Cristiano Ribeiro Viana

**Avaliação do impacto da implantação do controle de
qualidade em um banco de amostras teciduais
criopreservadas**

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de
Doutor em Ciências

Programa de Patologia
Orientadora: Prof.^a Dra. Sheila
Aparecida Coelho Siqueira

**São Paulo
2013**

Cristiano Ribeiro Viana

**Avaliação do impacto da implantação do controle de
qualidade em um banco de amostras teciduais
criopreservadas**

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de
Doutor em Ciências

Programa de Patologia
Orientadora: Prof.^a Dra. Sheila
Aparecida Coelho Siqueira

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 5890, de 20 de dezembro de 2010.
A versão original está disponível na Biblioteca FMUSP)

**São Paulo
2013**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Viana, Cristiano Ribeiro

Avaliação do impacto da implantação do controle de qualidade em um banco de amostras teciduais criopreservadas / Cristiano Ribeiro Viana. -- São Paulo, 2013.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Patologia.

Orientadora: Sheila Aparecida Coelho Siqueira.

Descritores: 1.Banco de tecidos 2.Controle de qualidade 3.DNA 4.Degradação do RNA 5.Isquemia fria 6.Criopreservação

USP/FM/DBD-013/13

Dedicatória

À minha esposa Zélia, grávida do meu segundo filho, pelo amor, carinho, compreensão e incansável apoio ao longo da elaboração desta tese.

Ao meu filho, Cristiano Filho, pela felicidade e alegria que me transmite todos os dias.

Aos meus pais, João e Elza, pelo amor, amizade e por nunca terem medido esforços para que eu alcançasse meus objetivos.

Aos meus avós, Jones e Maria Aparecida e João e Maria Isabel, pelo carinho, força e incentivo que sempre me deram.

A minha sogra, Maria Aparecida, que faleceu em 2012, deixando muita saudade, a lembrar-me um enorme exemplo de dignidade, simplicidade, dedicação e amor ao próximo.

Agradecimentos

À minha orientadora, Prof.^a Dra. S heila Aparecida Coelho Si queira, pelo auxílio e amizade demonstrados durante a elaboração desta tese.

À Universidade de São Paulo, em especial ao Departamento de Patologia, pela oportunidade de realizar o curso de doutorado.

À Fundação Pio XII / Hospital de Câncer de Barretos, pelo incentivo e apoio financeiro para realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Edmundo Carvalho Mauad, pelo incentivo à realização do doutorado.

Ao Prof. Dr. André Lopes Carvalho, ao Prof. Dr. José Humberto Tavares Guerreiro Fregnani e ao Prof. Dr. Rui Manoel Reis, que muito contribuíram para o meu crescimento científico.

Aos membros da minha banca de qualificação, Prof. Dr. Raymundo Soares de Azevedo, Prof.^a Dra. Maria Claudia Zerbini e Prof.^a Dra. Ligia Maria Kerr, pelas excelentes sugestões dadas.

Ao Prof. Dr. Cristovam Scapulatempo Neto e a Prof.^a Dra. Ligia Maria Kerr, pelo auxílio durante esses anos.

Aos meus colegas patologistas, pelo apoio e compreensão às minhas ausências.

Aos funcionários do departamento de patologia, centro cirúrgico, banco de tumores, centro de pesquisa em oncologia molecular, biblioteca e núcleo de apoio ao pesquisador, do Hospital de Câncer de Barretos e aos funcionários da biblioteca e da secretaria da pós graduação da Universidade de São Paulo, pelo grande auxílio prestado.

A Deus e a todos aqueles, que de forma direta ou indireta, contribuíram para a realização deste trabalho.

“A leitura faz do homem um ser completo; a conversa faz dele um ser preparado, e a escrita o torna preciso”.

Francis Bacon (1561/1626).

Normalização adotada

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. Terceira edição. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

Sumário

Lista de abreviaturas	
Lista de figuras	
Lista de tabelas	
Resumo	
Abstract	
1 INTRODUÇÃO.....	17
1.1 Incidência de câncer no Brasil e no mundo.....	17
1.2 Prevenção e controle do câncer.....	17
1.3 O impacto da revolução genômica na biomedicina.....	19
1.4 O papel fundamental dos biobancos na articulação da pesquisa translacional e da medicina personalizada.....	20
1.4.1 Necessidade da criação de banco de tumores.....	24
1.4.1.1 Bancos de tumores.....	25
1.4.1.1.1 Integração e treinamento da equipe multidisciplinar.....	29
1.4.1.1.1.1 Papel central do patologista.....	30
1.4.1.1.2 Garantia e controle de qualidade.....	31
1.4.1.1.2.1 Qualidade dos ácidos nucléicos.....	37
1.4.1.1.2.2 Avaliação anual das amostras.....	44
1.4.1.1.3 Aspectos éticos e legais.....	45
1.4.1.1.4 Segurança.....	48
1.5 Redes cooperativas de bancos de tumores.....	49
1.6 Bancos de tumores no Brasil.....	53
1.6.1 Banco de tumores do Hospital de Câncer de Barretos.....	54
2 OBJETIVOS.....	58
3 MÉTODOS.....	60
3.1 Local e período do estudo.....	60
3.2 Programa de controle e garantia de qualidade.....	60
3.2.1 Divisão do banco de tumores em banco pré e banco pós à implantação do programa de garantia e controle de qualidade.....	68

3.2.1.1 Seleção das amostras para a comparação entre banco pré e banco pós.....	68
3.2.2 Coleta das amostras para a comparação entre os dois intervalos de TIF.....	69
3.2.3 Macrodissecção de todas as amostras estudadas.....	69
3.2.4 Maceração das amostras utilizadas na comparação entre os dois intervalos de TIF.....	70
3.2.5 Homogeneização das amostras usadas na comparação entre a qualidade do banco pré e banco pós.....	70
3.2.6 Extração de DNA e RNA total para avaliar a qualidade das amostras estudadas.....	71
3.2.6.1 Extração de RNA total das amostras utilizadas na comparação entre os dois intervalos de TIF.....	71
3.2.6.2 Extração de DNA e RNA total das amostras utilizadas na comparação entre o banco pré e o banco pós.....	72
3.2.7 Avaliação da qualidade do DNA e do RNA total das amostras.....	72
3.3 Análise estatística.....	73
3.4 Questões éticas.....	74
4 RESULTADOS.....	76
4.1 Comparação entre os bancos pré e pós controle de qualidade.....	76
4.1.1 Amostras armazenadas em freezer a -80°C há mais de 5 anos.....	78
4.2 Comparação entre os tempos de isquemia fria.....	79
4.3 Comparação entre os métodos de extração do RNA: Trizol x Kits.....	81
5 DISCUSSÃO.....	83
6 CONCLUSÕES.....	92
7 ANEXOS.....	94
8 REFERÊNCIAS.....	109

Lista de abreviaturas

Banco pré - Banco pré controle de qualidade

Banco pós - Banco pós controle de qualidade

CID-O - Classificação Internacional de Doenças Oncológicas

CEP - Comitê de Ética e Pesquisa

CHTN - Rede Cooperativa de Tecidos Humanos

CNIO - Centro Nacional de Investigações Oncológicas

DNA - Ácido desoxirribonucléico

HE - Hematoxilina e eosina

IEP - Instituto de Ensino e Pesquisa

INCA - Instituto Nacional do Câncer (Brasil)

Microarray - Técnica de hibridização que permite a investigação da análise da expressão de milhares de genes ao mesmo tempo

NCI - Instituto Nacional do Câncer (Estados Unidos)

POPs - Procedimentos operacionais padrões

RH - Registro hospitalar

RIN - Número de integridade do RNA

RNA - Ácido ribonucléico

TCLE - Termo de consentimento livre e esclarecido

TIF - Tempo de isquemia fria

TuBaFrost - Banco de Tecido Tumoral Humano Congelado

US-LA CRN - Rede de Pesquisa de Câncer Estados Unidos-América Latina

USP - Universidade de São Paulo

Lista de figuras

Figura 1 - Agilent 2100 Bioanalyzer com o Agilent RNA 6000 Nano Chip.....	41
Figura 2 - Agilent RNA Nano Chip.....	41
Figura 3 - Gel virtual (esquerda) mostrando a degradação progressiva do RNA e eletroferograma (direita) destacando os três intervalos da integridade do RNA, ou seja, intacto, parcialmente degradado e totalmente degradado (Agilent Technologies, 2012).....	42
Figura 4 - Figura interpretativa do eletroferograma, mostrando um RNA de alta qualidade. A parte superior destaca os dois picos claros e distintos das bandas 18s e 28s. A parte inferior enfatiza a regularidade do traçado antes e entre os dois picos, mostrando a quase ausência de fragmentação do RNA.....	43
Figura 5 - Figura mostrando o número total de cada tipo de amostra (colunas vermelhas) e a respectiva quantidade de doadores (colunas verdes).....	55
Figura 6 - Cronômetro utilizado para controlar o TIF.....	61
Figura 7 - Cubas de aço inox envoltas por campo cirúrgico, ambos estéreis, utilizados no transporte da peça cirúrgica.....	62
Figura 8 - Luvas e instrumentos estéreis utilizados para dissecar as amostras.....	62
Figura 9 - Coleta de fragmentos tumorais.....	63
Figura 10 - Tubos criogênicos estéreis identificados. O de tampa vermelha contém fragmentos de tumor e o de tampa verde fragmentos de tecido normal.....	64
Figura 11 - Container contendo nitrogênio líquido em fase de vapor, utilizado para o congelamento imediato das amostras.....	65
Figura 12 - Freezers a -80°C utilizados para o armazenamento em longo prazo.....	66
Figura 13 - Imagens típicas da qualidade do RNA representada por eletroferograma e gel virtual.....	73

Lista de tabelas

Tabela 1 - Comparação entre as amostras dos bancos pré e pós, com relação à integridade do RNA.....	76
Tabela 2 - Comparação entre o número de amostras dos bancos pré e pós, com relação aos valores do número de integridade do RNA (RIN), considerados ideais para estudos de microarray.....	76
Tabela 3 - Comparação entre as amostras dos bancos pré e pós, com relação à contaminação do RNA por proteínas.....	77
Tabela 4 - Comparação entre as amostras dos bancos pré e pós, com relação à contaminação do RNA por reagentes químicos.....	77
Tabela 5 - Comparação entre as amostras dos bancos pré e pós, com relação à contaminação do DNA por proteínas.....	78
Tabela 6 - Comparação entre as amostras dos bancos pré e pós, com relação à contaminação do DNA por reagentes químicos.....	78
Tabela 7 - Número de integridade do RNA (RIN) de cada amostra coletada no ano de 2006, de acordo com a topografia.....	79
Tabela 8 - Comparação entre os tempos de isquemia fria e a qualidade do RNA total em todas as amostras.....	80
Tabela 9 - Comparação da integridade do RNA nas amostras extraídas com Kits e com Trizol.....	81

RESUMO

Viana, C. R. Avaliação do impacto da implantação do controle de qualidade em um banco de amostras teciduais criopreservadas [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2013.

Bancos de tumores foram criados para organizar a coleta, armazenamento e distribuição de amostras biológicas de pacientes oncológicos, favorecendo seu uso nas pesquisas sobre o câncer. Amostras adequadas devem ter RNA, DNA e proteínas de boa qualidade. RNA de boa qualidade deve estar íntegro e puro e DNA deve ter boa concentração e pureza. Baseado em normas internacionais, foi elaborado e implantado um abrangente sistema de controle de qualidade no banco de tumores do Hospital de Câncer de Barretos, que para fins de estudo foi dividido em banco pré-controle de qualidade (denominado banco pré) e em banco pós-controle de qualidade (denominado banco pós). Objetivando comparar a qualidade das amostras nos dois bancos, através da extração de RNA total e de DNA (utilizando-se homogeneizador de tecidos e Kits), selecionou-se de forma aleatória 200 amostras tumorais, distribuídas igualmente entre mama, colôrecto, estômago, pulmão e tireóide, sendo 100 do banco pré e 100 do banco pós. Para se avaliar a influência do tempo de isquemia fria (tempo entre a excisão do espécime cirúrgico e o congelamento rápido da amostra armazenada) na qualidade do RNA total de amostras tumorais do banco pós, foram coletadas 200 amostras tumorais, distribuídas igualmente entre mama, colôrecto, estômago, pulmão e tireóide, de 100 de adores diferentes, metade com o tempo de isquemia fria (TIF) de até 30 minutos e a outra metade do mesmo espécime com TIF de 45 minutos. Extraíu-se RNA total dessas amostras (com maceração manual e Trizol) e comparou-se a sua qualidade, através do número de integridade do RNA (RIN), dentro dos dois intervalos de tempo e nas diferentes topografias. Ao comparar-se as amostras com RIN acima de 7 (consideradas ideais para experimentos de microarray), do banco

pré e do banco pós, foram encontrados 73 (73%) no pré e 87 (87%) no segundo ($p=0,013$). Ao comparar-se o intervalo de TIF de até 30 minutos com o de 45 minutos, encontrou-se respectivamente 63 (64,3 %) e 36 (36 %) amostras com RNA total intacto, 11 (11,2%) e 17 (17 %) com RNA total parcialmente degradado e 24 (24, 5%) e 47 (47%) com RNA total degradado ($p<0,001$). Amostras tireoidianas e colorretais foram mais sensíveis ao aumento do TIF ($p=0,006$ e $p=0,03$, respectivamente), e as de estômago e pulmão menos sensíveis ($p=0,919$ e $p=0,384$, respectivamente). Ao comparar-se as 200 amostras dos dois bancos, constatou-se que a grande maioria apresentava boa qualidade, porém o banco pós se destacou ao avaliar-se o número de amostras ideais para estudos de microarray, por provável interferência do TIF, ainda não controlado no banco pré. Constatou-se também que algumas amostras do banco pré, armazenadas há mais de cinco anos em freezer a -80°C , apresentaram excelente qualidade. O presente estudo também mostrou que o TIF é muito importante para a preservação da qualidade do RNA total, por isso, deve-se sempre respeitar o tempo máximo de 30 minutos. Ainda se observou que a degradação do RNA é tecido dependente e que amostras processadas com homogeneizador de tecidos e extraídas com RNeasy Mini Kit apresentaram melhor qualidade do RNA, que as maceradas manualmente e extraídas com Trizol.

Descritores: Banco de tecidos; Controle de qualidade; DNA; Degradação do RNA; Isquemia fria; Criopreservação.

ABSTRACT

Viana, C. R. Evaluating the impact of implementation of quality control in a bank of cryopreserved tissue samples [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2013.

Tumor banks were created to organize the collection, storage and distribution of biological samples of cancer patients, favoring its use in cancer researches. Appropriate samples should have good quality of RNA, DNA and proteins. RNA of good quality should be intact and pure and DNA should have good concentration and purity. Based on international standards, we elaborated and implanted an comprehensive system of quality control in the tumor bank of Barretos Cancer Hospital, which was divided for study purposes in pre bank quality control (denominated pre bank) and post bank quality control (denominated post bank). Aiming to compare the quality of the samples in two banks, through the extraction of total RNA and DNA (by tissue homogenizer and Kits), we selected 200 tumor samples in a random way, distributed equally among breast, colorectal, stomach, lung and thyroid, being 100 of the pre-bank and 100 of the post bank. To evaluate the influence of cold ischemia time (time between the excision of the surgical specimen and the fast freezing of the stored sample) in the quality of total of RNA tumor samples of the post bank, we collected 200 tumor samples, distributed equally among breast, colorectal, stomach, lung and thyroid, from 100 different donors, half with the cold ischemia time (CIT) up to 30 minutes and the other half of the same specimen with CIT exactly 45 minutes. We extracted total RNA of these samples (with manual maceration and Trizol) and compared their quality, through the RNA integrity number (RIN), inside two intervals of time and in different topographies. Comparing samples with RIN above 7 (considered ideals for microarray experiments), of the pre bank and of the post bank, we found 73 (73%) in the first and 87 (87%) in the second ($p=0,013$). Comparing the interval of CIT up to 30 minutes with the exactly 45 minutes, we found respectively 63 (64,3%) and

36 (36%) samples with total RNA intact, 11 (11,2%) and 17 (17%) with total RNA partially degraded and 24 (24,5%) and 47 (47%) with total RNA degraded ($p<0,001$). Thyroid and colorectal samples were more sensitive to the increase of CIT ($p=0,006$ and $p=0,03$, respectively), and stomach and lung samples less sensitive ($p=0,919$ and $p=0,384$, respectively). Comparing the 200 samples from the two banks, we verified that the great majority had good quality; however the post bank stood out the evaluating number of the ideal samples for microarray studies, for probable interference of CIT, still not controlled in the pre bank. We also verified that some samples of the pre bank, stored more than 5 years in freezer at -80°C presented excellent quality. The study still showed that CIT is very important to preserve the quality of total RNA, for that, we should always respect the maximum time of 30 minutes. We still observed that the degradation of RNA is tissue dependent and that samples processed with tissue homogenizer and extracted using RNeasy Mini Kit showed better quality of RNA than macerated manually and extracted with Trizol.

Descriptors: Tissue bank; Quality control; DNA; RNA degradation; Cold ischemia; Cryopreservation.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Incidência de câncer no Brasil e no mundo

O câncer é um problema de saúde pública mundial (Sewart et al., 2009). Segundo estimativas da Organização Mundial de Saúde, para o ano de 2030, são esperados 27 milhões de casos incidentes de câncer com 17 milhões de mortes. O maior efeito desse aumento vai incidir em países de baixa e média renda (Instituto Nacional do Câncer, 2012).

No Brasil, as estimativas para o ano de 2012, válidas também para 2013, apontam a ocorrência de aproximadamente 518.510 casos novos de câncer, incluindo os casos de pele não melanoma, reforçando a magnitude do problema do câncer no país. Sem os casos de câncer de pele não melanoma, estima-se um total de 385.000 casos novos, com próstata, pulmão, colorreto e estômago predominando no sexo masculino e mama, colo uterino, colorreto e tireóide no sexo feminino (Instituto Nacional do Câncer, 2012).

1.2 Prevenção e controle do câncer

A prevenção e o controle do câncer precisam adquirir o mesmo foco e a mesma atenção que a área de serviços assistenciais, pois o câncer pode se tornar um grande obstáculo para o desenvolvimento socioeconômico de países emergentes como o Brasil (Instituto Nacional do Câncer, 2012).

A oncologia do século XX foi caracterizada pelo tratamento sintomático de doenças frequentemente avançadas, pelo diagnóstico e classificação morfológica do tumor e por regimes terapêuticos genéricos não efetivos para todos os tumores com morfologias similares causando frequentes efeitos colaterais para os pacientes. Em contraste, a oncologia do século atual está focada na prevenção / detecção precoce, classificação molecular do tumor, caracterização das vias envolvidas na oncogênese, na predição da resposta farmacogenômica e em terapias alvo (Morente et al., 2008).

A luta contra o câncer conhece muitas fronteiras. Pesquisas são necessárias para prevenção e para um melhor atendimento para aqueles que adquiriram a doença. Isto implica em uma maior necessidade de amostras humanas para a investigação. A falta de um acesso mais fácil a essas amostras para a comunidade científica é considerado como o principal obstáculo para a pesquisa em saúde, sendo os bancos de tumores os locais mais adequados para tentar resolver esse problema (Riegman et al., 2008).

Crescentes esforços têm sido feitos em todo o mundo para estudar as causas do câncer e sua associação com fatores genéticos, ambientais e estilo de vida. A identificação de marcadores de diagnóstico para detecção precoce e o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos que serão eficazes ao paciente é a principal motivação para a pesquisa em câncer. No entanto, as limitações de amostras disponíveis dificultam a tradução bem sucedida de resultados da investigação para a prática clínica. Para superar essas limitações existe a necessidade de criar bancos de tumores de qualidade, que irão organizar a coleta de amostras e de seus dados clínicos de maneira satisfatória (Morente et al., 2008; Dougall, 2011; Zain et al., 2012).

1.3 O impacto da revolução genômica na biomedicina

Desde o final da década de 80 a pesquisa em câncer vem mudando bastante, deixando de usar linhagens celulares e animais para utilizar amostras tumorais, particularmente nas pesquisas focadas em tumores humanos, para os quais existem relativamente poucos bons modelos animais. Além disso, nos últimos anos, tem havido uma crescente conscientização de que aplicando as tecnologias moleculares em evolução, para amostras de tecidos humanos, os pesquisadores podem explorar plenamente as capacidades ainda crescentes da revolução genômica na medicina (Lopez-Guerrero et al., 2006).

As novas informações obtidas a partir do Projeto do Genoma Humano têm facilitado os estudos moleculares e celulares. Técnicas avançadas para análise de DNA, RNA e proteínas têm potencialmente trazido um maior impacto na prevenção, diagnóstico, monitoramento, prognóstico e tratamento da maioria das doenças humanas, inclusive do câncer (Oosterhuis et al., 2003; Goebl et al., 2004; Ambrosone et al., 2006; Herpel et al., 2010; Reis et al., 2010; Tang et al., 2012).

A execução desse projeto direciona a um novo mundo de pesquisa, baseado em diversas técnicas moleculares como identificação de polimorfismos (que predispõe o risco de doenças ou aspectos farmacogenômicos de seu tratamento), análise de expressão gênica através de micro array de DNA e RNA (que tem como objetivo capturar a biologia e o fenótipo da doença), ensaios genômicos como hibridação genômica comparativa, rastreamento de genes para doenças hereditárias e multifatoriais (especialmente em diferentes etnias) e muitas outras questões, que têm

se tornado grandes desafios na genética médica e humana (Morente et al., 2008 ; Rudloff et al., 2010; Yu, Zhu, 2010; Majidzadeh-A et al., 2012).

Para conduzir esses estudos que irão utilizar proteínas e ácidos nucleicos, modelos da mesma espécie são mais adequados, havendo atualmente cada vez mais demanda por tecidos e tumores humanos, ao invés de animais, já que a espécie humana é única e os resultados mais relevantes vêm de material humano (Garman et al., 2007; Thomas et al., 2010; Yu, Zhu, 2010; Adams, 2011; Bérubé et al., 2011; Foster, 2011; Fuller, 2011; Pierscionek, 2011; Majidzadeh-A et al., 2012). No entanto, muitos estudos ainda ocorrem em modelos animais, devido à pouca disponibilidade de amostras humanas (Balaguer et al., 2006; Bunton, 2010; Coleman, 2011).

