

Banco de tumores en Chile, su aporte a la investigación: resultados de un proyecto piloto

Iván Roa E^{1,2}, Carmen G Artigas A³.

A pilot experience with a tumor bank

Background: Despite having the technical facilities and the knowledge, Chile did not have a tumor bank until recently. **Aim:** To describe the results of the first three years of a tumor bank. **Material and methods:** All cases stored in a tumor bank from June 2004 to June 2007 were included. Samples were frozen in isopentane, afterwards in liquid nitrogen and finally transferred to freezers at -80°C . Quality controls with DNA and RNA extraction and immunohistochemistry, were performed. **Results:** In the study period, 1239 cases were collected and 79% were malignant tumors. In 78% of cases, samples from the tumor and of normal neighboring tissue, were stored. Twenty six percent of samples were from breast cancer and 22% for digestive tumors. Immunohistochemical expression of vimentin was measured in 30 cases and the expression of Ki67 and p53 in 20 cases. Thirteen of 15 breast cancer samples had expression of estrogen receptors. In 30 cases, DNA and RNA extraction was carried out, amplifying β -globin and β -actin. Moreover RNA was extracted from 63 gastric cancer, 30 colon cancer and gallbladder cancer samples, for specific projects. **Conclusions:** The creation of a tumor bank is feasible, preserving samples of high biological quality. (Rev Méd Chile 2008; 136: 733-40).

(Key words: Breast neoplasms; Cryopreservation; Human tumour banking; Tissue banks)

Recibido el 23 de octubre, 2007. Aceptado el 28 de enero, 2008.

Este trabajo es producto de los aportes parciales de los siguientes Proyectos: Fondecyt: 1060375; 1050603; Fondos de Desarrollo Clínica Alemana de Temuco y Clínica Alemana de Santiago y del PBCT6-CTI-SA.

¹Servicio Anatomía Patológica Clínica Alemana de Santiago. Facultad de Medicina Universidad del Desarrollo. ²Departamento de Anatomía Patológica. Facultad de Medicina. Universidad de la Frontera. ³Servicio Anatomía Patológica Clínica Alemana de Temuco.

Desde hace años se desarrollan metodologías para la conservación de células, tejidos y fluidos, para su posterior utilización en diagnóstico e investigación^{1,2}. Esta metodología se basa esencialmente en la conservación de tejidos a través de la utilización de sencillas técnicas de criopreservación^{3,4}. También han sido descritas metodologías más complejas capaces, no sólo de

mantener gametos, células y tejidos por largos períodos de tiempo en condiciones de congelación, sino que su posterior reanimación con todo su potencial genético y funcional⁵⁻⁷. En la actualidad, novedosas técnicas como la vitrificación de células y tejidos, así como la incorporación de criopreservantes han mejorando sustancialmente la viabilidad celular posterior a la congelación^{8,9}.

En nuestro país, específicamente en el área de los tumores malignos, no se han desarrollado bancos de tumores (BT), a pesar de existir las condiciones y el conocimiento para estos propósi-

Correspondencia a: Iván Roa E. Vitacura 5951. Clínica Alemana. Santiago, Chile. E mail: iroa@alemana.cl.

tos. En nuestro medio, algunos proyectos de investigación han contemplado la obtención y manutención de este tipo de muestras congeladas a bajas temperaturas con el objeto de aplicar técnicas de biología molecular^{10,11}, sin embargo, el término del proyecto frecuentemente llevaba consigo el término de las actividades de criopreservación.

En la mayor parte de los departamentos de Anatomía Patológica, los remanentes de tejidos normales y tumorales, posterior al estudio anatómopatológico son eliminados y una gran cantidad de material de alta calidad biológica se desecha, imposibilitando la realización de estudios, además de limitar la obtención de casuísticas que permitan obtener conclusiones estadísticamente válidas y competitivas en el ámbito de la investigación. Tampoco ha existido una política encaminada a la creación y desarrollo de BT en nuestro país, lo que ha traído consigo una limitación para la generación de estudios, desarrollo de proyectos y cooperación entre grupos de investigadores.

Inicialmente, en el estudio de las enfermedades neoplásicas a nivel genético-molecular, la determinación de las alteraciones estructurales del ADN (genómica) fueron el objetivo principal^{12,13}, posteriormente el concepto de funcionalidad del gen y su expresión cobró mayor importancia, lo cual requiere mejorar las condiciones de obtención, procesamiento y conservación de las muestras con el objeto de obtener ARN, especialmente ARNm. La incorporación de nuevas metodologías enfocadas al estudio y caracterización funcional del producto o proteómica, y recientemente la metabonomía, han aumentado aún más las restricciones respecto de las condiciones que requieren las muestras para este tipo de estudios¹⁴⁻¹⁷. En este proceso, no sólo es importante la obtención de los casos, sino además, el control de todas aquellas etapas y procesos que determinan la calidad estructural y funcional de las muestras^{18,19}.

