de estas magnitudes. Parece claro que estos estudios en muchos casos son de valor limitado, bien sea por el número de muestras incluidas, bien sea por su limitación a un tipo concreto de instrumentos. Por otro lado, se conoce cómo la estabilidad de una determinada magnitud no es igual en una muestra normal que en una patológica.

Finalmente, no hay que olvidar que un mismo espécimen y muestra se pueden utilizar para realizar determinaciones de magnitudes diferentes. Por esta razón, habrá que asumir la menor estabilidad de las magnitudes que se vayan a analizar. Por todo ello, parece recomendable asumir las especificaciones señaladas en la Tabla I.

2.2. El respeto de los derechos de los pacientes en la obtención de las muestras

La utilización de material biológico humano está condicionada por las técnicas necesarias para obtenerlo y por la voluntad del sujeto para acceder a su utilización científica. Las técnicas para la obtención de material biológico pueden ser muy banales (recogida de pelo, exudado, descamación mucosa, o incluso muestras de sangre periférica), o bien suponer un riesgo –a veces elevado– para el paciente, como en el caso de biopsias o muestras intraoperatorias.

Cuando los procedimientos que se utilizan para obtener las muestras son los mismos que se llevan a cabo por razones diagnósticas o terapéuticas, la información sobre riesgos y el consentimiento para esos procedimientos son los mismos que deben atenderse en el caso de la intervención diagnóstica o terapéutica. En estos casos, sólo sería necesario un consentimiento específico en relación con el destino posterior de las muestras.

Cuando el único objetivo de estos procedimientos es la obtención de muestras para la investigación, entonces, además del consentimiento para la extracción y la utilización de las muestras, es imprescindible la información detallada y el conocimiento de las molestias y riesgos asociados a estas prácticas.

TABLA I. Condiciones preanalíticas óptimas para magnitudes hemostáticas

I. HEMOSTASIA PRIMARIA						
Magnitud	Preparación del paciente	Tubo primario	Transporte y conservación del espécimen	Muestra	Método de obtención de la muestra	Conservación de la muestra
1. Recuento plaquetario y frotis	Rep.	EDTA (a)	20-25 °C (<6 h); 2-8 °C (<12 h)	Espécimen	Agitac.	Id. espécimen
2. Agregación plaquetaria	Rep./Ayun.	Cit. Na o ACD	20-25 °C (2-4 h)	PRP	Cent. (20 °C)	20-25 °C (<4 h)
3. Tiempo de hemorragia (tiempo de sangría, TH)	Rep.	No				
4. Función plaquetaria, sangre total (PFA 100 Col/ADP y Col/EPI)	Rep.	Cit. Na	20-25 °C (<4 h)	Sangre Cit.	Agitac.	Id. espécimen
5. Factor von Willebrand	Rep./Ayun.	Cit. Na	2-8 °C (<4 h)	PPP	Cent. 2.500 g (15 min, 4 °C)	2-8 °C (4 h); -20 °C (1 m); -80 °C (>3 m, <1 a)
6. Glicoproteínas de membrana plaquetaria (citometría de flujo)	Ayun.	Cit. Na o EDTA	20-25 °C (<4 h)	Conc. Pt.	Cent. o gel filtr.	20-25 °C (<4 h)
7. Glicoproteínas de membrana plaquetaria (electroforesis)	Ayun.	Cit. Na o EDTA	20-25 °C (<4 h)	Pt. L.	Cent. o gel filtr.	2-8 °C (4 h); -70 °C (>3 m, <1 a)
8. Anticuerpos antiplaquetarios		EDTA	20-25 °C (<4 h)	Conc. Pt.	Cent.	20-25 °C (4 h)
9. Cuantificación de gránulos densos plaquetarios		Cit. Na o ACD	20-25 °C (<2 h)	Pt. L./ Conc. Pt.	Cent. o gel filtr.	20-25 °C (4 h)
10. Beta-2-tromboglobulina		Cit. Na + inh. Pt.	2-8 °C (4 h)	PPP	Cent. 2.500 g (15 min)	2-8 °C (4 h); -70 °C (>3 m, <1 a)
11. Factor 4 plaquetario		Cit. Na + inh. Pt.	2-8 °C (4 h)	PPP	Cent. 2.500 g (15 min)	2-8 °C (4 h); -70 °C (>3 m, <1 a)
II. COAGULACIÓN						
1. Tiempo de protrombina (TP); INR tubo	Rep./Ayun.	Cit. Na	8-25 °C (<4 h)	PPP	Cent. 2.500 g (15 min, 4 °C)	8-25 °C (24 h); -20 °C (1 m); -70 °C (>3 m) (b)
2. INR, sangre capilar	Rep./Ayun.		Uso inmediato	Sangre SA	Uso inmediato	
3. Tiempo de tromboplastina parcial activado (TTPA, tiempo de cefalina)	Rep.	Cit. Na	8-25 °C (<4 h)	PPP	Cent. 2.500 g (15 min, 4 °C)	2-8 °C (4 h); -20 °C (1 m); -70 °C (>3 m, <1 a)
4. Tiempo de trombina (TT)	Rep.	Cit. Na	8-25 °C (<4 h)	PPP	Cent. 2.500 g (15 min, 4 °C)	8-25 °C (2-4 h); -20 °C (1 m); -70 °C (>3 m, <1 a)

TABLA I. Condiciones preanalíticas óptimas para magnitudes hemostáticas (continuación)

Magnitud	Preparación del paciente	Tubo primario	Transporte y conservación del espécimen	Muestra	Método de obtención de la muestra	Conservación de la muestra
5. Tiempo de reptilase	Rep.	Cit. Na	8-25 °C (<4 h)	PPP	Cent. 2.500 g (15 min, 4 °C)	8-25 °C (2-4 h); -20 °C (1 m); -70 °C (>3 m, <1 a)
6. Consumo de protrombina	Rep.	Sin antic.	20-25 °C	Suero	Cent. 2.500 g (15 min, 4 °C)	8-25 °C (2-4 h); -70 °C (>3 m)
7. Fibrinógeno	Rep.	Cit. Na	8-25 °C (<4 h)	PPP	Cent. 2.500 g (15 min, 4 °C)	8-25 °C (2-4 h); -20 °C (1 m); -70 °C (>3 m, <1 a)
8. Factor II	Rep.	Cit. Na	8-25 °C (<4 h)	PPP	Cent. 2.500 g (15 min, 4 °C)	8-25 °C (6 h); -20 °C (1 m); -70 °C (>3 m, <1 a)
9. Factor V	Rep.	Cit. Na	2-8 °C (<4 h)	PPP	Cent. 2.500 g (15 min, 4 °C)	2-8 °C (2-4 h); -20 °C (1 m); -70 °C (>3 m, <1 a)
10. Factor VII	Rep.	Cit. Na	8-25 °C (<4 h)	PPP	Cent. 2.500 g (15 min, 4 °C)	20-25 °C (6 h); -20 °C (1 m); -70 °C (>3 m, <1 a)
11. Factor VII activado (VII:a)	Rep.	Cit. Na	8-25 °C (<4 h)	PPP	Cent. 2.500 g (15 min, 4 °C)	8-25 °C (2-4 h); -20 °C (1 md); -70 °C (>3 m, <1 a)
12. Factor VIII	Rep.	Cit. Na	2-25 °C (<4 h)	PPP	Cent. 2.500 g (15 min, 4 °C)	2-8 °C (2-4 h); -20 °C (1 m); -70 °C (>3 m, <1 a)
13. Factor IX	Rep.	Cit. Na	8-25 °C (<4 h)	PPP	Cent. 2.500 g (15 min, 4 °C)	8-25 °C (6 h); -20 °C (1 m); -70 °C (>3 m, <1 a)
14. Factor X	Rep.	Cit. Na	8-25 °C (<4 h)	PPP	Cent. 2.500 g (15 min, 4 °C)	8-25 °C (6 h); -20 °C (1 m); -70 °C (>3 m, <1 a)
15. Factor XI	Rep.	Cit. Na	8-25 °C (<4 h)	PPP	Cent. 2.500 g (15 min, 4 °C)	8-25 °C (6 h); -20 °C (1 m); -70 °C (>3 m, <1 a)
16. Factor XII	Rep.	Cit. Na	8-25 °C (<4 h)	PPP	Cent. 2.500 g (15 min, 4 °C)	8-25 °C (6 h); -20 °C (1 m); -70 °C (>3 m, <1 a)

TABLA I. Condiciones preanalíticas óptimas para magnitudes hemostáticas (continuación)

Magnitud	Preparación del paciente	Tubo primario	Transporte y conservación del espécimen	Muestra	Método de obtención de la muestra	Conservación de la muestra
17. Factor XIII	Rep.	Cit. Na	8-25 °C (<4 h)	PPP	Cent. 2.500 g (15 min, 4 °C)	8-25 °C (6 h); -20 °C (1 m); -70 °C (>3 m, <1 a)
18. Factor Fletcher (prekalicreína)	Rep.	Cit. Na	8-25 °C (<4 h)	PPP	Cent. 2.500 g (15 min, 4 °C)	8-25 °C (6 h); -20 °C (1 m); -70 °C (>3 m, <1 a)
19. Factor Fitzgerald (factor Flujeauc, Williams, cininógeno alto peso molecular)	Rep.	Cit. Na	8-25 °C (<4 h)	PPP	Cent. 2.500 g (15 min, 4 °C)	8-25 °C (6 h); -20 °C (1 m); -70 °C (>3 m, <1 a)
20. Inhibidores adquiridos (factores de la coagulación)	Rep.	Cit. Na	8-25 °C (<4 h)	PPP	Cent. 2.500 g (15 min, 4 °C)	8-25 °C (6 h); -20 °C (1 m); -70 °C (>3 m, <1 a)
21. Titulación Bethesda anticuerpos FVIII y FIX	Rep.	Cit. Na	8-25 °C (<4 h)	PPP	Cent. 2.500 g (15 min, 4 °C)	8-25 °C (6 h); -20 °C (1 m); -70 °C (>3 m, <1 a)
22. Titulación anti-FVIII porcino	Rep.	Cit. Na	8-25 °C (<4 h)	PPP	Cent. 2.500 g (15 min, 4 °C)	8-25 °C (6 h); -20 °C (1 m); -70 °C (>3 m, <1 a)
23. Titulación anti-FIXa (heparinemia)	Rep.	Cit. Na	8-25 °C (<4 h)	PPP	Cent. 2.500 g (15 min, 4 °C)	8-25 °C (6 h); -20 °C (1 m); -70 °C (>3 m, <1 a)
24. Productos de degradación del fibrinógeno/fibrina (PDF)	Rep.	Tromb. + EACA	8-25 °C (<4 h)	Suero	Cent. 2.500 g (15 min, 4 °C)	8-25 °C (6 h); -20 °C (1 m); -70 °C (>3 m, <1 a)
25. Dímero D (D-D)	Rep.	Cit. Na	8-25 °C (<4 h)	PPP	Cent. 2.500 g (15 min, 4 °C)	8-25 °C (6 h); -20 °C (1 m); -70 °C (>3 m, <1 a)
26. Monómeros de fibrina soluble		Cit. Na	8-25 °C (<4 h)	PPP	Cent. 2.500 g (15 min, 4 °C)	20-25 °C (2 h); 2-8 °C (4 h)
27. Fibrinopéptido A		Cit. Na + AP	8-25 °C (<4 h)	PPP	Cent. 2.500 g (15 min, 4 °C)	8-25 °C (6 h); -20 °C (1 m); -70 °C (>3 m, <1 a)
28. Complejos trombina-antitrombina (TAT)	Rep.	Cit. Na	8-25 °C (<4 h)	PPP	Cent. 2.500 g (15 min, 4 °C)	8-25 °C (6 h); -20 °C (1 m); -70 °C (>3 m, <1 a)

TABLA I. Condiciones preanalíticas óptimas para magnitudes hemostáticas (continuación)

Magnitud	Preparación del paciente	Tubo primario	Transporte y conservación del espécimen	Muestra	Método de obtención de la muestra	Conservación de la muestra
29. Fragmento 1+2 de la protrombina	Rep.	Cit. Na	8-25 °C (<4 h)	PPP	Cent. 2.500 g (15 min, 4 °C)	8-25 °C (2-4 h); -20 °C (1 m); -70 °C (>3 m, <1 a)
III. FIBRINOLISIS						
1. Lisis de euglobulinas (test de von Kaula)	Rep.	Cit. Na	2-8 °C (<4 h)	PPP	Cent. 2.500 g (15 min, 4 °C)	2-8 °C (<4 h)
2. Plasminógeno	Rep.	Cit. Na	2-8 °C (<4 h)	PPP	Cent. 2.500 g (15 min, 4 °C)	2-8 °C (<4 h); -20 °C (7 d); -70 °C (>3 m, <1 a)
3. Activador tisular plasminógeno (t-PA)	Rep.	Cit. Na acidific.	<8 °C (<2 h) Baño de agua helada	PPP	Cent. 2.500 g (15 min, 4 °C)	2-8 °C (<2 h); -20 °C (1 m); -70 °C (>3 m, <1 a)
4. Activador plasminógeno tipo urocinasa (u-PA)	Rep.	Cit. Na acidific.	<8 °C (<2 h) Baño de agua helada	PPP	Cent. 2.500 g (15 min, 4 °C)	2-8 °C (<2 h); -20 °C (1 m); -70 °C (3-6 m)
5. Complejos plasmina-antiplasmina (complejos PAP)	Rep.	Cit. Na	<8 °C (<2 h) Baño de agua helada	PPP	Cent. 2.500 g (15 min, 4 °C)	2-8 °C (<2 h); -20 °C (1 m); -70 °C (3-6 m)
IV. INHIBIDORES DE LA COAGULACIÓN Y FIBRINOLISIS						
1. Antitrombina (AT)	Rep.	Cit. Na	8-25 °C (<4 h)	PPP	Cent. 2.500 g (15 min, 4 °C)	20-25 °C (7 d); -20 °C (1 m); -70 °C (>3 m, <1 a)
2. Proteína C (PC)	Rep.	Cit. Na	8-25 °C (<4 h)	PPP	Cent. 2.500 g (15 min, 4 °C)	8-25 °C (2-4 h); -20 °C (1 m); -70 °C (>3 m, <1 a)
3. Proteína S (PS)	Rep.	Cit. Na	8-25 °C (<4 h)	PPP	Cent. 2.500 g (15 min, 4 °C)	8-25 °C (2-4 h); -20 °C (1 m); -70 °C (>3 m, <1 a)
4. Proteína S (PS: Ag, total y libre)	Rep.	Cit. Na	8-25 °C (<4 h)	PPP	Cent. 2.500 g (15 min, 4 °C)	8-25 °C (2-4 h); -20 °C (1 m); -70 °C (>3 m, <1 a)

TABLA I. Condiciones preanalíticas óptimas para magnitudes hemostáticas (continuación)

Magnitud	Preparación del paciente	Tubo primario	Transporte y conservación del espécimen	Muestra	Método de obtención de la muestra	Conservación de la muestra
5. Alfa-2-antiplasmina	Rep.	Cit. Na	8-25 °C (<4 h)	PPP	Cent. 2.500 g (15 min, 4 °C)	8-25 °C (2-4 h); -20 °C (1 m); -70 °C (>3 m, <1 a)
6. Inhibidor del activador tisular del plasminógeno tipo 1 (PAI-1)	Rep.	Cit. Na + inh. Pt.	8-25 °C (<4 h)	PPP	Cent. 2.500 g (15 min, 4 °C)	8-25 °C (2-4 h); -20 °C (1 m); -70 °C (>3 m, <1 a)
7. Cofactor II de la heparina	Rep.	Cit. Na	<8 °C (<2 h) Baño de agua helada	PPP	Cent. 2.500 g (15 min, 4 °C)	2-8 °C (<2 h); -20 °C (1 m); -70 °C (>3 m, <1 a)
8. Trombomodulina (TM)	Rep.	Cit. Na	<8 °C (<2 h) Baño de agua helada	PPP	Cent. 2.500 g (15 min, 4 °C)	8-25 °C (2-4 h); -20 °C (1 m); -70 °C (>3 m, <1 a)

Claves y notas

h: horas; d: días; s: semanas; m: meses; a: año; Rep.: reposo; Ayun.: ayunas; Cit. Na: citrato trisódico; Cit. Na + inh. Pt.: citrato trisódico con inhibidores de función plaquetaria; Cit. Na + AP: citrato trisódico con antiproteasas; PPP: plasma rico en plaquetas; PPP: plasma pobre en plaquetas; Pt. L.: plaquetas lavadas; Conc. Pt.: concentrado de plaquetas; Sangre SA: sangre total sin anti-coagulante.

El espécimen para todas las magnitudes es sangre a excepción del tiempo de hemorragia (TH) que no utiliza espécimen propiamente dicho y se realiza *in vivo*.

El método de obtención del espécimen es punción venosa para todas las magnitudes, excepto el TH y el INR en sangre capilar (esta última se realiza por punción capilar). Asimismo, se pueden determinar magnitudes hemostáticas en lactantes mediante punción capilar.

(a) Si se sospecha pseudotrombopenia, se debe hacer un recuento plaquetario en sangre Cit. Na.

(b) La congelación de PPP para INR conduce a opalescencia con determinados reactivos tras su descongelación.

Esta tabla ha sido tomada de: Battle J, López Fernández MF. Manual de obtención, transporte y conservación de muestras biológicas en Hematología y Hemoterapia. AEHH-SETH 2003.

TABLA II. Estabilidad de ciertas magnitudes hemostáticas según algunos estudios

I. HEMOSTASIA PRIMARIA						
Magnitud	Estabilidad del espécimen a temperatura ambiente	Estabilidad en la muestra			Comentario	Referencia
		-20 °C	4-8 °C	20-25 °C		
1. Recuento plaquetario y frotis	7 días		4 días			31, 50, 51
II. COAGULACIÓN						
1. Tiempo de protrombina (TP)	4 horas-1 día	1 mes	8 horas-1 día	4 horas-1 día	Dependiente del tipo de reactivo	31, 40, 48
2. Tiempo de tromboplastina parcial activado (TPPA, tiempo de cefalina)	8-12 horas	1 mes	2-8 horas	2-8 horas	Estabilidad reducida en plasma heparinizado	21, 31, 40, 46
3. Tiempo de trombina (TT)	1-4 horas	1 mes	1 hora-2 días	1-4 horas	Estabilidad dependiente de reactivo y contenido de heparina	21, 23, 31, 40
4. Tiempo de reptilase (TR)		1 mes	4 horas	4 horas		31, 49
5. Fibrinógeno	8 horas	1 mes	1-7 días	1-7 días		31
6. Factor II		1 mes		6 horas		40
7. Factor V		1 mes	2 días	1 día	Centrifugación a 4 °C	21, 31, 40
8. Factor VII			Inestable	6 horas		40
9. Factor VIII		2 semanas	4 horas	3 horas	Centrifugación a 4 °C	21, 31, 40
10. Factor IX	1 mes			6 horas		40
11. Factor X		1 mes	Inestable	6 horas		41
12. Factor XI			Inestable	6 horas		40
13. Factor XII			Inestable	6 horas		40
14. Factor XIII		1 mes		4 horas		40
15. Productos de degradación del fibrinógeno/fibrina (PDF)	Inestable	1 mes	1 día	3 horas	Precisa 10 U trombina + 150 KIU kallikreí. Aprotinina o inhibidor tripsina de soja	36, 40, 44
16. Dímero D (D-D)	24 horas	6 meses	4 días	8 horas		40, 42, 43
17. Monómeros de fibrina soluble	24 horas	3 meses	1 día	2 horas		40, 45
18. Fibrinopéptido A			2 horas			40
III. INHIBIDORES DE LA COAGULACIÓN Y FIBRINOLISIS						
1. Antitrombina (AT)	8 horas	1 mes	2 semanas	7 días		31
2. Proteína C (PC)		1 mes	7 días	7 días		31, 47
3. Proteína S (PS)		4 horas	4 horas	4 horas		31, 40, 42

Esta tabla ha sido tomada de: Battle J, López Fernández MF. Manual de obtención, transporte y conservación de muestras biológicas en Hematología y Hemoterapia. AEHH-SETH 2003.

Sin embargo, si el procedimiento de la obtención de la muestra representara una afectación de la integridad corporal de tal entidad que pudiera poner en peligro la salud del sujeto, no se podría justificar su empleo en aras de la investigación científica, ni tan siquiera con el consentimiento del sujeto, aunque no debe descartarse como finalidad secundaria o residual.

En ocasiones, por ejemplo, dentro de ensayos clínicos, se propone la obtención de muestras –en algunos casos mediante biopsias– con una frecuencia que es mayor de la habitual para el seguimiento y el control de un paciente normal. En esos casos, los Comités Éticos de Investigación Clínica deben valorar los riesgos que supone la obtención de muestras adicionales y cuando se considera que está justificada, así como asegurar que la información que recibe el paciente sea completa y que incluye la explicación de dicha toma de muestras con más frecuencia de la imprescindible.

Si el procedimiento de obtención no afectase de este modo a la integridad corporal, se debe mantener la posibilidad de donación con la finalidad de investigación científica y, a este respecto, será preciso valorar los riesgos de dicha operación (una extracción de sangre, por ejemplo, sería una intervención aceptable a estos efectos).

En el caso de los fallecidos, la finalidad de investigación científica justifica la obtención de órganos, tejidos y otras partes del cuerpo que, además, se presupone consentida por el sujeto en vida, postura que se ha mantenido en la legislación española (artículo 5.2 de la Ley de extracción y trasplante de órganos: “La extracción de órganos u otras piezas anatómicas de fallecidos podrá realizarse con fines terapéuticos o científicos, en el caso de que éstos no hubieran dejado constancia expresa de su oposición”; y artículo 8 del Real Decreto 411/1996). Esta justificación o presunción se refiere a la utilización de las muestras y no de los datos, por lo cual la muestra ha de ser anónima.

2.3. La gratuidad de la donación

Como propiedad de una persona, las muestras biológicas pueden ser objeto de contratos. Sin embargo, por determinados criterios cabe imponer limitaciones a los mismos en función de su origen humano y de la diferencia entre unas partes del cuerpo y otras.

De su origen humano deriva que se deban tener en cuenta la incidencia en el derecho a la integridad (si es que se ha de proceder a la separación del cuerpo), así como el respeto a la dignidad humana (en el que incide la finalidad del contrato y que podría vulnerarse incluso si por motivos espurios el titular se perjudicara a sí mismo) y a la autodeterminación (puesto que se ha de poder decidir sobre el destino y uso de la muestra).

Estas razones justifican la exclusión de los órganos y tejidos no regenerables de los negocios jurídicos onerosos, o bien de los regenerables cuya obtención requiera un procedimiento invasivo, en tanto en uno y otro caso se produce un menoscabo para la integridad del sujeto.