1.4 O papel fundamental dos biobancos na articulação da pesquisa translacional e da medicina personalizada

Percebendo a importância dos bancos de amostras tumorais juntamente com seus dados clínicos, mantidos de uma forma facilmente disponível, muitos pesquisadores ao redor do mundo têm sido motivados a criar seu biobanco, dentro das suas áreas de pesquisa, aumentando cada vez mais o número de amostras, o que facilita a realização de novos estudos (Cavuşoğlu et al., 2008).

Biobanco é um termo genérico que abrange várias subcategorias de bancos: banco de base populacional, banco para epidemiologia, banco de sangue, banco de espermatozoides, banco de órgãos e tecidos para transplante, banco de tecido embalsamado em parafina, banco de doenças raras, banco de tumores, etc. Essa subclassificação é

essencial, já que não é possível estabelecer as mesmas normas para todas as organizações que armazenam material biológico (Cavuşoğlu et al., 2008; Riegman et al., 2008; Bevilacqua et al., 2010; Hamilton et al., 2011).

Os biobancos de tecidos humanos são de particular importância e podem ser definidos como unidades funcionais ou institucionais, essenciais para a aquisição de amostras de alta qualidade para a pesquisa translacional, que tem como objetivo a descoberta e a validação de biomarcadores, bem como a identificação de novos alvos para a terapia, que trará os benefícios futuros para o diagnóstico e tratamento dos pacientes. É, portanto, uma atividade estratégica para a investigação e inovação em biomedicina (Morente et al., 2008; Bevilacqua et al., 2010).

O biobanco deve servir como ponto central de aquisição e triagem de tecidos, de outros materiais biológicos e de informações do paciente. Ele deve ser uma parte integrante dos meios de diagnóstico, com acesso imediato a informações e amostras do paciente. Deve-se utilizar seus serviços da melhor forma possível para garantir exemplares da mais alta qualidade para os pesquisadores (Dhir, 2008).

O Biobanco não deve ser considerado uma atividade estática. Pelo contrário, é uma disciplina nova, que precisa evoluir continuamente, de acordo com o desenvolvimento permanente de novas técnicas e metas científicas. Para cumprir as exigências atuais da comunidade científica, os biobancos precisam enfrentar alguns desafios essenciais, incluindo um projeto apropriado, procedimentos mais harmonizados e adequados e sustentabilidade, todos eles no âmbito de suas dimensões éticas, jurídicas e sociais (Riegman et al., 2008).

A criação de grandes bancos de tecidos frescos congelados, juntamente com seus dados clínicos correspondentes é uma ferramenta extremamente importante que

desempenha um papel fundamental na condição de esforços colaborativos entre clínicos, patologistas e cientistas para adquirir uma melhor compreensão das características moleculares do câncer e de potencialmente desenvolver biomarcadores importantes de diagnóstico e prognóstico, além de modalidades de tratamento mais individualizadas e eficientes (Brimo et al., 2011).

A biotecnologia moderna, baseada no perfil de expressão gênica e proteômica, tem trazido uma quantidade enorme de dados que fornecem uma oportunidade para identificar os produtos dos genes que desempenham um papel chave no desenvolvimento do câncer e de novas terapias para atingir as células cancerígenas. É essencial validar os produtos dos genes identificados a partir de tais estudos, como potenciais alvos de diagnóstico, de prognóstico e de terapia. No entanto, tanto a pesquisa básica quanto a pesquisa translacional frequentemente dependem da disponibilidade de DNA, RNA e proteínas de alta qualidade, isolados de amostras biológicas de pacientes com câncer (Morente et al., 2007; Cavuşoğlu et al., 2008; Sewart et al., 2009).

O conceito de "assinaturas moleculares", em que o tecido neoplásico pode ser classificado de acordo com o padrão de expressão de genes e proteínas, e a correlação com o estágio, prognóstico e história natural do câncer são passos importantes para individualizar a escolha do tratamento subsequente, com a quimioterapia adjuvante, radioterapia ou tratamento com novos agentes anticancerígenos. Atualmente, pode-se avaliar uma variedade de marcadores moleculares que permitem a definição dos subgrupos de mau prognóstico que precisam de regimes de tratamento mais agressivos e a seleção farmacodinâmica dos

indivíduos com maior probabilidade de responder a determinados fármacos citotóxicos (Lopez-Guerrero et al., 2006).

O estudo do perfil molecular e a análise de vias ou marcadores específicos em amostras de tumor ou de sangue auxiliam na tentativa de classificar molecularmente o câncer, ajudando a identificar pacientes com potencial benefício da terapia adjuvante baseada em agentes quimioterápicos ou em terapia alvo, além de identificar marcadores moleculares preditivos de sobrevida, recorrência e metástase (Raso, Wistuba, 2007).

A histopatologia é apenas parcialmente capaz de espelhar e prever o comportamento clínico individual de tumores. Através da aplicação de instrumentos moleculares, subgrupos tumorais antes indistinguíveis foram identificados e a definição de um padrão preciso de mutação gênica evidenciou classes de tumores com implicações clínicas e prognósticas (Bonin et al., 2010). Nos últimos anos, os avanços na tecnologia e a garantia de qualidade dos tecidos armazenados tornaram o perfil genômico confiável o suficiente para que decisões médicas possam ser tomadas baseadas em ensaios clínicos, beneficiando de forma direta os pacientes (Tang et al., 2012).

É cada vez mais evidente que as estratégias de seleção de tratamentos mais promissoras irão identificar e incorporar características específicas do próprio tumor. A fim de facilitar essa mudança para a medicina personalizada é extremamente importante estabelecer alguns princípios padrões para a coleta, preparação e análise de tecidos tumorais para os estudos de pesquisa translacional, ou seja, estudos que visam a aplicação prática das descobertas científicas (Hwang et al., 2008; Signoretti et al., 2008; Ruiz-Godoy et al., 2010).

1.4.1 Necessidade da criação de banco de tumores

Vários institutos de patologia possuem grandes arquivos de tecido neoplásico e seus correspondentes não neoplásicos, que foram obtidos com propósito diagnóstico e estão emblocados em parafina, mas além de esse material apresentar limitações para estudos genéticos, eles não possuem dados clínicos diretamente associados, o que restringe seu uso para as pesquisas (Asslaber et al., 2007).

A Patologia Molecular se expande dramaticamente dentro da Anatomia Patológica. De fato, a análise molecular de tecidos é frequentemente essencial para o diagnóstico, prognóstico, e / ou indicação de tratamento, particularmente no câncer (terapias alvo, por exemplo). Embora tecidos fixados com formalina e embebidos em parafina possam ser utilizados para algumas análises moleculares, tecidos tumorais congelados são necessários em muitos casos (Boudou-Rouquette et al., 2010).

Um centro de investigação em oncologia necessita manter um banco de tumores apropriado, a partir do qual amostras de alta qualidade são armazenadas em série, juntamente com os seus dados clínicos mais relevantes, para que possam servir de base para a pesquisa translacional no presente e no futuro (Morente et al., 2006 ; Mishra et al., 2007; Thomas, 2010).

Uma importante necessidade de muitos projetos de pesquisa é a disponibilidade de materiais de alta qualidade, adequadamente selecionados. A ausência desses materiais condensa o estudo desde o início, enquanto que a sua presença garante a matéria-prima essencial e apropriada para responder às questões científicas (Dhir, 2008). A falta de acesso a tecido humano normal e maligno é um dos principais obstáculos para a pesquisa relacionada ao câncer. A criação de banco de tumores

surge como uma prioridade (Clausen et al., 1989; Balaguer et al., 2006; Yu, Zhu, 2010).

1.4.1.1 Bancos de tumores

Os bancos de tumores foram criados para organizar a coleta, o armazenamento e a distribuição de amostras biológicas de pacientes oncológicos, juntamente com seus dados clínicos, para serem usados nas pesquisas sobre o câncer, depois de cumpridos os protocolos habituais de diagnóstico (Oosterhuis et al., 2003; Balaguer et al., 2006; Carvalho et al., 2007; Reis et al., 2010; Ruiz-Godoy et al., 2010; Yu, Zhu, 2010; Zain et al., 2012).

Muitos procedimentos diagnósticos e terapêuticos incluem a remoção do tecido doente e de parte do tecido normal circunjacente. Na maioria das vezes, apenas parte desse tecido será usado para diagnóstico patológico. O tecido residual é que poderá ser coletado para o banco, tornando-se um recurso muito valioso para a pesquisa básica e translacional (Riegman et al., 2006).

O objetivo geral de um banco de tumores é disponibilizar amostras de tecidos preservados da melhor forma possível, contendo DNA, RNA e proteínas de alta qualidade, para facilitar e agilizar as pesquisas básica e translacional sobre o câncer. Essas pesquisas visam aperfeiçoar os métodos de prevenção e diagnóstico, e descobrir novos marcadores prognósticos e terapêuticos para o câncer, beneficiando o doador e todos os que sofrem da doença (Carvalho et al., 2007; Rodrigues et al., 2009; Yu, Zhu, 2010).

Criar um banco de tumores é um desafio e uma prioridade nos centros de pesquisa sobre o câncer (Morente et al., 2006). Em geral, no início de sua criação, as amostras de tecido neoplásico e seu correspondente normal, junto com os dados clínicos do doador, representam a maior parte do material a ser recolhido. Posteriormente, fluidos corporais como sangue periférico, e scarro e urina também podem ser coletados (Yu, Zhu, 2010; Dougall, 2011; Majidzadeh-A et al., 2012).

Bancos de tumores de alta qualidade precisam da colaboração de médicos e cientistas básicos, além do consentimento informado dos pacientes e da aprovação ética. Os procedimentos operacionais padrões (POPs), a coleta de tecido fresco rapidamente congelado, o armazenamento e o controle de qualidade dos tecidos criopreservados são fatores fundamentais na construção e manutenção do banco de tumores (Yu, Zhu, 2010).

Um banco de tumores pode ser um instrumento de grande ajuda para a pesquisa científica, pois oferece para os pesquisadores amostras tumorais que foram armazenadas em condições ideais de conservação. Através da análise dessas amostras, o pesquisador pode entender melhor o câncer com relação ao diagnóstico, prognóstico, profilaxia e tratamento. Um banco de tumores bem organizado e estruturado facilita e permite descobertas que podem melhorar a saúde da população (Reis et al., 2010).

Tão importante quanto garantir a rastreabilidade completa da coleta, do processamento e do armazenamento da amostra é a obtenção de dados clínicos de qualidade, já que eles são fundamentais para o desenvolvimento da pesquisa (Isabelle et al., 2006; Lopez-Guerrero et al., 2006; Riegman et al., 2006; Riegman et al., 2008). O banco de dados das respectivas amostras deve conter informações clínicas

do paciente (genética familiar; história de saúde da família; uso de tabaco, nicotina, álcool; estado dietético; paridade; menopausa; gestação; lactação; uso de contraceptivo oral; história de reposição hormonal; uso de medicamento, etc.), do estado da doença (exames complementares, data do diagnóstico, estadiamento clínico, cronograma de tratamento com informações sobre cirurgia, radio terapia, quimioterapia, terapia de suporte hormonal, etc.), do seguimento do doador, além de dados patológicos da amostra (tipo e tamanho do espécime, classificação e grau histológicos, invasão angiolinfática, com comprometimento linfodenal e presença de metástase) (Ambrosone et al., 2006; International Agency for Research on Cancer, 2007; Cavuşoğlu et al., 2008; Hwang et al., 2008; Reis et al., 2010; Zain et al., 2012). Esses bancos permitem constituir grandes coleções, executar vários testes nas mesmas amostras e repetir experiências ao longo dos anos. Através da sua utilização, a coleta de amostra, que era uma das etapas mais demoradas e difíceis em estudos genéticos, foi contornada, e a investigação molecular pode ser conduzida de forma mais conveniente. Com todas essas vantagens ainda há poucos bancos estabelecidos em todo mundo (Majidzadeh-A et al., 2012).

Os bancos de tumores contribuem para a investigação translacional, promovendo a integração cada vez mais e melhor entre clínicos e pesquisadores. Investigação translacional é uma integração de pesquisa clínica e laboratorial visando à melhoria da prevenção, diagnóstico e tratamento de doenças através da aplicação prática das descobertas científicas. A identificação de um tumor ou de um marcador biológico permite uma melhor compreensão da patologia, do diagnóstico, do prognóstico, de indicadores de terapia mais adequada e do potencial de recorrência (Reis et al., 2010; Ruiz-Godoy et al., 2010).

Um bom banco de tumores deve ter pessoal e infraestrutura nos locais de coleta de amostras, que devem ser obtidas imediatamente após a excisão, antes da fixação, para assegurar a ótima preservação de proteínas e ácidos nucleicos (Carvalho et al., 2007; Dhir, 2008). Devem-se coletar amostras apenas de tumores maiores que 1,0 cm, para nunca prejudicar o diagnóstico do paciente. Sempre que possível as amostras de tecido normal devem ser coletadas a pelo menos 3,0 cm do tumor (Mishra et al., 2007; Yu, Zhu, 2010).

A falta de padronização dos métodos de coleta, processamento e armazenamento de amostras biológicas tem resultado em uma variabilidade na qualidade das mesmas e consequentemente, na reprodutibilidade dos resultados das pesquisas posteriores (Leyland-Jones et al., 2008).

A coleta de tecido fresco / congelado é dependente de vários fatores para que a coleção de amostras seja aceitável para os experimentos científicos. No entanto, desde que os princípios gerais da coleta rápida com congelamento imediato (ou transferência para RNAlater) e da prioridade da avaliação patológica completa sejam respeitados, a amostra poderá ser coletada (Leyland-Jones et al., 2008).

Em se tratando de amostra de sangue, o DNA tem grande chance de produzir produtos finais utilizáveis, mas apesar disso, quando se quer estudar amplificação de DNA ou perfis de expressão de RNA e de proteínas, esse tipo de amostra não é indicado (Riegman et al., 2008).

Deve-se avaliar a atividade do banco não somente pelo número de amostras armazenadas, mas preferencialmente pelo número de projetos cooperativos e de publicações em que está envolvido (Morente et al., 2007). Um banco de tumores

com nenhuma ou com pouca produção científica, mesmo armazenando milhões de amostras, não deve ser considerado um bom banco (Morente et al., 2008).

As vantagens de se ter um banco de tumores de qualidade não são apenas para as instituições coletoras, mas também para a futura geração de pacientes com câncer, uma vez que agora é possível fazer pesquisa com todos os tipos de tumores, inclusive com tumores raros, o que não era possível até pouco tempo atrás (Oosterhuis et al., 2003; Lopez-Guerrero et al., 2006).

Para o planejamento e logística de um banco de tumores, vários aspectos de ordem técnica, legal, médica, estrutural e física devem ser considerados. Eles podem ser agrupados em quatro categorias: projeto e estrutura; equipe multidisciplinar e de informática; aspectos ético-legais e coleta, preservação e controle de qualidade das amostras (Bevilacqua et al., 2010; Ruiz-Godoy et al., 2010).

1.4.1.1.1 Integração e treinamento da equipe multidisciplinar

Um banco de tumores de qualidade necessita de uma ampla integração, com treinamento e motivação de cirurgiões, enfermeiros, técnicos, patologistas, biólogos moleculares, auxiliares de escritório, cientistas da computação, estatísticos e epidemiologistas; além do fornecimento de tecido humano normal e neoplásico de alta qualidade com informação clínica, garantindo que as amostras possam ser utilizadas de forma satisfatória nas pesquisas e nos estudos de expressão gênica em geral (Morente et al., 2006; Hwang et al., 2008; Riegman et al., 2008; Ruiz-Godoy et al., 2010; Yu, Zhu, 2010; National Cancer Institute, 2011; Canadian Tumour Repository Network, 2012).

Os cirurgiões e as enfermeiras cirúrgicas devem ser informados sobre a importância e a necessidade do transporte rápido do espécime cirúrgico, a fim de melhorar a qualidade das amostras armazenadas (Balaguer et al., 2006). O pessoal envolvido na coleta, análise, processamento, preservação, armazenamento e distribuição de tecidos e células humanas deve ser devidamente qualificado e dotado de treinamento oportuno e relevante (Kaminski et al., 2012).

O treinamento de profissionais altamente qualificados melhora os padrões dos bancos de tumores, reconhecendo-os como parte integrante da biomedicina (Balaguer et al., 2006; Bevilacqua et al., 2010).

1.4.1.1.1.1 Papel central do patologista

A patologia é a base de um banco de tumores. Os patologistas não só fornecem informações essenciais para identificar a amostra, como também tomam decisões sobre o que deve ou não ser coletado, certificando-se que todo espécime cirúrgico primeiramente seja suficiente para o diagnóstico, que é prioridade e de sua responsabilidade, para depois coletar a amostra excedente e armazená-la de maneira ideal para ser usada em pesquisas (Oosterhuis et al., 2003; Balaguer et al., 2006; Lopez-Guerrero et al., 2006; International Agency for Research on Cancer, 2007; Mager et al., 2007; Morente et al., 2007; Bevilacqua et al., 2010; Clotworthy, 2011; Foster, 2011; National Cancer Institute, 2011).

Devido a sua formação e experiência profissional, os patologistas são as pessoas ideais para realizarem a amostragem, o armazenamento, a avaliação diagnóstica e a distribuição de amostras de tecido humano, desempenhando um papel fundamental

como investigadores e facilitadores da medicina moderna. Além disso, são os personagens principais na contínuidade entre a pesquisa e os cuidados médicos, estando também envolvidos indiretamente na escolha da terapia apropriada para os pacientes com câncer (Becich, 2000; Carvalho et al., 2007; Hwang et al., 2008; Bevilacqua et al., 2010; Herpel et al., 2010; Ruiz-Godoy et al., 2010).

O envolvimento direto de patologistas em todas as etapas de um banco de tumores não só assegura que as amostras de tecidos sejam adequadas para os estudos investigativos, mas também garante que o atendimento ao paciente não seja afetado de forma negativa (Pitt et al., 2008; Signoretti et al., 2008). Os patologistas desempenham um papel vital nos bancos de tumores, apesar de contar com poucos recursos, possuem um grande cargo de trabalho e de serem pouco reconhecidos pela sua contribuição (Leyland-Jones et al., 2008; Foster, 2011).

1.4.1.1.2 Garantia e controle de qualidade

Assegurar a qualidade é fundamental para o sucesso operacional de um banco de tumores, e a sua utilidade a longo prazo depende de verificações intermitentes através do controle de qualidade. O programa de garantia de qualidade de um banco de tecidos envolve planejamento, execuções, avaliações, documentações e melhorias para garantir que as amostras tenham um padrão de qualidade desejável. Por outro lado, o controle de qualidade envolve atividades técnicas que irão medir os atributos e desempenhos de um determinado processo ou de padrões de qualidade pré-definidos, tudo isso para minimizar erros que poderiam afetar de forma adversa os resultados científicos. O controle de qualidade é uma das mais importantes

medidas de garantia de qualidade (Morente et al., 2006; International Agency for Research on Cancer, 2007; Mishra et al., 2007; Pitt et al., 2008; National Cancer Institute, 2011; Canadian Tumour Repository Network, 2012; Tang et al., 2012).

Um banco de tumores de qualidade deve estar em uma área de segurança com acesso limitado, ter pessoal treinado para todos os procedimentos requeridos, ter auditorias internas e externas, controlar e documentar a manutenção de todos os materiais e equipamentos, bem como de todos os eventos que não se enquadram nos POPs (Mishra et al., 2007).

O controle de qualidade das amostras de tecido para projetos de pesquisa representa uma função essencial de um banco de tecidos e é um elemento chave da boa prática científica em projetos de investigação com base em tecidos humanos. Sua falta é causa frequente de dados incorretos em pesquisas biomédicas, causando consideráveis prejuízos para os respectivos projetos e para a comunidade científica, além de poder alterar a caracterização molecular do tumor, resultando em conduta clínica errada (Herpel et al., 2010; Johnsen et al., 2010). Para possibilitar a comparação dos resultados produzidos em experimentos com amostras de tecidos obtidos de diferentes institutos, é fundamental padronizar procedimentos operacionais para coleta, armazenamento e controle de qualidade (Balaguer et al., 2006; Riegman et al., 2006; Mager et al., 2007; Pitt et al., 2008; Johnsen et al., 2010; National Cancer Institute, 2011).

Um bom banco de tecidos precisa de um processo de controle de qualidade, o qual é geralmente dirigido pelo patologista (Yu, Zhu, 2010). Assegurar a qualidade dos tecidos armazenados é crucial, pois é estimado que aproximadamente 10% das amostras congeladas são insuficientes para análise molecular (Boudou-Rouquette et

al., 2010). A análise da qualidade inclui parâmetros tais como a avaliação do diagnóstico tumoral e das porcentagens de tecido tumoral, de estroma, de hemorragia e de necrose. A necrose é um dos fatores mais limitantes para a análise molecular, já que amostras que apresentam mais de 30 % da mesma tornam-se impróprias para a extração de ácidos nucleicos e proteínas (Boudou-Rouquette et al., 2010; Johnsen et al., 2010). Os patologistas devem observar a lâmina histológica em primeiro lugar, a fim de confirmar que existem mais de 70% de células tumorais viáveis nas amostras coletadas (National Cancer Institute, 2011; Yu, Zhu, 2010).

Um sistema eficaz de gestão de qualidade requer a documentação de todos os POPs, de uma forma passível de revisão e modificação. Os principais tópicos abordados nos POPs internacionais são: responsabilidades da liderança; definição de políticas e objetivos; estrutura organizacional; descrição das funções; planos e horários de treinamentos; aprovação local pelo comitê de ética; consentimento, privacidade e autonomia do paciente; controles de entrada de amostras e de outros materiais; controle da coleta, conservação, armazenamento e processamento das amostras; coordenação e rastreamento de projetos; informações clínicas detalhadas das amostras coletadas e avaliação histopatológica e molecular das amostras (International Agency for Research on Cancer, 2007; Herpel et al., 2010; Yu, Zhu, 2010).