La calidad de las muestras de un BT guarda relación con una serie de factores entre los cuales podemos mencionar: la rapidez en la obtención de la muestra, el período de prefijación, el período de isquemia desde la oclusión de los pedículos vasculares hasta la extracción del órgano y factores ambientales tales como temperatura, pH, drogas utilizadas en el paciente y anestésicos,

etc.²⁰. La representatividad de los fragmentos almacenados también es un aspecto fundamental, así como la no contaminación de los tejidos que serán utilizados como controles, por lo que el rol del patólogo es fundamental en esta etapa^{12,13,21}.

Aun cuando en nuestro Departamento se ha utilizado la conservación de tejidos normales y tumorales mediante congelación desde hace más de una década en los distintos proyectos de investigación, en junio de 2004 se creó oficialmente el BT en la ciudad de Temuco con la participación de la Unidad de Anatomía Patológica del Hospital Hernán Henríquez Aravena, Departamento de Anatomía Patológica Universidad de La Frontera y Clínica Alemana de Temuco, haciéndose extensiva posteriormente a Clínica Alemana de Santiago. Para esta nueva estructura se requirió definir bases técnicas, administrativas, protocolos, sistemas de control de calidad, etc. Los estándares de procesamiento y controles de calidad se basaron en los protocolos utilizados en los Bancos de Tumores del MD Anderson en Houston y en la Red de Bancos de Tumores de España dependiente del Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas²², con algunas modificaciones.

El objetivo de este trabajo es mostrar los resultados obtenidos en los tres primeros años de funcionamiento del BT, así como de los sistemas de control implementados para el aseguramiento de la calidad de las muestras.

MATERIAL Y MÉTODO

Casos. Se incluyeron todos los casos almacenados en el BT desde junio de 2004 hasta junio de 2007, de acuerdo al siguiente protocolo: de cada pieza quirúrgica oncológica obtenida en fresco se tomaron muestras del tumor y, en los casos en que fue posible del tejido adyacente sin tumor (control). Del tumor se obtuvo 5 muestras de 0,5 CC (2 en OCTTM, 2 en RNA-laterTM y 1 sin aditivos). Una cantidad similar de muestras se tomaron de los tejidos no tumorales del mismo caso, para ser utilizados como controles. Adicionalmente se tomaron muestras para estudio histológico e inmunohistoquímico que fueron fijadas en formalina zinc tamponada.

Protocolo de procesamiento. Las muestras fueron colocadas en criotubos, identificados y sometidos a congelación en isopentano a -50°C por 2 min y

sumergidas en nitrógeno líquido (-196°C), por un periodo de dos semanas. Los criotubos fueron traspasados a cajas de congelación identificadas individualmente con un sistema de coordenadas y almacenadas hasta su utilización en congeladores de -80°C (*freezer* de baja temperatura).

Control de calidad tiempo/conservación. Como tiempo máximo aceptable desde la extracción quirúrgica hasta la congelación, se consideró de 2 h para la obtención ADN y de 30 min para ARN y proteínas. Posterior a ese tiempo, las muestras fueron consideradas no aptas para el BT.

Control de calidad tejido/diagnóstico. En todos los casos se obtuvo además muestra para estudio histológico durante la biopsia intraoperatoria, a fin de asegurar la presencia de tumor en las muestras seleccionadas. También, se tomó una muestra del mismo sitio que fue procesada para estudio histológico convencional e inmunohistoquímica.

Control de calidad del almacenamiento. El control de la integridad de las muestras, se realizó en forma periódica y aleatoria mediante extracción de ADN y ARN, así como la amplificación de productos del gen de la β -globina (ADN)²³ y de la β -actina (ARN)^{24,25}. La antigenicidad se controló mediante estudio inmunohistoquímico con los siguientes anticuerpos (vimentina, Ki67, p53 y receptores nucleares de estrógenos para el tejido mamario). De acuerdo a recomendaciones¹⁸, una de cada veinte de las primeras 500 muestras almacenadas en el BT fue procesada como control de calidad, a fin de objetivar las características y resultados obtenidos con el material almacenado.

Extracción ADN. La extracción se realizó mediante el *kit* Genomic Puregene, (Gentra, USA) de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. Se utilizó 7 cortes de 12 micras de tejido congelado, se agregó *buffer* de digestión (TRIS 0.01M pH 7,8 EDTA 0,005M, SDS 0,5%) y proteinasa-K 10 mg/mL, hasta digestión completa del tejido. El ADN fue precipitado con isopropanol, lavado con etanol 70% y resuspendido en solución tampón TE pH 7,4 (10 mM Tris.Cl, 1mM EDTA pH 8,0).

Amplificación de ADN. Se realizó PCR simple con un par de iniciadores del gen de la β -globina

humana²³. Los productos de la amplificación de la β -globina fueron de 268, 536 y 986 pb, visualizados por electroforesis en geles de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio.

Extracción ARN. Se utilizó la misma cantidad de muestra que la utilizada para extraer ADN. El tejido obtenido fue suspendido en trizol (Life Technology, USA) y homogenizado mecánicamente. Después de la precipitación del ARN, fue resuspendido en agua tratada con dietilpíropicarbato (DEPC). Para la cuantificación del ARN se utilizó un espectrofotómetro GeneQuant (Amersham, USA) y visualizado en geles de agarosa.