Pero cabe preguntarse por qué aplicarla a la materia biológica regenerable cuya separación del cuerpo no incida en la salud ni represente daño personal (de hecho, incluso las concepciones más restrictivas en relación con el derecho a la disponibilidad del propio cuerpo han aceptado tradicionalmente que las sustancias corporales sean objeto de contratos onerosos, como el contrato de lactancia o la venta de cabello). Lo cierto es que esta materia no parece que deba excluirse del tráfico y, por lo tanto, por ejemplo, el pelo podría venderse como se venden las cosas de titularidad privada. Por este mismo criterio, también podría defenderse que fueran objeto de negocio las sustancias de desecho (como la placenta), los tumores extraídos en una operación, las muestras obtenidas para análisis o los gametos masculinos (la obtención de óvulos requiere procedimientos invasivos para su obtención y tratamientos previos con posibles incidencias en la salud de la mujer).

No obstante, el comercio de la materia humana se debe restringir por otros criterios para evitar desviaciones en su uso de las que deriven riesgos potenciales de distinta índole, como pudiera ser la desigualdad o discriminación en el acceso a los tratamientos médicos derivada de la diferencia de recursos. Así, cuando la obtención de esta materia se dirija a satisfacer intereses no comerciales o el ejercicio de derechos fundamentales, no se debe introducir en el comercio. Por el contrario, cuando este uso no responda a estos intereses, no existirá inconveniente en calificarla como objeto de negocio jurídico siempre, claro está, que se trate de materia regenerable. En definitiva, sólo si se pretende utilizar material biológico regenerable obtenido sin procedimientos que representen riesgos para la salud, con fines cosméticos o industriales, el titular podrá venderlo (o sacar algún tipo de provecho económico de su donación, como participar en la explotación comercial de una patente registrada a partir de las investigaciones con su ADN). Si la finalidad es terapéutica, de investigación científica o de reproducción humana, el titular no podrá vender el objeto de su propiedad.

En consonancia con este razonamiento, la transmisión de la propiedad de órganos, tejidos y células destinados meramente a la investigación científica ha de ser gratuita, sin perjuicio de que suele admitirse una compensación económica por los gastos o molestias sufridas. Tampoco podrá cobrarse una contraprestación cuando se cedan las muestras a otros investigadores, lo que no impide que el profesional que cede la muestra pueda exigir el pago de los gastos de transporte y conservación de la muestra.

3. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

3.1. Procedimientos técnicos para la preparación de las muestras

3.1.A. Tejidos y tumores

A.1. Para cualquier tipo de muestra

- Se aconseja el uso de guantes estériles a lo largo de todo el proceso para evitar la contaminación de la muestra por manipulación y para minimizar el riesgo de infección causado por la misma, ya que no siempre se conocerá su capacidad infecto-contagiosa.

- Si se dispone de una cámara de flujo laminar, se debe llevar a cabo el procesamiento de la muestra en la misma para mantener la deseada esterilidad.
- Se debe utilizar una base limpia para el manejo de las muestras (por ejemplo, papel de filtro desechable).
- Asimismo, en el caso de muestras sólidas, es recomendable tomar improntas y/o extensiones sobre portaobjetos de cada muestra, algunos de los cuales se pueden fijar en alcohol o acetona y almacenar para su uso en diferentes estudios, o bien teñir para un control rápido de la calidad del tejido/muestra seleccionada para el archivo.
- Se recomienda el uso de cuchillas de bisturí desechables y nuevas, tijeras bien afiladas y limpias, así como pinzas en las mejores condiciones, preferentemente esterilizadas. Además, este material se debe cambiar tras cada muestra, incluso entre la muestra de tejido normal y tumoral de un mismo paciente. En caso de que se utilice una misma pieza del instrumental para ambas, resulta aconsejable realizar primero la toma de tejido normal.
- La toma de los fragmentos tisulares se hará en las áreas donde no se sospeche la existencia de fenómenos de necrosis o isquemia que redunden en una pobre preservación.

A.2. Para muestras específicas

Tomando como modelo de tumor sólido infantil el neuroblastoma, se presentan las siguientes recomendaciones técnicas generales en el manejo del material tisular.

A.2.1. Consideraciones generales

El tumor debe ser remitido desde el quirófano al laboratorio de Anatomía Patológica en condiciones estériles lo más pronto posible.

El manejo y el tallado del tumor siempre han de ser realizados por el patólogo. De forma ideal, se debe extraer material de dos áreas macroscópicas diferentes para los estudios biológicos y de patología molecular.

Esta recomendación es especialmente interesante en el caso de que existan nódulos macroscópicos, como es el caso del ganglioneuroblastoma nodular, en el que la heterogeneidad de los mismos tiene impacto pronóstico.

A.2.2. Consideraciones específicas

1) Material de resecciones completas:

- En el caso de una resección completa del tumor, se debe seccionar la neoplasia a lo largo del diámetro máximo, tomando dos secciones de dos áreas morfológicamente diferentes (1 cm x 1 cm x 1 cm). Asimismo, se identifican estas secciones con letras mayúsculas (A y B, por ejemplo). A su vez, cada una de estas secciones se fragmenta en cuatro partes: A1, A2, A3, A4, B1, B2, B3, B4.

- En las muestras A1 y B1 se realizan diez improntas citológicas que se fijan al aire y se congelan a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ para estudios de hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH) y citometría estática. Posteriormente, estos dos fragmentos se fijan en formaldehído con objeto de efectuar su estudio histopatológico y el recuento celular para establecer el porcentaje de células tumorales, células normales, focos de necrosis o calcificación, etc., información que es fundamental para la interpretación de los estudios biológicos.
- Las muestras A2, A3, B2 y B3 se congelan con nitrógeno líquido y se almacenan a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$. Antes de usar estas secciones para estudios biológicos, se deben realizar cortes por congelación a fin de establecer el recuento celular.
- Las muestras A4 y B4 se introducen en medio de cultivo RPMI 1640 con el objetivo de preparar suspensiones celulares que pueden servir para el cariotipado convencional y estudios de MYCN y del 1p en preparados celulares de citocentrífuga. En estos casos, también es necesario conocer el porcentaje de células tumorales, por ejemplo, mediante la técnica inmunohistoquímica de marcaje con GD2, NB84 o tirosín-hidroxilasa.
- El resto del espécimen quirúrgico será incluido para su estudio histológico convencional, con un análisis exhaustivo de las áreas centrales y periféricas del tumor, así como de los márgenes quirúrgicos de refección.

2) Material tumoral de neoplasias irresecables:

- **Biopsias a cielo abierto:** en estos casos, el cirujano debe obtener material de dos áreas diferentes del tumor. Si el espécimen es mayor de 1 cm^3 , se seccionará en cuatro partes que se procesarán siguiendo el modelo explicado en el apartado anterior. Si el material obtenido es más pequeño, se intentará dividir en tres fragmentos: uno para improntas y estudio histológico, otro para ser congelado, y el tercero para incluirlo en medio RPMI 1640.
- **Biopsias *tru-cut*:** preferentemente, se deben obtener cuatro fragmentos de áreas tumorales diferentes. El tamaño de la aguja recomendado es de 18 G. El patólogo debería estar presente junto al radiólogo para evaluar la calidad del material obtenido y realizar un recuento celular del material utilizado para estudios biológicos.

Los especímenes deben medir 1 cm de longitud y tener un grosor como mínimo de 0,1 cm. El procedimiento ideal para evitar artefactos consiste en colocar la aguja en un tubo con medio RPMI 1640, Hanks o PBS y agitar hasta que el cilindro sea liberado hacia el medio. Para evaluar la calidad del material y establecer el porcentaje celular, sería ideal que la biopsia por *tru-cut* estuviera precedida por una punción mediante aspiración con aguja fina (PAAF) de la zona. En el caso de obtener cuatro fragmentos, dos de ellos se fijan en formol al 4% y se incluyen en parafina para su estudio histológico e inmunohistoquímico. Los dos fragmentos restantes se congelan a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ después de ser embebidos en un medio soluble tipo OCT para realizar secciones congeladas.

Otro método alternativo es dividir cada fragmento en dos partes iguales: una de las cuales se fija en formol y la otra se congela. Las improntas citológicas se pueden realizar directamente del material congelado, seguidas de un corte por congelación para establecer la calidad del material y el recuento celular.

- **PAAF:** en general, se recomienda realizar dos punciones separadas con un tamaño de aguja de 0,6-0,7 mm (22-23 gauge). Dependiendo de la cantidad del aspirado, se colocará una gota en cuatro portaobjetos y, mediante extensiones, se dejarán secar al aire. La aguja y el resto del aspirado se introducirán en un tubo con 1 mL de PBS y la suspensión obtenida se introducirá en un vial Eppendorf. Una extensión de cada aspirado se teñirá con Diff-Quick para una evaluación rápida del material obtenido. El resto de las extensiones se utilizarán para inmunocitología, FISH y citometría estática. Se debería analizar, morfológicamente o inmunocitoquímicamente, una extensión de cada aspirado para el estudio del recuento celular. Las suspensiones celulares se utilizarán para citometría de flujo, cultivo, citogenética, o bien para obtener preparados de citocentrífuga que, una vez secados al aire, se congelarán para futuros análisis biológicos.

3.1.B. ADN y ARN

Para estudios moleculares en Biomedicina se puede utilizar tanto el ADN como el ARN, pero hay que saber en cada momento cuál de estas moléculas es la necesaria para una investigación determinada. Por ello y con respecto al ADN, conviene recordar que hay dos tipos de mutaciones: las mutaciones germinales, que están en todas las células y se transmiten a la generación siguiente, y las mutaciones somáticas que no se transmiten y que suelen aparecer *de novo* en un individuo y en algún tipo celular del mismo. De ahí que sea importante conocer, en cada caso, no sólo cuál es la molécula de elección, sino también cuál es la muestra más adecuada para obtener esa molécula. Sin embargo, se dispone hasta la fecha de poca información para los investigadores en este campo. Además, hoy en día, en la mayoría de los análisis se parte de la PCR o de la reacción en cadena de la polimerasa, capaz de amplificar el ADN de una sola célula. Esta extraordinaria sensibilidad introduce un riesgo de contaminación por otra muestra de otra procedencia, por lo que es necesario de forma general una esterilidad rigurosa y un cuidado exquisito en la manipulación de las mismas.

B.1. ADN

B.1.1. Muestras a partir de las cuales se realiza la extracción de ADN

Todos los siguientes tipos de muestras –entre otros– pueden servir para el estudio del ADN. La relación incluye los más frecuentemente utilizados:

1) Sangre periférica: las más empleadas son las células nucleadas de la sangre para extraer el ADN genómico, ya que son las de más fácil acceso y proporcionan un ADN abundante y de alta calidad. De preferencia, la sangre ha de ser total, sin haber separado sus componentes, y sin coagular, lo que se consigue colocándola en tubos con el anticoagulante EDTA (ácido etilendiaminotetracético). El EDTA actúa evitando la coagulación y quelando los iones calcio, lo cual previene la acción de las endonucleasas del ADN dependientes del calcio. Sin embargo, otros anticoagulantes, como la heparina o el ácido cítrico, pueden producir también resultados acep-

tables. Se han de sacar aproximadamente 10 mL de sangre total periférica del brazo en uno o dos tubos con anticoagulante EDTA. La cantidad suele ser menor si se trata de un niño pequeño. En realidad, la cantidad necesaria de ADN para realizar estudios genéticos es muy pequeña y con sólo unos pocos microgramos se pueden realizar multitud de estudios, tales como estudios de secuenciación, de microsátélites, de polimorfismos de cambios de una sola base (SNPs), y hasta estudios de genes por *Southern*. Pero, si lo que se quiere es dejar ADN en un banco para posteriores estudios, se debe recomendar extraer los 10 mL como la cantidad mínima requerida. El paciente o donante no tiene que estar en ayunas y no necesita ningún tratamiento previo. Por último, se debe etiquetar perfectamente el tubo de sangre e identificarlo preferentemente con el código que, en cada caso, se establezca en cada laboratorio o biobanco.

Una alternativa a la sangre fresca es la extracción de ADN de células sanguíneas a partir de sangre seca conservada en las llamadas *Guthrie Cards*. Desde hace más de diez años, este tipo de muestras se han utilizado sobre todo en los estudios de cribado neonatal. Las manchas de sangre seca contienen un ADN muy estable en el tiempo, de fácil manejo, transporte a temperatura ambiente y obtención; asimismo, salvo los problemas éticos derivados del consentimiento informado –que no son objeto de este capítulo–, hoy en día sirven para numerosos estudios epidemiológicos.

2) Células epiteliales bucales: otra fuente de extracción de ADN son las células epiteliales bucales mediante raspado del interior de la boca o el centrifugado de un enjuague bucal. Diversos sistemas se han propuesto para recuperar las células epiteliales bucales, ya que se usan cada vez más debido a la no invasividad de la toma de la muestra. Entre ellos, el enjuague bucal parece que asegura una mayor cantidad, calidad y estabilidad del ADN, incluso si éste se extrae cinco días después del enjuague. Se ha demostrado, asimismo, que se obtiene mucha mayor cantidad de ADN si el enjuague se hace antes de lavarse los dientes.

3) Raíces de cabello: por la misma razón anteriormente expuesta de no utilizar técnicas invasoras, también se pueden utilizar raíces de cabello, que se extraen mediante un simple tirón, para obtener ADN genómico completo. Los cabellos se colocan en sobres vacíos bien etiquetados y se pueden mantener de esta forma durante casi una semana hasta la extracción del ADN.

En estos últimos casos, la cantidad de ADN extraída podría ser insuficiente para algunos análisis (como los análisis por *Southern Blot*), aunque los estudios por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y los análisis de SNPs dan solución a muchos de estos problemas.

4) Biopsia de tejido: sólo en el caso de querer estudiar mutaciones somáticas en las que un solo tejido está alterado, es necesario extraer el ADN genómico del propio tejido afectado (por ejemplo, en algunos tumores), puesto que en sangre total no se detectaría la mutación. Éste es el caso también de los aspirados de médula ósea utilizados en Hematología. Lo ideal es que el tejido llegue al laboratorio

en fresco (por ejemplo, directamente del quirófano en el caso de la extracción de un tumor) y se procese de inmediato, o se congele para su conservación hasta la extracción, bien a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$, bien directamente sumergiéndolo en nitrógeno líquido. El cirujano sólo tiene que sumergir un mínimo fragmento de tejido –si éste es sólido– en un tubo estéril que contiene una solución de suero salino fisiológico y enviarlo de inmediato al laboratorio. Una descripción detallada de cada técnica de extracción para cada tejido supera el propósito de este capítulo. Pero también se consigue aislar ADN de manera satisfactoria a partir de especímenes patológicos históricos conservados en parafina, así como de muestras en formol, y hasta de aquellas momificadas para estudios antropológicos. La calidad del ADN que se obtiene, en estos casos, de los tejidos depende de la edad del tejido y de las condiciones de conservación. Con frecuencia el ADN de muestras de tejidos está parcialmente degradado y tiene un peso molecular menor que el del ADN extraído de la sangre. Sin embargo, una vez más, los estudios de SNPs y otros por PCR están dando solución a estos problemas.

5) Vellosidades coriales: la biopsia de las vellosidades coriales, al ser de origen fetal, es la mejor fuente de ADN de un feto y se suelen utilizar para el diagnóstico prenatal. La extracción de vellosidades coriales la realizan los ginecólogos con la ayuda guiada por ecografía. La madre gestante no necesita ninguna preparación especial ni tiene que estar en ayunas. La muestra extraída, tanto transcervicalmente como por aspiración transabdominal, se coloca inmediatamente en un tubo estéril que contiene una solución de suero salino fisiológico. Por tener que atravesar tejidos maternos, puede haber células maternas contaminantes, por lo que hay que limpiarla concienzudamente bajo un microscopio binocular de bajo aumento.

6) Líquido amniótico: también se pueden utilizar para el diagnóstico prenatal las células contenidas en el líquido amniótico extraído por medio de una amniocentesis o punción transabdominal ecoguiada. Como las células no son abundantes, se suelen cultivar, lo que enlentece el estudio prenatal; de ahí deriva su menor uso. Pero para según qué diagnósticos o usos de investigación, nuevamente las técnicas de PCR y de SNPs solventan este problema.

B.1.2. Preparación-extracción del ADN

Como existe una gran variedad de fuentes a partir de las cuales se puede obtener ADN, se han desarrollado protocolos muy diversos que se pueden llevar a cabo mediante sistemas automáticos o manuales. Las técnicas de extracción de ácidos nucleicos son relativamente sencillas y, básicamente, las mismas para todo tipo de células. En todos los casos, el objetivo es obtener la máxima cantidad de ADN y de óptima calidad y pureza.

Así, todo protocolo:

- En primer lugar, empieza por romper o lisar las células, ya sea por métodos mecánicos o químicos.

- Posteriormente, se incuban las células con una proteinasa para extraer las proteínas del ADN.
- A continuación, se separan el ADN y el ARN del resto de los constituyentes de la célula, utilizando bien una mezcla con fenol, bien una solución salina sobresaturada. La forma de extracción más habitual es mediante el sistema llamado de precipitación con fenol-cloroformo, donde los ácidos nucleicos se distinguen de las restantes sustancias bioquímicas que no se disuelven en fenol. Por este motivo, tras una centrifugación, el fenol se separa de la fase acuosa; las proteínas y las grasas permanecen en el fenol, y el ADN y el ARN en la fase acuosa. Los restos de fenol se eliminan con cloroformo, porque el fenol se disuelve en el cloroformo, mientras que los ácidos nucleicos permanecen en la fase acuosa.
- Finalmente, una vez conseguida una solución relativamente pura de ácidos nucleicos, la adición de sal y etanol frío hasta elevar la concentración de etanol al 66% hará que el ADN se vuelva insoluble y precipite. El ADN genómico tiene tal peso molecular que ese precipitado es visible, semejante a un trozo de algodón (si hay suficiente material), y puede ser extraído fácilmente de la solución con un gancho de vidrio y disuelto de nuevo en una disolución de agua y ácido etilendiaminotetracético (EDTA), listo para su análisis o conservación.

Las fuentes a partir de las cuales se obtiene ADN son:

1) Sangre periférica: los leucocitos representan la mayor fuente de ADN para los estudios de rutina en medicina. Los núcleos de los leucocitos se extraen mediante centrifugación y tan sólo es necesario evitar toda destrucción enzimática o mecánica de los mismos.

A partir de 10 mL a 30 mL de sangre recogidos en anticoagulante, preferentemente EDTA, se obtienen algunos cientos de microgramos de ADN en forma de fragmentos de una talla superior a 20 kb, los cuales son suficientes tanto en cantidad como en calidad para realizar muchos y diversos estudios a partir de la muestra almacenada en el banco.

Ya se ha dicho que para obtener buenos resultados lo ideal es que la sangre se procese en las 24 horas siguientes a la extracción. Pero, en el caso de que la muestra llegue congelada para la extracción del ADN, es primordial que la descongelación se realice justo antes de que se vaya a comenzar con la extracción. En ambos casos, se ha de lavar la sangre completa previamente con una solución salina de suero fisiológico y, mediante centrifugaciones sucesivas, se va recogiendo el botón celular. Posteriormente, esa masa celular se mezcla vigorosamente con una solución hipotónica (normalmente agua destilada) para producir la lisis de los eritrocitos, y los leucocitos se recuperan nuevamente por centrifugación.

En este punto del proceso, nuevamente y si es necesario, se pueden congelar los leucocitos sin ningún problema a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta poder seguir con el proceso.

A continuación (o descongelando previamente el botón celular a temperatura ambiente), se añade un tampón de lisis de leucocitos, SDS (dodecil sulfato de sodio al

10% P/V, que es un detergente) y una solución de proteinasa K, y se incuba durante toda la noche a 37 °C. La proteinasa K es una proteinasa muy activa que libera el ADN nuclear al medio y digiere las proteínas que estaban asociadas a él. Posteriormente, el ADN se somete a una serie de extracciones que ya se han comentado (fenol-cloroformo V/V) y se precipita con alcohol etílico frío (-20 °C).

Trabajando en las cantidades indicadas, el ADN precipita en forma de filamentos visibles a simple vista, que se recuperan con una pipeta Pasteur con el extremo en forma de ganchillo o con asas de siembra microbiológicas. A partir de este momento, el ADN ha de disolverse de nuevo en una solución amortiguadora de TE (trishidroximetilaminometano: 2 mol/L; EDTA: 0,25 mol/L; pH: 7,5), manteniendo la mezcla en agitación suave, a 37 °C durante dos horas. A continuación, se observa si la muestra está bien disuelta y, si no lo está, se mantiene a temperatura ambiente un día o dos más. Finalmente, el ADN disuelto se cuantifica y se realizan las técnicas analíticas correspondientes o se conserva directamente en el banco a -70 ó -80 °C.

Otra posibilidad de extracción, menos utilizada porque deja más impurezas, pero también menos contaminante y más sencilla, consiste en suprimir la etapa fenólica. En este protocolo, la eliminación de las proteínas celulares se lleva a cabo mediante la deshidratación y precipitación de las mismas con una solución saturada de cloruro sódico. Se realiza una emulsión con esa solución y, tras centrifugar, las proteínas precipitadas quedan formando un botón en el fondo del tubo, con lo que el sobrenadante que contiene el ADN se transfiere a otro tubo. Finalmente, el ADN se precipita igual que en el método anterior.

En los últimos años, debido al auge que han tomado las técnicas de ADN y a la cada vez mayor cantidad de extracciones que se realizan, se han comenzado a comercializar los llamados “robots”, que son aparatos que realizan automáticamente todos estos pasos. Su eficacia se basa en que permiten extraer de la sangre el ADN muy puro y sólo en unas cuantas horas, así como tratar numerosas muestras simultáneamente. En los casos de genotipado masivo y de creación de nuevos bancos de ADN, es una opción rentable, no así para los laboratorios clínicos hospitalarios pequeños. Entre los diversos modelos se pueden citar el *Applied Biosystems 380A*, el *Whatman SNAP extraction system* y el *Genra Autopure LS*, entre otros.

2) Sangre fresca transformada por medio del EBV: si la sangre llega fresca al laboratorio y es de especial interés su conservación, se pueden transformar los linfocitos –es decir, hacerlos inmortales– por medio del virus Epstein-Barr, y mantenerlos de este modo congelados en forma de cultivos hasta la extracción del ADN. Esto garantiza una fuente inagotable de ADN, lo que es importantísimo en patologías en las que la persona va a fallecer (estudios para el cáncer), en aquellas en las que la patología molecular es muy infrecuente (enfermedades raras), o bien para inmortalizar poblaciones enteras. En los grandes bancos de ADN y en los grandes equipos de investigación genómica, ésta ha de considerarse una práctica habitual, no así en los hospitales o centros pequeños. No corresponde a este capítulo indicar el protocolo de transformación celular, aun así una vez transformadas las células se congelan habitualmente en su medio de cultivo, el RPMI con un 30% de suero y un 6-10% de DMSO, y para la extracción del ADN se descon-

gelan a temperatura ambiente, se centrifugan y el botón celular se trata de la misma forma en que se ha expuesto previamente.

3) Tejido o células en cultivo: los tejidos humanos o animales son una fuente muy buena de ADN genómico por su alta densidad celular. Por ejemplo, un gramo de tejido hepático contiene aproximadamente 10^9 células cuando, para obtener un número equivalente de células nucleadas sanguíneas, se requeriría aproximadamente un litro de sangre. Sin embargo, presentan el inconveniente de la facilidad de degradación de los ácidos nucleicos, lo que se soluciona procesándolos tan pronto como sea posible tras su recogida, o bien congelándolos de inmediato como ya se ha descrito.