Quando se trata de aspectos técnicos, melhores práticas devem ser aplicadas à manipulação e amostragem do material cirúrgico (menor tempo de isquemia, avaliação e seleção macroscópica precisa), congelação e armazenamento, banco de dados, manutenção e transferência de amostras e informação para o pesquisador (Balaguer et al., 2006). Vários fatores, incluindo o tipo e a representatividade da

amostra, o tempo de isquemia fria, o tempo de isquemia quente, a preservação do tecido, o método de extração do ácido nucléico, o tipo e o período de armazenamento e congelamento e a estabilidade das moléculas que serão estudadas são fatores que afetam a qualidade molecular do tecido. Isso porque tecidos com baixa celularidade são mais instáveis do que os densamente celulares, condições de hipóxia ou isquemia iniciam mecanismos de morte celular e subsequente degradação, tecido fresco não fixado é melhor do que o tecido fixado para extração de ácidos nucléicos, períodos curtos de armazenamento resultam em melhor quantidade e qualidade do ácido nucléico e tecido congelado aumenta a preservação do ácido nucléico (Pegg, 2001; Jewell et al., 2002; Tschulik, Zatloukal, 2001; Pitt et al., 2008; Roa, Artigas, 2008; Signoretti et al., 2008).

O tempo de isquemia quente é definido como o tempo de interrupção de suplemento sanguíneo do tecido até a sua excisão do paciente e o tempo de isquemia fria (TIF) é aquele que vai da excisão do paciente até o congelamento rápido ou instantâneo da amostra que será armazenada no banco de tumores (National Cancer Institute, 2011). O tempo de isquemia quente é muito difícil de ser controlado, porém o TIF deve ser o menor possível (preferencialmente abaixo de 30 minutos), à temperatura ideal e sob condições que impeçam a degradação do RNA e / ou das proteínas, ou mesmo a funcionalidade das células, e se possível em um ambiente estéril (Loken, Demetrick, 2005; Balaguer et al., 2006; Dhir, 2008; Yu, Zhu, 2010). Quando isso não for possível a amostra poderá ser coletada em até 2 horas (tempo de degradação do DNA), destacando o TIF ao registrá-la no banco de dados (Mager et al., 2007; Dhir, 2008).

O ideal é coletar as amostras imediatamente após a cirurgia, antes da fixação, para assegurar a melhor preservação das proteínas e dos ácidos nucleicos (Oosterhuis et al., 2003). As três técnicas utilizadas para assegurar o controle de qualidade morfológico da amostra que será coletada têm suas vantagens e desvantagens, são elas:

- Imagem em espelho: consiste em colher amostra de um tecido rente ao tecido coletado para o bloco, executando posteriormente uma análise histológica convencional do mesmo. Esta técnica fornece aspectos morfológicos muito bons dos tecidos, no entanto, analisa o tecido ao lado do congelado e não o tecido congelado em si;
- Congelação: são realizados cortes congelados do tecido em uma matriz própria para congelamento que ajuda a identificar a constituição celular exata da amostra. É referência em termos de controle morfológico, porém ela consome tempo e tecido, podendo ser problemática quando a amostra é muito pequena;
- Imprint citológico: nada mais é do que raspar com uma lâmina de vidro ou de bisturi a área tumoral de interesse, para em seguida deslizar suavemente sobre outra lâmina de vidro, para então corar o material obtido em hematoxilina e eosina (HE). Tem vantagens em termos de rapidez, custo e preservação do material, no entanto as características do tumor podem influenciar na celularidade do esfregaço (Dhir, 2008; Boudou-Rouquette et al., 2010).

Para a coleta recomenda-se o uso de instrumentos limpos para cada ressecção, e que eles sejam lavados ou trocados entre a dissecação dos tecidos normais e tumorais. O uso de instrumentos estéreis é recomendado se o tecido for utilizado para análise de perfis de RNA (Morente et al., 2006). Frascos de vidro e frascos de plástico

comum não são recipientes adequados para armazenar amostras em nitrogênio líquido e em fase de vapor, uma vez que as baixas temperaturas podem facilmente quebrar ou estourar o recipiente (Yu, Zhu, 2010). Criotubos ou tubos de criogenina com tampas de rosca são uma opção funcional e eficiente para abrigar fragmentos pequenos ou grandes de tecido que serão congelados subitamente (Morente et al., 2006; Yu, Zhu, 2010). Deve-se usar canetas próprias para identificar os tubos, pois marcadores à base de álcool vão borrar ao serem colocados no freezer a -80°C . Esses frascos não poderão conter nenhuma informação que identifique o paciente, para garantir o anonimato do mesmo (Leyland-Jones et al., 2008).

O congelamento imediato das amostras de tecido após a cirurgia e o posterior armazenamento a -80°C geralmente servem como procedimentos padrão para a aquisição de espécimes cirúrgicos (Mick et al., 2006). O melhor recipiente para o congelamento instantâneo da amostra coletada (colocada dentro do criotubo) é um container próprio contendo nitrogênio líquido a uma temperatura inferior a -170°C . O nitrogênio líquido garante excelente integridade para a amostra e uma grande variedade de opções para análise do tecido (National Cancer Institute, 2011). Assim que possível as amostras devem ser transferidas para um freezer adequado, normalmente à temperatura de -80°C , que induz uma mudança reversível no estado físico do tecido e uma inativação enzimática, o que significa que os ácidos nucleicos ficam quimicamente preservados. O armazenamento em freezer de nitrogênio líquido em fase de vapor é mais recomendado para pesquisa proteômica (Morente et al., 2006; Pitt et al., 2008; Suh et al., 2009; Johnsen et al., 2010; Yu, Zhu, 2010). Porém, como os efeitos das condições de armazenamento podem ser específicos de cada tecido, novos estudos serão essenciais para o esclarecimento da influência específica

da temperatura e do tempo de armazenamento na expressão gênica e proteica das amostras de câncer (Signoretti et al., 2008; Rudloff et al., 2010).

A Criopreservação permite estudos morfológicos de alta qualidade, análises moleculares e citogenéticas, além da extração de DNA e RNA; porém exige cuidados especiais para garantir a longevidade dos tecidos armazenados. Requer amostras pequenas variando entre 0,5 e 1,0 cm³, que devem ser acondicionadas em freezers com temperaturas abaixo de -80 °C (Morente et al., 2006; Carvalho et al., 2007; Mager et al., 2007; Mishra et al., 2007; Reis et al., 2010). É necessário que o local de instalação dos freezers apresente temperatura satisfatória (inferior a 22°C), iluminação e espaço suficiente para a circulação de ar (Mishra et al., 2007).

Em geral, as amostras devem ser processadas o mais rapidamente possível, e é importante documentar o TIF e o tempo de armazenamento, tornando-os disponíveis para os usuários finais, que poderão fazer conclusões satisfatórias sobre os seus resultados experimentais (Pitt et al., 2008).

1.4.1.1.2.1 Qualidade dos ácidos nucleicos

Com o advento dos bancos de tumores, que contêm grande número de amostras, a análise de DNA, RNA e proteínas a partir de amostras tumorais humanas está se tornando um fator cada vez mais importante na pesquisa oncológica (Sewart et al., 2009). Técnicas moleculares para a caracterização de tecidos, como microarray e PCR em tempo real, geralmente requerem coleções de tecidos frescos congelados, como fontes de ácidos nucleicos de alta qualidade, fundamentais para a interpretação significativa dos resultados e para a facilitação da comparação dos resultados entre

centros independentes (Jewell et al., 2002 ; Micke et al., 2006 ; Canadian Tumor Repository Network, 2012).

Muitos estudos têm demonstrado que a criopreservação não afeta a qualidade do DNA e que mesmo o DNA extraído a partir de tecido embebido em parafina pode ser utilizado para análises moleculares (Yu, Zhu, 2010). Tecidos frescos ou congelados tendem a ter RNA de melhor qualidade que os fixados em formol, pois ela endurece o tecido e aumenta as ligações cruzadas entre as macromoléculas, tornando o RNA compacto e difícil de recuperar (Tang et al., 2012). Evitar a degradação do RNA é o maior desafio nesse processo, pois ele é considerado a molécula mais frágil e degrada-se muito rapidamente se precauções especiais não forem tomadas para sua preservação. Um dos fatores mais importantes para preservar a qualidade do RNA é o TIF, mas a sua influência na integridade do RNA ainda não está bem documentada (Micke et al., 2006; Riegman et al., 2008; Rudloff et al., 2010; Yu, Zhu, 2010; Tang et al., 2012).

O RNA é mais instável que o DNA. Isso se deve ao fato dos tecidos, da saliva e do próprio ambiente terem altas concentrações de enzimas líticas (RNases), que o degradam rapidamente (Micke et al., 2006; Sandusky et al., 2007; Yu, Zhu, 2010). Por isso, na maioria das vezes, vale a pena avaliar a qualidade do RNA antes de se submeter um espécime às caras análises de microarray (Tang et al., 2012).

Um RNA de qualidade deve estar íntegro (as moléculas não devem estar fragmentadas) e puro, ou seja, livre de contaminantes como sais, etanol, lipídeos, polissacarídeos, proteínas, fenol, clorofórmio e outras substâncias que podem estar presentes nas soluções utilizadas na sua extração ou no tecido de origem. Isto é especialmente importante no caso em que o RNA será utilizado em reações

enzimáticas, uma vez que estas exigem condições químicas específicas, além de serem suscetíveis à inibição por uma série de compostos. Um DNA de qualidade deve ter boa concentração e pureza (Schroeder et al., 2006; Pitt et al., 2008; Biomedical Genomics, 2012; Gene Quantification, 2012).

Para avaliar a pureza do RNA e a concentração e pureza do DNA, utiliza-se o espectro de absorvância da amostra através de um espectrofotômetro. Com os espectrofotômetros mais modernos, é necessário utilizar apenas pequena quantidade de amostra para se obter um espectro completo, preciso e quase sempre sem que seja necessário diluir a amostra. Em poucos segundos, observa-se na tela um gráfico mostrando as razões de absorvância 260/280 e 260/230, além da concentração do ácido nucleico avaliado (Biomedical Genomics, 2012; Gene Quantification, 2012; Oxford Gene Technology, 2012). Proteínas apresentam um pico de absorvância a 280 nm e outros contaminantes (como sais, polissacarídeos e compostos orgânicos como fenol) apresentam pico de absorvância em torno de 230 nm. Por isso, a razão das absorvâncias 260/280nm é frequentemente utilizada para avaliar a contaminação por proteínas, sendo o valor de referência (amostra livre de proteínas) maior ou igual a 1.8. Já a razão das absorvâncias 260/230nm é utilizada para avaliar a contaminação por outros compostos (valor de referência também maior ou igual a 1.8). A concentração do DNA vai depender de cada amostra analisada (Biomedical Genomics, 2012; Gene Quantification, 2012).

A integridade das moléculas de RNA é de fundamental importância para os experimentos que tentam refletir de maneira instantânea a expressão gênica, no momento da extração do RNA. Até recentemente, não havia nenhum padrão confiável para estimar a integridade das amostras de RNA. A razão 28S/18S do RNA

ribossômico, avaliada usando eletroforese em gel de agarose, que é a medida comum para esta finalidade, tem-se mostrado inconsistente e subjetiva. O advento da separação eletroforética micropilar do RNA fornece base para uma abordagem automatizada de alto rendimento, de modo a estimar a integridade das amostras de RNA de forma inequívoca. O Agilent 2100 Bioanalyzer extrai um algoritmo que descreve a integridade do RNA. O algoritmo resultante é um procedimento automatizado e independente do usuário, por isso, confiável para a padronização do controle de qualidade do RNA. O Bioanalyzer considera características de várias regiões do eletroferograma gravado, a fim de obter uma previsão sólida e confiável da integridade do RNA, especialmente se comparado com os métodos tradicionais (Schroeder et al., 2006; Mager et al., 2007; Lawson et al., 2010; Rudloff et al., 2010; Agilent Technologies, 2012; Biomedical Genomics, 2012).

Nos últimos anos, o Agilent 2100 Bioanalyzer junto com o Agilent RNA 6000 Nano Chip (Figura 1) tem-se tornado uma técnica convencional para a análise da qualidade do RNA (avaliando sua integridade), mas ainda é um equipamento pouco comum nos laboratórios. Ele é um dispositivo bio-analítico automatizado que usa tecnologia microfluídica que proporciona divisões eletroforéticas de forma automatizada e reprodutível. Pequenas quantidades de RNA são separadas nos canais dos chips microfabricados de acordo com o seu peso molecular e, subsequentemente, são detectadas através de fluorescência laser induzida. O resultado é automatizado e fornecido no prazo de 30-40 minutos na forma de dados digitais de alta qualidade, sendo visualizados um eletroferograma, um gel virtual e uma pontuação com base no valor do número de integridade do RNA (RIN). Além disso, tem a vantagem de requerer pequenas quantidades de material (mínimo de 50 picogramas de RNA, que é

equivalente a cerca de cinco células) (Schroeder et al., 2006 ; Staal et al., 2006 ; Agilent Technologies, 2012 ; Biomedical Genomics, 2012 ; Canadian Tumour Repository Network, 2012).

Figura 1 - Agilent 2100 Bioanalyzer com o Agilent RNA 6000 Nano Chip
Fonte: Centro de Pesquisa em Oncologia Molecular do Hospital de Câncer de Barretos, 2012

Cada chip colocado no Bioanalyzer contém 16 cavidades, sendo 12 para colocar as amostras que serão avaliadas e 4 para colocar os respectivos controles (Figura 2).

Figura 2 - Agilent RNA Nano Chip
Fonte: Biomedical Genomics, 2012

Abaixo observa-se o gel virtual e o eletroferograma, fornecidos pelo Bioanalyzer (Figura 3).

Figura 3 - Gel virtual (esquerda) mostrando a degradação progressiva do RNA e eletroferograma (direita) destacando os três intervalos da integridade do RNA, ou seja, intacto, parcialmente degradado e totalmente degradado

Fonte: Agilent Technologies, 2012

A figura 4 ajuda a interpretar o eletroferograma. Este caso mostra um RNA de alta qualidade (RIN 9).

Figura 4 - Figura interpretativa do eletroferograma, mostrando um RNA de alta qualidade. A parte superior destaca os dois picos claros e distintos das bandas 18s e 28s. A parte inferior enfatiza a regularidade do traçado antes e entre os dois picos, mostrando a quase ausência de fragmentação do RNA

Fonte: Canadian Tumour Repository Network, 2012

O RIN é um algoritmo universal baseado em uma combinação de características diferentes que contribuem para obter informações sobre a integridade do RNA. Seus valores vão de 1 a 10, sendo que um valor de RIN alto corresponde a RNA intacto, ou seja, com alta expressão gênica e um valor baixo de RIN significa RNA degradado, ou seja, baixa expressão gênica. O RIN representa uma medição independente e padronizada da qualidade do RNA (Schroeder et al., 2006; Field et al., 2009; Lawson et al., 2010; Biomedical Genomics, 2012).

Em tecidos congelados, um RNA é considerado de alta qualidade quando o seu RIN é maior ou igual a 7, sendo considerado ideal para análise de microarray. Se o RIN for maior ou igual a 5 o RNA é suficiente para estudos de PCR em tempo real (Schroeder et al., 2006; Pitt et al., 2008; Field et al., 2009; Lawson et al., 2010; Rudloff et al., 2010; Bio medical Genomics, 2012; Gene Quantification, 2012). Não há nenhum estudo sistemático sobre a influência da criopreservação sobre a qualidade das proteínas. Precisamos acumular a experiência de diferentes bancos de tecidos para estabelecer o padrão de controle de qualidade para proteínas (Yu, Zhu, 2010).

1.4.1.1.2.2 Avaliação anual das amostras

Os bancos devem assegurar que as amostras biológicas fornecidas sejam adequadas para as pesquisas, realizando uma avaliação anual (Riegman et al., 2008).

No primeiro ano de um banco, deve-se avaliar a qualidade de 2% de suas amostras a cada seis meses, por meio da extração de RNA total, pois como foi explicado anteriormente, ele é mais sensível às oscilações de temperatura que o DNA, que suporta até 2 horas de isquemia fria sem sofrer alterações. Se não forem encontrados problemas, nos anos seguintes deve-se avaliar 1% das novas amostras coletadas a cada ano. Além de avaliar a qualidade do material congelado deve-se checar também a precisão do registro (identificação e localização da amostra) e a eficácia dos equipamentos (Morente et al., 2006; International Agency for Research on Cancer, 2007; Mager et al., 2007; Pitt et al., 2008; Canadian Tumour Repository Network, 2012).

1.4.1.1.3 Aspectos éticos e legais

Na configuração dos bancos de tumores, as implicações éticas, legais e sociais devem ser cuidadosamente consideradas, de acordo com as normas de cada país, pois inúmeros projetos de pesquisas têm sido barrados por causa dessas questões (Carvalho et al., 2007; Hwang et al., 2008; Morente et al., 2008; Yu, Zhu, 2010). Os bancos devem fornecer soluções técnicas otimizadas para a aquisição, armazenamento, documentação e transferência de espécimes, que cumpram com as normas nacionais e internacionais e as exigências legais (Herpel et al., 2010).

A ética no campo dos biobancos requer o estabelecimento de princípios que irão identificar possíveis desvios e a criação de mecanismos que irão detectar e impedir os abusos que podem ocorrer durante a aquisição, processamento e distribuição das amostras teciduais para pesquisa (Pedraza, 2011). Devem ser muito bem definidos os direitos, responsabilidades e obrigações dos membros e parceiros do banco, bem como dos pacientes doadores e dos pesquisadores que utilizam tecidos e tecnologias fornecidos pelo banco (Herpel et al., 2010).

Nenhum tecido a mais deve ser removido do paciente para propósito de pesquisa. Somente deve ser excisada a quantidade apropriada de tecido necessária para a ressecção cirúrgica curativa ou diagnóstica e parte do seu excedente colhido para o banco (LiVolsi et al., 1993; Roa, Artigas, 2008; Rodrigues et al., 2009). Esses tecidos devem ser utilizados com o único objetivo de responder às questões científicas levantadas, sem qualquer interesse comercial, ou mesmo incentivo financeiro ao doador (Oosterhuis et al., 2003).

A Convenção dos Direitos Humanos e de Biomedicina do Conselho Europeu defende e estipula que: o doente deve dar o seu consentimento informado; os projetos de investigação devem ser aprovados por um comitê de ética; o material biológico humano deve ser registrado de forma a não permitir a identificação do paciente e que a transferência de material para outro país só pode ser possível se o país receptor tiver regulamentos semelhantes ao do país fornecedor (Teodorovic et al., 2003). Devido à necessidade de respeitar os regulamentos nacionais e ao mesmo tempo encontrar uma maneira de trocar as amostras entre países com diferentes regimes, o Banco Europeu de Tecido Tumoral Humano Congelado (TuBaFrost) teve como solução a criação do chamado princípio do país de origem, que significa: “Se o tecido pode ser legitimamente usado para determinado tipo de pesquisa no país onde foi retirado e a cuja jurisdição o paciente pertence, ele também pode ser usado para tal pesquisa no país para onde ele é enviado, dentro do contexto de um programa científico, mesmo que neste país apliquem-se outras regulamentações para pesquisa com tecido residual retirado de paciente sob a sua jurisdição” (van Veen et al., 2006). A questão mais importante no banco de tecidos é obter o consentimento livre e informado do doador, ou de seu parente mais próximo ou representante legal, em algumas situações especiais, como coma, emergência ou incapacidade mental (Mishra et al., 2007). A maioria das pessoas concorda em doar parte de seu tecido excisado para tumorigênese ou pesquisa de biomarcadores (Yu, Zhu, 2010). Kettis-Lindblad et al. (2006) entrevistaram seis mil pacientes, e grande parte dos entrevistados (86%) concordaria em doar amostras e informações para fins de pesquisa genética. As normas e leis são diferentes em cada país, não sendo possível

um termo de consentimento unificado. Por isso, cada país ou Instituição deve criar o seu (Mager et al., 2007; Ruiz-Godoy et al., 2010).

Não é necessário que a equipe do banco de tumores ou o médico do doador solicitem o consentimento ou autorização. Um bom comunicador, um conselheiro ou profissional devidamente treinado pode assumir essa responsabilidade de uma maneira melhor. Tempo e um ambiente adequado e não coercivo são necessários para a obtenção do consentimento informado. O potencial doador deve receber informações equilibradas, mostrando o bem que uma doação individual poderá fazer para a sociedade. O termo deverá conter elementos básicos como informações sobre o uso, benefícios e riscos associados à doação do tecido, bem como garantir a confidencialidade e o anonimato do paciente e a natureza voluntária da doação, além do direito de retirar o consentimento a qualquer momento. Isso significa que a pessoa envolvida deve ter capacidade legal para dar consentimento, deve ser capaz de exercer livre poder de escolha, sem a intervenção de qualquer elemento de força, fraude, engano, coação, superação ou outra forma de constrangimento ou coerção, e deve ter conhecimento e compreensão suficientes dos elementos envolvidos no assunto (Ooslerhuis et al., 2003; Cavuşoğlu et al., 2008; Morente et al., 2008; Rodrigues et al., 2009; Ruiz-Godoy et al., 2010; Patel, 2011; Pedraza, 2011; Siminoff et al., 2012; Zain et al., 2012).

Para garantir a privacidade e o anonimato do paciente, não se deve usar nada que o identifique na amostra, que deverá ser identificada através de código de barras e ficar disponível no sistema do banco para os pesquisadores (Morente et al., 2006). O acesso aos dados de identificação do paciente é restrito ao administrador e aos assistentes do banco (Hwang et al., 2008).

Ao fornecer amostras para determinada pesquisa o comitê do banco ou o comitê de ética da instituição deve analisar o mérito científico e o potencial impacto da pesquisa proposta, se a pesquisa é adequada ao propósito e à natureza do banco, a adequação do projeto de pesquisa e os recursos financeiros para conduzi-la, os benefícios e os riscos da pesquisa proposta, considerações legais e éticas, a qualificação da equipe que irá realizar a pesquisa e o ambiente na qual ela será realizada (Pitt et al., 2008).

Conclui-se que, os bancos de tumores devem sempre obedecer a sólidos critérios éticos e legais, entre os quais estão a existência do consentimento informado, a garantia da privacidade e do anonimato do doador, a prioridade do diagnóstico patológico e a proibição do uso comercial de tecido humano (Oosterhuis et al., 2003; Balaguer et al., 2006; van Veen et al., 2006; Carvalho et al., 2007; Reis et al., 2010; Ruiz-Godoy et al., 2010).