Para la extracción de ADN de los tejidos, se requieren unos procesos preliminares para romper el tejido en trozos finos a partir de los cuales las células se pueden lisar y el ADN queda liberado. Esto se puede realizar, bien picando finamente la muestra, bien rompiéndola por homogeneización, bien aplastándola en un mortero en el caso del tejido congelado (con lo que se rompe en trozos pequeños). En todo caso, los trozos se incuban durante 24 horas con SDS y proteinasa K (al igual que lo indicado para la sangre periférica) y, finalmente, el ADN se precipita con el sistema fenol-cloroformo.

Si la muestra es fresca y no muy grande, se puede cultivar. Son numerosos los protocolos de cultivos celulares existentes, puesto que dependen del tipo de tejido cultivado. Generalmente, si se trata de cultivos en “monocapa”, la disgregación que se ha de hacer para la extracción del ADN suele ser a base de tripsina, con lo que se consigue tener las células en suspensión y tratarlas a partir de ese momento como en el punto anterior. Con este sistema, se pueden obtener cientos de microgramos de ADN en función del tiempo de cultivo y de lo perecedero del mismo.

Muchos tejidos recogidos a partir de los Departamentos de Patología están generalmente embebidos en parafina. El ADN en estas muestras es estable durante muchos años, aunque está fragmentado. Para trabajar con estas muestras y antes de extraer el ADN, hay que realizar secciones con un microtomo y, a este material, se le ha de quitar la parafina mediante un tratamiento con xileno. El resto de la técnica es idéntica a la descrita para los apartados anteriores. De una biopsia de algunos miligramos, se recuperan varias docenas de microgramos de ADN. Se puede enriquecer la muestra mediante un microdisector láser.

Existen publicados numerosos protocolos de variantes de la técnica general que intentan recuperar el ADN lo menos degradado posible. Por ejemplo, se ha descrito una técnica en la que no hace falta la desparafinación previa de la muestra y que da resultados bastante buenos, simplemente modificando el protocolo de extracción mediante incubación con proteinasa K entre 24 horas y cinco días. La cantidad de ADN que se obtiene es óptima y de un tamaño que puede alcanzar las 5 kb.

Existen en el mercado muy diversos kits de extracción comercializados que también facilitan el proceso. Generalmente, se obtiene con ellos una pureza muy buena de ADN, si bien menor cantidad que con las técnicas manuales, por lo que su uso depende del tipo de laboratorio y del tipo de material que se esté procesando.

Las vellosidades coriales utilizadas en el diagnóstico prenatal pueden ser un material muy valioso en un banco si el ADN fetal es patológico –ya que muy probablemente el feto no llegará a nacer–, considerándose un tejido biológico y, por consiguiente, todo lo dicho anteriormente sirve para este tipo de muestras con pequeñas modificaciones. Cabe señalar, de todas formas, que en este caso la extracción del ADN se realiza inicialmente sólo con el fin de elaborar un diagnóstico prenatal, por lo que se ha de efectuar siempre de inmediato.

Se colocan las vellosidades en una placa de Petri con un poco de suero fisiológico y, utilizando una lupa, se ha de eliminar la posible contaminación por tejido materno; a continuación, se procede a la homogeneización de la muestra de forma mecánica, tal y como previamente se ha indicado. En el caso de que existan restos hemáticos –abundantes si la extracción de las vellosidades ha sido realizada por vía transabdominal– se han de efectuar una o varias lisis de eritrocitos con el correspondiente tampón. Es muy importante insistir en la eliminación por completo de los posibles restos de contaminación materna, puesto que a la hora de realizar el diagnóstico prenatal podría llevar a graves errores por la mezcla de ADN fetal y materno.

Posteriormente, se efectúa la digestión, como siempre con proteinasa K, pero en una solución amortiguadora que contiene urea, NaCl (cloruro sódico), EDTA (ácido etilendiaminotetraacético), Tris (trihidroximetilaminometano) y SDS (dodecil sulfato de sodio), lo que ayuda a la desnaturalización y a la digestión de las proteínas. Finalmente, se realiza la precipitación del ADN tal y como se ha indicado anteriormente.

4) Células bucales y raíces de cabello: en este caso, las muestras han de llegar frescas al laboratorio o, más recientemente, se ha descrito una técnica por la que se recolectan las células en filtros semejantes a las *Guthrie Cards*. En cualquier caso, son numerosos los protocolos que existen para una recolección óptima de las células y, a partir de ellas, del ADN. El problema que intentan resolver es la poca cantidad de muestra que, habitualmente, ronda los 0,2-6 microgramos totales obtenidos de ADN. Pero los mayores avances en este campo se centran últimamente, ya no en la extracción del ADN que existe realmente, sino en la técnica llamada PEP (*primer extension preamplification*), que permite amplificar completamente el genoma (WGA) y, de esta forma, partir desde el inicio de una cantidad de ADN mucho mayor pero producida *in vitro*.

Lo mismo se puede decir en el caso de las raíces de cabello. Una raíz fresca contiene aproximadamente de 0,2 a 0,5 microgramos de ADN, que no es una cantidad suficiente para realizar las técnicas utilizadas en Biología Molecular, como es el *Southern Blot*, pero sí adecuada para su uso en la técnica de la PCR (reacción en cadena de la polimerasa). De ahí que las técnicas de PEP y de WGA se estén imponiendo en este campo.

La extracción del ADN en este caso se realiza introduciendo la raíz de pelo en un tubo que contenga una solución amortiguadora y proteinasa K. Para la digestión de las proteínas se ha de calentar la muestra a 60 °C durante 30 minutos. Posteriormente, se hierve durante 20 minutos para desnaturalizar la proteinasa K y se toma una alícuota para realizar la amplificación del ADN mediante la PCR o la PEP.

B.2. ARN

B.2.1. Extracción del ARN

El ARN mensajero se encuentra sólo en aquellos tejidos en los que se expresa; en consecuencia, si se quiere estudiar cómo incide una mutación en la funcionalidad de una célula, se tendrá que acudir al órgano específico. Por esta razón, se debería saber extraer ARN de todo tipo de tejidos aunque muchos genes se expresen también en sangre periférica.

Hay que tener en cuenta, no obstante, una particularidad muy especial del ARN: la facilidad de degradación enzimática de esta molécula por medio de las ribonucleasas. Las ribonucleasas son enzimas muy estables y activas presentes en múltiples sistemas biológicos (incluidas bacterias y hongos ambientales) que, por lo general, no requieren cofactores. Por lo tanto, las precauciones que han de tomarse a la hora de extraer una muestra para obtener ARN deben ser extremas. Todo el material que entre en contacto con la muestra (tubos, frascos, jeringas, agua, soluciones, etc.) ha de estar libre de RNAsas y completamente esterilizado. Como precaución adicional es bueno, además, que los materiales y las soluciones hayan sido tratadas con los inhibidores de las RNAsas, como el dietil pirocarbonato (DEPC) al 0,1%.

Con respecto a los tejidos líquidos (sangre y aspirado medular), éstos se han de anticoagular para realizar una buena obtención del ARNm, lo que hasta hace poco se lograba, igual que para el ADN, simplemente con EDTA. Recientemente, han salido al mercado diversos tubos especiales de varias casas comerciales, para la recogida de muestras, que combinan el anticoagulante con reactivos que mantienen la estabilidad del ADN y que, además, se encuentran libres de RNAsas.

En cuanto a los tejidos sólidos, se debe hacer la extracción del ARN de inmediato o congelar dichos tejidos antes de la extracción. En este último caso y para obtener el ARN, el método de congelación de elección es la inmersión directa en nitrógeno líquido de la biopsia de tejido. Como en el caso del ADN, si el procesamiento es inmediato, el tejido se coloca en tubos con suero fisiológico, pero además se añaden inhibidores de las RNAsas, DEPC, etc.

Finalmente, resta comentar que puede ocurrir que el clínico que realice una extracción de muestra para estudios moleculares no sepa si en el laboratorio se van a utilizar muestras de ADN o de ARN. En este caso, quien realiza la extracción deberá siempre aplicar las precauciones de la muestra con más riesgo de perderse, esto es, se han de seguir los protocolos del ARN.

B.2.2. Preparación de ARN total

El aislamiento y el almacenamiento del ARN son herramientas de suma importancia dentro de la investigación en Biología Molecular, ya que posibilita la realización de estudios de expresión génica y de cambios en la misma.

Debido a la facilidad de degradación del ADN es indispensable que, en el proceso de extracción y en cualquier tipo de muestra o tejido, se tomen todas las precauciones necesarias en el laboratorio valorando las posibles fuentes de contaminación con RNAsas y actuando en consecuencia para evitarlas:

- **Las superficies de trabajo:** representan una fuente de contaminación al estar expuestas al ambiente (bacterias, hongos y células humanas) y, por ello, es necesario tratar todas las superficies con soluciones inhibitoras de la RNAsa. En general, suele servir la limpieza con etanol al 70% y aplicar un producto comercial llamado RNase Zap® de Sigma. Esta limpieza se ha de hacer en todas aquellas superficies de contacto, tales como la campana de flujo, el plástico, las pipetas, la centrífuga, etc. Para una mayor esterilización de la superficie de trabajo, antes y después de la manipulación, se debe dejar actuar además una luz UV durante más de tres horas.
- **Contaminación corporal:** puede suceder tanto por los fluidos (saliva o sudor) como por la piel. Contienen una elevada concentración de RNAsas, por lo que es necesaria la utilización de guantes estériles durante cualquier manipulación del ARN. Asimismo, deben cambiarse frecuentemente a lo largo del proceso y siempre que se entre en contacto con cualquier otra superficie.
- **Material fungible con el que se realiza la extracción** (tales como tubos y puntas): son también una fuente de RNAsas que se debe evitar, para lo cual se utilizan en todo momento materiales certificados libres de nucleasas, puesto que no es suficiente el autoclave en estos casos por tratarse de enzimas termorresistentes que se mantienen estables a temperaturas superiores de 100 °C.
- **Buffer y agua:** es necesario asegurarse de que todos los *buffers* y el agua utilizados están certificados libres de nucleasas.

Además de la posible contaminación por RNAsas, es indispensable evitar la contaminación por ADN, ya que los extractos de ácidos nucleicos contienen también nucleasas y ribonucleasas en altas concentraciones.

Igualmente, al evitar el contacto con el ADN se evitan falsos positivos en la extracción de ARN. Para ello, es necesario tomar también las siguientes medidas:

- Separar, en la medida de lo posible, la zona de trabajo del ADN de la del ARN.
- Utilizar un juego de pipetas automáticas exclusivas para la manipulación del ARN.
- Usar puntas estériles con filtro para evitar la contaminación del extremo de la pipeta.
- Incubar con DNAsa durante la extracción del ARN para eliminar los posibles restos de ADN. Los ácidos nucleicos, que son estables en la célula intacta, llegan a ser muy vulnerables a la digestión por las nucleasas endógenas.

Siguiendo todas estas precauciones, las técnicas de extracción de ARN, en general, consisten en un primer paso para obtener células lo más limpias posibles que, posteriormente, se lisarán para obtener el ARN. Estas células –que pueden ser los leucocitos de la sangre periférica o las células de cualquier otro tejido–, una vez homoge-

neizadas, se pueden congelar a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ sin que la diferencia afecte significativamente a la extracción del ARN. Es aconsejable el proceso de la congelación en alícuotas, dada la inestabilidad del ARN, para asegurar que mientras se trabaja con un tubo no se estropean los demás.

A partir de ahí, hoy en día se aconseja aislar el ARN a partir de esos botones celulares con algún kit comercializado a tal efecto que permita asegurar las extremas condiciones de seguridad del protocolo de trabajo descrito. Existen diversos kits en el mercado, todos los cuales básicamente comprenden los mismos pasos esenciales:

- **Lisis eficaz de las células y desnaturalización de los complejos de nucleoproteínas presentes en los extractos celulares:** se utiliza para ello una combinación de detergente (SDS) con tiocianato de guanidina (TCG), que inactiva las RNAsas y permite así que el ARN quede en solución y aislado de las proteínas.
- **Inactivación de la actividad de las ribonucleasas presentes en la célula:** se lleva a cabo con la combinación de TCG y beta-mercaptoetanol.
- **Eliminación de las proteínas:** este paso se realiza gracias a la precipitación de las proteínas celulares a altas concentraciones de TCG mientras el ARN permanece en solución. Acto seguido, una centrifugación limpia el lisado celular de proteínas y restos, logrando que el ARN precipite selectivamente.
- **Eliminación del ADN contaminante de las células:** se suele incubar con la enzima DNasa I libre de RNAsas.
- **Elución del ARN:** el ARN total se disuelve en agua libre de RNAsas.

En el caso de tejidos, la extracción de ARN es algunas veces más difícil, ya que la RNasa endógena es activa mientras la muestra está siendo procesada. Dos tejidos, en particular, contienen una elevada actividad catalítica de RNAsa: el páncreas y el bazo; mientras que el hígado y el intestino presentan una menor actividad de dicha enzima. De cualquier modo, como se ha expuesto anteriormente, se recomienda usar tejidos tan frescos como sea posible, cortados en trozos pequeños (menos de un gramo cada uno), y congelarlos rápidamente en nitrógeno líquido hasta que se vaya a comenzar la extracción.

3.1.C. Células

El abanico de opciones, respecto del procesamiento o utilización de las células, es inmenso y depende, naturalmente, del estudio que se quiere realizar, así como del tipo celular de que se trate. Algunas de las posibilidades son:

- **Caracterización morfológica mediante distintos tipos de microscopia.**
- **Inmunofenotipaje:** citometría, inmunomarcaje.
- **Estudio de componentes celulares, caracterización molecular.**
- **Técnicas de análisis masivo** de proteínas (Proteómica) y ácidos nucleicos (Genómica), de su expresión (Transcriptómica) y de sus múltiples interacciones en la célula (Metabólica).

En los últimos años y particularmente desde la obtención de líneas de células troncales embrionarias humanas y del descubrimiento de la posible diferenciación de células troncales adultas de un determinado linaje a células maduras de otro linaje distinto, se han abierto interesantes posibilidades para la diferenciación específica y controlada *in vivo* e *in vitro* de células troncales, así como para su utilización como fuente de células funcionales para tejidos alterados o envejecidos. Además, en el plano de investigación más básica, las líneas derivadas de células troncales y ellas mismas constituyen un modelo particularmente importante para la determinación de los mecanismos que regulan la diferenciación celular.

Las células obtenidas de acuerdo con los métodos descritos en la sección 2 de este capítulo (apartado 2.1.B) se pueden utilizar en numerosas ocasiones directamente, tal y como se ha comentado en dicho apartado. Otras veces, sin embargo, el tipo de experimentación o la necesidad de un número de células elevado, etc., demanda el empleo de cultivos celulares.

C.1. Tipos de cultivos celulares

C.1.1. Cultivo primario

Las células obtenidas *ex vivo* y puestas en condiciones de cultivo constituyen un cultivo primario. Durante un cierto tiempo, las células mantenidas en cultivo pueden conservar muchas de las características fisiológicas que presentan *in vivo*. Otra forma de obtener cultivos primarios consiste en el cultivo de explantes o pequeños fragmentos de tejido puestos en cultivo de los que se van desprendiendo células individuales. El establecimiento de estos cultivos no siempre es fácil. Son inicialmente heterogéneos, pueden ser mantenidos *in vitro* por un tiempo limitado y, a largo plazo, el cultivo se llena de las células presentes en la muestra que mejor crecen en las condiciones del cultivo, generalmente los fibroblastos.

C.1.2. Cultivo continuo

Algunos tipos celulares se pueden mantener en cultivo y proliferar durante más tiempo, constituyendo un cultivo continuo o una línea celular. Estas líneas pueden tener, no obstante, una capacidad de proliferación limitada a un número de generaciones, o bien ser ilimitada.

Las células con una capacidad de proliferación limitada suelen haber alcanzado ya un cierto grado de diferenciación, al menos en las condiciones en las que se ha establecido el cultivo. Por el contrario, las células denominadas troncales poseen una alta capacidad proliferativa y un grado importante de indiferenciación, que es el caso de las células troncales embrionarias. Estas células en condiciones muy controladas de cultivo se mantienen como células troncales, mientras que si se modifican dichas condiciones las células se diferencian a múltiples linajes celulares.

Los cultivos con una capacidad de proliferación más larga o ilimitada se establecen con células que muestran una mayor capacidad de renovación, como las células tu-

morales o aquellas que son “inmortalizadas” mediante una transformación por un tratamiento químico o una infección viral.

Hay que considerar que, en general, las células cultivadas durante un gran número de pases, principalmente las de crecimiento “indefinido” o las líneas transformadas, son células que retienen pocas de sus características *in vivo*. Por otra parte, la propagación de una línea durante un gran número de pases conlleva normalmente cambios en las propiedades de las células que pueden asimismo incluir cambios genéticos.

C.2. Establecimiento de subcultivos de líneas celulares

Las células no pueden crecer en un medio de cultivo indefinidamente. Los nutrientes del medio se consumen, se acumulan productos tóxicos, las células pueden morir o alterarse y, en todo caso, llega un momento en el que la densidad celular inhibe el crecimiento. Es necesario, por lo tanto, renovar el cultivo a medida que alcanza una determinada densidad celular. El procedimiento varía según las células crezcan adheridas o en suspensión.

En general, las células adherentes crecen en monocapa hasta que se cubre la superficie disponible. Antes de que esto suceda es necesario subcultivar, para lo que las células han de desprenderse del sustrato, convirtiéndose temporalmente en células en suspensión. El procedimiento a seguir consiste en:

- 1) En primer lugar, se decanta el medio antes de que las células alcancen el 100% de confluencia.
- 2) Se lavan las células con PBS sin $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ y se les añade la suficiente tripsina/EDTA en HBSS sin $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ para cubrir las células sin exceso.
- 3) Las células se ponen entonces en el incubador durante 2-10 minutos.
- 4) Cuando bajo el microscopio invertido se observa que las células se redondean y comienzan a desprenderse, se añade medio con suero con el objetivo de inactivar la tripsina.
- 5) Se resuspenden las células y, mediante pipeteo, se lavan y cuentan, resuspendiéndolas finalmente en un medio fresco y a la densidad apropiada según el tipo celular; a continuación, se añaden a un nuevo *flask* con medio precalentado.

En este proceso es particularmente importante la digestión con tripsina, la cual se debe monitorizar cuidadosamente, porque un exceso de digestión de pipeteo puede matar muchas células. También ha de tenerse en cuenta que, al levantar las células adherentes con tripsina, muchas o algunas de sus proteínas de membrana se pueden eliminar. Por este motivo, cuando las células son finalmente levantadas para su análisis, en ocasiones conviene utilizar métodos alternativos como “raspadores” o “espátulas” a fin de evitar los efectos de la tripsina.

En el caso de células en suspensión, una vez alcanzada una alta densidad y antes de que el medio se acidifique en exceso, se deben centrifugar, contadas y resembradas a la densidad adecuada según el tipo celular en un medio fresco precalentado.

C.3. Medios y condiciones de cultivo

El aspecto crítico de los cultivos celulares es conseguir que las células en el cultivo mantengan el estado inicial de diferenciación o indiferenciación y sus propiedades fisiológicas. El medio y las condiciones de cultivo van a determinar no sólo la supervivencia de las células, sino también su capacidad de proliferación y, en gran medida, el mantenimiento de sus propiedades fisiológicas. En este sentido, aspectos que se deben evaluar cuidadosamente son: la temperatura y la atmósfera del incubador, el sustrato de adhesión en el caso de cultivos adherentes, el medio de cultivo y el pH.

El sustrato es crítico en los cultivos adherentes para que muchas de las células en cultivo mantengan sus propiedades fisiológicas e incluso su supervivencia y crecimiento. A este respecto, es necesario utilizar los materiales óptimos, plásticos tratados para cultivo, vidrio o sustratos recubiertos de materiales biológicos, como colágeno, gelatina, fibronectina, laminina, etc.

Por su parte, el medio de cultivo debe, por un lado, mantener el pH óptimo para el crecimiento celular y, por otro lado, aportar los nutrientes y factores que la célula necesita para su crecimiento y el mantenimiento del estado fisiológico.

Los medios generales contienen sales inorgánicas que proporcionan los iones necesarios para regular la ósmosis, el potencial de membrana y la adhesión a la matriz extracelular; asimismo, contienen carbohidratos, generalmente azúcares, que actúan como fuente de energía, y vitaminas; así como ácidos grasos y lípidos, normalmente presentes en el suero que se añade a muchos cultivos, aunque hay células que necesitan aportes especiales de colesterol y esteroides, sobre todo en los medios sin suero; también se encuentran proteínas y péptidos, normalmente aportados por el suero, y oligoelementos, como el zinc, el cobre, el selenio y el ácido tricarbóxico.

El suero se utiliza como aporte general de nutrientes, proteínas, ácidos grasos y también factores de crecimiento. El más comúnmente utilizado es el suero de ternera fetal, pero también se emplean habitualmente suero de caballo o suero de ternera neonata. Por su naturaleza, la composición del suero es difícil de precisar y varía de lote a lote, motivo por el cual es imprescindible testar los lotes y tener en cuenta que las condiciones de cultivo podrían variar con uno nuevo. En numerosas ocasiones es necesario un control más estricto de la composición del medio, por lo que cada vez existen más medios libres de suero y con componentes estándares.

Por otra parte, muchas células necesitan aporte de factores de crecimiento, interleucinas u otro tipo de señales, presentes en su microambiente *in vivo*, que ayudan a man-

tener *in vitro* el estado fisiológico de la célula. Determinar el tipo de “señales” que permiten el crecimiento o el estado fisiológico de las células *in vivo* y tratar de simularlo *in vitro* constituiría el fin último de un medio de cultivo.

Las células crecen a un pH óptimo que, en general, se encuentra entre 7,2 y 7,4. Este pH se puede mantener mediante el empleo de una atmósfera de 5-10% de CO₂ que se equilibra con el CO₃/HCO₃ presente en el medio, lo que resulta poco tóxico para las células además de económico. También se pueden utilizar medios tamponados generalmente con HEPES, lo que resulta más caro, si bien altas concentraciones de HEPES pueden ser tóxicas para algunas células. En general, los medios de cultivo suelen llevar un indicador de pH, normalmente el rojo fenol que vira de rojo a amarillo cuando se acidifica el medio, o a púrpura si se basifica, lo que permite una monitorización continua del pH del medio.

C.4. Trabajo en esterilidad

Uno de los aspectos clave para el trabajo de cultivo es la esterilidad. Los cultivos celulares son susceptibles de contaminarse con bacterias, levaduras, hongos, micoplasma y virus. Es necesario prevenir estas contaminaciones, así como realizar comprobaciones periódicas de la ausencia de estos contaminantes. Para ello, se debe trabajar siempre en cabina de flujo laminar y desinfectar la superficie de trabajo con etanol al 70%. Se pueden utilizar otros desinfectantes, como hipoclorito, fenoles y aldehídos, pero su uso rutinario se desaconseja. Se debe utilizar todo el material estéril, asegurándose de que aquel que haya sido envuelto no muestra roturas en el envoltorio. Además, se ha de aplicar etanol al 70% en los guantes periódicamente durante la manipulación, mantener despejada la superficie de trabajo y evitar pasar las manos por encima de los cultivos, las soluciones o los medios. Tampoco es aconsejable tocar con las pipetas las bocas de las botellas y frascos ni succionar con la boca para pipetear, debiendo utilizarse pipeteadores automáticos. Es importante, finalmente, flamear pinzas, material de vidrio, etc., antes de introducirlo en el cultivo, así como limpiar la cabina de flujo una vez que se ha terminado con etanol al 70%.