1.4.1.1.4 Segurança

A segurança é de suma importância para as pessoas que lidam com amostras humanas e bancos de tumores. Além das medidas gerais de segurança contra incêndios, riscos elétricos e físicos, conforme aplicável em outros lugares, precauções especiais devem ser tomadas para proteger os trabalhadores contra: patógenos do sangue (vírus da imunodeficiência humana e das hepatites B e C), doenças adquiridas através do contato (como a tuberculose em locais endêmicos, por exemplo) e o risco de queimaduras químicas e térmicas (nitrogênio líquido e gelo seco). A equipe envolvida deve tratar todos os materiais como se fossem

potencialmente, contaminados ou infectados, usando sempre aventais, calças compridas, sapatos cobertos, luvas de plástico, óculos e máscaras de proteção, além de ser vacinada contra hepatite B. E por razões de segurança, não se devem coletar amostras de pacientes que tenham confirmadas alguma das doenças citadas acima (Clausen et al., 1989; LiVolsi et al., 1993; Morente et al., 2006; International Agency for Research on Cancer, 2007; Mager et al., 2007; Mishra et al., 2007; Reis et al., 2010; Yu, Zhu, 2010).

Nos locais onde se usam cilindros de nitrogênio líquido para o armazenamento imediato das amostras, é importante frisar que a fase de vapor evita os riscos de explosão encontrados na fase líquida (Mishra et al., 2007). Além disso, quando se trabalha com nitrogênio líquido, é obrigatório usar luvas anti-congelamento, bem como óculos de proteção (Pitt et al., 2008).

1.5 Redes cooperativas de bancos de tumores

O câncer é uma doença global, cujo conhecimento requer a comparação entre os padrões da doença em diferentes partes do mundo. Além disso, os estudos sobre muitas formas raras de câncer são limitados pela dificuldade em recrutar números suficientes de casos dentro de qualquer banco de tumores isolado. Redes de bancos implicam em um fluxo multidirecional de informações, conhecimentos e materiais biológicos entre centros de diferentes partes do mundo, e requerem que todos os bancos adotem normas técnicas comuns para a coleta, armazenamento, recrutamento e gerenciamento de dados das amostras (International Agency for Research on Cancer, 2007).

O número de amostras armazenadas em um biobanco é um aspecto relevante para suportar as necessidades da medicina personalizada, entretanto, explorar todo potencial dos biobancos, através de uma cooperação entre eles é indispensável (Asslaber et al., 2007). A medicina clínica deve ser baseada em evidências e isto significa o estudo de um grande número de casos antes de aceitar o valor clínico de um novo marcador ou de uma nova droga. Por esta razão, estudos multicêntricos e multinacionais com grande número de casos são necessários. Redes cooperativas entre os bancos são essenciais para suprir essa necessidade (Morente et al., 2008). Uma rede cooperativa de bancos garante a visibilidade e acessibilidade dos tecidos, disponibilizando grandes quantidades de amostras de tumores específicos ou raros, bem como proporcionando oportunidades de contato para colaboração entre cientistas de ponta (Lopez-Guerrero et al., 2006). As vantagens de uma rede de bancos são múltiplas: séries suficientemente amplas de casos; amostras incluídas em ensaios clínicos multicêntricos e multinacionais; amostras incluídas em estudos cooperativos inter-hospitalares; diminuição dos efeitos dispersos da origem multicêntrica da amostra, além de favorecer a cooperação entre os centros (Carvalho et al., 2007). Independentemente, de que rede cooperativa a coleção de amostras pertença, ela deve ficar guardada na sua instituição original, onde pode ser usada para diagnóstico clínico, estudos e pesquisas dentro da própria instituição (Morente et al., 2007).

Não se sabe exatamente qual foi o primeiro banco de tumores a funcionar regularmente; no entanto, nos últimos anos extensas redes de bancos de tumores têm sido formadas para atuar de forma homogênea, seguindo de terminados padrões. Entre essas redes estão a Rede Cooperativa de Tecidos Humanos (CHTN) que surgiu

em 1987 nos Estados Unidos e é comandada pelo Instituto Nacional do Câncer (NCI), sendo a primeira rede cooperativa de tumores humanos para pesquisa (Morrin et al., 2005), o TuBaFrost e o Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO) na Espanha, que muito vem contribuindo com a globalização da ciência (Ruiz-Godoy et al., 2010).

O TuBaFrost é um banco virtual de tumores, administrado pela Organização dos Institutos de Câncer Europeus, que tem como intuito promover e integrar os bancos de tumores de vários países europeus. Esse banco possui um grande número de amostras de alta qualidade que são coletadas e armazenadas nos laboratórios dos centros de câncer e das universidades de cada país coletor. Padronizações da coleta e do armazenamento, além de um rigoroso controle de qualidade, foram adotadas por eles para minimizar a variabilidade interinstitucional (Lopez-Guerreiro et al., 2006; Morente et al., 2006; Riegman et al., 2006; Veen et al., 2006). Esse modelo não corresponde a um banco de tumores central, mas a uma rede cooperativa e coordenada de bancos que se baseiam em protocolos homogêneos e de excelência no tratamento das amostras, e que estão interconectados através de uma rede de computadores. Os requisitos mínimos de qualidade exigidos para esses bancos são: TIF de no máximo 30 minutos, seleção das amostras pelo patologista ou técnico treinado sob sua supervisão, temperatura menor que -80°C para armazenamento, alarme nos freezers, freezer back-up, termo de consentimento informado, avaliações realizadas por um comitê de ética, etc. (Morente et al., 2007).

No ano de 2009, o NCI em parceria com Brasil, Argentina, Chile, México e Uruguai, criou a Rede de Pesquisa de Câncer Estados Unidos - América Latina (US-LACRN). Essa foi a primeira rede formal de pesquisa estabelecida entre a América

Latina e os Estados Unidos e tem como objetivo acelerar o controle do câncer entre as populações hispânicas no continente latino-americano e norte-americano e fortalecer a pesquisa sobre a doença nessas regiões. O projeto piloto desta parceria é um estudo sobre câncer de mama denominado: “Perfil molecular de câncer de mama estádios II e III entre mulheres latino-americanas recebendo tratamento padrão”, que ajudará a determinar e diferenciar os efeitos de terapias padrão de cânceres de mama em mulheres latino-americanas. Esse estudo foi iniciado em abril de 2011 e conta com a participação de diversos hospitais / clínicas localizados nos países membros, assim como de 10 centros de pesquisas e 11 bancos de tumores. No Brasil, a US-LA CRN é coordenada pelo Ministério da Saúde e integrada pelo Instituto Nacional de Câncer, Hospital A. C. Camargo, Instituto de Câncer do Estado de São Paulo e pelo Hospital de Câncer de Barretos (National Cancer Institute, 2012).

Em síntese, uma rede cooperativa de banco de tumores representa um grande desafio para a pesquisa oncológica, e deve basear-se em modelos de cooperação e de procedimentos padronizados, apropriados e disponíveis de forma que possibilitem a realização de estudos moleculares, limitando a variabilidade nos estudos multicêntricos (Morente et al., 2006). Os bancos não devem servir exclusivamente para satisfazerem suas necessidades ou projetos de pesquisas individuais e todos os esforços devem ser feitos para garantir que as amostras e seus dados estejam disponíveis para toda a comunidade científica (International Agency for Research on Cancer, 2007).

1.6 Bancos de tumores no Brasil

Os três maiores bancos de tumores do Brasil são os do Hospital de Câncer de Barretos, do Hospital A. C. Camargo e do Instituto Nacional do Câncer (Reis et al., 2010).

Segundo a nova legislação brasileira, um biobanco deve conter um sistema seguro de identificação, que garanta o sigilo, o respeito à confidencialidade e à recuperação dos dados dos sujeitos da pesquisa. É obrigatório obter-se do sujeito da pesquisa ou seu responsável legal o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), antes da coleta de qualquer amostra biológica. O TCLE deve conter informações relativas ao sujeito e às amostras; e às etapas de coleta, processamento, armazenamento, distribuição e descarte de material biológico humano. O sujeito da pesquisa deve optar pela necessidade ou dispensa de novo consentimento a cada pesquisa; deve ser informado sobre a perda ou destruição de suas amostras biológicas; bem como sobre o encerramento do Biobanco ou do Biorrepositório, quando for o caso. As amostras armazenadas permanecem sob guarda e responsabilidade institucional, porém o sujeito da pesquisa, ou seu representante legal, a qualquer tempo e sem quaisquer ônus ou prejuízos, pode retirar o consentimento de guarda e utilização do material biológico armazenado. A legislação brasileira veda o patenteamento e a utilização comercial de material biológico humano armazenado em Biobancos e Biorrepositórios (Conselho Nacional de Saúde, 2011).

1.6.1 Banco de tumores do Hospital de Câncer de Barretos

O banco de tumores do Hospital de Câncer de Barretos foi criado em março de 2006, vinculado ao Departamento de Patologia e ao Instituto de Ensino e Pesquisa (IEP). A equipe de seis pessoas é composta por quatro funcionários em dedicação total e exclusiva, sendo dois biólogos e duas técnicas auxiliares e por um patologista e uma bióloga molecular, que são os responsáveis pela assessoria e coordenação. O banco também recebe suporte técnico do Departamento de Informática. Diferentemente da maioria dos bancos de tumores que possuem coleções de amostras específicas de determinados tipos de tumores (Yu, Zhu, 2010), este banco contém uma ampla variedade de amostras de diferentes tipos tumorais. Até dezembro de 2012 foram coletadas 81.466 amostras biológicas, distribuídas entre tecido tumoral, tecido normal, tecido metastático, sangue, soro, leucócitos, plasma, medula óssea, líquido ascítico e lavado bucal de 18.379 doadores diferentes (Figura 5). As amostras podem ser utilizadas em projetos de pesquisas previamente aprovados pelo Comitê de Ética e Pesquisa (CEP) do hospital, que conta com dois membros do banco de tumores.

Figura 5 - Figura mostrando o número total de cada tipo de amostra (colunas vermelhas) e a respectiva quantidade de doadores (colunas verdes)

Fonte: Banco de tumores do Hospital de Câncer de Barretos, 2012

Estudos que avaliam a viabilidade das amostras podem ser úteis na identificação precoce de problemas na coleta, manuseio e processamento, antes que outros estudos científicos sejam realizados. Estes estudos também podem ajudar na validação de novos processos e protocolos implantados (Pitt et al., 2008). Devido ao grande volume de amostras do banco e a criação do centro de pesquisa em oncologia molecular, decidiu-se elaborar e implantar um abrangente sistema de controle de qualidade baseado em normas internacionais, visando uniformizar a coleta, o congelamento, o armazenamento e o rastreamento das amostras, além de garantir o fornecimento adequado das mesmas para as pesquisas.

Há poucos estudos na literatura avaliando a influência das possíveis variáveis que podem ocorrer durante a coleta de amostras biológicas e suas interferências na qualidade do RNA extraído (Jewell et al., 2002; Ohashi et al., 2004; Spruessel et al., 2004; Rudloff et al., 2010). Segundo Micke et al. (2006) existem poucos estudos relatando a manipulação do tecido fresco entre a cirurgia e o subsequente congelamento e armazenamento no banco de tumores. Acredita-se que o TIF possa

ter efeitos significativos na integridade e nos níveis de expressão do RNA , podendo consequentemente influenciar nos resultados dos estudos de expressão gênica. No entanto, não se sabe a partir de que TIF uma amostra de tecido estará desqualificada para a posterior análise de RNA (Micke et al., 2006). Por isso, resolveu-se também estudar a influência do TIF em diversas amostras tumorais de diferentes órgãos, coletadas em dois intervalos de tempo.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

- Avaliar e comparar a qualidade de amostras tumorais congeladas de um banco de tumores, pré e pós à implantação de um programa de garantia e controle de qualidade, através da extração de DNA e RNA total, a fim de identificar e corrigir possíveis falhas.
- Avaliar e comparar a influência do TIF na qualidade do RNA total de amostras tumorais congeladas de diferentes topografias, coletadas em dois intervalos diferentes.
- Comparar a influência dos métodos de processamento (maceração manual versus maceração automatizada) e de extração (Kits versus Trizol) nas amostras coletadas com TIF abaixo de 30 minutos.
- Averiguar se o congelamento imediato das amostras diretamente em nitrogênio líquido interfere na qualidade dos ácidos nucleicos.

3 MÉTODOS

3.1 Local e período do estudo

O estudo foi realizado no Hospital do Câncer de Barretos - Fundação Pio XII, entre os anos de 2008 e 2012, e contou com as participações do Banco de Tumores, do Departamento de Patologia, do Centro Cirúrgico, do IEP e do Centro de Pesquisa em Oncologia Molecular do próprio hospital, além do Departamento de Patologia da Universidade de São Paulo (USP).

3.2 Programa de controle e garantia de qualidade

Baseado em normas internacionais utilizadas em bancos de tumores, com algumas modificações e adaptações, desenvolveu-se e implantou-se um programa de controle e garantia de qualidade, visando padronizar a coleta, o armazenamento e a distribuição das amostras, para que elas possam ser utilizadas nas pesquisas científicas sem interferir no resultado das mesmas. O programa implantado foi dividido em 12 tópicos principais:

- TIF ou tempo de coleta:

É definido como sendo o tempo entre a excisão do espécime cirúrgico e o congelamento rápido da amostra a ser armazenada (Hatzis et al., 2011).

As amostras foram coletadas imediatamente após os espécimes cirúrgicos serem removidos dos pacientes e transportados até a sala da patologia no próprio centro cirúrgico (sala de congelação). O TIF máximo foi de 30 minutos, com o objetivo de minimizar o máximo possível as alterações nas expressões gênicas de DNA, RNA e proteínas (Morente et al., 2006; Isabelle et al., 2006; International Agency for Research on Cancer, 2007; Hwang et al., 2008; Ivan et al., 2008; Reis et al., 2010; Yu, Zhu, 2010). O controle desse tempo foi feito usando cronômetro (Cronobio, modelo SW2018) (Figura 6) auxiliado pelo técnico de enfermagem (responsável por cada sala cirúrgica) assim que a peça cirúrgica era removida pelo cirurgião e parado pelo patologista ou técnico responsável pela coleta (presentes na sala de congelação durante todo o período cirúrgico).

Figura 6 - Cronômetro utilizado para controlar o TIF

- Técnicas de assepsia para dissecar o material:

Como o objetivo principal foi a extração de RNA, que é particularmente sensível às ações das RNases, que podem estar presentes nos instrumentos ou em superfícies usados na manipulação e processamento das amostras, os espécimes

cirúrgicos foram transportados até a sala de congelação dentro de recipientes de aço inox esterilizados recobertos por campos cirúrgicos também esterilizados (Figura 7). O responsável pela coleta usou luvas e instrumentos (pinças, tesouras e bisturis) também estéreis (Figura 8), trocando os mesmos entre a dissecação de tecido normal e tumoral, com o objetivo de evitar contaminação (Morente et al., 2006; Isabelle et al., 2006; International Agency for Research on Cancer, 2007; Mager et al., 2007; Ivan et al., 2008; Pitt et al., 2008; Kowalski et al., 2012).

Figura 7 - Cuba de aço inox envolta por campo cirúrgico, ambos estéreis, utilizados no transporte da peça cirúrgica

Figura 8 - Luvas e instrumentos estéreis utilizados para dissecar as amostras

- Tamanho e quantidade da amostra coletada e recipiente para armazenamento:

O tamanho da amostra tumoral coletada variou de 0,5 a 1,0 cm³, com número de fragmentos variando de 1 a 4, dependendo do tamanho de cada tumor, fugindo das áreas de necrose e nunca comprometendo o diagnóstico (Figura 9). Quando havia tecido normal seguia o mesmo padrão de medida e de número de fragmentos do tecido tumoral (Morente et al., 2006; Isabelle et al., 2006; International Agency for Research on Cancer, 2007; Mager et al., 2007; Hwang et al., 2008; Ivan et al., 2008; Canadian Tumour Repository Network, 2012). As amostras de tecido tumoral foram colocadas em tubos criogênicos estéreis de 2ml (Greiner bio-one) com tampas de cor vermelha e as de tecido normal com tampas de cor verde (Figura 10).

Figura 9 - Coleta de fragmentos tumorais

- Identificação das amostras:

No momento da coleta, todo o tubo criogênico foi identificado com o registro hospitalar (RH) do paciente (doador), data e topografia da coleta (Figura 10), usando caneta de marcação permanente (EasyPath, modelo 51-05031). Após o congelamento instantâneo da amostra, preencheu-se a ficha de registro de entrada de material no

banco, que continha as seguintes informações: RH, idade e sexo do doador, data da cirurgia, tempo de coleta da amostra, topografia, nome do patologista e técnico que coletaram a amostra e quantidade de fragmentos de tecido tumoral e normal coletados.

Figura 10 - Tubos criogênicos estéreis identificados. O de tampa vermelha contém fragmentos de tumor e o de tampa verde fragmentos de tecido normal

- Técnicas de congelamento:

Na sala de congelação, os tubos criogênicos com as amostras eram rapidamente colocados em um container de 5 litros (ABS, modelo SC11/7) (Figura 11) contendo nitrogênio líquido, a uma temperatura de aproximadamente -196°C , para o congelamento imediato ou instantâneo das mesmas (Morrin et al., 2005; Morente et al., 2006; Isabelle et al., 2006; International Agency for Research on Cancer, 2007; Mager et al., 2007; Pitt et al., 2008). Esse container foi identificado como recipiente para armazenamento de material biológico a uma temperatura de -196°C .

Figura 11 - Container contendo nitrogênio líquido, utilizado para o congelamento imediato das amostras

- Transporte e armazenamento das amostras:

Todos os dias, após o término das cirurgias da manhã e da tarde, as amostras foram transportadas para o banco dentro de recipientes térmicos (ThermoFlask®) contendo nitrogênio líquido, para então serem cadastradas em definitivo no sistema de gerenciamento de dados e colocadas dentro de caixas plásticas numeradas e com tampas, que eram armazenadas em freezers próprios (Thermo, modelos 706, 906 e ULT2186-6-D41) (Figura 12) a uma temperatura de -80°C , com temperatura ambiente não podendo ultrapassar 22°C , para evitar o degaste excessivo e a falha prematura (Morrin et al., 2005; Morente et al., 2006; Isabelle et al., 2006; International Agency for Research on Cancer, 2007; Mager et al., 2007; Mishra et al., 2007; Ivan et al., 2008; Pitt et al., 2008; Field et al., 2009; Ruiz-Godoy et al., 2010; Yu, Zhu, 2010).

Figura 12 - Freezers a -80°C utilizados para o armazenamento em longo prazo

- Sistema de segurança para os freezers:

Para evitar danos causados por grandes oscilações de temperatura ou queda de energia, foi implantado um sistema seguro de eletricidade, ligando os freezers a um gerador de emergência do Hospital. Também foi instalado um alarme que monitora qualquer oscilação de temperatura de 10% acima ou abaixo de -80°C , com aviso sonoro e visual local, e interligado à central telefônica do hospital, que disca para números pré-programados. Além disso, disponibiliza-se também um freezer reserva para suprir eventuais falhas mecânicas. O freezer mais novo (Thermo, modelo ULT2186-6-D41) possui um sistema de “back-up” de CO_2 , que também ajuda a evitar danos às amostras em caso de oscilações de temperatura (International Agency for Research on Cancer, 2007; Morente et al., 2007; Pitt et al., 2008).

- Desenvolvimento de um sistema de gerenciamento de dados:

Para facilitar a seleção e o rastreamento das amostras para as pesquisas, o Centro de Processamento de Dados do Hospital desenvolveu um sistema de gerenciamento de dados que permite codificar todas as amostras pela Classificação Internacional de Doenças Oncológicas (CID-O). Além disso, ele fornece a localização imediata e precisa de cada amostra dentro de cada freezer, associada a

dados como data da coleta, tempo de isquemia fria, tempo de congelamento, tipo histológico do tumor, idade e sexo do doador e tratamentos prévios realizados.

- Análise do material coletado através de técnica de congelação:

Tumores com identificação macroscópica duvidosa e / ou com extensas áreas de necrose foram previamente analisados pelo patologista plantonista do dia, através de técnicas de congelação (cortes histológicos em criostato, imprint ou rasprint citológico), para tentar garantir a representatividade da amostra.

- Identificação e manutenção preventiva de todo equipamento:

Os freezers, os containers de armazenamento de nitrogênio líquido e os sistemas elétrico e de alarme passaram por um processo de manutenção preventiva a cada 6 meses (International Agency for Research on Cancer, 2007), realizado por técnicos e engenheiros do Departamento de Engenharia do Hospital, garantindo assim o perfeito funcionamento dos mesmos.

- Elaboração de protocolos técnicos de funcionamento:

Foram criados POPs e Instruções de Trabalho sobre toda a dinâmica operacional do banco de tumores, para que na ausência de um responsável por determinado procedimento, outra pessoa habilitada possa substituí-lo de maneira correta.

- Criação do Termo de Informação e Consentimento:

Desenvolveu-se um termo de consentimento e informação para o paciente, explicando e pedindo autorização para a coleta de tecidos para serem usados em estudos e pesquisas, e garantindo seu anonimato (Anexo A). Cada termo foi previamente assinado pelo paciente ou responsável legal. Devido à nova legislação brasileira para biobancos, criada em 2011 pelo Conselho Nacional de Saúde,

elaborou-se um novo termo de consentimento, que está em aprovação na Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (Anexo B).

3.2.1 Divisão do banco de tumores em banco pré e banco pós à implantação do programa de garantia e controle de qualidade

Para avaliar a eficácia do programa implantado, o banco de tumores foi dividido em banco pré-controle de qualidade (banco pré) e em banco pós-controle de qualidade (banco pós), neste estudo. O banco pré continha as amostras coletadas entre 23/03/06 (data da coleta da primeira amostra do banco) e 30/06/08, período em que não havia um programa de controle e garantia de qualidade. Os meses de julho, agosto e setembro de 2008 foram usados para treinamento e educação de todos os envolvidos com o banco. O banco pós englobou as amostras de tecido tumoral colhidas de 01/10/08 a 30/09/2011, período que contava com o programa de controle e garantia de qualidade.

3.2.1.1 Seleção das amostras para a comparação entre banco pré e banco pós

Após três anos de início do trabalho, foram separadas 100 amostras de tecido tumoral do banco pré e 100 do banco pós. Essas 200 amostras foram selecionadas de forma aleatória, por um funcionário do banco, que apenas buscou no sistema de gerenciamento de dados a topografia, para homogeneizar a amostragem e o período de coleta, para separar os bancos, de maneira que se obtivesse 20 de mama, 20 de pulmão, 20 de tireóide, 20 de estômago e 20 de intestino grosso (colorretal), de cada

banco. Através da extração de RNA total e de DNA, avaliou-se a qualidade das amostras selecionadas e comparou-se os dois bancos.

3.2.2 Coleta das amostras para a comparação entre os dois intervalos de TIF

Entre outubro de 2008 e julho de 2009, período que já contava com o programa de garantia e controle de qualidade, foram colhidas 20 amostras tumorais de tireóide, 20 de mama, 20 de pulmão, 20 de colorretal e 20 de estômago, de 100 pacientes diferentes, com TIF menor que 30 minutos (tempo sugerido por alguns bancos), dependendo do tempo em que cada espécime cirúrgico chegava na sala de congelamento. Dos mesmos tumores desses mesmos pacientes também foram colhidas 20 amostras tumorais de tireóide, 20 de mama, 20 de pulmão, 20 de colorretal e 20 de estômago com um TIF de 45 minutos (tempo escolhido por nós). Através da extração de RNA foi avaliada a qualidade das 200 amostras coletadas, que foram comparadas dentro dos dois intervalos de TIF e de cada topografia.

3.2.3 Macrodissecção de todas as amostras estudadas

Antes de começar a extração, as amostras criopreservadas foram colocadas em pinos contendo um meio para tecido congelado chamado Tissue-Tek OCT (Sakura, USA), que eram encaixados em um criostato (Leica CM1 850 UV, GE), para a obtenção de cortes histológicos. Os cortes com 5 µm de espessura foram colocados em lâminas de vidro e corados por HE (Merck KGaA, GE), para serem avaliados por um patologista em microscópio óptico (Nikon Eclipse E-200), que circundou a área

tumoral com caneta de marcação permanente, deixando de fora áreas contendo necrose, fibrose, tecido normal e calcificação. Amostras contendo menos de 70% de células tumorais viáveis ou mais de 30% de necrose por entre as células tumorais foram descartadas (Boudou et al., 2010). Cada lâmina marcada pelo patologista foi utilizada como “guia”, para selecionar o tecido tumoral que estava no criostato, para que ele pudesse ser cortado com bisturi estéril e individual e enviado para a maceração ou homogeneização.

3.2.4 Maceração manual das amostras utilizadas na comparação entre os dois intervalos de TIF

Após a macrodissecção, essas amostras que seriam extraídas com Trizol® (Invitrogen), foram envolvidas em papel alumínio e maceradas manualmente com auxílio de um martelo, para sempre serem colocadas em tubos criogênicos contendo o reagente e armazenadas em freezer a -80°C, até o momento da extração.

3.2.5 Maceração automatizada das amostras usadas na comparação entre a qualidade do banco pré e banco pós

Essas amostras macrodissecadas, que seriam extraídas através de Kits, foram colocadas em tubos próprios do homogeneizador de tecidos Precellys 24 (Bertin technologies), contendo esferas de cerâmicas e reagente do próprio Kit, para então serem homogeneizadas a uma velocidade de 6.500 rpm, em 2 ciclos de 10 segundos,

com um intervalo de 5 minutos, no qual a amostra reposava em gelo, para em seguida iniciar-se o processo de extração.

3.2.6 Extração de DNA e RNA total para avaliar a qualidade das amostras estudadas

A extração de DNA e de RNA total das amostras foi realizada no laboratório do Centro de Pesquisa em Oncologia Molecular do Hospital de Câncer de Barretos.

3.2.6.1 Extração de RNA total das amostras utilizadas na comparação entre os dois intervalos de TIF

A extração de RNA total das amostras utilizadas para avaliar os dois intervalos de TIF foi realizada entre janeiro e junho de 2010. De acordo com o protocolo de extração do laboratório, baseado em publicação prévia (Sambrook, Russel, 2001), foi utilizado o reagente Trizol® (Invitrogen, Suécia), que realizou a homogeneização ou “lise” da amostra, rompendo as células e dissolvendo os componentes celulares, mantendo a integridade do RNA. A adição de clorofórmio, seguida da centrifugação, separou a solução em fases aquosa e orgânica. O RNA permaneceu exclusivamente, na fase aquosa. Depois da transferência da fase aquosa para um novo tubo, o RNA total foi recuperado por precipitação com isopropanol, e o DNA e as proteínas da amostra ainda poderiam ser recuperados por precipitação sequencial. A precipitação com etanol resultou em DNA na interface e uma precipitação adicional com isopropanol produziu proteínas a partir da fase orgânica.

3.2.6.2 Extração de DNA e RNA total das amostras utilizadas na comparação entre o banco pré e do banco pós

A extração de DNA e de RNA total das amostras utilizadas para avaliar a qualidade do banco pré e do banco pós foi realizada entre outubro de 2011 e março de 2012. Para a extração, foram utilizados os Kits (RNeasy Mini Kit e DNeasy Tissue Kit) (Qiagen), seguindo instruções do fabricante.

3.2.7 Avaliação da qualidade do DNA e do RNA total das amostras

A qualidade do RNA total foi avaliada pela sua pureza e pela sua degradação e a do DNA pela sua concentração e pureza (Pitt et al., 2008; Gene quantification, 2012).

A pureza (ausência de contaminação por proteínas e / ou por reagentes químicos) do RNA total e do DNA foi avaliada por espectrofotômetro (Nano Vue, General Electric), sendo analisada com base na relação de absorbância A_{260nm}/A_{280nm} para averiguar a contaminação por proteínas e na relação de absorbância A_{260nm}/A_{230nm} para checar a contaminação por sais ou reagentes químicos (fenol, por exemplo), onde as razões A_{260}/A_{280} e A_{260}/A_{230} devem ser ≥ 1.8 (Staal et al., 2006; Oxford Gene Technology, 2012). A concentração do DNA também foi fornecida pelo espectrofotômetro.

A degradação do RNA foi avaliada utilizando-se o equipamento Agilent 2100 Bioanalyser com o Agilent RNA 6000 Nano Chip (Agilent Technologies, USA), conforme instruções do fabricante. Ela foi expressa pelo RIN, onde valores de $RIN <$

3 indicavam RNA totalmente degradado, $3 < RIN \leq 5$ RNA parcialmente degradado e $5 < RIN \leq 10$ RNA intacto. Exemplos de RNA degradado, parcialmente degradado e intacto são ilustrados na figura 13.

Figura 13 - Imagens típicas da qualidade do RNA representada por eletroferograma e gel virtual

Fonte: Viana et al., 2012

3.3 Análise estatística

O programa utilizado foi o SPSS software do Windows, versão 15.0.

Foi feita a comparação de proporções e parâmetros qualitativos entre os 2 bancos (pureza do DNA e do RNA e degradação do RNA) e entre os 2 intervalos de TIF (degradação do RNA). Na comparação dos 2 bancos, tanto para pureza quanto para degradação, foi usado o Teste do qui-quadrado, pois as variáveis eram independentes e os dados qualitativos. Na comparação entre os 2 intervalos de TIF (até 30 e 45 minutos) e entre as fotografias (para degradação do RNA), foi também utilizado o Teste do qui-quadrado e o Teste exato de Fisher, pois embora as amostras comparadas sejam do mesmo tumor, elas são diferentes, sendo consideradas variáveis independentes (Dawson, Trapp, 2003).

A significância estatística adotada foi de 0,05. Valores de p menores que 0,05 foram considerados significantes.

3.4 Questões éticas

O estudo foi aprovado no CEP do Hospital de Câncer de Barretos com número 131/2008 no dia 14 de fevereiro de 2008 e na Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa da Faculdade de Medicina da USP com número 1009/08 em 20 de novembro de 2008.

As amostras coletadas foram previamente autorizadas pelos doadores, através do termo de informação e consentimento ao paciente, que foi assinado pelo mesmo ou responsável em cada caso.

4 RESULTADOS

4.1 Comparação entre os bancos pré e pós controle de qualidade

Ao comparar-se as amostras do banco pré e do banco pós, através do RIN, encontrou-se respectivamente 95 (95 %) e 94 (94 %) amostras com RNA total intacto, 3 (3 %) e 1 (1 %) com RNA total parcialmente degradado e 2 (2 %) e 5 (5 %) com RNA total degradado ($p=0,318$ - Tabela 1). Ao avaliar-se o número de amostras com RIN acima de 7, consideradas ideais para experimentos de microarray, encontrou-se 73 (73 %) no banco pré e 87 (87 %) no banco pós ($p=0,013$ - Tabela 2).

Tabela 1 - Comparação entre as amostras dos bancos pré e pós, com relação à integridade do RNA

RNA	Banco pré	Banco pós	TOTAL
Degradado	2 (2 %)	5 (5 %)	7 (3,5 %)
Parcialmente degradado	3 (3 %)	1 (1 %)	4 (2 %)
Intacto	95 (95 %)	94 (94 %)	189 (94,5 %)

$p=0,318$

Tabela 2 - Comparação entre o número de amostras dos bancos pré e pós, com relação aos valores do número de integridade do RNA (RIN), considerados ideais para estudos de microarray

RIN	Banco pré	Banco pós	TOTAL
< 7	27 (27 %)	13 (13 %)	40 (20 %)
≥ 7	73 (73 %)	87 (87 %)	160 (80 %)

$p=0,013$

Analisando a pureza do RNA, através da razão de absorbância A_{260}/A_{280} (contaminação por proteínas) encontrou-se 93 (93%) de amostras puras no banco pré e no banco pós ($p=1,000$ - Tabela 3) e da razão de absorbância A_{260}/A_{230} (contaminação por reagentes químicos) encontrou-se 53 (53 %) no banco pré e 51 (51%) no banco pós ($p=0,777$ - Tabela 4).

Tabela 3 - Comparação entre as amostras dos bancos pré e pós, com relação à contaminação do RNA por proteínas

RNA	Banco pré	Banco pós	TOTAL
Puro	93 (93 %)	93 (93 %)	186 (93 %)
Contaminado	7 (7 %)	7 (7 %)	14 (7 %)
$p=1,000$			

Tabela 4 - Comparação entre as amostras dos bancos pré e pós, com relação à contaminação do RNA por reagentes químicos

RNA	Banco pré	Banco pós	TOTAL
Puro	53 (53 %)	51 (51 %)	104 (52 %)
Contaminado	47 (47 %)	49 (49 %)	96 (48 %)
$p=0,777$			

Todas as amostras de DNA apresentaram boa concentração. Com relação a sua pureza, analisando a razão A_{260}/A_{280} , encontrou-se 100 (100%) amostras puras no banco pré e 98 (98%) no banco pós ($p=0,497$ - Tabela 5) e analisando a razão A_{260}/A_{230} , encontrou-se 89 (89%) e 87 (87%) respectivamente ($p=0,663$ - Tabela 6).

Tabela 5 - Comparação entre as amostras dos bancos pré e pós, com relação à contaminação do DNA por proteínas

DNA	Banco pré	Banco pós	TOTAL
Puro	100 (100 %)	98 (98 %)	198 (99 %)
Contaminado	0 (0 %)	2 (2 %)	2 (2 %)

p=0,497

Tabela 6 - Comparação entre as amostras dos bancos pré e pós, com relação à contaminação do DNA por reagentes químicos

DNA	Banco pré	Banco pós	TOTAL
Puro	89 (89 %)	87 (87 %)	176 (88 %)
Contaminado	11 (11 %)	13 (13 %)	24 (12 %)

p=0,663

4.1.1 Amostras armazenadas em freezer a -80°C a mais de 5 anos

Das 100 amostras do banco pré, 16 foram coletadas no ano de 2006, ou seja, há mais de 5 anos. Destas todas apresentaram RNA intacto e 13 tiveram RIN acima de 7 (Tabela 7).

Tabela 7 - Número de integridade do RNA (RIN) de cada amostra coletada no ano de 2006, de acordo com a topografia

<i>Topografia</i>	<i>RIN</i>
Colorretal	7,4
Colorretal	7,4
Colorretal	9,3
Colorretal	9,8
Colorretal	9,8
Estômago	6,4
Estômago	8,7
Estômago	9,3
Estômago	10
Mama	8,1
Mama	8,2
Mama	9
Pulmão	6,4
Pulmão	6,9
Pulmão	8,8
Pulmão	9

4.2 Comparação entre os tempos de isquemia fria

Ao comparar-se as 98 amostras tumorais (2 foram excluídas na macrodissecção por apresentarem mais de 30 % de necrose por entre as células tumorais) coletadas com TIF de até 30 minutos com as 100 coletadas com TIF de 45 minutos, observa-se que a quantidade de amostras com RNA degradado e parcialmente degradado quase dobrou e que a com RNA íntegro reduziu pela metade, com o aumento do TIF

($p < 0,001$ - Tabela 8). Analisando as diferentes topografias, nota-se que as amostras de tireóide e as colorretais foram as que apresentaram maior degradação do RNA total com o aumento do TIF ($p = 0,006$ e $p = 0,030$ respectivamente - Tabela 8). Com relação às amostras de mama, percebe-se um aumento significativo em relação à quantidade de RNA degradado, uma redução importante na quantidade com RNA íntegro e que o número de amostras com RNA parcialmente degradado não sofreu alteração, com o aumento do TIF ($p = 0,131$ - Tabela 8). As amostras de pulmão, seguidas pelas de estômago, foram as que sofreram menor degradação do seu RNA com o aumento do TIF ($p = 0,919$ e $p = 0,384$ respectivamente - Tabela 8).

Tabela 8 - Comparação entre os tempos de isquemia fria e a qualidade do RNA total em todas as amostras

Amostras	Tempos de isquemia fria						
	Até 30'			45'			
	Intacto	Degradado	Parcialmente degradado	Intacto	Degradado	Parcialmente degradado	
Tireóide	16 (80 %)	3 (15 %)	1 (5 %)	6 (30 %)	7 (35 %)	7 (35 %)	p=0,006
Colorretal	11 (55 %)	6 (30 %)	3 (15 %)	4 (20 %)	14 (70 %)	2 (10 %)	p=0,030
Mama	14 (70 %)	4 (20 %)	2 (10 %)	8 (40 %)	10 (50 %)	2 (10 %)	p=0,131
Pulmão	7 (36,9 %)	7 (36,8 %)	5 (26,3 %)	6 (30 %)	9 (45 %)	5 (25 %)	p=0,919
Estômago	15 (79 %)	4 (21 %)	0 (0 %)	12 (60 %)	7 (35 %)	1 (5 %)	p=0,384
TOTAL	63 (64,3 %)	24 (24,5 %)	11 (11,2 %)	36 (36%)	47 (47 %)	17 (17 %)	P<0,001

4.3 Comparação entre os métodos de extração do RNA: Trizol x Kits

Ao comparar-se as 100 amostras extraídas com Trizol (do TIF de até 30 minutos) com as 98 extraídas com Kits (do banco pós, que também adotou TIF de até 30 minutos), encontra-se um número bem maior de amostras com RNA íntegro no grupo que foi utilizado Kits durante o processo de extração ($p < 0,0001$ - Tabela 9).

Tabela 9 - Comparação da integridade do RNA nas amostras extraídas com Kits e com Trizol

RNA	Kits	Trizol	TOTAL
Degradado	5 (5,0 %)	24 (24,5 %)	29 (14,6 %)
Parcialmente Degradado	1 (1,0 %)	11 (11,2 %)	12 (6,1 %)
Intacto	94 (94 %)	63 (64,3 %)	157 (79,3 %)
$p < 0,0001$			

5 DISCUSSÃO

Estudos relatando a manipulação do tecido fresco entre a cirurgia e subsequente congelamento e armazenamento no banco de tumores, são escassos. Acredita-se que o TIF possa ter efeitos significativos na integridade e nos níveis de expressão do RNA, podendo consequentemente, influenciar nos resultados dos estudos de expressão gênica. No entanto, não se sabe a partir de que tempo de isquemia fria uma amostra de tecido estará desqualificada para a posterior análise de RNA (Micke et al., 2006). Deve-se sempre controlar o TIF, pois de acordo com Morente et al., (2006) o tempo de isquemia quente durante a cirurgia, não pode ser previsto e nem controlado com precisão. Ao comparar-se a qualidade das 100 amostras coletadas com TIF de até 30 minutos com as 100 coletadas com 45 minutos, constata-se que o grupo de 30 minutos, principalmente em algumas topografias, foi bem melhor que o de 45. Analisando cada topografia em separado, observa-se que em todas houve aumento da degradação do RNA total com a progressão do TIF (embora em pulmão e estômago não tenha havido significância estatística), e consequentemente, uma piora na qualidade das amostras. As amostras de tireóide e as colorretais, seguidas pelas de mama, foram as que apresentaram maior degradação do RNA total, enquanto as de pulmão e estômago mostraram maior estabilidade, com o aumento do TIF. Este estudo tem uma casuística grande e engloba diferentes topografias, comparado aos outros estudos da literatura, que serão discutidos a seguir, e permite concluir que o TIF, embora seja tecido dependente, é o principal fator relacionado à degradação e deve ser sempre o menor possível, não devendo ultrapassar 30 minutos.

Spruessel et al. (2004), avaliaram o impacto da isquemia no perfil de expressão gênica e proteica de tecidos neoplásicos e não neoplásicos de cólon, e mostraram que as alterações iniciais nesses perfis já foram observadas de 5-8 minutos após a ressecção do cólon. Quinze minutos após a cirurgia, 10-15% de todos os genes e proteínas detectáveis diferiram significativamente dos valores de base, e que 30 min após a cirurgia isto tinha aumentado para 20%. Huang et al. (2001), também estudando amostras tumorais de cólon, quantificaram os efeitos da isquemia e concluíram que o tempo de isquemia menor que 20 minutos fornece perfis de expressões gênicas relativamente estáveis e que um tempo de isquemia maior que 40 minutos mostrou resultados com desvios significativos. Esses dois estudos, condizem com os nossos achados em amostras de cólon, e reforçam a idéia que a degradação é tecido dependente e que o TIF é o principal fator relacionado à degradação.

Blackhall et al. (2004), ao analisarem a estabilidade e a heterogeneidade dos perfis de expressão gênica em amostras de câncer de pulmão, em diferentes intervalos de isquemia fria (até 120 minutos), observaram que o RNA extraído desses tecidos não apresentou nenhum padrão de mudança na expressão gênica, em relação aos diferentes intervalos de tempo, mas concluíram que é prudente congelar a amostra o mais rápido possível após a ressecção, idealmente dentro de 30-60 minutos. Esses achados poderiam condizer com os do presente estudo nas amostras de pulmão ao analisar-se o TIF, já que não houve diferença significativa entre 30 e 45 minutos. Porém as nossas amostras de pulmão já estavam com a qualidade ruim com o tempo de 30 minutos, não permitindo tal comparação. Tal fato pode ser justificado pelo método de extração, que será discutido mais adiante.

Dash et al. (2002), estudaram amostras de câncer de próstata, para verificar se o TIF de 1 hora afetava a degradação do RNA, e mostraram que menos de 0,6% dos genes estudados foram afetados. Embora não se tenha estudado amostras de próstata, esses achados servem para reforçar a hipótese de que o TIF é tecido dependente.

Segundo o estudo de Mücke et al. (2006), o RNA manteve-se estável, durante várias horas, em tecido fresco de amígdalas a temperatura ambiente. Embora também sirva para reforçar a hipótese de que o TIF é tecido dependente, eles usaram um pequeno número de amostras e não utilizaram o RIN, que é um indicador de integridade mais preciso.

Rudloff et al. (2010) observaram em amostras de pâncreas que o TIF de até 1 hora não influenciou negativamente na qualidade do RNA total. O mesmo ocorreu com Johnson et al. (2010) em amostras tumorais de adrenal, achados esses que podem indicar que esses tecidos são mais resistentes à isquemia.

Essa parte do nosso trabalho resultou na publicação de um artigo em revista internacional (Anexo C).

Comparando as amostras do banco pré e do banco pós, com relação à integridade e à pureza do RNA, observou-se que praticamente não houve diferença entre elas. Embora não tenha sido encontrado um valor exato na literatura, o fato dos dois bancos apresentarem mais de 90% das amostras estudadas com RNAs íntegros e livres de contaminação por proteínas (A_{260}/A_{280}), em todas as topografias estudadas, é um indicativo de excelente qualidade. Aproximadamente, metade das amostras dos dois bancos apresentou algum grau de contaminação por reagentes químicos (A_{260}/A_{230}), porém a relação A_{260nm}/A_{230nm} é usada como uma medida secundária da pureza do ácido nucléico (Oxford Gene Technology, 2012). Fatores como a diluição

da amostra e até mesmo o fenol podem influenciar na precisão da relação A_{260}/A_{230} (Oxford Gene Technology, 2012). No presente trabalho isso deve ter ocorrido porque a quantidade de reagente (fenol) utilizada durante o processo de extração é padrão para 30 mg de tecido e após a macrodissecção os fragmentos de tecidos não eram pesados rotineiramente. Consequentemente, em quantidade menor de tecido pode ocorrer impregnação do reagente, causando a contaminação observada. Embora essa relação seja uma medida secundária da pureza do ácido nucleico, a partir deste estudo, todo tecido que for submetido à extração de ácidos nucleicos, será previamente pesado. O banco pós se destacou ao avaliar o número de amostras ideais para estudos de microarray, ou seja, aquelas com RIN maior ou igual a 7 (Schroeder et al., 2006), com 14% a mais que o banco pré, por provável interferência do TIF, ainda não controlado no banco pré. Ao comparar-se as amostras dos dois bancos, analisando a concentração e a pureza do DNA, praticamente não se encontra diferença, estando as mesmas com excelente qualidade. Pelo fato de ambos os bancos apresentarem RNA de excelente qualidade, conclui-se que não houve diferença com relação a técnicas de assepsia, ou seja, a substituição da lavagem dos instrumentos de coleta (utilizada no banco pré após cada coleta) pelo uso de instrumentos estéreis (utilizados no banco pós após cada coleta). Mesmo assim decidiu-se manter o uso de materiais esterilizados, com o intuito de evitar possíveis contaminações.