3.1.D. Fluidos

La muestra se obtiene en la mayoría de los casos mediante la centrifugación del espécimen, que puede ser de mayor o menor intensidad según el tipo de magnitud a analizar:

- A bajas revoluciones (150-200 gramos durante cinco minutos), por ejemplo, para obtener un plasma rico en plaquetas (PRP).
- A altas revoluciones (2.000-3.000 gramos durante 15-30 minutos), en el caso de la obtención de un plasma pobre en plaquetas (PPP).

A su vez, la centrifugación se puede llevar a cabo a baja temperatura (4-6 °C) para conseguir PPP en la mayoría de los casos o, por el contrario, sin refrigerar para obtener PRP. En este último caso, y teniendo en cuenta que el proceso de centrifuga-

ción incrementa la temperatura, es necesario asegurarse de que la temperatura de la centrífuga no supere en ningún momento los 25 °C, a fin de evitar el deterioro de las muestras a analizar. Nuevamente en la Tabla I se especifican las condiciones recomendables para cada magnitud. Es importante que cada laboratorio establezca su protocolo concreto respecto del material del que disponga y que lo siga rigurosamente.

Las muestras de líquidos biológicos se deben procesar antes de las dos horas, debido al deterioro inmediato de las células a contar y al cambio de sus características físico-químicas. Sólo las pruebas bioquímicas se pueden realizar con una demora de hasta 24 horas conservadas a 4 °C.

3.2. El respeto de los derechos del paciente relativos al uso de las muestras

Como se dijo en el sección 2 de este capítulo (apartado 2.2), además del consentimiento del sujeto para la obtención de la muestra es preciso obtener su consentimiento para la utilización de la misma. Si bien normalmente ambos consentimientos se realizarán en un solo acto y en un solo documento, se exponen a continuación los aspectos específicos relacionados con el uso.

Este consentimiento se podrá prestar junto con el que corresponde a la extracción cuando las muestras se obtengan, específicamente, para la investigación o como fin principal para el diagnóstico o la terapia pero, a la vez, se prevea la investigación con las mismas. Lógicamente, no es posible prestar a la vez ambos consentimientos cuando la muestra proviene de una colección almacenada sin haberse previsto este uso residual. El consentimiento para que las muestras se utilicen en investigación, en este caso, se prestará siempre con posterioridad a la extracción en otro documento.

Cuando se trate de muestras que puedan asociarse a un individuo, es decir, muestras identificadas o identificables, el sujeto debe consentir expresamente en virtud de los principios que regulan la protección de datos de carácter personal y que son aplicables a este supuesto. La utilización de muestras identificadas o identificables sin el consentimiento informado podría justificarse en algunos casos (ver capítulo V).

Con respecto a los criterios aplicables para muestras anónimas o anonimizadas, no existe todavía una normativa específica estatal. No obstante, el criterio que se sigue en la Recomendación del Consejo de Europa sobre utilización de muestras biológicas en investigación es que este material podrá utilizarse sin el consentimiento expreso en el caso de las muestras anónimas y en las muestras anonimizadas, salvo que conste la voluntad contraria del donante.

En el ámbito autonómico es muy significativa la previsión del artículo 36 de la Ley 8/2003, de 8 de abril, sobre derechos y deberes de las personas en relación con su salud, de la comunidad autónoma de Castilla y León, según el cual: “En el marco de la

normativa aplicable y siempre que no exista oposición por parte del interesado, los centros, servicios y establecimientos sometidos a la presente Ley podrán conservar y utilizar tejidos o muestras biológicas para fines lícitos distintos de aquellos que motivaron la biopsia o la extracción”.

Como regla general, el consentimiento es revocable y esta norma ha de aplicarse cuando se trata de un consentimiento para que se utilice una muestra biológica en investigación biomédica. Ya se trate de muestras o de datos, obviamente la revocación del consentimiento sólo se puede ejercer cuando se trate de muestras asociadas o asociables a un sujeto identificado.

Los efectos de la decisión cuando el sujeto fuente decide que su muestra no se siga utilizando para fines de investigación pueden ser, o bien la destrucción, o bien la anonimización, y lo mismo ocurre con los datos que se hubieran obtenido de su análisis. Esta cuestión se debería aclarar en la información previa al consentimiento y debería constar en el documento correspondiente. Se habría de informar, además, de que la cancelación o la anonimización de los datos significa que no se van a seguir utilizando en el futuro, pero no comporta que se vayan a destruir los que ya se han obtenido en el curso de la investigación. Estos datos han de mantenerse como parte de la documentación de dicha investigación.

Los efectos de la revocación dependerán de lo convenido en el documento de consentimiento, es decir, donde consta si en este supuesto la muestra se destruye o se anonimiza.

4. CONSERVACIÓN

4.1. Procedimientos técnicos para la conservación de las muestras

4.1.A. Tejidos y órganos

A.1. Sistemas y formatos de archivos

Los sistemas y formatos de archivo de muestras en el banco de tejidos u órganos son variados (tubos, bloques de OCT, secciones congeladas, frotis o improntas congeladas, bloques de parafina, matrices de tejido, o bien órganos enteros, como es el caso de los cerebros en los bancos de tejido neurológico). De forma ideal, sería conveniente disponer en todos los casos de muestras archivadas en diferentes formatos debido a que, habitualmente, a las ventajas de cada formato de archivo se asocian también algunas limitaciones o inconvenientes. Los lugares donde residen los sistemas de archivo han de disponer de un control físico de acceso, ya sea mediante cerradura o candado, ya sea mediante identificación por tarjeta magnética de las personas que entren en dichos lugares. A continuación, se describen estos sistemas y formatos de archivo, que se agrupan en sistemas de archivo a temperatura ambiente y sistemas de congelación.

A.1.1. Sistemas de archivo a temperatura ambiente

- Láminas con improntas y extensiones.
- Tejido incluido en parafina.

Este tipo de muestras se almacenan de forma que no queden expuestas a la luz, el polvo y los cambios de temperatura. Se debe procurar no contaminar por la manipulación sin guantes.

A.1.2. Sistemas de archivo a bajas temperaturas

Habitualmente, para la realización de diferentes tipos de estudios retrospectivos sobre material archivado relacionados con el análisis de proteínas, ARN u otros componentes celulares, se requiere que la muestra haya sido preservada a bajas temperaturas. Aunque en términos generales a menor temperatura hay una mayor garantía de calidad de la muestra, la selección de la temperatura a la que debe archivarse viene determinada por lo que se pretende estudiar *a posteriori* sobre ese espécimen en concreto.

En cualquier caso, en general, se recomienda el empleo de arcones de $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ (o temperaturas inferiores) y congeladores de nitrógeno líquido a temperaturas mucho más bajas. En este último caso, el mantenimiento de las células almacenadas en fase gaseosa evitaría, al máximo, la posibilidad de contaminación cruzada entre diferentes muestras. Probablemente, sean estos últimos sistemas de criopreservación los más recomendables dada su capacidad de conservación, si bien su precio y necesidades de mantenimiento los hacen menos asequibles.

No obstante, es imprescindible, sea cual sea el equipo empleado, que éste disponga de los adecuados sistemas de seguridad que garanticen la preservación de muestras: alarmas de temperatura y corriente eléctrica, generadores de emergencia, etc. Estas alarmas deben estar conectadas a una central que, en caso de problemas, avise a los encargados del banco de tejidos en el mismo momento en el que se produzcan. En los equipos con suministro de N_2 líquido, así como en los arcones, debe existir un sistema de apoyo (*back-up*) para suplir las posibles deficiencias en su funcionamiento, siendo también conveniente tener localizados otros contenedores con espacio libre dentro de la institución para casos de extrema emergencia. Resulta difícil hacer recomendaciones respecto del número total de congeladores necesarios, puesto que dependerá del ritmo de entrada de muestras que, hay que tenerlo presente, siempre será en principio superior al de salida, por lo que habrá que ir previendo con suficiente antelación la adquisición de nuevos equipos y/o la eliminación de muestras que se consideren innecesarias, y todo ello en función de las dimensiones finales y la capacidad de las instituciones de biotecnología.

Cualquiera que sea el equipo, las muestras deben estar bien organizadas dentro del mismo. Esto se consigue por medio de cajas dispuestas de forma ordenada en estantes (*racks*).

Es necesario seguir un programa de mantenimiento del equipo con revisiones periódicas, limpieza de la escarcha y eliminación de las muestras obsoletas.

A.2. Sistemas de congelación

Existen dos métodos principales habitualmente recomendables para la congelación de tejidos: congelación directa en isopentano y congelación en molde con medio OCT; cada una de ellas tiene ventajas y limitaciones.

A.2.1. Congelación directa en isopentano

El fragmento de tejido seleccionado se sumerge directamente en isopentano frío (histobath, isopentano extraído de arcón a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$). Cuando el tejido se ha endurecido y queda blanco, se introduce en tubos de almacenamiento entre 1 y 2 cc. La ventaja de esta técnica es su rapidez y que el contenedor empleado para el archivo de la muestra ocupa muy poco espacio a la vez que tiene una capacidad relativamente grande. Si fuera necesario un estudio microscópico, este material se puede cortar en el criomicrotomo, montando la muestra sobre OCT.

A.2.2. Congelación en molde de OCT

El fragmento seleccionado se coloca en un criomolde con OCT que se congela como en el caso anterior. Este método es algo más lento y para una misma cantidad de tejido ocupa más espacio al almacenarlo, pero es recomendable cuando se trata de muestras en cilindros que, por su tamaño y forma, pueden sufrir si no se congelan en el molde, o de aquellas en las que se necesite una orientación muy específica si se tienen que realizar cortes para un estudio microscópico. Además, permite almacenar de forma inmediata muestras de estudios intraoperatorios sin necesidad de volver a congelar el tejido.

A.3. Etiquetado e identificación de muestras

Tiene como objetivo asegurar de forma inequívoca la procedencia y las características específicas de cada una de ellas. Con ello se busca controlar al máximo los posibles errores o la ambigüedad en la identificación, o incluso evitar la necesidad de realizar procedimientos adicionales sobre la muestra para conocer algunas de sus características que han sido previamente exploradas (por ejemplo, tejido de procedencia, riqueza en células tumorales).

Aunque existen varios sistemas de etiquetado, el más recomendable emplea códigos de barras/puntos. Otras posibilidades incluyen escritura con tinta indeleble o contenedores (por ejemplo, tubos) que tienen grabados sistemas de barras/puntos. Cualquiera que sea el sistema empleado es recomendable que se cumplan los siguientes requisitos:

- Evitar el deterioro de la etiqueta y de la información contenida en ella con el tiempo y la temperatura extrema.
- Generar un número o cadena alfanumérica que sirva de identificador único de dicha muestra, sea cual sea la base de datos en la que ésta figure.
- Su lectura debe ser inequívoca y sin ambigüedades, y permitir la rápida identificación de la muestra.

- Se ha de colocar en un sitio visible y de fácil acceso en el contenedor de la muestra, e incluir sin problemas de espacio todo el código identificador.
- No debe contener datos confidenciales directa o fácilmente identificables. Por ejemplo, DNI, siglas del paciente o número de historia clínica.
- El sistema de etiquetado debe estar ligado a todos los datos técnicos de procesamiento en la base de datos del biobanco, como se refiere en la sección 6 del presente capítulo.

Según estas premisas, los sistemas de etiquetado con códigos de barras/puntos son en principio recomendables, ya que además garantizan una gran rapidez en el etiquetado, una identificación rápida e inequívoca de la muestra y se pueden utilizar para la elaboración de códigos que contengan un importante volumen de información en un espacio pequeño. De cualquier manera, es importante seleccionar un tipo de pegatina que no corra el riesgo de despegarse y/o borrarse total o parcialmente, en especial cuando se utiliza un archivo de muestras en N₂ a temperaturas muy bajas.

A.4. Equipos de almacenamiento

Los equipos de almacenamiento a bajas temperaturas son de dos tipos, teniendo en cuenta la temperatura a la que deben almacenar las muestras:

1) -80 °C: se trata de congeladores, habitualmente verticales, con capacidad de 450-650 litros, en cuyo interior las muestras se disponen en cajones y *racks*. Están conectados a la red eléctrica y conviene que tengan un sistema de seguridad de suministro eléctrico. Para asegurar la cadena de frío, incluso si hay pérdida de suministro eléctrico, se suelen instalar sistemas de aporte de CO₂ que pueden suplir una interrupción de la tensión eléctrica de hasta dos días.

2) -196 °C: son contenedores con nitrógeno líquido. Habitualmente, las muestras se almacenan en la fase de vapor, aunque en algunas ocasiones puede convenir el uso de la fase líquida. Hay dos tipos de contenedores según el nitrógeno en fase líquida pueda o no estar en contacto con las muestras. En los sistemas tradicionales es posible el contacto entre el nitrógeno líquido y las muestras (y, en consecuencia, con el operador). En otros sistemas, por el contrario, la fase líquida está custodiada por una cámara hueca, y, por lo tanto, no puede estar en contacto directo ni con las muestras ni con el operador.

4.1.B. ADN y ARN

B.1. Condiciones para la conservación

Las muestras de ADN se deben conservar congeladas por debajo de 20 °C. Teóricamente, la mejor opción es a -80 °C, pero existen laboratorios que prefieren conservarlas a -20 °C y que manifiestan que nunca han tenido problemas de degradación. Los congeladores deberán estar ubicados en lugares con las mismas condiciones de seguridad física y con las restricciones de acceso mencionadas en el apartado A.1 (apartado 4.1.A del capítulo II).

En el caso del ARN, el almacenamiento es un paso crítico para la integridad del ARN extraído, puesto que pequeñas cantidades de RNAsas pueden deteriorar el ARN guardado si no se mantiene a temperaturas de refrigeración extremas de -70 a -80 °C que inhiban la actividad enzimática. Independientemente de la técnica usada, en buenas condiciones las muestras de ARN se pueden conservar más de un año congeladas en agua que contenga un inhibidor de RNAsas, como el isotiocianato de guanidina, entre otros. Si el destino es la realización de RT-PCR, una buena alternativa es congelar la muestra después de su retrotranscripción a ADNc, molécula que es mucho más estable que el ARN.

B.2. Sistemas y formatos de archivos. Equipos de almacenamiento

Todas las muestras de ADN y ARN se conservan en tubos estériles bien cerrados para evitar la contaminación. Una buena opción es situarlos en cajas de 100 tubos numerados, que se apilan de diez en diez en *racks* o columnas dentro de grandes congeladores verticales a -80 °C. También se emplean en numerosas ocasiones los arcones.

B.3. Etiquetado e identificación de muestras

El etiquetado y la identificación de muestras de ARN y ADN han de seguir las mismas normas que las señaladas en el apartado anterior de tejidos y órganos 4.1.A (apartado A.3).

4.1.C. Células

Como ya se ha señalado, las células no pueden mantenerse en cultivo indefinidamente por múltiples razones: esto genera problemas de espacio, muchas células no permiten el cultivo prolongado y las que lo permiten son susceptibles de sufrir cambios irreversibles en su biología. Además, los cultivos prolongados incrementan el riesgo de contaminación microbiológica o de otro tipo.

Por esta razón, la forma de mantener las células asegurando que se mantengan en su estado inicial es criopreservarlas, es decir, proceder a su ultracongelación en condiciones que permitan su posterior recuperación. En general, se consigue mediante una congelación lenta y una descongelación rápida.

C.1. Congelación

Para realizar la congelación, el cultivo debe estar en fase exponencial de crecimiento, libre de contaminantes y saludable, según los criterios morfológicos y/o fisiológicos que correspondan. Para células adherentes esto suele corresponder a una situación previa a la confluencia.

La congelación de las células en suspensión se puede realizar directamente, pero las células adherentes deben ser previamente “levantadas” con tripsina/EDTA. A continuación, hay que bloquear la acción de la tripsina con suero y lavar las células. Una vez la-

vadas y contadas, la viabilidad de las células a congelar debe ser superior al 90%. Acto seguido, las células se centrifugan y resuspenden en un crioprotector adecuado, como puede ser el DMSO al 10% con un 90% de suero fetal bovino. Cada criotubo, convenientemente etiquetado, no debe contener una concentración superior a $2-4 \times 10^6$ células/mL, y no se debe llenar del todo. Los criotubos se depositan en contenedores tipo Nalgene Mr. Frosty rellenos de isopropanol a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ normalmente hasta el día siguiente. Las células ya congeladas se deben almacenar en contenedores de nitrógeno líquido o gaseoso.

C.2. Descongelación

La descongelación debe ser rápida; por ejemplo, el criotubo se puede calentar en un baño a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta que esté parcial pero no completamente descongelado. A continuación, las células se han de pipetear despacio sobre el medio de cultivo apropiado y colocarlas ya, sin más, en el incubador. En algunos casos, es necesario eliminar los restos de DMSO, porque puede resultar tóxico para ciertas células. En este caso, antes de poner las células en el incubador, hay que centrifugarlas y resuspenderlas nuevamente en el medio.

C.3. Organización y mantenimiento de un banco de células congeladas

Si se pretende organizar un banco de células congeladas, es conveniente distinguir alícuotas de células *ex vivo* y células de cultivo. La congelación de células *ex vivo* debe seguir los mismos criterios de viabilidad que las células de cultivo. En el caso de las células de cultivo, es conveniente que éstas se almacenen cuando lleven pocos pases de cultivo, lo que asegura que mantengan su estado inicial.

En caso de necesitar cantidades importantes de una línea o trabajar con ella de forma continua durante un tiempo, es recomendable generar un pequeño *stock* de alícuotas de trabajo a partir de una alícuota del *stock* original, congelando nuevas alícuotas en los primeros pases de cultivo, que se irán descongelando y reponiendo a lo largo del trabajo por el mismo procedimiento antes indicado, de forma que se asegure que las células utilizadas son lo más parecidas posible a las originales. Si es posible y las células tras cultivo mantienen sus características originales, se podría reponer el *stock* original de estos primeros pases.

Algunas cuestiones de las tratadas en los apartados 4.1.A y 4.1.B del presente capítulo son aplicables a este epígrafe, como son el etiquetado y la identificación de muestras y los equipos de almacenamiento.

4.1.D. Fluidos

Las muestras pueden conservarse de diferentes maneras, lo que supone también diferentes condiciones de estabilidad y tiempos máximos permitidos diferentes para cada una de ellas. Las especificaciones que se deberían considerar óptimas quedan reflejadas en la Tabla I.

Más allá de cuatro horas después de la recolección, las muestras de plasma se pueden almacenar en el congelador a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta cuatro semanas y, si se congelan rápidamente a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$, hasta seis meses.

Las muestras congeladas con anterioridad a realizar la medición, deberían ser descongeladas de forma rápida a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su total licuación. Las muestras descongeladas deben mezclarse, suavemente, por inversión del tubo antes de realizar la medición.

La homogeneización inadecuada de las muestras congeladas después de la descongelación es una fuente de error muy común. Durante la descongelación se producen gradientes de concentración que van desplazándose desde las soluciones concentradas que primero funden hacia las capas inferiores por las paredes del recipiente. Por consiguiente, después de la descongelación la muestra deberá invertirse varias veces, evitando la formación de espuma, con especial atención a los materiales no disueltos, que serán disueltos por calentamiento suave si fuera necesario.

Como ya se ha expresado anteriormente, las muestras de líquidos biológicos se deben procesar antes de las dos horas. Las muestras destinadas a bioquímica se pueden centrifugar y separar de las células, en cuyo caso se pueden guardar durante 24 horas a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Algunas cuestiones de las tratadas en los apartados 4.1.A y 4.1.B del presente capítulo son aplicables a este epígrafe, como son el etiquetado y la identificación de muestras y los equipos de almacenamiento.

4.2. El respeto de los derechos de los pacientes durante la conservación de las muestras

4.2.A. Diferenciación entre muestras según su relación con un sujeto identificado o identificable

Dado que la muestra biológica es un soporte de toda la información genética del sujeto fuente, es necesario aplicar a su tratamiento los principios que corresponden según el derecho a la protección de datos de carácter personal.

A.1. Investigación con muestras anónimas o con muestras irreversiblemente disociadas

Es fundamental distinguir, por una parte, si se va a trabajar con datos anónimos o anonimizados y, por otra, si son atribuibles a personas. Son datos anónimos los que no se pueden asociar a una persona determinada, y son datos anonimizados los que, siendo de carácter personal, pasan a desvincularse absolutamente de un sujeto, o bien cuando obtener dicha asociación exija un esfuerzo no razonable, entendiéndose por tal el empleo de una cantidad de tiempo, gastos y trabajo desproporcionados. Estas categorías no están sujetas al régimen de protección de datos de carácter personal.

A.2. Investigación con muestras reversiblemente disociadas

Los principios de protección de los datos de carácter personal se aplican a “cualquier información concerniente a personas físicas identificadas o identificables” –artículo 3 de la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal (LOPD)–. Una persona es identificable cuando existe cualquier elemento que permite determinar directa o indirectamente su identidad física, fisiológica, psíquica, económica, cultural o social (artículo 1.5 del Real Decreto 1332/1994, de 20 de junio).

Así pues, cuando un dato se desvincula de la identidad del sujeto a través de un código y esta operación se puede realizar de manera inversa o, lo que es lo mismo, cuando subsiste la posibilidad de relacionar de nuevo el dato con la identidad sin que esta operación precise un esfuerzo no razonable en los términos antes aludidos, el dato es de carácter personal.

Las muestras reversiblemente disociadas (aquellas que no están directamente asociadas a un sujeto, sino que se identifican, por ejemplo, a través de un código) contienen datos de carácter personal, siempre que exista la posibilidad razonable de que, a través de este código, se pueda restablecer la identidad del sujeto fuente. Se debe llamar la atención sobre qué no es relevante a efectos de considerar un dato como reversiblemente disociado y, por lo tanto, sometido al régimen de datos de carácter personal, y quién es la persona capaz de llevar a cabo este proceso de reversión; es decir, aunque los datos no sean asociables a un sujeto por parte del investigador que los maneja, la posibilidad de que otra persona los consiga obliga a incluirlos en dicho régimen.

Se trata, por consiguiente, de dilucidar la cantidad de esfuerzo que se precisaría para restablecer las identidades a efectos de determinar si es o no “desproporcionado” y aplicar o no, en consecuencia, los principios de protección de datos.

Se ha de tener en cuenta que, según la legislación, un dato debe someterse al régimen de protección de datos de carácter personal cuando sea atribuible a un sujeto por parte de cualquiera, ya sea quien lo ha recabado (por ejemplo, el clínico), quien lo está utilizando (por ejemplo, el investigador) u otra persona.