Há uma grande polêmica na literatura com relação ao uso ou não de conservantes de RNA, como o RNAlater, antes do congelamento rápido em nitrogênio líquido. Há preocupações de que o uso desses conservantes pode alterar tanto a preservação do tecido para exame histológico e imunohistoquímico quanto a

sua expressão gênica. Segundo Lawson et al. (2010), esses conservantes são fortes agentes desnaturantes que têm o potencial de tornar os tecidos armazenados inadequados para estudo imunohistoquímico e que permitem subsequente extração de RNA de melhor qualidade apenas em amostras pequenas (provenientes de biópsias), onde ocorre rápida penetração da solução conservante. Isso não deve ser verdade para as amostras maiores, onde seria necessário mais tempo para o conservante penetrar, anulando qualquer vantagem. Micke et al. (2006) relataram que o RNA alterou a produção significativa dos tecidos e alterações importantes na expressão de vários genes por RT-PCR. O presente estudo não usou conservantes de RNA antes do congelamento rápido das amostras provenientes de peças cirúrgicas, apenas controlou o TIF e a maioria delas apresentou RNA total de ótima qualidade, condizendo com o trabalho de Johansen et al. (2010), que demonstrou que a qualidade do RNA total avaliada através do Agilent Bioanalyzer não foi diferente entre as amostras armazenadas após congelamento imediato ou tratadas com agentes de preservação do RNA.

De acordo com Isabelle et al. (2006), Morente et al. (2006), Mager et al. (2007) e Ivan et al. (2008) é melhor usar o isopentano (2-metil butano) como opção para o congelamento rápido das amostras, por ele ser um criocuidador mais eficiente e causar menos criofatos que o nitrogênio líquido. Devido ao difícil manuseio do mesmo, escolheu-se a alternativa de colocar a amostra dentro de tubos de criogenina e realizar o congelamento súbito direto em nitrogênio líquido. Obteve-se excelentes resultados, ou seja, amostras com altos índices de qualidade e com morfologia preservada.

Pouco se sabe da criopreservação em longo prazo (Reis et al., 2010). Muitos cientistas acreditam que o armazenamento de tecidos a temperaturas mais baixas auxilia na preservação da integridade da amostra em longo prazo, entretanto não há um consenso geral sobre isso (Mishra et al., 2007). Tecidos humanos obtidos para pesquisa são congelados e armazenados por períodos variáveis. Convencionalmente, considera-se que quanto mais longo o período de armazenamento, menor será o rendimento ou a qualidade do ácido nucléico. No entanto, faltam estudos controlados para validar estas observações (Jewell et al., 2002). Os métodos de armazenamento são variados. As amostras são frequentemente armazenadas em freezers a -80°C , ou preferencialmente, dentro de freezers com nitrogênio em fase líquida ou de vapor (Loken, Demetrick, 2005). O armazenamento de tecido congelado em freezers a -80°C tem algumas vantagens em comparação com o armazenamento em nitrogênio líquido, tais como maior acessibilidade à amostra, facilidade na instalação, manutenção e custos menores. No entanto, o nitrogênio líquido garante uma temperatura mais baixa e mais estável (Helsing et al., 2000). Para um armazenamento mais longo do que cinco anos, o nitrogênio líquido é recomendado (International Agency for Research on Cancer, 2007). Qualman et al. (2004) propuseram que os tecidos devem ser armazenados em freezers de nitrogênio líquido em fase de vapor, porque as amostras mantidas a cerca de -170°C apresentam uma maior integridade do que as mantidas a temperaturas mais elevadas e que freezers a -80°C devem ser utilizados para o armazenamento de tecido em curto prazo (uma semana ou menos). Segundo Mishra et al. (2007) a temperatura para armazenamento a longo prazo deve ser menor que -80°C . Chu et al. (2002) estudando tecidos ginecológicos (tumoriais e não tumorais) concluíram que a

integridade do DNA permanece inalterada após longo período de congelamento em freezer a -80°C , enquanto a integridade do RNA é comprometida após 5 anos ou mais de armazenamento. Segundo Yu e Zhu (2010), a temperatura de armazenamento de -80°C foi reconhecida como uma condição adequada pela maioria dos bancos de tecidos, porém, depois de quanto tempo essa preservação afeta a atividade biológica e a integridade das macromoléculas ainda é incerto. Este estudo constatou que todas as 16 amostras do banco pré-congeladas rapidamente em nitrogênio líquido e armazenadas há mais de 5 anos em freezer a -80°C , apresentaram excelente qualidade, todas com RNA intacto e 13 (81,25%) delas com RIN acima de 7, mostrando a eficiência da criopreservação a -80°C em longo prazo e contradizendo alguns trabalhos citados acima. Pretende-se estudar a qualidade de parte das amostras armazenadas há 10 anos, com o intuito de avaliar a criopreservação a -80°C nesse período, porém isso só será possível daqui a 3 anos, quando as primeiras amostras coletadas completarão esse tempo.

De acordo com Staal et al. (2006) e Tang et al. (2012), o método de extração (Trizol versus RNeasy) afeta os padrões de expressão do RNA no sangue. Observa-se que as nossas amostras teciduais, processadas com homogeneizador de tecidos e extraídas com RNeasy Mini Kit apresentaram melhor qualidade do RNA (94% delas apresentando RNA intacto), que as maceradas manualmente e extraídas com Trizol (64,3% delas apresentando RNA intacto), nos advertindo que protocolos de extração podem afetar negativamente a qualidade dos tecidos e consequentemente os resultados. Isso pode justificar o fato de que apenas 7 (36,9%) das nossas 20 amostras de pulmão selecionadas para estudar o TIF de até 30 minutos (extraídas com Trizol) apresentarem RNA intacto, quando comparadas as 18 (90%) das 20

amostras de pulmão selecionadas para estudar o banco pós, também com TIF de até 30 minutos, porém extraídas com Kits. Um segundo artigo sobre os achados da comparação entre os bancos pré e pós, relatados anteriormente, será submetido à publicação em 2013.

CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

- Não houve diferença entre a qualidade das amostras tumorais do banco pré e do banco pós, com relação à qualidade dos ácidos nucleicos, estando ambos com excelente qualidade.
- O banco pós se destacou por apresentar maior número de amostras com RIN acima de 7, ideais para estudos de microarray.
- O TIF é muito importante para a preservação da qualidade do RNA total de amostras tumorais criopreservadas, sendo o principal fator relacionado à degradação, que é tecido dependente.
- Ao coletar amostras para banco de tumores, deve-se evitar que o TIF seja maior que 30 minutos.
- Os métodos de processamento do tecido e de extração interferem na qualidade do RNA total, sendo que amostras com maceração automatizada e extraídas com RNeasy Mini Kit apresentaram melhor qualidade do RNA, que as maceradas manualmente e extraídas com Trizol.
- Realizou-se o congelamento imediato das amostras coletadas diretamente em nitrogênio líquido e não se observou problema com relação à qualidade dos ácidos nucleicos.

7 ANEXOS

Anexo A - Termo de informação e consentimento aplicado no trabalho

**FUNDAÇÃO
PIO XII**
Hospital de Câncer de Barretos

Termo de Informação e Consentimento

Para obter um maior conhecimento clínico e científico do câncer, o corpo clínico deste Hospital (médicos e pesquisadores) desenvolve pesquisa clínica científica. Através dessa pesquisa é possível conhecer melhor os mecanismos da doença e, portanto, oferecer novas possibilidades de diagnóstico e tratamento. Ainda mais, este trabalho envolve a busca, em tumores, de novos genes ou lesões em genes já existentes. Estes estudos são realizados em fragmentos de tumores removidos em cirurgias, ou em material biológico colhido.

Você está sendo admitido(a) neste Hospital para estabelecimento de diagnóstico e /ou tratamento de alguma forma de tumor. Para fins de diagnóstico, fator prognóstico e/ou como parte de seu tratamento, há a necessidade de remoção do tumor e/ou material biológico relacionado à enfermidade. É prática rotineira deste Hospital usar parte do tumor e/ou material biológico retirado, para exames clínicos laboratoriais, necessários para um diagnóstico definitivo. O restante do tumor que é retirado, ou do material biológico, não é utilizado, sendo então congelado e armazenado para novos exames se necessários. Caso contrário, são descartados, conforme legislação sanitária regulamentar sobre o assunto.

A obtenção e o estudo dos referidos fragmentos de tumor e material biológico não implicarão em riscos adicionais no seu tratamento ou na sua cirurgia, nem tampouco, em aumento no tempo da operação ou na extensão da mesma. O projeto de pesquisa proposto que vier utilizar este material será previamente apresentado à apreciação da Comissão de Ética em Pesquisa do Hospital.

O fragmento de tumor e/ou material biológico será identificado no laboratório por um código formado por números e letras e, portanto, sua privacidade e identificação serão preservadas. A eventual inclusão dos resultados em publicação científica será feita de modo a manter o anonimato do paciente.

Concordando com o uso do material para os fins acima descritos, é necessário esclarecê-lo(a) que não existem quaisquer benefícios ou direitos financeiros a receber sobre os eventuais resultados decorrentes da pesquisa. Se você não concordar em doar o material para pesquisa, sua decisão não influenciará, de nenhum modo, no seu tratamento.

Caso você ainda tenha questões a fazer sobre este termo de consentimento ou alguma dúvida que não tenha sido esclarecida pelo seu médico, por gentileza, entre em contato com a Comissão de Ética Médica, pelo telefone (17) 3321-6600.

Você receberá uma cópia deste documento e o original será arquivado em seu prontuário. Somente assine este termo, se consentir.

Declaração

Declaro estar ciente das informações ora prestadas, tendo lido atentamente e concordado com todo o teor.

Barretos, _____ de _____ de _____

Responsável ou Paciente

Nome: _____

R G: _____ RGH: _____

20. tils. 100Rts 07/2006 mod 502

Anexo B - Novo TCLE do Hospital de Câncer de Barretos**TERMO DE INFORMAÇÃO E CONSENTIMENTO PARA GUARDA E
UTILIZAÇÃO DE
MATERIAL BIOLÓGICO DE
PACIENTES PORTADORES DE TUMORES**

Os pesquisadores deste Hospital, em conjunto com o Instituto de Ensino e Pesquisa da Fundação Pio XII, desenvolvem pesquisas para conhecer melhor os mecanismos do câncer e, portanto, buscar novas possibilidades de prevenção, diagnóstico e tratamento. Para obter maior conhecimento sobre o câncer estamos criando um “Banco de Amostras de Material biológico” (BIOBANCO) de indivíduos com e sem câncer. “Amostra de material biológico” é qualquer material que possa ser extraído do seu corpo para análise, como, por exemplo, tumor, sangue, saliva, urina, secreção, entre outros.

No seu caso, você tem diagnóstico ou suspeita de câncer e está sendo convidado(a) a participar do BIOBANCO doando material biológico para o Hospital de Câncer de Barretos. O seu material doado será comparado futuramente com o de outros indivíduos em estudos sobre as causas, tratamentos e prevenção do câncer. Ao comparar suas amostras com o de outros indivíduos, alterações genéticas que afetam o surgimento e desenvolvimento do câncer poderão ser encontradas. Os resultados dessas pesquisas, incluindo genes, poderão ser armazenados em bancos de dados públicos que são supervisionados por autoridade competente.

A sua participação neste BIOBANCO é voluntária e não é obrigatória. Você pode aceitar participar do BIOBANCO e depois desistir a qualquer momento. Isto não tirará nenhum direito do seu tratamento e assistência neste hospital. Você também poderá pedir a qualquer momento que as suas informações sejam excluídas completamente do BIOBANCO e que elas não sejam usadas para mais nada.

A obtenção do material biológico não implicará em riscos adicionais ao seu diagnóstico, tratamento e chance de cura. Também não acarretará atraso para o seu diagnóstico e tratamento. O material doado será armazenado de forma adequada no Hospital de Câncer de Barretos por período indeterminado.

Juntamente com suas informações genéticas, outros dados, tais como idade e sexo poderão ser armazenados nesse mesmo banco de dados. Outras informações a seu respeito poderão ser obtidas a partir do seu prontuário médico. Essas pesquisas e a subsequente formação de bancos de dados poderão auxiliar pesquisadores do mundo todo a encontrar genes e alterações em genes relacionadas ao câncer. Nenhuma informação pessoal que permita sua identificação (nome, endereço...) será disponibilizada para acesso público. Somente os coordenadores do BIOBANCO terão acesso direto às suas informações. Também existe a possibilidade que a sua amostra não seja utilizada em estudo algum. Resultados dessas pesquisas não serão colocados em nenhum prontuário médico ou relatório para planos de

saúde. Da mesma forma não terão nenhuma relação com o tratamento que está sendo oferecido a você.

Apesar do seu material biológico ficar guardado no Hospital de Câncer de Barretos, ele pertence a você. A qualquer momento, durante ou após este estudo, você poderá retirar este material do hospital ou pedir que seja descartado. O material também poderá ser descartado se o mesmo perder qualidade (e, por isso, não puder mais ser usado em qualquer outro estudo) ou por iniciativa do Hospital de Câncer de Barretos. Se for por iniciativa do hospital, o seu material será oferecido a, no mínimo, duas instituições de pesquisa que possuam BIOBANCO. Se elas não aceitarem o material e a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa em Seres Humanos aprovar, o seu material será descartado conforme o Plano de Gerenciamento de Resíduos do Hospital.

O Hospital de Câncer de Barretos tomará todas as medidas para manter suas informações pessoais (como nome, endereço e outras) em sigilo. Durante todo o estudo e mesmo depois que terminar, quando os resultados deste estudo forem publicados em revistas científicas ou apresentados em congressos ou reuniões, a sua identidade será guardada em segredo, não sendo revelada qualquer informação a seu respeito que possa identificar você publicamente. Contudo, durante o estudo, os coordenadores do BIOBANCO poderão ter acesso aos seus dados. Mesmo assim, a sua privacidade será mantida. Você também terá direito ao resultado dos exames realizados com o seu material biológico.

As pesquisas que vierem a utilizar o seu material serão previamente analisadas pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Câncer de Barretos, ou quando for o caso, pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa em Seres Humanos. O seu material será utilizado somente se este comitê aprovar o estudo.

A doação do material biológico não terá custos para você. Todos os custos relacionados com o BIOBANCO serão pagos pelo Hospital de Câncer de Barretos. Também não haverá qualquer tipo de pagamento devido à sua participação (mesmo que haja patentes ou descobertas). Ao assinar este Termo de Consentimento, você não perderá nenhum direito, inclusive o de indenização por dano à sua saúde se isto acontecer em virtude da doação do material.

Em caso de dúvidas você poderá entrar em contato com o Hospital de Barretos pelo telefone (17) 3321-6600 (ramal 6894 - Comitê de Ética em Pesquisa ou ramal 6963 - BIOBANCO).

DECLARAÇÃO DE CONSENTIMENTO:

Eu, _____, li e entendi este termo de consentimento. Eu concordo em ser doador de material biológico para este BIOBANCO que será coletado por pessoal especialmente treinado para este fim. Entendi que o material será adequadamente armazenado e utilizado futuramente e de forma anônima em pesquisa aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Câncer de Barretos. Eu entendi a informação fornecida por este documento e eu tive a

oportunidade de fazer perguntas e esclarecer dúvidas. Este documento será assinado em duas vias, sendo que uma delas ficará comigo.

Embora tenha autorizado a utilização do material biológico para pesquisa, manifesto os seguintes desejos:

1. Concordo que utilizem meu material biológico em futuras pesquisas devidamente aprovadas pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Câncer de Barretos (assinale apenas uma das duas alternativas abaixo):

☐ Sem necessidade de um novo consentimento para cada pesquisa.

☐ Com necessidade de um novo consentimento para cada pesquisa. Neste caso gostaria de ser comunicado pessoalmente ou através de carta registrada com aviso de recebimento.

2. Autorizo que os resultados dessa pesquisa, incluindo informações de genes, possam ser armazenados em bancos de dados públicos, desde que a minha identidade seja preservada:

☐ SIM

☐ NÃO

3. Apesar de minha amostra ser utilizada de forma anônima, os coordenadores do BIOBANCO têm acesso à minha identidade. Dessa forma, eu gostaria de ser comunicado caso, durante a pesquisa, venha a ser descoberta alguma informação de relevância no meu risco ou de meus familiares de desenvolver câncer ou outras doenças genéticas.

☐ SIM

☐ NÃO

Caso você tenha respondido SIM, responda abaixo:

No caso da minha falta (falecimento), (escrever Sim ou Não), autorizo meu familiar, abaixo indicado, a ter acesso a esta informação. O mesmo será informado por carta, com aviso de recebimento, convidando-o para comparecer ao Hospital.

Familiar indicado para receber informações

_____/_____
(Nome do familiar) (grau de parentesco)

Endereço:

Cidade: _____ Estado: _____ CEP: _____

Por ser verdade, assino este termo.

Nome do(a) paciente / Representante
legal

Assinatura

Data

Nome do(a) responsável pela aplicação
do termo de consentimento

Assinatura

Data

Nome da(a) testemunha, se for o caso

Assinatura

Data

The interference of cold ischemia time in the quality of total RNA from frozen tumor samples

Cristiano Ribeiro Viana, Cristovam Scapulatempo Neto, Ligia Maria Kerr, Edenir Inêz Palmero, Marcia Maria Chiquitelli Marques, et al.

Cell and Tissue Banking

International Journal for Banking,
Engineering and Transplantation
of Cells and Tissues Incorporating
Advances in Tissue Banking

ISSN 1389-9333

Cell Tissue Bank

DOI 10.1007/s10561-012-9313-5

Your article is protected by copyright and all rights are held exclusively by Springer Science+Business Media B.V.. This e-offprint is for personal use only and shall not be self-archived in electronic repositories. If you wish to self-archive your work, please use the accepted author's version for posting to your own website or your institution's repository. You may further deposit the accepted author's version on a funder's repository at a funder's request, provided it is not made publicly available until 12 months after publication.

The interference of cold ischemia time in the quality of total RNA from frozen tumor samples

Cristiano Ribeiro Viana · Cristovam Scapulatempo Neto ·
Ligia Maria Kerr · Edenir Inéz Palmero · Marcia Maria Chiquitelli Marques ·
Tamara Colaiacovo · Abel Feliciano de Queiroz Junior ·
André Lopes Carvalho · Sheila Aparecida Coelho Siqueira

Received: 13 March 2012 / Accepted: 18 April 2012
© Springer Science+Business Media B.V. 2012

Abstract Tumor Banks were created to organize the collection, storage and distribution of biological samples from oncological patients, facilitating its use in cancer research. To ensure the quality of the samples from our bank, we implemented standard operating procedures international. In order to evaluate the influence of cold ischemia time (time between surgical removal of the specimen and the snap freezing of the sample) on the quality of the samples (evaluated by measurement integrity of their RNA), collected during 10 months two tumor samples from each donor, one with up to 30 min of cold ischemia and

other with exact 45 min, totaling 100 different donors and 200 samples, 40 from each of the following organs: breast, thyroid, stomach, lung and colorectum. We extracted total RNA from the samples and with the aid of a Bioanalyser, evaluate their quality, comparing it with cold ischemia times in different organs. Among the samples up to 30 min and the samples with exact 45 min, we respectively found 63 (64.3 %) and 36 (36 %) with intact RNA, 11 (11.2 %) and 17 (17 %) partially degraded and 24 (24.5 %) and 47 (47 %) degraded ($p < 0.001$). Thyroid and colorectal samples were more sensitive to variations in cold ischemia time

C. R. Viana (✉) · C. S. Neto · L. M. Kerr
Department of Pathology, Barretos Cancer Hospital
(Pio XII Foundation), Barretos, Brazil
e-mail: crisrviana@yahoo.com.br

C. S. Neto
e-mail: cristovamscapula@uol.com.br

L. M. Kerr
e-mail: kerr.l@hotmail.com

E. I. Palmero · M. M. C. Marques
Department of Molecular Oncology, Barretos Cancer
Hospital (Pio XII Foundation), Barretos, Brazil
e-mail: edenirip@yahoo.com.br

M. M. C. Marques
e-mail: mmcmsilveira@gmail.com

T. Colaiacovo · A. F. de Queiroz Junior
Bank of Tumors Barretos Cancer Hospital (Pio XII
Foundation), Barretos, Brazil
e-mail: tamara.colaiacovo@gmail.com

A. F. de Queiroz Junior
e-mail: bctumores@hcancerbarretos.com.br

A. L. Carvalho
Institute of Education and Research Barretos Cancer
Hospital (Pio XII Foundation), Barretos, Brazil
e-mail: alopescarvalho@uol.com.br

S. A. C. Siqueira
Department of Pathology, Hospital das Clinicas Sao
Paulo, São Paulo, Brazil
e-mail: sheila.siqueira@hcnnet.usp.br

($p = 0.006$ and $p = 0.03$, respectively). Stomach and lungs were less sensitive ($p = 0.919$ and $p = 0.384$, respectively). We concluded that the cold ischemia time up to 30 min was more efficient to maintain the integrity of RNA in most samples, and that RNA degradation varied according to the different topographies.

Keywords Tumor bank · RNA · Quality control · Degradation · Cold ischemia

Introduction

Cancer incidence has been increasing. According to estimates from the World Health Organization, in 2008 there were 12.4 million new cases and 7.6 million cancer deaths worldwide (Instituto Nacional do Câncer 2010).

Knowledge of the human genome and the advanced study techniques for the analysis of DNA, RNA and protein have potentially brought a greater impact onto prevention, diagnosis, prognosis and treatment of most human diseases (Herpel et al. 2010; Ooslerhuis et al. 2003; Reis et al. 2010). To conduct these studies, models of the same species are more appropriate, therefore, the demand for human tissue and tumors increases even more (Clausen et al. 1989; Thomas 2010).

Tumor banks were created to organize the collection, storage and distribution of biological samples from oncological patients, upon completion of the usual diagnostic protocols, favouring its use in cancer research (Carvalho et al. 2007; Ooslerhuis et al. 2003; Yu and Zhu 2010).