4.2.B. Confidencialidad

El objetivo del tratamiento de muestras biológicas para investigación es llevar a cabo un análisis y obtener datos biomédicos de interés científico. Además, el uso de la muestra en sí genera una información de carácter personal: el hecho de que la muestra se ha obtenido, de que está almacenada, etc. Tanto sobre los datos que se obtengan del análisis como sobre todas las cuestiones relativas al uso o el procesamiento de la muestra, el sujeto fuente tiene un derecho al secreto que se plasma en una obligación de confidencialidad que obliga a cualquier persona que tenga acceso legítimo a la información.

La obligación de confidencialidad sobre la información del sujeto fuente está reconocida en normas generales, por ejemplo, en el artículo 10 de la LOPD, el artículo 10 de

la Ley General de Sanidad y el artículo 7.1 de la Ley 41/2002. Además, existen normas sectoriales relativas, por una parte, a la investigación y, por otra parte, a la donación de material biológico humano, que prevén particularmente esta obligación de confidencialidad.

Se debe añadir que la ruptura del deber de secreto puede representar incluso un delito, según los términos del artículo 199 del Código Penal.

De este modo, la regla general que debe guiar al profesional es el deber de secreto. En consecuencia, únicamente el sujeto fuente tiene derecho a que se le comuniquen los datos que se obtengan del análisis de las muestras.

Cuando esta información pueda tener interés para los familiares del sujeto, debe advertírsele sobre esta eventualidad en el momento de solicitar su consentimiento. Cuando se obtenga un dato que, a juicio del profesional, deba ser conocido por los familiares del paciente, es éste quien tiene el deber de comunicárselo.

Si el paciente se niega, sólo en situaciones muy excepcionales quedaría justificada la ruptura del deber de secreto por parte del profesional. Se trataría de supuestos en los que la omisión de la información podría causar un grave y evidente perjuicio al familiar.

4.2.C. Derecho a no saber

El reconocimiento del derecho a no saber surge para hacer frente a situaciones donde pueden producirse descubrimientos inesperados. Esta hipótesis es más frecuente en la investigación biomédica que en otras situaciones de diagnóstico clínico, en las que se parte de una sospecha acerca de una determinada enfermedad del paciente con carácter previo al análisis.

Este derecho cobra una especial trascendencia en la utilización de muestras biológicas para investigación y aparece reconocido en el Convenio de Derechos Humanos y Biomedicina del Consejo de Europa, según el cual: “Toda persona tendrá derecho a conocer toda la información obtenida respecto de su salud. No obstante, deberá respetarse la voluntad de una persona de no ser informada” (artículo 10.2); y en la Declaración Internacional de la UNESCO sobre Datos Genéticos Humanos: “Cuando se recolecten datos genéticos humanos, datos proteómicos humanos o muestras biológicas con fines de investigación médica y científica, en la información suministrada en el momento del consentimiento debería indicarse que la persona en cuestión tiene derecho a decidir ser o no informada de los resultados de la investigación. Esta disposición no se aplicará a investigaciones sobre datos irreversiblemente disociados de personas identificables ni a datos que no permitan sacar conclusiones particulares sobre las personas que hayan participado en tales investigaciones. En su caso, los familiares identificados que pudieran verse afectados por los resultados deberían gozar también del derecho a no ser informados” (artículo 10).

Por lo que se refiere a la legislación interna, el artículo 4.1 de la Ley 41/2002 señala: “Los pacientes tienen derecho a conocer, con motivo de cualquier actuación en el ámbito de su

salud, toda la información disponible sobre la misma, salvando los supuestos exceptuados por la Ley. Además, toda persona tiene derecho a que se respete su voluntad de no ser informada”; y en el artículo 9.1 se añade: “La renuncia del paciente a recibir información está limitada por el interés de la salud del propio paciente, de terceros, de la colectividad y por las exigencias terapéuticas del caso. Cuando el paciente manifieste expresamente su deseo de no ser informado, se respetará su voluntad haciendo constar su renuncia documentalmente, sin perjuicio de la obtención de su consentimiento previo para la intervención”.

Por consiguiente, cuando se solicite el consentimiento para participar en una investigación que implique el análisis de muestras biológicas se deberá preguntar previamente al interesado sobre su deseo de ser informado o no de los hallazgos sobre su salud, así como de las repercusiones sobre sus familiares, teniendo en cuenta que si la omisión de la información comporta un grave riesgo para la salud de aquél o la de éstos este derecho debe ceder.

Si el sujeto no manifestó su voluntad sobre esta cuestión, se deben considerar ciertos criterios coherentes con lo que se acaba de exponer, esto es, la gravedad de los riesgos que pudiera comportar la omisión de información para la salud del interesado o de sus familiares, y la existencia de medidas terapéuticas o preventivas. No hay obligación de comunicar cualquier otra información que no hubiese sido requerida previamente.

4.2.D. Derechos de acceso y rectificación

La garantía del ejercicio del derecho de acceso es fundamental cuando se admite la posibilidad de consentimiento para investigación científica de manera genérica y de consentimiento para cualquier cesión con estos fines. Gracias a la posibilidad que tiene el sujeto de conocer las circunstancias del uso y almacenamiento de la muestra y de conocer cualquier dato que se obtenga a partir de la misma, se asegura que conserva el control sobre su información personal.

El artículo 13 de la LOPD recoge el derecho de acceso del sujeto a sus datos almacenados y el artículo 18 de la Ley 41/2002 lo regula, en concreto, para la información contenida en la historia clínica.

El derecho de acceso se ejercita en relación con los datos obtenidos y a través de un documento que ofrezca un reflejo objetivo de la realidad, pero no necesariamente con la entrega de la muestra biológica.

Por otra parte, tras el acceso, el sujeto tiene derecho a que se rectifiquen sus datos de carácter personal que resulten inexactos. No deben entenderse como inexactos los datos que se están evaluando en el proceso de investigación científica.

4.2.E. Periodo de conservación

El periodo de conservación de la muestra y de los datos de carácter personal relacionados con ésta queda determinado por el cumplimiento de la finalidad que justificó su recogida.

La información previa al consentimiento del sujeto para que se utilicen sus muestras debería incluir la previsión sobre el periodo de almacenamiento. Sin embargo, es frecuente que no exista una fecha determinada, sobre todo en los casos en los que el destino de la muestra es un biobanco.

Teniendo en cuenta la finalidad de los biobancos, sería oportuno que jurídicamente se pudieran establecer periodos de conservación muy dilatados, y más allá de las finalidades concretas que justificaron la recogida, para que las muestras recopiladas a veces durante muchos años pudieran ser de utilidad. Con carácter prospectivo debería ser posible que, al informar al sujeto de los objetivos del biobanco, éste accediera a la conservación de la muestra por periodos muy dilatados y a su posible utilización en diferentes proyectos de investigación, manteniendo siempre la opción de acceso en cualquier momento a los datos que se obtengan y de revocación del consentimiento.

5. CIRCULACIÓN

5.1. Aspectos técnicos del transporte de muestras biológicas

Todos los que reciban o envíen muestras deben garantizar, como elementos básicos, las tres premisas siguientes:

- Identificación y garantía de trazabilidad de las muestras y solicitudes.
- Formación adecuada del personal que debe manipular y transportar las muestras para garantizar sus características originales.
- Definición de las condiciones de preparación, manipulación y transporte que requiere cada tipo de muestra.

5.1.A. Legislación aplicable

En Europa, la mayoría de los países utilizan las normas ADR (*Accord Dangereux Routier*) para el transporte por carretera de mercancías peligrosas. Para el transporte aéreo, las normas correspondientes y de obligado cumplimiento son las Instrucciones Técnicas de la ICAO (*International Civil Aviation Organization*), aunque se tiende a utilizar las Normas de Mercancías Peligrosas de la Asociación de Transporte Aéreo Internacional (IATA).

La IATA publica estas normas bianualmente (este capítulo se ha basado en la publicada el 1 de enero de 2005; la siguiente actualización, se publicará en enero de 2007). Pueden, además, encontrarse normas locales propias de cada país, cuya existencia se deberá comprobar antes de realizar los envíos.

Destaca la siguiente normativa:

1) Postal:

- *The Universal Postal Union (UPU). Manual of the Universal Postal Convention 1995.* Regulación detallada para el transporte de sustancias biológicas por correo.

2) Carretera:

- Acuerdo europeo sobre transporte internacional de mercancías peligrosas por carretera (ADR 2003).
- Real Decreto 2115/1998, de 2 de octubre, sobre transporte de mercancías peligrosas por carretera.
- BOE 7/2/2003, enmiendas propuestas por Portugal a los anexos A y B del Acuerdo europeo sobre transporte internacional de mercancías peligrosas por carretera.

3) Tren:

- Reglamento de Transporte Internacional por Ferrocarril de Mercancías Peligrosas (RID), publicado en el *Boletín Oficial del Estado* del 20 al 26 de agosto de 1986.
- Contrato de transporte internacional por ferrocarril de las mercancías (CIM o COTIF) (Berna, 9 de mayo de 1980), publicado en el *Boletín Oficial del Estado* de 18 de enero de 1986.
- Real Decreto 412/2001, de 20 de abril, por el que se regulan diversos aspectos relacionados con el transporte de mercancías peligrosas por ferrocarril.
- BOE 18-2-2003, enmiendas al Reglamento de Transporte Internacional de Mercancías Peligrosas por Ferrocarril (RID), anejo al Convenio relativo a los Transportes Internacionales por Ferrocarril (COTIF), adoptadas por la Comisión de Expertos del RID, en Praga el 23 de noviembre de 2001.

4) Avión:

- Instrucciones técnicas para la seguridad en el transporte aéreo de mercancías peligrosas de la Organización Internacional de Aviación Civil (ICAO). Asociación Internacional de Transporte Aéreo: IATA-DGR, Montreal, 2005.

5) Mar:

- Código Internacional de Transporte Marítimo de Mercancías Peligrosas (IMDG). *International Maritime Organization* (IMO), Londres, 1995.

La mayor parte de las muestras biológicas se transportan en avión por compañías de mensajería, excepto en los viajes muy cortos. Es preciso recordar, no obstante, que cada muestra suele transportarse por carretera al final del viaje aéreo, de modo que cada envío tendrá que cumplir las normas locales de transporte por carretera, que deberán comprobarse para cada envío. Las compañías de mensajería conocen dichas normas y podrán asesorar en cada caso.

Los EE.UU. poseen un conjunto de normas completamente distintas del resto del mundo. Sus normas son las 49 CFR, que significa Código de Normas Federales. Las 49 CFR cubren el transporte aéreo y aquel por carretera o autopista, aunque en la mayoría de los casos las normas 49 CFR son las mismas que las de la IATA. Este aspecto se debe tener en consideración si se desean enviar muestras a los EE.UU.

Es importante que las compañías de mensajería utilizadas establezcan buenas relaciones de trabajo con los centros y que su personal comprenda estas normas y las cumpla.

5.1.B. Envío de muestras

Se han de acordar con las mensajerías especializadas los tiempos y la forma de solicitud de los envíos con anticipación a la puesta en marcha del proyecto del que se trate, teniendo en cuenta que hay muestras que se deben enviar en el momento inmediatamente posterior a su extracción.

La mayoría de las compañías de mensajería solicitan un formulario o cualquier otro tipo de notificación formal, por escrito, que confirme los detalles del envío, cómo, cuándo y dónde deben recoger el envío, y dónde debe ser entregado.

Existen varios procedimientos que se deben seguir antes de que una muestra biológica esté preparada para su despacho. En primer lugar, es necesario identificar con exactitud qué es lo que se va a enviar.

Para el envío de las muestras es preciso tener en cuenta uno de los componentes esenciales del mismo, como es el acondicionamiento de la muestra; por ejemplo, el hielo seco se utiliza para mantener las muestras congeladas.

5.1.C. Identificación

Hay una gran variedad de mercancías peligrosas que se envían rutinariamente por todo el mundo, por lo que es preciso un código de reconocimiento en función de varios parámetros:

1) Clases según el tipo de peligro: las Naciones Unidas desarrollaron un sistema de división de todos estos productos en nueve clases según el tipo de peligro. Así, las muestras biológicas, si se estiman infecciosas, están comprendidas en la clase 6.2, que cubre todos los tipos de sustancias infecciosas. Existe otra clase relacionada con el envío de muestras, se trata de la clase 9 (“mercancías peligrosas diversas”). El hielo seco o dióxido de carbono sólido está clasificado como sustancia de clase 9.

2) Número UN: también deben clasificarse con un número UN, que es un número único de cuatro dígitos mundialmente reconocido. Por ejemplo, UN2814 representa “sustancia infecciosa que afecta a los humanos”, y es comprendido en cualquier parte (por ejemplo, el virus Ebola). Otro número que hay que reconocer es el UN3373, que cubre muestras de diagnóstico; es un nuevo número UN que se introdujo en 2003 y es el más utilizado en la investigación clínica.

3) Nombre correcto del envío: necesario para todas las mercancías peligrosas, es el texto oficial que se encuentra en las normas de mercancías peligrosas de la IATA junto con el número UN. Por lo tanto, para una muestra biológica infecciosa, la designación completa es “UN2814, sustancia infecciosa que afecta a los humanos”.

En las normas de mercancías peligrosas aparece un asterisco al final del nombre correcto del envío. Esto significa que tiene que incluir un nombre técnico adicional en el nombre correcto del envío. Este nombre puede ser un virus, bacteria o cualquier otro

término apropiado. El nombre correcto del envío completo es, por ejemplo, “UN2814 sustancia infecciosa que afecta a los humanos (virus Ebola)”.

5.1.D. Clasificación de las muestras para el envío

¿Cómo se sabe qué muestras biológicas se deben tratar como infecciosas y cuáles como muestras de diagnóstico? Esta distinción es muy importante porque los requisitos de etiquetado y documentación varían en función de la clasificación. Esta decisión afecta también a los costes de transporte y envío –generalmente, el envío de las muestras infecciosas es más caro que el de las muestras de diagnóstico, porque las precauciones que se han de tomar son mayores–; como también afecta a los cargos de flete y de manipulación.

Los ensayos clínicos y los estudios suelen contener muestras de diagnóstico o muestras infecciosas, y esta información se debe encontrar recogida y detallada en el protocolo, normalmente como apéndice, abarcando la recogida, la manipulación y el envío de las muestras. Esto se aplica al protocolo de estudio clínico, a la farmacocinética, la farmacodinámica, la genética, los tejidos y las muestras de seguridad.

La OMS desarrolló criterios concretos para clasificar muestras biológicas. Cada muestra se asignaba a un grupo de riesgo atendiendo a su posibilidad de infección dentro de la especie humana. Desde el 1 de enero de 2005, todas las muestras biológicas se clasifican como muestras infecciosas y deben ser asignadas a una de estas dos categorías:

- **Categoría A:** aquellas sustancias infecciosas que se transportan de forma que, cuando ocurra una exposición accidental, pueden causar incapacidad permanente, amenazan la vida u originan enfermedad fatal a humanos o animales. Existe una lista de sustancias que cumplen estos criterios dentro de la normativa de la OMS. Las sustancias infecciosas de este grupo se corresponden con el código UN2814, y el nombre correcto de este envío será “sustancia infecciosa que afecta a humanos”. Por ejemplo, hepatitis B (cultivos), VIH (cultivos), virus Ebola o virus Lassa.
- **Categoría B:** cualquier sustancia infecciosa que no cumpla los criterios para ser incluida en la categoría A. Las sustancias infecciosas de este grupo se corresponden con el código UN3373, y el nombre correcto de envío será “especimen clínico o espécimen de diagnóstico”. Por ejemplo, hepatitis B, VIH, CMV.

En el protocolo debe incluirse una frase similar a esta: “Las muestras de este estudio están clasificadas como sustancia biológica, categoría B. Para su envío, las muestras deberán ser empaquetadas y enviadas con el código UN3373, espécimen clínico o de diagnóstico”.

5.1.E. Empaquetado

El almacenamiento y el empaquetado correctos son de la máxima importancia para asegurar que las muestras mantengan su integridad y su valor para los trabajos de in-

investigación y desarrollo. Las cajas para el transporte de muestras biológicas tienen que cumplir determinadas normas. Han de ser resistentes a los golpes en caso de caída desde una cierta altura y también poseer otras características para asegurarse de que las muestras no se dañan ni se producen fugas en ellas durante el transporte. Deben soportar, además, cambios bruscos de temperatura y presión. Las que se usan de una forma más general se suministran habitualmente por los proveedores y empresas de transporte acreditadas. Deben cumplir también las normas de las Naciones Unidas.

Las cajas autorizadas tienen una marca UN impresa en ellas, y no es aceptable que esta marca vaya escrita en la caja. Si las cajas no tienen la citada marca, no se deberá hacer uso de ellas para los envíos de muestras infecciosas. La marca UN está constituida por varias partes:

- El logotipo UN.
- El código del tipo de paquete.
- La clase de mercancías para la que puede usarse.
- La fecha de fabricación más el código de la autoridad que realiza la prueba.
- El nombre o el logotipo del fabricante.

Las normas de empaquetado que se han descrito corresponden a las instrucciones del embalaje 602 y 650 de las Normas de Mercancías Peligrosas de la IATA.

Las cajas tienen distinto tamaño según la muestra que se quiere enviar. Existen, como mínimo, tres niveles de empaquetado: un recipiente primario, uno secundario y un paquete exterior. Todos los paquetes interiores deben poseer material absorbente para recoger la muestra en caso de fuga o accidente durante el transporte. También debe actuar como material protector. El material protector puede ser gomaespuma, algodón o plástico de burbujas. El material absorbente podría ser también algodón u hojas absorbentes especiales. También llevan una tapa aislante que se coloca encima de las muestras.

Muchas veces se utiliza un nivel adicional cuando se coloca una caja dentro de otra con la finalidad de dejar espacio para el hielo seco.

Se examinará ahora un ejemplo de cómo empaquetar una muestra biológica:

- Colocar en una gradilla los tubos individuales que contienen las muestras.
- Distribuir uniformemente las muestras en la gradilla.
- Colocar la tapa y el material absorbente alrededor y fijarla con una goma elástica.
- Poner la gradilla y su protección en una bolsa de plástico –una bolsa por gradilla–.
- Sacar el exceso de aire.
- Cerrar la bolsa. La bolsa cerrada se puede introducir ahora en la caja exterior.
- Puede haber soportes alrededor de la gradilla que proporcionan espacio para el hielo seco.
- Disponer una hoja de relleno (protectora/absorbente) en la parte superior.
- Introducir todos los documentos del envío en la parte superior de la caja.
- Cerrar y sellar la tapa de la caja interior y exterior en la secuencia correcta.

A la hora de preparar el paquete se debe tener en cuenta que el hielo seco es un refrigerante de uso muy generalizado, pero también es una sustancia peligrosa que agota el oxígeno del aire y que puede causar mareo y otros síntomas. También es muy frío y quema cuando entra en contacto con la piel. Se deben llevar siempre guantes térmicamente aislados cuando se maneje hielo seco.

El hielo seco se ha de distribuir uniformemente alrededor de la caja. La cantidad de hielo seco necesaria depende del volumen del envío, de la duración del viaje puerta a puerta, incluida la previsión de cualquier retraso, y las condiciones de temperatura que es probable que se encuentren en ruta.

Por lo general, las compañías de mensajería pueden informar sobre la cantidad de hielo seco que hace falta cuando se requiere para el envío.

En otro ejemplo, para una muestra de tejido/biopsia, al igual que con todos los otros paquetes, existen tres niveles: primario, secundario y exterior. En este caso, los pasos específicos serán los siguientes:

- Colocar la tapa o tapas deslizantes en la caja de plástico que contiene la muestra.
- Cerrar la tapa deslizante y ponerla en el contenedor exterior, añadiendo material protector alrededor de los costados para mantenerla en su lugar.
- Introducir la gomaespuma de protección en la parte superior antes de cerrar la caja.
- Cerrar bien el contenedor.
- Disponer el contenedor en la caja UN y añadir los documentos del envío.
- Sellar la caja para poder colocarla en una caja mayor aislante con hielo seco.
- Añadir el hielo seco y distribuirlo uniformemente alrededor.
- Colocar la tapa de aislamiento y cerrar la caja.

5.1.F. Etiquetado

Los requisitos de marca y etiquetado para muestras biológicas son distintos según se trate de muestras de diagnóstico o de sustancias infecciosas. En muchos envíos, es el representante de la compañía de mensajería quien completa todas las marcas y el etiquetado. En otras circunstancias es responsabilidad del remitente hacerlo. Es importante que esto se haga correctamente porque, si se produce algún error, la muestra quedará detenida en alguna etapa de su transporte y esto retrasará el envío, poniendo en peligro la integridad de la muestra.

¿Qué información debe ir en una caja que contenga una muestra de diagnóstico empaquetada con hielo seco? En primer lugar, el/los nombre/s completo/s y dirección del remitente y del destinatario.

Se incluirá un rombo con el código “UN3373”, junto con el nombre: “muestra para diagnóstico o muestra clínica” (*Diagnostic specimen/Clinical specimen*). Esta información puede estar preimpresa en la caja. Se debe pegar además, o asegurarse de que lo hace la compañía de mensajería, una etiqueta de mercancías peligrosas diversas “clase 9” para tener en cuenta el hielo seco, que se considera una sustancia peligrosa.

En la caja debe aparecer el nombre del envío correcto (hielo seco o dióxido de carbono, sólido) y “UN1845”. Asimismo, la persona que realiza el envío o la compañía de mensajería tiene que escribir en la caja o en la etiqueta de clase 9 el peso neto del hielo seco: “UN1845, hielo seco 10 kilos” y “muestras de diagnóstico empaquetadas conforme a las instrucciones de empaquetado 650 de la IATA”.

¿Qué ocurre si se trata de una muestra infecciosa con hielo seco? Para las muestras infecciosas, además del nombre completo y la dirección del remitente y del destinatario, se debe incluir el nombre y el número de teléfono de una persona responsable; ésta puede encontrarse en cualquier lugar (es preferible que se encuentre en el lugar de destino o dentro de la misma franja horaria, ya que se pondrán en contacto con él/ella en caso de que surja algún problema con el envío).

Asimismo, deberá figurar el número “UN2814” y el nombre correcto del envío “sustancia infecciosa que afecta a los humanos”, junto con el nombre técnico entre paréntesis.

Se ha de añadir la cantidad neta total de la sustancia infecciosa (por ejemplo, 10 mL). Se debe señalar, asimismo, el código “UN1845, para cubrir el hielo seco/dióxido de carbono sólido (hielo seco 10 kilos)”. A la caja hay que fijar dos etiquetas: la etiqueta de sustancia infecciosa “clase 6.2” y la etiqueta de mercancías peligrosas diversas de clase 9, junto con la cantidad neta de hielo seco. Es frecuente también que vayan preimpresas en la caja dos etiquetas de orientación, pero si no es así se deben añadir antes del envío.

5.1.G. Documentación para el envío de mercancías peligrosas

El documento principal para el envío de mercancías peligrosas es la Declaración de Expedidor de Mercancías Peligrosas, cuyos apartados deberán completarse.

La Declaración del Expedidor sólo es necesaria para muestras biológicas clasificadas como sustancias infecciosas. Por lo tanto, no se requiere para muestras biológicas clasificadas como muestras de diagnóstico, aunque estén empaquetadas en hielo seco. La declaración se prepara por anticipado y, posteriormente, se incluye en el envío. En otras circunstancias, es la compañía de mensajería la que debe entregar las declaraciones previamente preparadas (preimpresas con la información básica). Sólo hay que añadir uno o dos textos breves de información específica inmediatamente antes del envío.