A tumor bank of quality requires a comprehensive integration, with training and motivation of surgeons, nurses, technicians, pathologists and molecular biologists, in addition to providing normal and neoplastic human tissue of high quality with clinical information, ensuring that samples can be used satisfactorily in research and studies of gene expression at large (Morente et al. 2006).

To ensure the quality of stored tissue is crucial because it is estimated that approximately 10 % of frozen samples are insufficient for molecular analysis. Necrosis is the factors that most contribute to this. Samples containing more than 30 % necrosis are unsuitable for the extraction of nucleic acids and proteins (Boudou et al. 2010).

The establishment of tumor banks in research cancer centers is challenging and crucial for the development of large-scale multicenter studies (Canadian Institutes of Health Research 2010; Morente et al. 2006). In Europe a virtual tumor bank was created in order to promote and integrate the tumor banks of various European countries, called European Human Tumor Frozen Tissue Bank (TuBa-Frost), which is administered by the Organization of European Cancer Institutes. This bank has a large number of high-quality samples that are collected and stored at the laboratories of the Cancer Centres and the universities of each collecting country. Standardization of collection and storage, and a strict quality control, were adopted by them to minimize inter-institutional variability (Lopez-Guerrero et al. 2006; Morente et al. 2006; Riegman et al. 2006; Van Veen et al. 2006).

According to TuBaFrost and also US, Canada and Chile Tumor Banks, excellence is based on the validity of some procedures such as collection, storage, retrieval and monitoring of samples. Most of the variations noted in studies that show conflicting results on the correlation of molecular markers, has been explained by the lack of standardization in the collection and storing of samples (Canadian Institutes of Health Research 2010; Morente et al. 2006).

In the first year of a bank, we must evaluate at every 6 months the quality of 2 % of the samples, by means of total RNA extraction (more sensitive to temperature fluctuations than DNA). In subsequent years, are assessed 1 % of collected samples each year (Mager et al. 2007; Morente et al. 2006; Pitt et al. 2008).

A good quality RNA must be intact (the molecules are not fragmented) and pure (free of contaminants that may be present in the solutions used during the extraction process or in the tissue of origin), especially in cases that will be used for enzymatic reactions (Gene Quantification 2010; Pitt et al. 2008).

The Barretos Cancer Hospital tumor bank was established in 2006 and now has 73,294 biological samples than 16,130 donors. Due to the large volume of samples of our bank, the implementation of the molecular oncology service, we decided to develop and implement standard operational procedures for quality assurance, based upon international standards, aiming to standardize the collection, freezing, storage and tracking of samples and then compared the influence of cold ischemia time on the quality of total

RNA from samples of different topographies, collected in two different time intervals.

Materials and methods

The study was conducted at the Barretos Cancer Hospital—Pio XII Foundation, with the participation of the Tumor Bank, Department of Pathology, Surgical Centre, Institute of Education and Research (IEP) and Laboratory of Molecular Oncology, addition to the participation of the Department of Pathology at University of São Paulo (USP).

International standards adopted for standardization and quality assurance

1. Cold ischemia time (time between surgical removal of the specimen and the snap freezing of stored sample):

The samples were collected and snap frozen immediately after surgical specimens were removed and transported to the pathology room inside the surgical centre (room for freezing). Maximum cold ischemia time was set at 30 min (Morente et al. 2006). The timing control was done using timers (Cronobio, model SW2018) triggered by nursing assistants or technicians (in charge of each operating room), so that the specimen was removed from the patient; and stopped by the pathologist or technician in charge of collection, at the moment when the fragment was snap frozen in liquid nitrogen.

2. Aseptic techniques to dissect the material:

The surgical specimens were transported to the freezing room in stainless steel trays covered with surgical drapes, both sterile. The collector wore gloves and surgical materials (tweezers, scissors and scalpels) sterile, swapping them between the dissection of normal and neoplastic tissue (Canadian Institutes of Health Research 2010; Isabelle et al. 2006; Mager et al. 2007; Morente et al. 2006; Roa and Artigas 2008).

3. Previous analysis of the material collected by means of freezing/cytological imprint technique:

Tumors with dubious Macroscopic identification and/or presenting extensive necrosis were previously

analysed by the pathologist under an optical microscope (Nikon Eclipse E-200), after histological sectioning under cryostat (Leica CM 1850 UV) or cytological imprint, both stained with haematoxylin and eosin in order to ensure the representativeness of the sample.

4. Size and quantity of collected sample and storage container:

From one to four fragments of neoplastic tissue were collected, measuring from 0.5 to 1.0 cm³ depending on the size of each tumor, always taking care to never compromise the diagnosis (Canadian Institutes of Health Research 2010; Isabelle et al. 2006; Mager et al. 2007; Morente et al. 2006; Roa and Artigas 2008). We also collected normal tissue if present, in similar size and quantity to the neoplastic ones. The neoplastic tissue samples were placed in sterile cryogenic tubes of 2 ml (Greiner bio-one) with red caps, and normal tissue with green caps, identified with the Hospital Registry (RH) of the patient, date and topography of collection, using permanent marker pen (EasyPath, model 51-05031).

5. Rapid freezing techniques:

The cryogenic tubes with samples were placed in a container of 5 litres (ABS, model SC11/7), containing liquid nitrogen at vapour phase at a temperature of approximately −196 °C, for their immediate freezing.

6. Tissue Storage:

Twice a day, in the end of the morning and in the afternoon, the tissues were transferred to the tumor bank in a thermo flask (Thermo) containing liquid nitrogen, they were then registered and stored in a own freezer (Thermo, model 906) to a temperature of −80 °C, with room temperature not higher than 22 °C (Isabelle et al. 2006; Mager et al. 2007; Morente et al. 2006; Roa and Artigas 2008).

7. Security System for freezers:

To prevent damage caused by large fluctuations in temperature or power outage, a safety system for electricity was implemented, connecting freezers to an emergency generator. An alarm was also installed to monitor any temperature change greater than 10 % above or below −80 °C, with local audible and visual warnings, and interconnected to the hospital switchboard, which dials pre-programmed numbers.

8. Coding of samples:

To facilitate the selection of samples for research, they were all coded by CID-O (International Classification of Diseases Oncology).

Collecting of 200 samples used to compare the quality of RNA at two time intervals and different topographies

We started collecting 6 months after the beginning of standardization and implementation of the quality assurance program. It was collected at the freezing room for 10 months two tumor samples from each donor, one with up to 30 min (recommended by some biobanks) of cold ischemia and other with exact 45 min (devised by us), totaling 100 different donors and 200 samples, 40 from each of the following organs: breast, thyroid, stomach, lung and colorectum.

Assessing the quality of samples through the extraction of RNA

The extraction of total RNA from these samples was performed at the Centre for Research in Molecular Oncology at the Barretos Cancer Hospital (Laboratory of Molecular Biology).

Before starting the extraction, histological sectioning was performed for each sample using a cryostat (Leica CM 1850 UV) for further evaluation by an optical microscope (Nikon Eclipse E-200) by a pathologist, in order to ascertain the viability of samples (those had more than 30 % necrosis were excluded) and mark the tumor area for microdissection (Boudou et al. 2010).

According to our laboratory's extraction protocol, the Trizol reagent was used (Invitrogen, Carlsbad, CA). The quality of total RNA was assessed using the Agilent RNA 6000 Nano Kit (Agilent Technologies, USA) and the results were obtained with the help of an Agilent 2100 Bioanalyser equipment (Agilent Technologies, USA), which was chosen for being a method both qualitative and quantitative (expressed in number of intact molecules), it also requires small amount of RNA (up to 250 ng of total RNA) and shows high sensitivity to detect degradation of total RNA, expressed by the RNA integrity number (RIN). RIN values range from 1 to 10, using a scale from 1 to 3 RIN indicates totally degraded RNA (Fig. 1), RIN greater than 3, less than or equal to 5, partially degraded RNA (Fig. 2) and RIN higher than 5, RNA intact (Fig. 3) (as instructed the manufacturer).

Statistical analysis

The software used was the SPSS for Windows, version 15.0.

The comparison of proportions of qualitative parameters (RNA degradation) between the two time intervals of collection, using the Chi-square and Fisher's exact test was made, although the samples compared at both time intervals were from the same tumors, they were different (Dawson and Trapp 2003).

Statistical significance was set for values of $p < 0.05$.

Ethical issues

In order to collect the samples after removal of the surgical specimens, we designed an informed consent

Fig. 1 Typical image totally degraded RNA, obtained from the electropherogram and virtual gel

Fig. 2 Typical image partially degraded RNA, obtained from the electropherogram and virtual gel

Fig. 3 Typical image intact RNA, obtained from the electropherogram and virtual gel

form declaration, which explained and asked permission to collect tissue for research studies. This was previously signed by patients or legal representatives.

The study was approved by the Research and Ethics Committee (CEP) of Barretos Cancer Hospital with number 131/2008 on February 14, 2008.

Results

When comparing the 98 tumor samples collected within 30 min (02 were excluded due to more than 30 % necrosis) to the 100 collected at 45 min, we observed that the amount of degraded and partially degraded RNA samples had almost doubled and with intact RNA had halved, with the increase in cold ischemia time ($p < 0.001$, Table 1). Analysing the different topographies, we noticed that the thyroid and colorectal samples showed the greatest degradation of total RNA with the increase in cold ischemia time ($p = 0.006$ and $p = 0.030$ respectively, Table 1).

Considering breast samples, we found a significant increase of samples with degraded RNA, a significant reduction in quantity for intact RNA and the number of partially degraded RNA samples did not change with the increase in cold ischemia time ($p = 0.131$, Table 1). Lung samples followed by stomach ones were those that suffered less degradation of their RNA with increase in cold ischemia time ($p = 0.919$ and $p = 0.384$ respectively, Table 1).

Discussion

Is well known that RNA degrades very rapidly if special precautions are not taken to preserve it (Tang et al. 2012). One of the most important factors to preserve the quality of RNA is the cold ischemia time, but its influence on the integrity of the RNA is not well documented (Rudloff et al. 2010). When comparing the quality of the 100 samples collected within 30 min with those 100 collected at 45 min (from the same

Table 1 Comparison between the cold ischemia times and quality of total RNA in all samples

Samples	Cold ischemia times						<i>p</i> value
	Up to 30'			At 45'			
	Intact	Degraded	Partly degraded	Intact	Degraded	Partly degraded	
Thyroid	16 (80 %)	3 (15 %)	1 (5 %)	6 (30 %)	7 (35 %)	7 (35 %)	0.006
Colorectal	11 (55 %)	6 (30 %)	3 (15 %)	4 (20 %)	14 (70 %)	2 (10 %)	0.030
Breast	14 (70 %)	4 (20 %)	2 (10 %)	8 (40 %)	10 (50 %)	2 (10 %)	0.131
Lung	7 (36.9 %)	7 (36.8 %)	5 (26.3 %)	6 (30 %)	9 (45 %)	5 (25 %)	0.919
Stomach	15 (79 %)	4 (21 %)	0 (0 %)	12 (60 %)	7 (35 %)	1 (5 %)	0.384
Total	63 (31.8 %)	24 (12.1 %)	11 (5.6 %)	36 (18.2 %)	47 (23.7 %)	17 (8.6 %)	<0.001

patients), by means of the RNA integrity number (RIN), we observed that in the group with the longest cold ischemia time, the number of degraded RNA nearly doubled and intact RNA halved. Analysing separately each topography, we observed that in all of them, there was an increase in degradation of total RNA with in the increased cold ischemia time and therefore deterioration in the quality of the sample. Thyroid and colorectal samples, followed by breast, showed the greatest degradation of RNA, while the lung and stomach showed greater stability of RNA, with the increase of cold ischemia time. Unlike the findings of Rudloff et al. (2010) on pancreas samples, where they observed that the cold ischemia time did not influence negatively the quality of total RNA and of Hatzis et al. (2011), where exposure of tumor tissue to an additional 40 min at room temperature before preservation did not affect the integrity or the purity of the extracted RNA, our findings reinforce the idea of Spruessel et al. (2004) that the cold ischemia time is the main factor related to degradation, and that the maximum time of 30 min should be respected whenever possible (Canadian Institutes of Health Research 2010; Morente et al. 2006; Reis et al. 2010; Roa and Artigas 2008).

When analysing the group of only those 100 samples collected within 30 min, we observed that the number of intact RNA was 64.3 %. And although an exact value couldn't be found in literature, we believe that this percentage may be indicative of good quality. Regarding those isolated by topography, we observed that thyroid showed 80 % of intact RNA, stomach 79 %, breast 70 % and colorectal 55 %,

showed good quality. However in the lung specimens, we found that only 36.9 % presented intact RNA.

We were surprised by the low percentage of lung samples containing RIN > 5, this finding gave us an idea of the limitation of these samples for studies of gene expression. In order to better predict the reason for this low percentage and based on Riegman et al. (2008), who said that the current measurement of cold ischemia time may be misleading by not measuring the time the tissue was without a blood supply. We checked the records of donors and found that they all came from thoracotomies, surgeries where warm ischemia time (no vascular irrigation in the region of the tumor before removal of the surgical specimen) is much higher than in other surgical procedures studied, justifying thus the low quality and alerting us about the importance of controlling this time to collect these samples. With this, we generated a change in the procedure for collection of lung tumors from thoracotomies, where ever possible, the surgeon removes a piece of the tumor through a simple incision as soon as access is gained to it, sutures the incised area, renew all materials (gloves, scalpel and tweezers) and continues the surgery. The fragment is immediately taken to the freezing room to be snap frozen as fast as possible, eliminating the warm ischemia time and minimizing the cold ischemia time.

Our study showed that the cold ischemia time is very important to preserve the quality of the RNA, therefore, where possible, must rapidly freeze tissue samples, with a maximum of 30 min. Also showed that in lung tumors from thoracotomies there is an important interference by the warm ischemia time in the degradation of RNA, so we recommend that when

possible, the flow of collection for these samples should be altered. Moreover, it was observed that RNA degradation is tissue dependent and that the procedures adopted for quality control are effective.

Acknowledgments We thank the Board, to the Institute of Education and Research and the colleagues and staff at Barretos Cancer Hospital (Pio XII Foundation), for the support and collaboration during the study.

References

- Boudou P, Tiret E, Wendum D et al (2010) Imprint cytology in tumor tissue bank quality control: an efficient method to evaluate tumor necrosis and to detect samples without tumor cells. *Virchows Arch* 456:443–447
- Canadian Institutes of Health Research (2010) Models for tumor bank programs in Canada. <http://www.cihr-irsc.gc.ca/e/24198.html>. Accessed 12 Sept 2010
- Carvalho L, Bernardo MT, Tavares M et al (2007) Banco de tumores imperativo na medicina. *Acta Med Port* 20: 325–333
- Clausen KP, Grizzle WE, Livolsi V et al (1989) The cooperative human tissue network. *Cancer* 63:1452–1455
- Dawson B, Trapp RG (2003) *Bioestatística Básica e Clínica*. McGraw-Hill Intramericana do Brasil Ltda, Rio de Janeiro
- Gene quantification (2010) RNA integrity and quantification. <http://www.gene-quantification.de/ma-integrity.html>. Accessed 24 Oct 2010
- Hatzis C, Sun H, Yao H et al (2011) Effects of tissue handling on RNA integrity and microarray measurements from resected breast cancers. *J Natl Cancer Inst*. doi:10.1093/jnci/djr438
- Herpel E, Röcken C, Manke H et al (2010) Quality management and accreditation of research tissue banks: experience of the National Center for Tumor Diseases (NCT) Heidelberg. *Virchows Arch*. doi:10.1007/s00428-010-0998-1
- Instituto Nacional do Câncer (2010) Incidência de Câncer no Brasil. http://www.inca.gov.br/estimativa/2010/index.asp?link=conteudo_view.asp&ID=2. Accessed 11 Sept 2010
- Isabelle M, Teodorovic I, Morente MM et al (2006) TuBaFrost 5: multifunctional central database application for a European tumor bank. *Eur J Cancer*. doi:10.1016/j.ejca.2006.04.032
- Lopez-Guerrero JA, Riegman PH, Oosterhuis JW et al (2006) TuBaFrost 4: access rules and incentives for a European tumor bank. *Eur J Cancer*. doi:10.1016/j.ejca.2006.04.030
- Mager SR, Oomen MHA, Morente MM et al (2007) Standard operating procedure for the collection of fresh frozen tissue samples. *Eur J Cancer* 43:828–834
- Morente MM, Mager R, Alonso S et al (2006) TuBaFrost 2: standardizing tissue collection and quality control procedures for a European virtual frozen tissue bank network. *Eur J Cancer*. doi:10.1016/j.ejca.2006.04.029
- Oosterhuis JW, Coebergh JW, Van Veen EB (2003) Tumor banks: well-guarded treasures in the interest of patients. *Nat Rev Cancer* 3:73–77
- Pitt KE, Campbell LD, Skubitz APN et al (2008) Best practices for repositories: collection, storage, retrieval and distribution of biological materials for research. *Cell Preserv Technol*. doi:10.1089/cpt.2008.9997
- Reis ST, Feitosa EB, Pontes-Junior et al (2010) Tumor banks: the cornerstone of basic research in urology. *Int Braz J Urol*. doi:10.1590/S1677-55382010000300012
- Riegman PH, Dinjens WN, Oomen MH et al (2006) TuBaFrost 1: uniting local Frozen tumor banks into a European network: an overview. *Eur J Cancer*. doi:10.1016/j.ejca.2006.04.031
- Riegman PH, Morente MM, Betsou F et al (2008) Biobanking for better healthcare. *Mol Onc*. doi:10.1016/j.molonc.2008.07.004
- Roa I, Artigas CG (2008) Banco de tumores em Chile, su aporte a la investigación: resultados de um proyecto piloto. *Rev Med Chile* 136:733–740
- Rudloff U, Bhanot U, Gerald W et al (2010) Biobanking of human pancreas cancer tissue: impact of ex vivo procurement times on RNA Quality. *Ann Surg Oncol* 17: 2229–2236
- Spruessel A, Steinann G, Jug N et al (2004) Tissue ischemia time affects gene and protein expression patterns within minutes following surgical tumor excision. *Biotechniques* 36:1030–1037
- Tang W, Hu Z, Muallem H et al (2012) Quality assurance of RNA expression profiling in clinical laboratories. *J Mol Diagn*. doi:10.1016/j.jmoldx.2011.09.003
- Thomas G (2010) Tissue banking for research: connecting the disconnected. *Cell Tissue Bank*. doi:10.1007/s10561-010-9212-6
- Van Veen EB, Riegman PH, Dinjens WN et al (2006) TuBaFrost 3: regulatory and ethical issues on the exchange of residual tissue for research across Europe. *Eur J Cancer*. doi:10.1016/j.ejca.2006.04.028
- Yu YY, Zhu ZG (2010) Significance of biological resource collection and tumor tissue bank creation. *World Gastrointest Oncol*. doi:10.4251/wjgo.v2.i1

8 REFERÊNCIAS

Adams K, Martin S. Ethical tissue: a not-for-profit model for human tissue supply. *Cell Tissue Bank*. 2011;12:9-10.

Agilent Technologies. A gilent 21 00 Bi oanalyzer [Inter net]. [c ited 2012 No v 13]. Available fro m: <<http://www.genomics.agilent.com/CollectionOverview.aspx?PageType=Platform&SubPageType=PlatformOverview&PageID=275>>.

Agilent Technologies. RNA Qu ality Control [Internet]. [c ited 2012 Nov 18]. Available fro m: <<http://www.genomics.agilent.com/CollectionOverview.aspx?PageType=Application&SubPageType=ApplicationOverview&PageID=123>>.

Ambrosone CB, Nesline MK, Davis W. Establishing a Cancer Center Data Bank and Biorepository for Multidisciplinary Research. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2006;15:1575-7.

Arjmand B, Emami-Razavi SH, Larijani B, Norouzi-Javidan A, Aghayan HR. The implementation of tissue banking experiences fo r settin g up a cGMP cell manufacturing facility. *Cell Tissue Bank*. 2 011 (p ublished o nline a head o f print). DOI 10.1007/s10561-011-9276-y.

Asslaber M, Ab uja PM, Stark K, Ede r J, G ottweis H , Tr auner M, S amonigg H , Mischinger HJ, Schippinger W, Ber ghold A, Den k H. The Genome Austria Ti ssue Bank (GATiB). *Pathobiology*. 2007;74:251-58.

Balaguer J, Cañete A, Costa E, Oltra S, Hernández M, Castel V. Tumour Banks in pediatric oncology. *Clin Transl Oncol*. 2006;8:884-8.

Becich MJ. The role of the pathologist as tissue refiner and data miner: the impact of functional g enomics on the modern pathology laboratory and the cri tical roles of pathology informatics and bioinformatics. *Mol Diagn*. 2000;5:287-99.

BéruBé K, Gibson C, Job C, Prytherch Z. Human lung tissue engineering: a critical tool for safer medicines. *Cell Tissue Bank*. 2011;12:11-3.

Bevilacqua G, Bo sman F, Dassel T, Höfler H, Janin A, Langer R, L arsimont D, Morente MM, Riegman P, Sc hirmacher P , St anta G, Z atloukal K, Cab oux E, Hainaut P. The role of the pathologist in tissue banking: European Consensus Expert Group Report. *Virchows Arch*. 2010;456:449-54.

Biomedical Genomics. RNA Quality Control [Internet]. [cited 2012 Jun 8]. Available from:<

http://www.biomedicalgenomics.org/RNA_quality_control_Bioanalyzer.html>.

Blackhall FH, Pintilie M, Wigle DA, Jurisica I, Liu N, Radulovich N, Johnston MR, Keshavjee S, Tsao MS. Stability and heterogeneity of expression profiles in lung cancer specimens harvested following surgical resection. *Neoplasia*. 2004;6:761-7.

Bonin S, Hlubek F, Benhattar J, Denkert C, Dietel M, Fernandez PL, Höfler G, Kothmaier H, Kruslin B, Mazzanti CM, Perren A, Popper H, Scarpa A, Soares P, Stanta G, Groenen PJ. Multicentre validation study of nucleic acids extraction from FFPE tissues. *Virchows Arch*. 2010;457:309-17.

Boudou-Rouquette P, Touibi N, Boëlle PY, Turet E, Fléjou JF, Wendum D. Imprint cytology in tumor tissue bank quality control: an efficient method to evaluate tumor necrosis and to detect samples without tumor cells. *Virchows Arch*. 2010;456:443-47.