La Declaración del Expedidor es el único documento necesario para cumplir con las normas relativas a mercancías peligrosas. Sin embargo, se requieren otros documentos para los procedimientos aduaneros. En todos los envíos internacionales, las mercancías deben ir acompañadas de una factura proforma de la muestra. Y, adicionalmente, todos los envíos han de incluir un inventario del contenido.

5.1.H. Aspectos particulares para cada tipo de muestra

Procesar y analizar las muestras lo antes posible ha de ser la finalidad principal de todo laboratorio. En la actualidad, debido a la concentración de laboratorios y a que al-

gunas determinaciones sólo se realizan en laboratorios específicos, las muestras se deben transportar de unos laboratorios a otros. Se ha de tener presente que el transporte se puede realizar mientras se garantice que el resultado obtenido es el mismo que el de la muestra en el momento de la obtención. Por este motivo, se deben valorar una serie de consideraciones generales que son aplicables a todas las muestras. Las características específicas para cada tipo de muestra se exponen en los siguientes apartados.

H.1. Tejidos

A continuación, se describe el procedimiento adicional que deberá cumplirse para el envío de tejidos. Para el empaquetado y transporte se seguirá lo descrito anteriormente, con los requisitos adicionales descritos a continuación.

H.1.1. Transporte de tejidos

El transporte de tejidos desde el banco hasta el centro de destino se efectuará:

- A través de medios adecuados de transporte terrestre ordinarios.
- Mediante un sistema con capacidad para mantener las adecuadas características del tejido. Estos sistemas y condiciones de traslado los establecerá el banco según el tipo de tejido que se quiere trasladar.

Se acompañará de la siguiente información para su identificación:

1) Un etiquetado exterior en el que figure:

- Tejido: tipo de tejido humano.
- Procedencia y destino del paquete.
- Nombre de los responsables del envío y de la recepción, con sus direcciones y teléfonos.
- Día y hora de salida del banco.
- Instrucciones de transporte.

2) La documentación que obligatoriamente deberá acompañar el envío será:

- Descripción de las características del tejido y de las soluciones de preservación.
- Relación de las pruebas efectuadas.
- Instrucciones, en su caso, para la descongelación y la utilización.
- Código del banco que permita el seguimiento de los tejidos enviados.

H.2. ADN y ARN

Una vez adjudicadas ciertas muestras a un equipo de investigación, en el caso del ADN es más aconsejable enviar el material descongelado. Se deben descongelar poco a poco, pasando primero el tubo de -80 °C a 4 °C y luego a temperatura ambiente. Se toma una pequeña alícuota del tubo del ADN madre y se coloca en otro tubo bien etiquetado para su transporte a temperatura ambiente. El tiempo de transporte se recomienda que no exceda de las 72 horas. En el caso del ARN, se aconseja

seja transportarlo congelado mediante agentes crioprotectores y con inhibidores de RNAsas.

En cuanto al transporte de las muestras, desde el lugar de la extracción hasta el laboratorio, se deben tener en cuenta las siguientes consideraciones: el ADN es bastante estable y no es muy problemático el envío de cualquier muestra para la extracción del mismo y el posterior estudio. Se ha de enviar preferentemente –eso sí, en el mismo día de la extracción– en un servicio de 24 horas al laboratorio de referencia.

Las muestras de sangre fresca y de aspirados de médula se enviarán anticoaguladas y pueden viajar por correo, sin ningún problema, a temperatura ambiente si no hace mucho calor; si no es así, se enviarán refrigeradas. En caso de que no se pueda mandar en el día, se aconseja mantener la muestra en la nevera hasta unas 72 horas como máximo. Y, si aun así no es posible enviarla, se puede congelar a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ y, cuando se pueda, se enviará congelada. Si se congela la muestra, se ha de tener en cuenta la precaución de cambiar previamente la sangre del tubo de extracción (generalmente de cristal) a un tubo de plástico (polipropileno) que aguante la congelación (el cristal puede estallar al congelarlo). De todas formas, es recomendable, además, realizar alícuotas por precaución.

Las muestras de sangre seca se mandan en sobres por correo ordinario, así como las muestras de raíces de cabello, sólo que en este último caso no se puede demorar la extracción del ADN de la raíz más allá de una semana.

Con respecto a las muestras de tejido sólido, se deben guardar las mismas precauciones que con las muestras líquidas. Las muestras parafinadas se envían en el día y a temperatura ambiente; deben llegar en menos de 24 horas al laboratorio de referencia (es preferible, por lo tanto, utilizar una mensajería). Las muestras de tejido en fresco para extracción de ADN, por ejemplo las vellosidades coriales, se envían suspendidas en suero fisiológico estéril y se deben recibir en menos de 24 horas, como ya se ha comentado previamente. Las muestras congeladas se envían en nieve carbónica.

El ARN mensajero, en cambio, es muy lábil y las condiciones para su envío, **al igual que para la extracción, deben ser muy estrictas**. Lo realmente óptimo para una prueba de ARN es procesar la muestra en un tiempo inferior a 30 minutos desde su obtención, si bien en el caso de tejidos líquidos se puede extraer el ARN de forma aceptable, aunque hayan pasado 24 horas, siempre que la muestra esté a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Sin embargo, hay que tener presente que, a medida que pasa el tiempo desde la extracción, disminuyen las posibilidades de obtener una buena muestra.

En el mercado cada vez existen más tubos con reactivos estabilizadores del ARN que posibilitan el mantenimiento de la muestra, sobre todo de sangre periférica, a temperatura ambiente durante unos días, lo que ha facilitado enormemente el trabajo para su transporte (por ejemplo, se pueden mandar por correo ordinario en sobres acolchados). Pero, para las muestras de tejidos (por ejemplo, un tumor), si no se pueden procesar en el momento, es importante congelar el tejido inmediatamente después de la extracción, a poder ser con un agente crioprotector –como por ejemplo, el DMSO al 10%– y enviarlas en nieve carbónica por mensajero.

H.3. Células

Sobre su transporte, se deben seguir las recomendaciones de las muestras de tejido sólido para la determinación de ADN.

H.4. Fluidos

Hay unas consideraciones generales para el transporte de fluidos:

- Las muestras de sangre total tienen una caducidad bastante rápida.
- Las muestras de plasma y suero se han de separar lo antes posible de las células.
- Se recomienda que la separación se realice antes de las dos horas.
- Se deben mantener el mínimo tiempo posible las muestras en el área de extracción.

H.4.1. Temperatura

- No todas las propiedades biológicas se deterioran con la misma rapidez.
- La temperatura de conservación y transporte de la muestra influye mucho en algunas propiedades biológicas de las muestras.
- Algunas veces se deben hacer alícuotas de las muestras debido a que de la misma muestra hay determinaciones que han de conservarse a distintas temperaturas.
- En general, existen tres temperaturas de transporte: temperatura ambiente (entre 18 y 25 °C), temperatura de refrigeración entre (4 y 8 °C), y temperatura de congelación (inferior a -18 °C).

H.4.2. Otras consideraciones

- Se recomienda que los tubos se transporten en posición vertical.
- Se deben evitar los movimientos bruscos y la agitación excesiva durante el transporte.
- La presión atmosférica también puede influir en las muestras.
- Se debe evitar el contacto directo con la luz, ya que altera algunas propiedades biológicas.
- Las muestras destinadas al examen de factores lábiles se deberían transportar al laboratorio tan rápidamente como fuese posible. Se debe garantizar que el transporte de estas muestras se realice en un tiempo máximo de cuatro horas, y que su temperatura se mantenga entre 8 y 25 °C.

Para la detección de muestras en malas condiciones es conveniente tener en cuenta las siguientes recomendaciones:

- Se observará cada tubo primario para confirmar que se ha llenado con un volumen adecuado. Los tubos obtenidos con exceso o defecto de sangre motivan una desproporción del agente anticoagulante, lo que conduce a resultados erróneos. El anticoagulante usado, su concentración, su relación con la sangre y la manera en la que la muestra es recolectada y procesada influyen de forma importante sobre los resultados.

- Deben desecharse todas las muestras hemolizadas (la hemolisis activa la coagulación), así como aquellas en las que se observen señales de coagulación (microcoágulos). Los resultados en estas muestras no son fiables en absoluto.
- Es necesario recordar que las poliglobulinas y las anemias importantes pueden producir resultados alterados de forma errónea, como consecuencia de la desproporción citrato/plasma, si no se ha previsto y, en consecuencia, modificado previamente.

5.2. La regulación jurídica de la importación y la exportación de muestras

La entrada y la salida de España de muestras biológicas para el diagnóstico o la investigación en humanos está regulada por el Real Decreto 65/2006, de 30 de enero, por el que se establecen requisitos para la importación y la exportación de muestras biológicas, que necesitan la autorización previa de la Dirección General de Salud Pública que se encuentra al final de su proceso de tramitación. El ámbito de aplicación de este real decreto se refiere a las muestras destinadas al diagnóstico o la investigación en seres humanos. La redacción literal no es suficientemente clara a efectos de entender si su aplicación se extiende a muestras biológicas para la investigación *in vitro*. No obstante, es la regulación más cercana sobre esta cuestión.

Dicha norma se aplica a cualquier material humano o de otra procedencia, patógena o no, que se destine al diagnóstico o a la investigación en humanos, excluyéndose de la misma los productos cuya importación y exportación está regulada en una normativa específica (por ejemplo, las materias primas destinadas a la elaboración de medicamentos o productos sanitarios, los medicamentos y los productos sanitarios, cosméticos y biocidas de uso clínico o personal).

Este Real Decreto habilita, como puntos fronterizos para la entrada y la salida de muestras, Barcelona, Bilbao, Madrid, Sevilla, Valencia y Málaga, y define los requisitos que se exponen a continuación.

5.2.A. Entrada

La solicitud de importación se debe presentar en la Dirección General de Salud Pública indicando el tipo de muestra que se desee.

A tales efectos, se acompañará de la siguiente documentación:

- Constatación de que existe un beneficio probado de la utilización de dicho tejido en el caso de tejidos procesados por técnicas no existentes en España.
- En el caso de tejidos que se procesen por técnicas existentes en España, cuando se comprueba la ausencia de disponibilidad de dichos tejidos en los bancos nacionales.

A tales efectos, se acompañará de la siguiente documentación:

- Una certificación sanitaria de origen en la que la autoridad competente en origen identifique el envío, especificando sus características y el posible riesgo sanitario si lo hubiere.
- Un documento de responsabilidad en el que el destinatario del producto se responsabilice de su correcta utilización y destrucción.
- Una acreditación de la actividad del importador. El importador debe estar suficientemente acreditado en función de su actividad y cumplir con la normativa de seguridad laboral aplicable a estos productos.
- Los envíos deberán cumplir las normas de transporte, embalaje, etiquetado y documentación que estipulan las normas nacionales e internacionales.
- Un modelo de despacho que después firmará el inspector de la aduana.

5.2.B. Salida

El interesado ha de presentar una declaración a la Dirección General de Salud Pública en la que figure la información necesaria para identificar la muestra y su destino. Se debe cumplir la normativa internacional de transporte aplicable a este tipo de muestras.

Cuando la autoridad sanitaria de destino exija un certificado sanitario de origen, éste se solicitará a la Dirección General de Salud Pública.

B.1. Transporte de material potencialmente peligroso

Se requiere que, en el transporte de las muestras biológicas, se observe lo dispuesto en las reglamentaciones nacionales e internacionales al respecto (ver apartado 5.1.D de este capítulo).

B.2. Registro de importadores y exportadores

Los importadores y exportadores que efectúen operaciones de importación o exportación de muestras al menos una vez al trimestre tienen la opción de darse de alta en un Registro de Importadores y Exportadores que se crea en el Ministerio de Sanidad y Consumo, dependiendo de la Dirección General de Salud Pública, gestionado por la Subdirección General de Sanidad Exterior. La inscripción en el registro exceptúa de la obligación de presentar caso por caso la certificación de la autoridad sanitaria de origen para llevar a cabo importaciones y habilita a los exportadores a obtener de forma automática el certificado sanitario de origen cuando éste sea exigido por la autoridad sanitaria de destino, determinando un tipo de productos y un periodo de tiempo en el que se efectúan las operaciones de importación y exportación.

Las instituciones o empresas que pretendan estar incluidas en dicho registro como importadores deben aportar:

- El documento de la autoridad sanitaria competente en el país de origen o de los centros autorizados a tal efecto que certifique que el centro expedidor cuenta con la autorización sanitaria para la manipulación y exportación de muestras, especificando el tipo de muestras para el que está autorizado.

- Un certificado de la autoridad sanitaria de la comunidad autónoma donde desarrolla su actividad en el que se indique que cuenta con los medios adecuados para la manipulación y la posterior destrucción del producto una vez utilizado y el tipo de muestras para el que están autorizados.
- En el caso de donantes de progenitores hematopoyéticos y bancos de sangre de cordón umbilical de países no pertenecientes a la UE reconocidos por la Asociación Mundial de Donantes de Médula (WMDA), así como en la búsqueda de donantes no emparentados, basta para la inscripción en el registro la aportación por la Organización Nacional de Trasplantes de una relación de los centros que realizan esa función y se encuentran acreditados para ello.

Las personas físicas o jurídicas están incluidas en dicho registro como exportadores y deberán presentar el certificado de la autoridad sanitaria competente dirigido a la Dirección General de Salud Pública, en el que se indique que cuenta con los medios adecuados para la obtención y la manipulación de las muestras, así como su adecuado envasado y transporte.

Los importadores y exportadores incluidos en dicho registro deberán renovar la inscripción cada cinco años y actualizarla cuando exista una modificación en el tipo de muestra a importar o exportar.

Las personas físicas o jurídicas inscritas en el registro únicamente tendrán que citar en las solicitudes de importación o exportación su número de inscripción en el registro y aportar la documentación que identifica las muestras.

5.3. Cautelas sobre el tratamiento de datos de carácter personal en la transferencia internacional de muestras biológicas identificadas o identificables

Por transferencia internacional de datos se entiende la transmisión de los mismos fuera de los Estados miembros de la Unión Europea y de los países que hayan suscrito el Convenio del Espacio Económico Europeo. La transmisión de información en el ámbito de dichos países no se considera transferencia internacional de datos, sino que se debe calificar como una mera cesión o comunicación de datos cuyo régimen jurídico es idéntico al de las que tengan lugar dentro del territorio nacional.

El fundamento jurídico de esta distinción consiste en que en el Espacio Económico Europeo existe un sistema armonizado de protección de los datos personales, de forma que puede concluirse que los países integrados en aquéllos ofrecen un nivel de protección adecuado o equiparable.

Las transferencias internacionales de datos que, como se ha señalado, son las transmisiones de información a terceros países que no garantizan dicho nivel de protección pueden presentar dos modalidades distintas: la cesión o comunicación de datos a terceros países o la prestación de servicios –en terceros países, como por ejemplo, el mero alojamiento de los datos– por cuenta de los responsables de ficheros establecidos en el territorio español.

La realización de transferencias internacionales de datos a terceros países que no dispongan de un nivel de protección equiparable al europeo constituye una de las principales preocupaciones de las autoridades nacionales y europeas de protección de datos. Esta preocupación se justifica porque, a partir del momento en que los datos personales se transfieren a terceros países sin un nivel de protección equivalente, las posibilidades de que se realicen tratamientos de datos sin garantías se multiplican exponencialmente.

Por esta razón, existe una especial sensibilidad respecto de dichas transferencias internacionales. Ahora bien, siendo conscientes de que en un mundo globalizado es necesaria la transmisión internacional de la información, se han buscado desde la perspectiva proteccionista europea procedimientos que permitan realizarlas con las garantías adecuadas.

La realización de transferencias internacionales de datos parte de la premisa básica de que el responsable de un fichero que pretende realizarlas ha de cumplir, en origen, las exigencias de la Ley Orgánica de Protección de Datos de Carácter Personal (LOPD). Es decir, el exportador de los datos debe cumplir las garantías establecidas en dicha norma.

Pero, además, el importador de los datos personales –la persona o entidad ubicada en el tercer país que no disponga de un sistema de protección equiparable al del lugar desde donde se transmiten los datos– debe contar con mecanismos que garanticen dicho nivel de protección adecuado o uno equivalente.

La prestación de tales garantías debe ser autorizada, como regla general, por la Agencia Española de Protección de Datos (AEPD). No obstante, la exigencia de esta autorización queda exceptuada en los supuestos previstos legalmente, entre los que consta el que el afectado haya dado su consentimiento inequívoco (e informado) a la transferencia prevista.

La Ley también permite las transferencias internacionales de datos en otros dos supuestos:

- Cuando la transferencia sea necesaria para la ejecución de un contrato entre el afectado y el responsable del fichero o para la adopción de medidas precontractuales adoptadas a petición del afectado.
- Cuando la transferencia sea necesaria para la celebración o ejecución de un contrato celebrado o por celebrar, en interés del afectado, por el responsable del fichero y un tercero.

Sin embargo, estas dos excepciones no resultan operativas cuando los datos objeto de tratamiento son datos especialmente protegidos, como es el caso de los datos genéticos, que se deben considerar como datos de salud.

Esta conclusión se apoya en que, en el tratamiento de dichos datos, la LOPD (artículo 7) sólo admite dos supuestos de legitimación: el consentimiento expreso del afectado o la habilitación en una norma con rango de ley.

Cuando no concurre alguna de las excepciones señaladas, la transferencia de datos a países que no garanticen un nivel adecuado o equivalente de protección exige la autorización del director de la AEPD.

Dicha autorización se puede conseguir sólo si se obtienen las garantías adecuadas, cuya evaluación se realizará por el director de la agencia, atendiendo a todas las circunstancias que concurren en la transferencia y, en particular, tomando en consideración: la naturaleza de los datos; la finalidad y la duración de los tratamientos de la información previstos; el país de origen y de destino final de los datos; las normas de derecho, generales o sectoriales, vigentes en el país tercero de que se trate; el contenido de los informes de la Comisión de la Unión Europea; así como las normas profesionales y las medidas de seguridad en vigor en dichos países.

Si se prestan garantías que cumplan los criterios expuestos, el director de la AEPD podría autorizar una transferencia internacional a cualquier país que se solicite.

No obstante, la necesidad creciente de efectuar transferencias internacionales de datos a países que no ofrecen un nivel de protección adecuado ha determinado que se hayan desarrollado procedimientos más estandarizados que permiten prestar tales garantías y facilitar los flujos internacionales de datos.

En este sentido, se han desarrollado los mecanismos que a continuación se detallan:

1) Transferencias a estados respecto de los cuales la Comisión Europea ha adoptado una decisión y ha declarado la existencia de un nivel adecuado de protección: en esta situación se encuentran Suiza (Decisión de la Comisión de 26 de julio de 2000), Canadá en determinados aspectos (Decisión de la Comisión de 20 de diciembre de 2000), la República Argentina (Decisión de la Comisión de 30 de junio de 2003), Guernsey e Isla de Man (Decisiones de noviembre de 2003 y abril de 2004).

No obstante, debe tenerse en cuenta que periódicamente la Comisión Europea evalúa si se mantienen las condiciones que permitieron adoptar la decisión de adecuación, pudiéndose –al menos en hipótesis– producir una revocación de la misma. Estas decisiones amparan la transferencia a cualquier persona o entidad, pública o privada, ubicada en dicho país.

2) Modalidades específicas de transferencia internacional amparada en decisiones de la Comisión Europea que tienen por destinatario a personas o entidades ubicadas en los EE.UU. (Decisión de 26 de julio de 2000 sobre los principios de puerto seguro): la peculiaridad de esta decisión afecta a dos aspectos. En primer lugar, no ampara la transferencia internacional dirigida a cualquier persona o entidad ubicada en los EE.UU., sino sólo las dirigidas a quienes, estando en dicho territorio, adoptan voluntariamente las garantías contempladas en el acuerdo de puerto seguro. En segundo lugar, esta decisión tiene la peculiaridad de que quienes efectúen dicha aceptación voluntaria del acuerdo han de suscribir no sólo los principios genéricos del mismo, sino también las denominadas FAQ. Las FAQ han de considerarse aclaraciones específicas que concretan los principios generales del acuerdo

que, por su indeterminación, ha suscitado preguntas y respuestas específicas sobre los mismos.

3) Otra posibilidad de realizar transferencias internacionales de datos es la que se basa en la suscripción por parte del exportador y del importador de los datos, de cláusulas contractuales que garanticen un nivel de protección adecuado en el tratamiento de la información personal: en este caso, el nivel de protección adecuado no se refiere a un país, sino sólo a las personas o entidades específicas que suscriben las cláusulas contractuales.

Dentro de esta modalidad se incluyen dos supuestos distintos:

- Las cláusulas contractuales para garantizar las transferencias entre dos responsables del fichero o tratamiento: exportador en España e importador en un tercer país sin nivel de protección adecuado (Decisión de la Comisión 2001/487/CE, de 15 de junio de 2001, modificada el 27 de diciembre de 2004).
- Las cláusulas contractuales entre un responsable del fichero o tratamiento ubicado en España y un prestador de servicios –encargado del tratamiento– ubicado en un tercer país que no garantiza el tantas veces mencionado nivel de protección adecuado (Decisión de la Comisión 2002/16/CE, de 27 de diciembre de 2001).

La normativa de protección de datos y las decisiones que se han mencionado prevén la posibilidad de suspender las transferencias internacionales de datos, previa audiencia del exportador, cuando concurra alguna de las siguientes circunstancias:

- Las autoridades de protección de datos del estado importador o cualquier otra autoridad competente en caso de no existir las primeras resuelven que el importador ha vulnerado las normas de protección de datos establecidas en su derecho interno.
- Existen indicios razonables de que se están vulnerando las normas o, en su caso, los principios de protección de datos por la entidad importadora de la transferencia, y que las autoridades competentes en el estado donde se encuentra el importador no han adoptado o no van a adoptar en el futuro las medidas oportunas para resolver el caso en cuestión, habiendo sido advertidas de la situación por la AEPD. En este caso, se podrá suspender la transferencia cuando su continuación pudiera generar un riesgo inminente de grave perjuicio a los afectados.

6. CESIÓN DE MUESTRAS PARA OTROS INVESTIGADORES

6.1. Usos de las muestras para investigación

La herramienta más útil para optimizar el uso de la muestra en investigación es la estructura de un biobanco. Los biobancos de una red tienen en común las siguientes características organizativas:

- El biobanco depende de un **servicio hospitalario o de un centro de investigación** cuya ubicación dependerá de la naturaleza de las muestras, de las cuales es depositario y responsable tras su obtención.
- Un **director o coordinador técnico**, responsable del funcionamiento científico del banco, incluyendo el estudio macroscópico, así como la selección y toma de muestras de especímenes quirúrgicos.
- Un **personal técnico** responsable del procesamiento, almacenamiento y conservación de las muestras.
- Un **presupuesto, espacio y equipamiento** adecuados para la actividad del biobanco.
- La adopción de un **protocolo de trabajo estandarizado** que asegura el cumplimiento de los requisitos ético-legales en el manejo de muestras, la correcta manipulación y el almacenamiento de los especímenes, así como su adecuada distribución y uso para investigación.
- El compromiso de **acción cooperativa** entre los bancos de la red. Implica la interconectividad informática regional y nacional, así como la disposición a compartir muestras regional y nacionalmente. La interconectividad informática se detalla en el capítulo IV.