Brimo F, Sircar K, Chevalier S, Saad F, Lacombe L, Têtu B, Scarlata E, Aprikian A. Banking of fresh-frozen prostate tissue using the alternate mirror image protocol: methods, validation, and impact on the pathological prognostic parameters in radical prostatectomy. *Cell Tissue Bank*. 2011 (published online ahead of print). DOI 10.1007/s10561-011-9284-y.

Bunton D. The use of functional human tissues in drug development. *Cell Tissue Bank*. 2010;12:31-2.

Canadian Tumour Repository Network. Standard Operating Procedure: Quality Assurance Procedures [Internet]. Accessed: 20 set. 2012. Disponível em: <<http://www.ctrnet.ca/operating-procedures>>.

Carvalho L, Bernardo MT, Tavares M, Coutinho P, Mação P, Oliveira C. Banco de Tumores Imperativo na Medicina. *Acta Med Port*. 2007;20:325-33.

Cavuşoğlu AC, Saydam S, Alakavuklar M, Canda T, Sevinç A, Kiliç Y, Harmancıoğlu O, Koçdor MA, Kinay M, Alanyali H, Görken I, Balci P, Demirkan B, Sakizli M, Güner G. A pilot study for human tumor/DNA banking: returned more questions than answers. *Med Oncol*. 2008;25:471-3.

Chu TY, Hwang KS, Yu MH, Lee HS, Lai HC, Liu JY. A research-based tumor tissue bank of gynecologic oncology: characteristics of nucleic acids extracted from normal and tumor tissues from different sites. *Int J Gynecol Cancer*. 2002;12:171-6.

Clausen KP, Grizzle WE, Livolsi V, Newton Junior WA, Aamodt R. The Cooperative Human Tissue Network. *Cancer*. 1989;63:1452-55.

Clotworthy M. Proceedings of the human tissues conference, House of Lords, 20 October 2009: Introduction. *Cell Tissue Bank*. 2011;12:1-2.

Coleman RA. Efficacy and safety of new medicines: a human focus. *Cell Tissue Bank*. 2011;12:3-5.

Conselho Nacional de Saúde. Resolução CNS nº 441, de 12 de maio de 2011 [Internet]. Acesso em: 11 nov. 2012. Disponível em: <<http://conselho.saude.gov.br/resolucoes/2011/Reso441.pdf>>.

Dash A, Maine IP, Varambally S, Shen R, Chinnaiyan AM, Rubin MA. Changes in differential gene expression because of warm ischemia time of radical prostatectomy specimens. *Am J Pathol*. 2002;161:1743-8.

Dawson B, Trapp RG. Bioestatística Básica e Clínica. 3ª ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana do Brasil Ltda; 2003.

Dhir R. Prostate cancer biobanking. *Curr Opin Urol*. 2008;18:309-14.

Dougall IG. The use of human tissue in drug Discovery. *Cell Tissue Bank*. 2011;12:7-8.

Field JK, Liloglou T, Niaz A, Bryan J, Gosney JR, Giles T, Brambilla C, Brambilla E, Vesin A, Timsit JF, Hainaut P, Martinet Y, Vignaud JM, Thunnissen FB, Prinsen C, Snijders PJ, Smit EF, Sozzi G, Roz L, Risch A, Becker HD, Elborn JS, Magee ND, Montuenga LM, Pajares MJ, Lozano MD, O'Byrne KJ, Harrison DJ, Niklinski J, Cassidy A; EUELC Collaborators. EUELC project: a multi-centre, multipurpose study to investigate early stage NSCLC, and to establish a biobank for ongoing collaboration. *Eur Respir J*. 2009;34:1477-86.

Foster CS. Pathology: coming in from the cold. *Cell Tissue Bank*. 2011;12:25-7.

Fuller BJ. Access to organs and tissues for research from the organ donor pool within the UK. *Cell Tissue Bank*. 2011;12:15-7.

Garman KS, Nevins JR, Potti A. Genomic strategies for personalized cancer therapy. *Hum Mol Genet*. 2007;16:226-32.

Gene Quantification. RNA integrity and quantification [Internet]. [cited 2012 Jan 20]. Available from: <<http://www.gene-quantification.de/rna-integrity.html>>.

Goebell PJ, Groshen S, Schmitz-Dräger BJ, Sylvester R, Kogevinas M, Malats N, Sauter G, Barton Grossman H, Waldman F, Cote RJ. The International Bladder Cancer Bank: proposal for a new study concept. *Urol Oncol*. 2004;22:277-84.

Hamilton KT, Herson MR. Skin bank development and critical incident response. *Cell Tissue Bank*. 2011;12:147-51.

Hatzis C, Sun H, Yao H, Hubbard RE, Meric-Bernstam F, Babiera GV, Wu Y, Pusztai L, Symmans WF. Effects of Tissue Handling on RNA Integrity and

Microarray Measurements From Resected Breast Cancers. *J Natl Cancer Inst.* 2011;103:1-13.

Helsing KJ, Hoffman SC, Comstock GW. Temperature variations in chest-type mechanical freezers. *Clin Chem.* 2000;46:1861.

Herpel E, Röcken C, Manke H, Schirmacher P, Flechtenmacher C. Quality management and accreditation of research tissue banks: experience of the National Center for Tumor Diseases (NCT) Heidelberg. *Virchows Arch.* 2010;457:741-47.

Huang J, Qi R, Quackenbush J, Daway E, Lazaridis E, Yeatman T. Effects of ischemia on gene expression. *J Surg Res.* 2001;99:222-7.

Hwang RF, Wang H, Lara A, Gomez H, Chang T, Sieffert N, Moon Y, Ram S, Zimmerman S, Lee JH, Pisters PW, Tamm EP, Fleming JB, Abbruzzese JL, Evans DB. Development of an Integrated Biospecimen Bank and Multidisciplinary Clinical Database For Pancreatic Cancer. *Ann Surg Oncol.* 2008;15:1356-66.

Instituto Nacional do Câncer (INCA). Incidência de Câncer no Brasil [Internet]. Acesso em : 21 set. 2012. Disponível em : <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2012/estimativa20122111.pdf>>.

International Agency for Research on Cancer (IARC). Common Minimum Technical Standards and Protocols for Biological Resource Centres Dedicated to Cancer Research (2007) [Internet]. [cited 2012 Set. 21]. Available from: <http://www.iarc.fr/en/publications/pdfs-online/wrk/wrk2/Standards_ProtocolsBRC.pdf>.

Isabelle M, Teodorovic I, Morente MM, Jaminé D, Passiukov A, Lejeune S, Therasse P, Dinjens WNM, Oosterhuis JW, Lam KH, Oomen MHA, Spatz A, Ratcliffe C, Knox K, Magner R, Kerr D, Pezzella F, van de Vijver M, van Boven H, Alonso S, Kerjaschki D, Pammer J, Lopez-Guerrero JA, Llombart-Bosch A, Carbone A, Gloghini A, van Veen EB, van Damme B, Riegman PHJ. TUBAFrost 5: Multifunctional central database application for a European tumor bank. *Eur J Cancer.* 2006;42:3103-9.

Jewell SD, Srinivasan M, McCart LM, Williams N, Grizzle WH, LiVolsi V, MacLennan G, Sedmak DD. Analysis of the molecular quality of human tissues: an experience from the Cooperative Human Tissue Network. *Am J Clin Pathol.* 2002;118:733-41.

Johnsen IK, Hahner S, Brière JJ, Ozimek A, Gimenez-Roqueplo AP, Hantel C, Adam P, Bertherat J, Beuschlein F. Evaluation of a Standardized Protocol for Processing Adrenal Tumor Samples: Preparation for a European Adrenal Tumor Bank. *Horm Metab Res.* 2010;42:93-101.

Kaminski A, Gut G, Uhrynowska-Tyszkiewicz I, Olender E. Tissue banking training courses: Polish experience. *Cell Tissue Bank.* 2012 (published online ahead of print). DOI 10.1007/s10561-012-9294-4.

Kettis-Lindblad A, Ring L, Viberth E, Hansson MG. Genetic research and donation of tissue samples to biobanks. What do potential sample donors in the Swedish general public think? *Eur J Public Health*. 2006;16:433-40.

Kowalski JB, Merritt K, Gocke D, Osborne J. Assessment of bioburden on human and animal tissues: Part 2—Results of testing of human tissue and qualification of a composite sample for routine bioburden determination. *Cell Tissue Bank*. 2012 (published online ahead of print). DOI 10.1007/s10561-012-9296-2.

Lawson MH, Russell DM, Cummings NM, Russell R, Morjaria JB, Brenton JD, Murphy G, Rintoul C. Tissue Banking of Diagnostic Lung Cancer Biopsies for Extraction of High Quality RNA. *J Thorac Oncol*. 2010;5:956-63.

Leyland-Jones BR, Ambrosone CB, Bartlett J, Ellis MJ, Enos RA, Raji A, Pins MR, Zujewski JA, Hewitt SM, Forbes JF, Abramovitz M, Braga S, Cardoso F, Harbeck N, Denkert C, Jewell SD. Recommendations for Collection and Handling of Specimens From Group Breast Cancer Clinical Trials. *J Clin Oncol*. 2008;26:5638-44.

LiVolsi VA, Clausen KP, Grizzle W, Newton W, Pretlow TG, Aamodt R. The Cooperative Human Tissue Network-An Update. *Cancer*. 1993;71:1391-4.

Loken SD, Demetrick DJ. A novel method for freezing and storing research tissue bank specimens. *Hum Pathol*. 2005;36:977-80.

Lopez-Guerrero JA, Riegman PHJ, Oosterhuis JW, Lam KH, Oomen MHA, Spatz A, Ratcliffe C, Knox K, Mager R, Kerr D, Pezzella F, van Damme B, van de Vijver M, van Boven H, Morente MM, Alonso S, Kerjaschki D, Pammer J, Carbone A, Gloghini A, Teodorovic I, Isabelle M, Passiukov A, Lejeune S, Therasse P, van Veen EB, Dinjens WNM, Lombart-Bosch A. TUBA4 : Access rules and incentives for a European tumor bank. *Eur J Cancer*. 2006;42:2924-9.

Mager SR, Oomen MHA, Morente MM, Ratcliffe C, Knox K, Kerr DJ, Pezzella F, Riegman PHJ. Standard operating procedure for the collection of fresh frozen tissue samples. *Eur J Cancer*. 2007;43:828-34.

Majidzadeh-A K, Kaviani A, Esmaeili R, Farahmand L, Shojamoradi MH, Zare AA, Eini L, Abbasvandi F, Olfatbakhsh A, Moazen H. Iranian Breast Cancer Bio-Bank: the activity and challenging issues. *Cell Tissue Bank*. 2012 (published online ahead of print). DOI 10.1007/s10561-012-9293-5.

Micke P, Ohshima M, Tahmasebpour S, Ren Z-P, Ostman A, Pontén F, Botling J. Biobanking of fresh frozen tissue: RNA is stable in nonfixed surgical specimens. *Lab Invest*. 2006;86:202-11.

Mishra A, Pandey A, Shaw R. Initiating tumor banking for translational research: MD Anderson and Liverpool experience. *Indian J Cancer*. 2007;44:17-24.

Morente MM, Mager R, Alonso S, Pezzella F, Spatz A, Knox K, Kerr D, Dijkstra WNM, Oosterhuis JW, Lam KH, Oomen MHA, van Damme B, van de Vijver M, van Boven H, Kerjaschki D, Pammer J, Lopez-Guerrero JA, Llombart-Bosch A, Carbone A, Gloghini A, Teodorovic I, Isabelle M, Passiukov A, Lejeune S, Therasse P, van Veen EB, Ratcliffe C, Riegman PHJ. TuBaFrost 2: standardizing tissue collection and quality control procedures for a European virtual frozen tissue bank network. *Eur J Cancer*. 2006;42:2684-91.

Morente MM, Alava E, Fernández PL. Tumour Banking: The Spanish Design. *Pathobiology*. 2007;74:245-50.

Morente MM, Fernández PL, Alava E. Biobanking: old activity or young discipline?. *Semin Diagn Pathol*. 2008;25:317-22.

Morrin H, Gunningham S, Currie M, Dachs G, Fox S, Robinson B. The Christchurch Tissue Bank to support cancer research. *N Z Med J*. 2005;118:U1735.

National Cancer Institute (NCI). NCI Best Practices for Biospecimen Resources (2011) [Internet]. [cited 2011 Dec. 20]. Available from: <<http://biospecimens.cancer.gov/bestpractices/2011-NCIbestpractices.pdf>>.

National Cancer Institute (NCI). United States–Latin America Cancer Research Network (US-LACRN) [Internet]. [cited 2012 Nov. 10]. Available from: <<http://www.cancer.gov/aboutnci/globalhealth/olacpd/crn>>.

Ohashi Y, Creek KE, Pirisi L, Kalus R, Young SR. RNA degradation in human breast tissue after surgical removal: a time-course study. *Exp Mol Pathol*. 2004;77:98-103.

Oosterhuis JW, Coebergh JW, Van Veen EB. Tumor banks: Well-guarded treasures in the interest of patients. *Nat Rev Cancer*. 2003;3:73-7.

Oxford Gene Technology (OGT). Understanding and measuring variations in DNA sample quality [Internet]. [cited 2012 Sept. 19]. Available from: <http://www.ogt.co.uk/resources/literature/402_understanding_and_measuring_variation_in_dna_sample_quality>.

Patel A. Tissue banking for research—bench to bedside and back—myth, reality or fast fading reality at the dawn of a personalised healthcare era. *Cell Tissue Bank*. 2011;12:19-21.

Pedraza JM. A model of a code of ethics for tissue banks operating in developing countries. *Cell Tissue Bank*. 2011 (published online ahead of print). DOI 10.1007/s10561-011-9279-8.

Pedraza JM, Vajaradul Y, Alvarez I. The future role of the professional associations in the promotion of tissue banking activities in Asia and the Pacific and in the Latin America regions. *Cell Tissue Bank*. 2011;12:319-27.

Pegg DE. The current status of tissue cryopreservation. *Cryo Letters*. 2001;22:105-14.

Pierscionek BK. The current limitations on tissue banking from an academic perspective. *Cell Tissue Bank*. 2011;12:23-4.

Pitt KE, Campbell LD, Skubitz APN, Somiari SB, Sexton KC, Pugh R, Aamodt R, Baird P, Betsou F, Cohen L, Souza Y, Gaffney E, Geary P, Grizzle WE, Gunter E, Horsefall D, Kessler J, Kaercher E, Michels C, Morales O, Morente MM, Morrin H, Petersen G, Riegman PHJ, Robb J, Seberg O, Thomas J, Thorne H, Walters C. 2008 Best Practices for repositories: Collection, storage, retrieval and distribution of biological materials for research. *Cell Preserv Technol*. 2008;6:3-58.

Qualman SJ, France M, Grizzle WE, Livolsi VA, Moskaluk CA, Ramirez NC, Washington MK. Establishing a tumor bank: banking, informatics and ethics. *Br J Cancer*. 2004;90:1115-19.

Raso MG, Wistuba II. Molecular Pathogenesis of Early-Stage Non-small Cell Lung Cancer and a Proposal for Tissue Banking to Facilitate Identification of New Biomarkers. *J Thorac Oncol*. 2007;2:S128-35.

Reis ST, Feitosa EB, Pontes-Junior J, Marin CC, Abe DK, Crippa A, Antunes AA, Nesrallah AJ, Oliveira LC, Ribeiro-Filho LA, Srougi M, Leite KRM, Dall'Oglio MF. Tumor Banks: The Cornerstone of Basic Research in Urology. *International Braz J Urol*. 2010;36:348-54.

Riegman PHJ, Dinjens WNM, Oomen MHA, Spatz A, Ratcliffe C, Knox K, Mager R, Kerr D, Pezzella F, van Damme B, van de Vijver M, van Boven H, Morente MM, Alonso S, Kerjaschki D, Pammer J, Lopez-Guerrero JA, Llombart-Bosch A, Carbone A, Gloghini A, Teodorovic I, Isabelle M, Jamine D, Passioukov A, Lejeune S, Therasse P, van Veen EB, Lam KH, Oosterhuis JW. TumorBankFrost 1: Uniting local Frozen Tumor Banks into a European Network: an overview. *Eur J Cancer*. 2006;42:2678-83.

Riegman PHJ, Morente MM, Betsou F, de Blasio P, Geary P. Biobanking for better healthcare. *Mol Oncol*. 2008;2:213-22.

Roa EI, Artigas ACG. Banco de tumores em Chile, seu aporte a la investigación: resultados de um projecto piloto. *Rev Med Chile*. 2008;136:733-40.

Rodrigues M, Vitó I, Santos R, Paiva J, Pontes P, Silva P, Carneiro F. Establishment of a Tumour Bank: the experience of the Department of Pathology of Hospital S. João (Porto, Portugal). *Cell Tissue Bank*. 2009;10:75-7.

Rudloff U, Bhanot U, Gerald W, Klimstra DS, Jarnagin WR, Brennan MF, Allen PJ. Biobanking of Human Pancreas Cancer Tissue: Impact of Ex-vivo Procurement Times on RNA Quality. *Ann Surg Oncol*. 2010;17:2229-36.

Ruíz-Godoy L, Meneses-García A, Suárez-Roa L, Enriquez V, Lechuga-Rojas R, Reyes-Lira E. Organization of a Tumor Bank: The Experience of the National Cancer Institute of México. *Pathobiology*. 2010;77:147-54.

Sambrook J, Russell DW. Molecular Cloning: a Laboratory Manual. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001.

Sandusky GE, Teheny KH, Esterman M, Hanson J, Williams SD. Quality control of human tissues--experience from the Indiana University Cancer Center-Lilly Research Labs human tissue bank. *Cell Tissue Bank*. 2007;8:287-95.

Schlomm T, Näkel E, Lübke A, Bunes A, Chun FK, Steuber T, Graefen M, Simon R, Sauter G, Poustka A, Huland H, Erbersdobler A, Sültmann H, Hellwinkel OJ. Marked gene transcript level alterations occur early during radical prostatectomy. *Eur Urol*. 2008;53:333-44.

Schroeder A, Mueller O, Stocker S, Salowsky R, Leiber M, Gassmann M, Lightfoot S, Menzel W, Granzow M, Ragg T. The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC Mol Biol*. 2006;7:3-17.

Sewart S, Barraclough R, Rudland PS, West CR, Barraclough DL. Molecular analysis of a collection of clinical specimens stored at 4°C as an alternative to snap-freezing. *Int J Oncol*. 2009;35:381-6.

Signoretti S, Bratslavsky G, Waldman FM, Reuter VE, Haaga J, Merino M, Thomas GV, Pins MR, Libermann T, Gillespie J, Tomaszewski JE, Compton CC, Hruszkewycz A, Linehan WM, Atkins MB. Tissue-Based Research In Kidney Cancer: Current Challenges And Future Directions. *Clin Cancer Res*. 2008;14:3699-705.

Siminoff LA, Traino HM. Consenting to donation: an examination of current practices in informed consent for tissue donation in the US. *Cell Tissue Bank*. 2012 (published online ahead of print). DOI 10.1007/s10561-012-9303-7.

Spruessel A, Steimann G, Jung M, Lee SA, Carr T, Fentz AK, Spangenberg J, Zornig C, Juhl HH, David KA. Tissue ischemia time affects gene and protein expression patterns within minutes following surgical tumor excision. *Biotechniques*. 2004;36:1030-37.

Staal FJ, Cario G, Cazzaniga G, Haferlach T, Heuser M, Hofmann WK, Mills K, Schrappe M, Stanulla M, Wingen LU, van Dongen JJ, Schlegelberger B. Consensus

guidelines for microarray gene expression analyses in leukemia from three European leukemia networks. *Leukemia*. 2006;20:1385–92.

Suh KS, Remache YK, Patel JS, Chen SH, Haystrand R, Ford P, Shaikh AM, Wang J, Goy AH. Informatics-guided procurement of patient samples for biomarker discovery projects in cancer research. *Cell Tissue Bank*. 2009;10:43-8.

Tang W, Hu Z, Muallem H, Gully ML. Quality Assurance of RNA Expression Profiling in Clinical Laboratories. *J Mol Diagn*. 2012;14:1-11.

Teodorovic I, Therasse P, Spatz A, Isabelle M, Oosterhuis W. Human tissue research: EORTC recommendations on its practical consequences. *Eur J Cancer*. 2003;39:2256-63.

Thomas G. Tissue banking for research: connecting the disconnected. *Cell Tissue Bank*. 2010;12:29-30.

Tschulik A, Zatloukal K. The increasing importance of tumor and tissue banks in the light of genomic and proteomic research. *Pathologe*. 2001;22:310-5.

van Veen EB, Riegman PH, Dinjens WN, Lam KH, Oomen MH, Spatz A, Mager R, Ratcliffe C, Knox K, Kerr D, van Damme B, van de Vijver M, van Booven H, Morente MM, Alonso S, Kerjashki D, Pammer J, Lopez-Guerrero JA, Lombart Bosch A, Carbone A, Gloghini A, Teodorovic I, Isabelle M, Passiukov A, Lejeune S, Therasse P, Oosterhuis JW. TuBaFrost 3: Regulatory and ethical issues on the exchange of residual tissue for research across Europe. *Eur J Cancer*. 2006;42:2914-23.

Viana CR, Neto CS, Kerr LM, Palmero EI, Marques MM, Colaiacovo T, de Queiroz Junior AF, Carvalho AL, Siqueira SA. The interference of cold ischemia time in the quality of total RNA from frozen tumor samples. *Cell Tissue Bank*. 2012 (published online ahead of print). DOI 10.1007/s10561-012-9313-5.

Yu YY, Zhu ZG. Significance of biological resource collection and tumor tissue bank creation. *World Gastrointest Oncol*. 2010;2:5-8.

Zain RB, Athirajan V, Ghani WMN, Razak IA, Latifah RJR, Ismail SM, Sallam AA, Bustam AZ, Rahman ZAA, Hussien A, Talib N, Cheong SC, Jallaludin A. An oral cancer biobank initiative: a platform for multidisciplinary research in a developing country. *Cell Tissue Bank*. 2012 (published online ahead of print). DOI 10.1007/s10561-012-9298-0.