Las muestras almacenadas en un banco de ADN y ARN pueden servir para numerosos trabajos de investigación. La cesión para un determinado proyecto de investigación debe estar bien cuidada tanto en el tipo de muestra de que se trate (anónima o no) como en el tipo de consentimiento informado que la persona donante o el paciente hayan realizado. En una palabra, para cualquier cesión o transferencia de ADN/ARN por parte del banco, deberá existir un contrato entre los responsables del banco y el equipo de investigación del proyecto que se quiere realizar.

6.2. Gestión de las peticiones de material

Es cada vez más frecuente que se establezcan relaciones de colaboración entre las instituciones que gestionan colecciones de muestras o biobancos; por esta razón, es importante disponer de un sistema adecuado de intercambio y de cesión de muestras.

La gestión de las muestras (obtención, procesamiento, conservación y distribución) se realizaría en cada hospital o centro de investigación. El nodo de coordinación de la red (si ésta existe), además de gestionar su propio biobanco, es habitualmente el encargado del dispositivo central de información de la red de biobancos, para lo que recibiría las actualizaciones de datos de los bancos o colecciones locales mediante los dispositivos informáticos (registros locales) que, al efecto, incorporaría el sistema de información de la red y de la gestión, así como la coordinación de las solicitudes de material que a ella se dirijan. Los bancos o colecciones de cada centro deberían tener autonomía para la gestión de sus muestras con el compromiso de ceder material en caso de requerirse para solicitudes no asumibles por otro banco o colección local. El nodo de coordinación de la red debe velar por la participación de todos los bancos en la cesión de material.

Habitualmente, cualquier investigador perteneciente a una red de trabajo podrá solicitar muestras al banco o a la unidad de coordinación de una red cooperativa. Aunque para cada banco los requisitos pueden cambiar, éstos incluyen que el proyecto tenga viabilidad científica, técnica y ética. Para ello, se suele enviar con la solicitud una me-

moria explicativa del proyecto, que se somete a una evaluación anónima por pares. Esta última no es necesaria si se trata de un proyecto que cuenta ya con la aprobación de la Agencia Nacional de Evaluación y Prospectiva (ANEP) u otra agencia nacional de evaluación. En el caso de que la solicitud se haga al nodo coordinador de una red cooperativa, será responsabilidad del mismo localizar en la base de datos un número suficiente de casos que reúnan las características previstas en el proyecto, así como su envío al equipo investigador. Además, será preciso lógicamente el informe favorable del Comité Ético de Investigación Clínica (CEIC) correspondiente.

En el sistema informático de cada banco debe quedar constancia de las solicitudes recibidas, del curso que han seguido y del resultado obtenido (aprobada, rechazada). Asimismo, debe quedar un registro de las transacciones realizadas con las muestras, del destino que han tenido, así como de su uso, para asegurar una perfecta trazabilidad de cada muestra.

La oficina central de una red cooperativa puede emitir documentos para avalar la disponibilidad de cierto tipo de muestras con el fin de lograr financiación de cualquier agencia de investigación, aunque el envío de muestras no tendrá lugar mientras no se cumplan los requisitos expresados en el párrafo anterior.

Por los mismos fundamentos jurídicos, tampoco podrá cobrarse una contraprestación cuando se cedan las muestras a otros investigadores, pero sí podrá exigirse el pago de los gastos de transporte y conservación de la muestra.

6.3. Aplicación de los principios de protección de datos de carácter personal en la cesión de las muestras

La cesión de las muestras es su transferencia a una persona distinta de aquella que se encargó de la obtención. El artículo 7 de la LOPD prevé que el tratamiento de los datos de carácter personal relativos a la salud, que incluye la cesión de los mismos, se lleve a cabo con consentimiento expreso, salvo los casos previstos en la Ley.

El consentimiento expreso para la cesión de datos de carácter personal relativos a la salud es preciso incluso cuando la misma tenga fines históricos, estadísticos o científicos. En efecto, a pesar de las excepciones previstas para el régimen general de tratamiento de datos, según las cuales no se precisa consentimiento expreso cuando se traten datos con aquellas finalidades (artículo 11 de la LOPD), se ha de tener en cuenta que los datos relativos a la salud son objeto de un régimen específico, que es el establecido en el artículo 7.

Así pues, cuando una muestra donada para investigación vaya a ser cedida por parte de quien la recibió (un investigador o un biobanco) a un tercero, se debe recabar el consentimiento expreso previo del sujeto fuente.

Ahora bien, no parece que existan argumentos jurídicos para descartar que el sujeto pueda otorgar un consentimiento general para cualquier cesión siempre que tenga por objeto la utilización de la muestra con la misma finalidad que la que justificó el consentimiento que pudiera manifestarse en el momento de la donación. Se ha de tener

presente, en este caso, que subsisten todos los derechos del sujeto a los que se ha hecho referencia, entre los que cabe destacar: en primer lugar, todos los implicados están obligados por el deber de secreto; en segundo lugar, el sujeto tiene derecho de acceso a cualquier información que se obtenga, ya sea por el destinatario de su donación o por el tercero que la recibió tras una cesión; en tercer lugar, tiene derecho de revocación del consentimiento con los efectos correspondientes, que se extenderán en su caso a las actividades del tercero que la recibió tras la cesión.

El consentimiento para la cesión prestado en estos términos es compatible con la obligación de que el sujeto conozca la finalidad para la que se destinarán los datos cuya comunicación se autoriza o el tipo de actividad de aquel a quien se pretenden comunicar, establecida en el artículo 11.3 de la LOPD.

7. PROCESAMIENTO. IMPLICACIONES JURÍDICAS DEL USO DE LA MUESTRA

Si el sujeto fuente de la muestra no ha prestado su consentimiento expreso para que este material se utilice con fines de investigación (por ejemplo, si se trata de muestras de un fallecido o de muestras obtenidas únicamente con finalidad clínica), según el ordenamiento jurídico vigente la muestra ha de anonimizarse, puesto que no cabe presunción para obtener datos de carácter personal relativos a la salud, ni se pueden obtener sin el consentimiento de investigación científica. Incluso tratándose de fallecidos, el carácter compartido de los datos genéticos (en función de lo cual la muestra “soporta información” de los familiares vivos) y la persistencia en la protección de algunos derechos son argumentos para sostener esta postura.

En efecto, existen límites para acceder a la información sobre la salud de los fallecidos que sólo se permitirá cuando exista un interés vital o el que lo pretenda sea un familiar, siempre que no constara una posición contraria y, tras el fallecimiento, subsisten las acciones civiles en defensa del honor y la intimidad. En este sentido, sí se podrá analizar la muestra identificada de un fallecido cuando quede justificado por el beneficio clínico que pudiera reportar a sus familiares.

Por el contrario, en el caso de que el sujeto preste expresamente su consentimiento para la utilización de su muestra en investigación biomédica, no hay impedimento para asociar a su identidad la muestra misma y los datos que se obtengan.

La cuestión es determinar en qué términos se debe expresar dicho consentimiento, cómo ha de interpretarse la obligación de información previa y cuál ha de ser su precisión. En definitiva, se trata de averiguar si una muestra puede ser donada para cualquier investigación o el consentimiento ha de ser expreso para un determinado proyecto. Lo que parece apropiado es que el CEIC valore si la finalidad de la obtención de la muestra biológica se ha establecido en unos límites razonables.

Lo recomendable es que se solicite el consentimiento en los términos más específicos posibles. No quedan totalmente cerradas otras posibilidades (al menos en el ac-

tual marco jurídico) si se cumplen determinados requisitos, en función de los cuales sea proporcional la protección del derecho del sujeto a la protección de sus datos con el fin que se persiga:

- Se debe justificar la utilidad científica de manera más rigurosa cuanto más genérico sea el consentimiento.
- Se ha de garantizar que el sujeto de la muestra tiene la posibilidad de revocar el consentimiento y la consecuente destrucción o anonimización de la muestra.
- Se debe solicitar siempre consentimiento específico cuando se trate de determinadas categorías de investigación en función del criterio de un Comité Ético de Investigación Clínica encargado de revisar estas investigaciones, por ejemplo, aquellas que indaguen en determinadas características de un grupo étnico o tendencias de comportamiento.
- El consentimiento habrá de precederse de la información pertinente. Esta información debería incluir el carácter voluntario de la obtención de la muestra, el carácter voluntario del análisis, la información que podría derivarse del análisis (en general), el uso que se hará de esta información, el derecho del sujeto de acceder a la información que se obtenga referida a él mismo, el derecho a la confidencialidad de los resultados, el derecho a que se anonimice la muestra, el derecho a consentir a las cesiones, la advertencia sobre la importancia de los resultados de los análisis para familiares, y la disponibilidad de consejo genético, cuando proceda. Si el consentimiento se prestó específicamente para una investigación concreta, no es válido para otra, aunque esté directamente relacionada con la primera. Ahora bien, el consentimiento del sujeto para el tratamiento de sus datos (es decir, para la utilización de la muestra) engloba otros tratamientos en las mismas circunstancias y con los mismos fines. Esto es, el consentimiento para una investigación con una determinada metodología engloba la utilización de otros métodos en la misma investigación (hay que tener en cuenta que las técnicas de investigación y, en concreto, de análisis molecular, evolucionan vertiginosamente, lo cual hace muy difícil informar con exactitud de las investigaciones que se van a efectuar sobre la muestra en pocos años).

En cuanto a la licitud de solicitar consentimientos más genéricos no se ha resuelto específicamente este aspecto en el ordenamiento jurídico español por el momento. Por una parte, hay que recordar que el artículo 3.h) de la LOPD define el consentimiento del interesado como “toda manifestación de voluntad, libre, inequívoca, específica e informada, mediante la que el interesado consienta el tratamiento de datos personales que le conciernen”.

Es cierto que la especificidad se refiere a que la voluntad del sujeto se dirija a un destino concreto y, por consiguiente, se descarten otros (especificidad es distinguir una especie de otra): si se consiente el tratamiento para investigación científica, se están excluyendo otros propósitos, como por ejemplo la publicidad, de manera que se especifica el destino de los datos.

Por otra parte, para la participación en investigación el consentimiento se debe obtener para cada estudio de forma específica. Así lo prevé la Ley 41/2002 (artículo 8.3:

“El consentimiento escrito del paciente será necesario para cada una de las actuaciones especificadas en el punto anterior de este artículo, dejando a salvo la posibilidad de incorporar anejos y otros datos de carácter general, y tendrá información suficiente sobre el procedimiento de aplicación y sobre sus riesgos”), el artículo 7 del Real Decreto 223/2004 sobre ensayos clínicos, que prevé el consentimiento tras haber entendido los objetivos y otras circunstancias del ensayo concreto, y el artículo 16.v) del Convenio de Oviedo (“No podrá llevarse a cabo investigación alguna en una persona a menos que se cumplan las condiciones siguientes: (...) v) que el consentimiento a que se refiere el artículo 5 sea otorgado expresa, específicamente y por escrito. Este consentimiento puede ser libremente revocado en todo momento”).

Sin embargo, el fundamento de dicha exigencia es que en estos supuestos se lleva a cabo una injerencia en la integridad que se justifica mediante aquella declaración de voluntad, mientras que en el caso del que nos ocupamos parece que los posibles riesgos para el individuo se limitan a su derecho a la protección de datos de carácter personal y no se ven implicados otros que sí cobran relevancia cuando se trata de una experimentación o una investigación *in vivo* en las cuales la salud del paciente puede verse directamente afectada.

En el caso de la muestra, el consentimiento genérico para su utilización representa no sólo la utilización de unos datos concretos conocidos por su titular, sino la potencial obtención de toda la información genética.

Es cierto que el consentimiento para que de una muestra se pueda obtener cualquier información genética en cualquier investigación científica (potencialmente toda la relativa a un sujeto) parece, en principio, una pérdida demasiado extensa de control de datos de carácter personal por parte del sujeto y una opción desproporcionada.

Lo que parece apropiado, en conclusión, es que el investigador redacte el modelo de consentimiento según las necesidades y objetivos de su trabajo, y opte por la alternativa que le resulte más apropiada: consentimiento a la investigación para un estudio determinado, consentimiento a la investigación para un estudio determinado con la posibilidad de futuros consentimientos para otros proyectos, consentimiento a la investigación con la muestra disociada para cualquier estudio, o bien consentimiento más genérico para la investigación con la muestra no anonimizada, en los términos y condiciones señaladas más arriba.

Es recomendable que los investigadores valoren la utilidad de las muestras para el futuro una vez que acabe el proyecto para el cual se recogieron, y tengan en cuenta esta circunstancia a la hora de recabar el consentimiento de los participantes.

8. PRÁCTICAS DE SEGURIDAD

El empleo de células o tejidos humanos implica un posible riesgo de transmisión de patógenos. Todas las muestras con reconocida capacidad infecciosa deben llegar al banco debidamente identificadas como tales para la toma de medidas especiales de

manipulación o almacenamiento, entre otras, o incluso para que se rechacen si el banco no se encuentra preparado para asumir los riesgos inherentes a estas muestras. No obstante, en ocasiones resulta imposible conocer la posible capacidad infecto-contagiosa de las muestras. Por ello, este material ha de ser siempre manejado con las máximas precauciones.

En cualquier caso, es preciso observar determinadas medidas de seguridad que protegen a las personas que las manejan y evitan la contaminación. En este sentido, las normas exigen ciertas condiciones de trabajo, de protección de las muestras y de tratamiento de los residuos.

8.1. Condiciones de trabajo

De forma rutinaria, es necesario mantener los cuidados necesarios para evitar estas contaminaciones: usar guantes e indumentaria de laboratorio; mantener la indumentaria de laboratorio exclusivamente en el mismo y no usarla fuera de éste; en el caso de trabajar en cabina, hacerlo en el tipo de flujo vertical y desinfectar periódicamente la zona de trabajo. Si se trabaja con células contaminadas, es necesario seguir la normativa específica establecida en su caso.

Es preciso observar las precauciones necesarias en función de las condiciones de trabajo, por ejemplo, los operarios de los sistemas de almacenamiento con nitrógeno líquido –un elemento potencialmente dañino dada la posibilidad de causar congelación instantánea de zonas corporales expuestas accidentalmente– deben llevar guantes especiales, pantallas oculares o gafas protectoras, así como ropa protectora.

Se deben observar las normas establecidas en los siguientes textos legales:

- Ley 31/1995, de 8 de noviembre, de Prevención de Riesgos Laborales y Ley 54/2003, de 12 de diciembre, de reforma del marco normativo de la prevención de riesgos laborales.
- Real Decreto 39/1997, de 17 de enero, por el que se aprueba el Reglamento de los Servicios de Prevención.
- Real decreto 664/1997, de 12 de mayo, sobre protección de los trabajadores contra riesgos relacionados con la exposición a agentes biológicos durante el trabajo.
- Directiva 2000/54/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 18 de septiembre de 2000, sobre protección de los trabajadores contra los riesgos relacionados con la exposición a agentes biológicos durante el trabajo.
- Real Decreto 773/97, de 30 de mayo, sobre disposiciones mínimas de seguridad y salud relativa a la utilización por los trabajadores de equipos de protección individual.

8.2. Protección de las muestras

Las muestras se deben almacenar en zonas de acceso restringido con el fin de minimizar la posibilidad de contaminación del personal y del ambiente, así como de asegurar las condiciones de calidad.

Los congeladores donde se almacenan las muestras deben estar cerrados con llave y en habitaciones con control de acceso físico (llave, tarjeta magnética, etc.). Para evitar el deterioro de las muestras por descongelaciones imprevistas, como un corte en el circuito eléctrico, por ejemplo, se debe colocar siempre el congelador conectado a un sistema con grupo electrógeno. El almacenamiento en congeladores de nitrógeno líquido se debe realizar utilizando viales que soporten las bajas temperaturas del medio sin romperse. En caso de rotura, se ha de vaciar el recipiente, dejar que el nitrógeno líquido se evapore y proceder a su limpieza.

Se ha de tener en cuenta la siguiente legislación:

- Real Decreto 255/2003, de 28 de febrero, por el que se aprueba el Reglamento sobre clasificación, envasado y etiquetado de preparados peligrosos.
- Real Decreto 363/1995, de 10 de marzo, por el que se aprueba el Reglamento sobre la declaración de sustancias nuevas y clasificación, envasado y etiquetado de sustancias peligrosas, y Real Decreto 99/2003, de 24 de enero, que lo modifica.
- Real Decreto 379/2001, de 6 de abril, por el que se aprueba el Reglamento de almacenamiento de productos químicos y sus instrucciones técnicas complementarias.

8.3. Tratamiento de residuos

8.3.A. Según el tipo de residuo

En función del tipo de residuo se procederá de la siguiente manera.

A.1. Residuos biológicos asimilables a los urbanos

Habitualmente, se trata de materiales sólidos no cortantes ni punzantes, como papeles, guantes, plásticos, gasas, etc., contaminados con sangre y fluidos biológicos. Para la recogida de estos residuos se recomienda el uso de bolsas de 220 mg/cm² de galga, en contenedores de basura especiales. Su eliminación se efectuará como residuos asimilables a los urbanos.

A.2. Residuos sólidos biológicos especiales

Tienen un potencial infeccioso superior a los residuos sólidos urbanos. La gestión de estos residuos se realizará conforme a lo establecido en la Ley 10/1998, de 21 de abril, de Residuos, y su normativa de desarrollo. En este tipo de residuos se incluyen materiales punzantes y cortantes, como agujas, hojas de bisturí, restos de vidrio roto, etc., que han estado en contacto con sangre y fluidos biológicos o con material procedente de actividades microbiológicas. Estos residuos especiales se deben acumular separadamente de todos los demás tipos en envases exclusivos rígidos, impermeables e interiormente inaccesibles. Estos envases son de un solo uso y, una vez cerrados, no se pueden volver a abrir. Han de mantenerse intactos hasta su recogida, evitando presiones y golpes que puedan afectar su integridad durante su almacenamiento o transporte. Su eliminación final se debe realizar por una entidad autorizada.

Residuos sólidos procedentes de cultivos microbiológicos no patógenos: están constituidos por placas de Petri, tubos de ensayo, matraces, etc., que contienen medio sólido de cultivo. Estos residuos se colocan en bolsas resistentes al autoclave para su esterilización con este medio. Una vez realizada la operación, los residuos se recogen por el personal encargado de esta actividad.

A.3. Residuos biológicos líquidos

Se inactivan con lejía de uso doméstico (hipoclorito sódico al 10%) durante 30 minutos, pudiéndose eliminar a continuación por el desagüe. Conviene precisar que el uso indiscriminado de lejía puede provocar contaminación ambiental. La disolución de lejía doméstica aquí indicada es suficiente, pero no se deben utilizar disoluciones más concentradas.

8.4. Listado de medidas preventivas

Las medidas preventivas que se han de tomar en la realización de cualquier operación que se lleve a cabo en un laboratorio de biotecnología o de tipo biológico (cultivos, centrifugaciones, análisis, etc.) son las siguientes:

1) Precauciones generales relativas al local:

- Establecer normas de seguridad en el trabajo de cada laboratorio acordes a sus características.
- Implicar a todo el personal del laboratorio en el cumplimiento de las normas de seguridad que se dictaminen.
- Limitar el acceso al laboratorio, permitiendo la entrada únicamente al personal autorizado.
- Señalar el riesgo biológico en todas las áreas de los laboratorios catalogados de nivel de contención 2 en adelante.
- Limpiar y desinfectar diariamente todas las superficies de trabajo, así como cuando se produzca un derrame.
- Mantener el laboratorio limpio y ordenado, y evitar utilizar los pasillos como almacén. Siempre debe quedar un espacio libre no inferior a 120 cm para poder evacuar el local en caso de emergencia.

2) Precauciones durante el desarrollo del trabajo:

- Evitar el empleo de libros y material de escritorio en el área de trabajo, ya que el papel contaminado es difícil de esterilizar.
- Está rigurosamente prohibido pipetear con la boca. El pipeteo se llevará a cabo con dispositivos especialmente diseñados al efecto, para cuyo uso correcto se entrenará adecuadamente al personal.
- Ha de limitarse el uso de agujas hipodérmicas y jeringas, debiendo utilizarse únicamente las unidades ya montadas.
- No debe volver a ponerse la capucha a las agujas y éstas no deben ser dobladas ni separadas de la jeringa.
- Las agujas y jeringas usadas, así como los bisturís, se deben desechar únicamente en contenedores especiales diseñados para este propósito.

- Cuando se centrifugue material biológico potencialmente infeccioso se deben utilizar tubos cerrados. La centrífuga ha de disponer de rotores o cestillos de seguridad que eviten la formación de aerosoles.
- La rotura accidental de un tubo y su vertido en la cubeta representa una incidencia importante que debe ser comunicada inmediatamente al responsable del laboratorio y al Servicio de Prevención de Riesgos Laborales; se procederá inmediatamente a la desinfección segura del equipo.
- No se deben utilizar centrifugas que no dispongan de sistema de cierre de seguridad, ni manipular tales equipos de forma que puedan abrirse mientras están en funcionamiento y formar aerosoles.
- Si el laboratorio dispone de ultracentrifugas, es fundamental llevar a cabo el equilibrado cuidadoso del rotor.
- Los derrames y accidentes, como cortes y pinchazos, deben ser informados inmediatamente al responsable del laboratorio y al Servicio de Prevención de Riesgos Laborales; asimismo, deben constar por escrito.

3) Reglas de higiene personal:

- Cubrir heridas y lesiones con apósitos impermeables antes de comenzar el trabajo. Si las lesiones no pueden cubrirse adecuadamente, no deben exponerse hasta que curen.
- Retirar anillos y otras joyas.
- Evitar el contacto de la piel con materiales potencialmente infecciosos. Para ello, cuando se manipulen muestras que contengan posibles agentes patógenos, se deberán usar guantes de látex o de silicona, que se retirarán siempre antes de salir del área de trabajo.
- Jamás se abandonará el laboratorio con los guantes puestos ni se cogerá con ellos el teléfono.
- Tras quitarse los guantes, se procederá al lavado de las manos mediante jabones antisépticos.
- Usar gafas protectoras y mascarillas faciales si existe riesgo de salpicaduras o de formación de aerosoles.
- No se deben usar lentes de contacto.
- No se debe comer, beber o fumar, así como tampoco aplicarse cosméticos en las áreas de trabajo. Asimismo, queda prohibido guardar alimentos o bebidas en las citadas áreas.
- El personal con el cabello largo debe llevarlo recogido.

9. EXPLOTACIÓN DE LOS RESULTADOS DE LA INVESTIGACIÓN

9.1. La relación con el paciente

Los aspectos económicos o comerciales también están presentes en relación con la donación de las muestras. Aquí se plantea la cuestión de si la persona de la que procede la muestra tiene o no derecho a recibir beneficios económicos derivados de la comercialización del fármaco o del producto una vez que ha sido patentado.

En el problema con la comercialización están implicados dos principios bioéticos: en primer lugar, el principio de altruismo, vigente en la mayoría de las legislaciones sobre trasplantes de órganos (en este sentido, la fuente del tejido o del órgano no puede recibir remuneración económica porque se entiende que hace “un regalo” a la ciencia y a la sociedad); en segundo lugar, el sistema de valores vigente en nuestras sociedades establece que el cuerpo humano y sus partes no deben ser objeto de transacción comercial. La pregunta que surge inmediatamente es si se pueden aplicar estos dos principios bioéticos tradicionales al marco de la donación de las muestras para investigación.

9.2. El marco jurídico aplicable

El marco jurídico al que se debe atender para estudiar esta cuestión está principalmente integrado por la Directiva 98/44/CE, sobre protección jurídica de invención biotecnológica que fue objeto de transposición en el ordenamiento jurídico español a través de la Ley 10/2002, de 29 de abril, que modificó la Ley de Patentes.

También se ha de tener en cuenta el artículo 21 del Convenio de Biomedicina del Consejo de Europa, que establece: “El cuerpo humano y sus partes, como tales, no deberán ser objeto de lucro”, asentado en el principio de la dignidad humana. Los órganos y tejidos, incluida la sangre, no deben ser comprados o vendidos o generar cualquier ganancia financiera para la persona a quien se le han extraído o para un tercero, ya sea una persona física o jurídica como, por ejemplo, un hospital o un centro de investigación. Sin embargo, los trabajos técnicos, como la toma de muestras, las pruebas, la esterilización, el fraccionamiento, la purificación, el almacenamiento, el cultivo, el transporte, etc.) que se realizan a partir de los órganos y tejidos sí pueden dar lugar a una legítima y razonable remuneración. De este modo, este artículo no prohíbe la venta de medicamentos que contengan tejido humano que ha sido sometido a un proceso de elaboración, siempre que no se venda el tejido como tal. Al mismo tiempo, no impide que la persona a quien se le ha extraído el tejido reciba una compensación equitativa por los gastos que ha sufrido o las pérdidas por el ingreso (en el caso de hospitalización), siempre que esa compensación no constituya una remuneración.

La Propuesta de Instrumento sobre el uso de materiales biológicos humanos almacenados con fines de investigación del Consejo de Europa en su artículo 8 es fiel al espíritu del principio establecido en el artículo 21 del Convenio de Biomedicina. Se reconoce que, en muchos casos, los productos biotecnológicos se han desarrollado a partir de una muestra biológica y, en la mayoría de los casos, resulta difícil cuantificar la participación que esa muestra concreta ha tenido en la consecución final del producto; por tal motivo, resultaría también difícil determinar la cuantía que le podría corresponder al titular de la muestra en una potencial comercialización del producto. Para los redactores de este instrumento es distinto el caso en el que la línea celular “rentable” se ha conseguido en exclusiva de un individuo, y se plantean que quizá en este caso sí fuera permisible algún tipo de remuneración. Para evitar comercializaciones del cuerpo humano y alguna que otra situación injusta, lo único que cabría aplicar sería una compensación económica como en el caso de la donación de gametos. Además, podría resultar muy difícil discernir esa participación “en exclusiva”.

También la Carta de los Derechos fundamentales de la Unión Europea en su artículo 3.2 prohíbe expresamente que el cuerpo humano o las partes del mismo, como tales, se conviertan en objeto de lucro.

Se ha de considerar que, en el ejercicio de presunciones, lógicamente se excluye del consentimiento del sujeto la utilización perjudicial de la muestra. Es decir, como señala la Recomendación 3 (1992) del Consejo de Europa, sobre pruebas genéticas de cribado y fines sanitarios: “Las muestras recogidas con fines médicos o científicos concretos no se podrán utilizar, sin el permiso de las personas interesadas o las personas legalmente facultadas para otorgar el permiso en nombre y representación de aquéllas, de ninguna manera que pudiera resultar perjudicial para las personas interesadas” (principio 13).

Pero tampoco se puede otorgar el consentimiento para usos que, sin ser estrictamente perjudiciales, pudieran representar una injerencia en sus derechos fundamentales. No se debe olvidar que la muestra es un material potencialmente generador, tanto con fines terapéuticos como reproductivos, y que puede ser objeto de manipulación genética. No puede deducirse que el sujeto fuente abandona la muestra para cualquier uso que se quiera hacer de ella, aunque sea lícito, como la reproducción. Cuando se pretenda utilizar una parte del cuerpo con estas finalidades, habrá que cumplir la regulación específica de estos usos y será preciso un consentimiento expreso.

En función de lo anterior, se adelanta que la persona de la que provenga la muestra nominativa tiene que dar su consentimiento para su almacenamiento, debiendo informar acerca de dónde y para qué fines se almacena. Además, la muestra sólo se podrá utilizar para los fines que justificaron su recogida y se conservará por el periodo necesario para llevarlos a cabo.

Es decir, la muestra es objeto de los principios de la protección de datos de carácter general como un soporte de información asimilable en cierto sentido a la historia clínica, a lo que habrá de añadir las previsiones legislativas de utilización de partes del cuerpo. Siguiendo este criterio, no se podrán almacenar muestras de personas identificables de forma rutinaria tras extracciones quirúrgicas o análisis de sangre, por ejemplo, sin una finalidad concreta (*sensu contrario*, si se considera necesario para la atención al paciente el almacenamiento estaría justificado).

9.3. ¿Se puede patentar un producto derivado de una muestra biológica?

La Directiva 98/44/CE parte del principio de que el cuerpo humano en los diferentes estadios de su constitución y de su desarrollo, así como el simple descubrimiento de uno de sus elementos, incluida la secuencia o la secuencia parcial de un gen, no podrán constituir invenciones patentables (artículo 5.1). No obstante, la propia directiva reconoce que es necesario indicar que no queda excluida la posibilidad de patentar las invenciones susceptibles de aplicación industrial que se refieran a un elemento aislado del cuerpo humano o producido de otra forma mediante un procedimiento técnico, aun en el caso de que la estructura de este elemento sea idéntica a la de un elemento

natural, dando por sentado que los derechos de la patente no pueden abarcar el cuerpo humano o sus elementos en su entorno natural. Por lo tanto, no queda excluida la posibilidad de patentar dicho elemento aislado del cuerpo humano o producido de otro modo, puesto que es el resultado de procedimientos técnicos que lo han identificado, purificado, caracterizado y multiplicado fuera del cuerpo humano, técnicas que sólo el ser humano es capaz de desarrollar y que no se presentan espontáneamente en la naturaleza.

Cuando se conceda una patente sobre una invención derivada de una muestra biológica, se han de cumplir los tres requisitos clásicos de patentabilidad, a saber, la novedad, la actividad inventiva y la aplicación industrial, y en estos casos el texto de la directiva exige que la aplicación industrial (utilidad) se deberá indicar de forma concreta en la solicitud de patente tal y como haya sido presentada. Cualquier clase de invención, además de cumplir con estos requisitos, ha de ser sometida a otros controles denominados tradicionales en el derecho de patentes, puesto que en definitiva contienen las excepciones clásicas en el derecho de patentes: en primer lugar, que su publicación o explotación no sea contraria al orden público o a las buenas costumbres (artículo 53 del Convenio de la Patente Europea); y, en segundo lugar, que su objeto no recaiga en una variedad vegetal, en una raza animal o en un procedimiento esencialmente biológico de obtención de vegetales o de animales –artículo 53.b) del Convenio de la Patente Europea–.

Desde el punto de vista eticocultural, la cultura europea ha venido considerando la existencia de límites a la patentabilidad o a la proyección de derechos económicos sobre el cuerpo humano orientados al respeto de la dignidad humana. Basándose en esto, las legislaciones internacionales, europeas y nacionales sobre patentes aluden a ello mediante la inclusión de cláusulas excluyentes con referencias al “orden público”, las “buenas costumbres” e incluso la “moralidad”. Los conceptos de orden público y de buenas costumbres son conceptos jurídicos indeterminados, estándares jurídicos que se deben interpretar conforme a las reglas habituales en cada ordenamiento positivo, pero que en definitiva acogen entre otros contenidos la barrera de carácter ético; asimismo, conviene aclarar que, como se trata de conceptos que son excepciones a la patentabilidad, se han de interpretar de manera restrictiva y no expansiva.

Tras la aprobación de la Directiva 98/44/CE, se establece una lista orientativa de las invenciones no patentables con la finalidad de proporcionar a los jueces y a las oficinas nacionales de patentes una guía para interpretar la referencia al orden público o las buenas costumbres, si bien no se puede pretender que la misma sea exhaustiva.

Esta lista orientativa señala excluidos de patente:

- Los procedimientos de clonación de seres humanos.
- Los procedimientos de modificación de la identidad genética germinal.
- La utilización de embriones humanos con fines industriales o comerciales.
- Los procedimientos de modificación de la identidad genética de los animales que supongan, para éstos, sufrimientos sin utilidad médica sustancial para el hombre o el animal y los animales resultantes de tales procedimientos.

Por lo tanto, nada se dice sobre la prohibición de patentar un producto derivado de una muestra biológica, siempre que el mismo cumpla con los tres requisitos de patentabilidad y no sea contrario al orden público ni a las buenas costumbres y que, además, su objeto no recaiga sobre una variedad vegetal, una raza animal o un procedimiento esencialmente biológico de obtención de vegetales o de animales. No se puede pasar por alto que se han realizado avances decisivos en el tratamiento de las enfermedades, merced a la existencia de medicamentos derivados de elementos aislados del cuerpo humano y/o producidos de otro modo, de medicamentos que son producto de procedimientos técnicos destinados a obtener elementos de una estructura similar a la de los elementos naturales que existen en el cuerpo humano; por consiguiente, conviene fomentar, mediante el sistema de patentes, la investigación conducente a la obtención y el aislamiento de los elementos valiosos para la producción de medicamentos.

De todos modos, la patente de invención no autoriza a su titular a dar aplicación a la invención, sino que se limita a conferirle el derecho de prohibir a terceros su explotación con fines industriales y comerciales y que, por lo tanto, el derecho de patentes no puede sustituir ni dejar sin efecto las legislaciones nacionales, europeas e internacionales que fijan, en su caso, limitaciones o prohibiciones, o que organizan el control de la investigación y de la utilización o comercialización de sus resultados, especialmente en relación con los requisitos de salud pública, seguridad, protección del medio ambiente, protección de los animales, conservación de la diversidad genética y respeto de determinadas normas éticas.

9.4. La cuestión del consentimiento como posible requisito de patentabilidad

Teniendo en cuenta la legislación sobre la protección jurídica de las invenciones biotecnológicas, en concreto la Directiva 98/44/CE, su considerando 26 trata sobre la necesidad de consentimiento informado en las patentes que contengan materia biológica de origen humano y establece que “cuando se presente una solicitud de patente de una invención que tiene por objeto una materia biológica de origen humano o que utiliza una materia de este tipo, la persona a la que se le hayan realizado las tomas deberá haber tenido ocasión de dar su consentimiento libremente y con la debida información sobre dichas tomas, de conformidad con el derecho nacional”.

Si bien es cierto que los considerandos de las directivas no tienen valor normativo, sí que resultan de gran consideración para la interpretación de las normas contenidas en el texto legal. En efecto, el consentimiento no podrá exigirse como condición de patentabilidad de la invención, así como tampoco su falta o inexactitud afectará a la validez de la patente ya concedida, pero su ausencia hubiera sido criticable si se tiene en cuenta toda la problemática surgida en los EE.UU. en el caso Moore contra el rectorado de la Universidad de California que se comenta más adelante. Ni la directiva ni las legislaciones nacionales de transposición han querido hacer del consentimiento una condición para la patentabilidad, sino sólo un instrumento eficaz para imponer de forma concreta la práctica del consentimiento libre e informado.

En la práctica, el equipo de investigación que trabaja con la muestra suele desconocer su origen, por lo que estas exigencias deberán cumplirse en el momento de realizar la toma conforme a la legislación vigente. Esto no impide que la persona que hubiera sido objeto de toma de muestras sin su consentimiento pudiese pedir responsabilidades a quienes efectuaron la extracción sin su consentimiento, pero no en el ámbito derivado del beneficio económico producido por la patente del producto realizado a partir de su muestra, puesto que la ausencia de este consentimiento no podrá ser una causa de nulidad de la patente.

Respetar el consentimiento libre e informado del sujeto fuente implica dar una información precisa, especialmente acerca de la eventualidad de una solicitud de patente. Esto significa que el sujeto debe conocer la posibilidad de que, a partir de la parte de cuerpo que dona, aunque sea información genética, cabe la posibilidad de desarrollar una patente si se llegara a desarrollar una invención que cumpliera todos los requisitos de patentabilidad. El problema es complejo, porque significa que alguien consigue un beneficio económico a través de la patente a partir o con la colaboración de un acto fundamentalmente altruista.

9.5. La propiedad de la patente del producto derivado de la muestra: la distribución de beneficios económicos

Formalmente, el titular o titulares de la patente son los que han instado la solicitud de inscripción del registro correspondiente ante la oficina de patentes. Esta titularidad da todos los derechos que otorga la concesión de la patente, de carácter patrimonial, y en principio se identifica la titularidad con la personalidad del solicitante o solicitantes.

Otro aspecto es que el inventor tiene el derecho moral de ser designado como tal inventor en la solicitud de registro de la patente, con independencia de quién sea su titular o solicitante.

La legitimación para presentar solicitudes de patentes nacionales o europeas recae sobre cualquier persona natural o jurídica y cualquier sociedad asimilada a una persona jurídica, en virtud de la legislación que le sea aplicable. Por lo tanto, pueden solicitarla el inventor (o coinventores) o sus causahabientes (en caso de fallecimiento del inventor). Si el inventor es un empleado de una empresa y la invención se realiza por el trabajador durante la vigencia de su contrato, o bien relación de trabajo o de servicios con la empresa que sean fruto de una actividad de investigación explícita o implícitamente constitutiva del objeto de su contrato, pertenecen al empresario. El trabajador autor de la invención no tendrá derecho a una remuneración suplementaria por su realización, excepto si su aportación personal a la invención y la importancia de la misma para la empresa exceden de manera evidente del contenido explícito o implícito de su contrato o relación de trabajo. Este principio aparece recogido en la Ley Española de Patentes de 1986 (artículo 15), pero se trata de un principio prácticamente aceptado en la mayoría de las legislaciones de nuestro entorno.

Si el trabajador lo es de un centro público de investigación en España, existe desde el año 2002 una normativa específica: Real Decreto 55/2002, que establece el régimen

de explotación y cesión de las invenciones realizadas en determinados entes públicos de investigación como el CSIC y el Instituto de Salud Carlos III (entre otros) por los funcionarios o por el personal contratado en régimen de derecho laboral por los mismos organismos que, asimismo, desarrollen actividades de investigación. En estos casos, corresponde a los organismos públicos de investigación la titularidad de las invenciones realizadas por el personal investigador como consecuencia de las actividades desarrolladas en el ámbito específico de sus funciones. El personal investigador que lleve a cabo cualquier invención estará obligado a comunicar inmediatamente tal circunstancia al director o presidente del organismo, una vez obtenidos los correspondientes resultados.

Asimismo, cuando se obtengan beneficios de la explotación de los derechos citados, conforme a ley corresponderá un tercio para el autor o autores de la invención y un tercio se distribuirá de acuerdo con los criterios que establezca el consejo rector del organismo, teniendo en cuenta la importancia y trascendencia de la patente, los beneficios que pueda generar y la participación o colaboración de personal distinto al autor o autores de la invención. De este modo, se persigue incentivar la investigación en los centros públicos de investigación.

El derecho de propiedad en la patente deriva del acto de invención. En el caso de las invenciones que contienen muestras biológicas, el acto de la invención corresponde a quien extraiga, purifique o manipule la muestra por algún medio que suponga actividad inventiva, y esta intervención es la que confiere el derecho a solicitar la invención.

9.6. La comercialización de las muestras

Es evidente que se pueden producir actos de disposición del propio cuerpo que, en ocasiones, incidirán o no sobre la integridad del mismo; parece que, en principio, el disponente queda excluido del beneficio económico, consecuencia de la extracomercialidad del cuerpo humano y de la negación de un genuino derecho de propiedad sobre el mismo.

Se parte del principio de que la muestra es una cosa, pero se ha de dejar establecido de forma clara que el reconocimiento de este derecho patrimonial no implica la comercialización de la muestra sin restricciones; en efecto, se podrán poner limitaciones en función de su origen humano y de la diferencia entre unas partes del cuerpo y otras. Éstas están debidamente reflejadas en el artículo 5 del Código Civil italiano, según el cual son lícitos los actos de disposición del cuerpo que no impliquen ni resulten contrarios a la ley, al orden público o a las buenas costumbres.

Todos los Estados miembros de la UE siguen el principio de que las donaciones de tejidos humanos han de ser gratuitas, según el ejemplo de la sangre. Sin embargo, el donante recibe compensaciones por las molestias causadas en la extracción del tejido (por ejemplo, gastos de viaje, etc.). A este respecto, caben dos posturas diferentes:

- 1) Quienes mantienen que por razones de justicia, cuando del tejido se derive una fuente de ganancia, el donante debería ser pagado. De este modo, mantienen que la

remuneración a los donantes podría incrementar el suministro de tejidos. Lo que sí parece cierto es que el tratamiento y la transformación de tejidos implica una serie de costes que podrían justificar su venta comercial, al igual que los derivados de la sangre. La comercialización de tejidos humanos tiene la ventaja agregada, según sus defensores, de ser una industria alentadora para invertir en áreas que producirán una mayor oferta de tejidos en el mercado. Este argumento podría ser defendible en relación con tejidos “diseñados” que requieren técnicas sofisticadas de procesos industriales.

2) La postura contraria –donación altruista–, basada en la solidaridad, es la que presenta mayores seguidores. Con esta postura se pretende evitar que el ser humano se convierta en un objeto (como fuente de órganos y tejidos), al mismo tiempo que se evita todo riesgo de explotación de las clases más desfavorecidas, ya que podrían estimar la donación de tejidos exclusivamente por razones económicas.

Esta última postura no evita que la buena disposición para donar merezca algún tipo de reconocimiento y apoyo. En efecto, se podría permitir el pago de determinados gastos, como por ejemplo lo establecido por la Comisión Nacional de Reproducción Humana Asistida de España. Se constata cada vez más la tendencia a compensar los gastos derivados de la donación. Habría que cuidar que esta cuantía fuese, en efecto, una “compensación” y no una “remuneración”, para evitar no sobrepasar el principio de no comercialización del cuerpo humano y sus partes, además de no aminorar el principio ético de la solidaridad. Este criterio ha sido recogido por el Consejo Nacional de Ética de Francia y Alemania en su Declaración Conjunta, de 2 de octubre de 2003. En cualquier caso, se debe evitar que las organizaciones de fondos públicos y privados recurran al pago de gastos excesivos.

La solución propuesta por algunos, como el Grupo Europeo de la Ética, de circunscribir los biobancos a instituciones públicas de salud o a organismos que no persigan beneficios económicos, sino que simplemente con el precio de la entrega de los tejidos cubran los gastos que ocasione el biobanco, resulta en la práctica bastante difícil, porque las industrias farmacéuticas y biotecnológicas están realmente interesadas en este nuevo sector por los resultados que podrían obtener, e incluso los propios organismos públicos podrían estar interesados en conseguir algún tipo de beneficio económico que les permitiese proseguir sus investigaciones y financiar nuevas líneas de investigación.

Parece ser que, tal y como se encuentra el estado de cosas sobre esta materia y con el fin de conseguir un equilibrio que resulte justo entre el sujeto fuente y los terceros (compañías farmacéuticas, biotecnológicas), lo más apropiado sería tratar de conseguir el aprovechamiento compartido de los beneficios (*benefits sharing*) en lugar de una remuneración individual. En efecto, en este mismo sentido se pronuncia la Declaración Internacional sobre los Datos Genéticos Humanos de la UNESCO, en su artículo 19, al establecer que los beneficios resultantes de la utilización de datos genéticos humanos, datos proteómicos humanos o muestras biológicas obtenidas con fines de investigación médica y científica deberían ser compartidos con la sociedad, en su conjunto, y con la comunidad internacional, de conformidad con la legislación o la política interna

y con los acuerdos internacionales. Los beneficios que deriven de la aplicación de este principio podrán revestir las siguientes formas:

- Asistencia especial a las personas y grupos que hayan tomado parte en la investigación.
- Acceso a la atención médica.
- Nuevos diagnósticos, instalaciones y servicios para dispensar nuevos tratamientos o medicamentos obtenidos gracias a la investigación.
- Apoyo a los servicios de salud.
- Instalaciones y servicios destinados a reforzar las capacidades de investigación.
- Incremento y fortalecimiento de la capacidad de los países en desarrollo para obtener y tratar datos genéticos humanos, tomando en consideración sus problemas específicos.
- Cualquier otra forma compatible con los principios enunciados en esta declaración.
- Acceso preferencial a terapias desarrolladas en virtud de sus contribuciones al biobanco (éste parece ser uno de los criterios más ampliamente compartidos).
- Participación en terapias, conforme a lo establecido por el *HUGO Ethics Committee en su Statement of benefit-sharing* (2000), que demanda la inversión del 1% al 3% de los ingresos netos de la investigación en fundaciones públicas, por ejemplo, en la expansión de infraestructuras médicas o de ayuda humanitaria.

De todos modos, el derecho interno y los acuerdos internacionales podrían fijar limitaciones a este respecto. Pero, en cualquier caso, parece clara la unanimidad respecto del rechazo a la participación del sujeto fuente en los beneficios económicos derivados de la comercialización del producto obtenido a partir de su muestra biológica.

10. RECOMENDACIONES PARA LA ESTRUCTURACIÓN Y FUNCIONAMIENTO DE UN BIOBANCO

Existen diez puntos importantes a tener en cuenta que se resumen en la Tabla III.

TABLA III. Recomendaciones para la estructuración y funcionamiento de un biobanco

- 1) Es muy importante que la actividad del biobanco no interfiera en el diagnóstico, porque este último es la finalidad principal para la que el paciente, de manera habitual, dé su consentimiento
- 2) Antes de establecer un biobanco, conviene centrar su objetivo (por ejemplo, tumores infantiles, tumores de adultos, sólo carcinomas de mama)
- 3) Un biobanco es una actividad multidisciplinar que abarca todos los estamentos de un hospital/centro de investigación
- 4) Todos los protocolos técnicos deben quedar escritos. Sería recomendable que estuvieran aprobados por un comité externo. Los protocolos éticos han de estar supervisados por un CEIC
- 5) Consideramos obligatoria la obtención del consentimiento informado para almacenar, ceder e investigar sobre muestras. Recomendamos que dicho documento esté aprobado por un CEIC
- 6) En muchas ocasiones, se requiere la anonimización de las muestras para preservar la confidencialidad
- 7) Conviene poner en marcha bases de datos seguras y funcionales que estén de acuerdo con todas las normas de protección de datos de carácter personal
- 8) Conviene tener en cuenta las condiciones de bioseguridad al diseñar y poner en marcha una instalación dedicada a biobanco
- 9) El personal que trabaja en el biobanco debe tener una formación específica y apropiada
- 10) El mayor rendimiento de un banco de tumores/tejidos se alcanza en el seno de una red cooperativa