RT-PCR. Para la obtención de c-ADN, se realizó reacción con transcriptasa reversa M-MLV (Invitrogen, USA). Como control interno se utilizó un par de iniciadores del gen de la β -actina. Los segmentos amplificados de 838 pb fueron visualizados en geles de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio.

Técnica de inmunohistoquímica. Se realizó la técnica estándar de streptavidina-biotina para tejidos fijados en formalina e incluidos en parafina y para tejidos congelados. Los anticuerpos utilizados fueron: vimentina clon V9 (Dako), antígeno Ki-67 (Dako), p53 (Novocastra) y para las muestras de tejido mamario determinación del receptor de estrógenos (Novocastra).

Control de calidad de la información. Se revisó la información contenida en las solicitudes de biopsias, la que fue confirmada a través de la revisión de las fichas clínicas. A todas las muestras se les asignó un número identificador en una base de datos sin la identificación del paciente, para mantener el anonimato de las muestras almacenadas en el BT. A este registro se incorporó la siguiente información: diagnóstico clínico, diagnóstico anatomopatológico completo (diagnóstico histológico, grado de diferenciación histológica, nivel de infiltración, tamaño tumoral, presencia de metástasis, etc.).

Consentimiento informado. En todos los casos en que fue posible se solicitó el consentimiento informado a los pacientes o sus representantes legales, cuyos textos habían sido aprobados por

los respectivos Comités de Ética de las instituciones participantes (Servicio Salud Araucanía Sur y Clínicas Alemanas), destacándose que sólo se puede recolectar para el BT los excedentes de tejidos, posterior al establecimiento del diagnóstico histológico definitivo o sus exámenes complementarios.

Seguimiento de pacientes. Se realizó seguimiento de todos los pacientes a través de la revisión de las fichas clínicas, controles clínicos de los pacientes y a través del registro civil e identificación.

RESULTADOS

Resultados generales. Las características de los casos almacenados en el BT entre 2004 y 2007 se resumen en la Tabla 1. De un total de 1.239 casos, 79% correspondieron a tumores malignos, de los cuales, alrededor de 15% ya habían fallecido en este corto período de seguimiento. En 78% de los casos fue posible obtener muestras tanto del tumor como del tejido macroscópicamente no tumoral como control. En los casos restantes, las muestras estaban constituidas exclusivamente por tumor.

En la Figura 1 se resume la distribución de los distintos tejidos tumorales almacenados en el BT. Se destaca la mayor facilidad para obtener muestras del sistema genital femenino, en donde aproximadamente 26% de las muestras corresponden a tejido glandular mamario y, si a esto se le suma ovario, endometrio y cuello uterino, este porcentaje se eleva a 38% del total de las muestras del BT. En segunda frecuencia (22%), le siguen los tumores del tubo digestivo, los que a pesar de tener una mayor incidencia en nuestro medio, su obtención presenta un mayor grado de dificultad. Esta particular distribución de las muestras parece guardar relación con el empleo más difundido de la biopsia intraoperatoria en la resolución de la patología quirúrgica oncológica mamaria, ya que este tipo de muestras son enviadas de inmediato al Servicio de Anatomía Patológica, facilitando su obtención.

Control de calidad expresión inmunohistoquímica. Los tejidos procesados para control de calidad se resumen en la Tabla 2. Diecisiete casos eran de

tejido mamario, todos con el diagnóstico de carcinoma ductal infiltrante y los restantes correspondieron a una amplia variedad de tejidos como ganglio linfático, testículo, tiroides, pulmón, etc.

En todos los casos se realizaron cortes para estudio histológico convencional, así como cortes de congelación en criostato, con el objeto de demostrar la presencia de tejido tumoral en las muestras almacenadas previo a su procesamiento. En todos ellos se realizó estudio inmunohistoquímico para vimentina, resultando positiva en la totalidad de los casos (Figura 2). En 20 casos se determinó la expresión del antígeno de proliferación celular Ki67 y del gen supresor tumores p53, cuyos resultados fueron variables, dependiendo del tipo tumoral, siendo la mayor parte de ellos positivos. En 15 de los

Tabla 1 Características generales de casos almacenados en el Banco de Tumores (2004-2007)

	n	%
Total	1.239	100
Tumores malignos	979	79
Tumores benignos	979	79
Pacientes fallecidos	186	15



Figura 1. Distribución de muestras por tejido u órgano almacenado en el Banco de tumores (2004-2007).

Tabla 2. Resumen control calidad en el Banco de Tumores (2004-2007)

Nº	Tipo tejido	ARN	ADN	VIM	Inmunohistoquímica		
		Beta actina (838 pb)	Beta globina (986 pb)		Ki-67	p53	Rec-E2
1	Mama	+	+	+	(-)	(-)	+
2	Mama	+	+	+	+	+	+
3	Mama	+	+	+	+	+	+
4	Mama	+	+	+	+	(-)	(-)
5	Mama	+	+	+	+	+	+
6	Mama	+	+	+	+	+	+
7	Mama	+	+	+	+	+	+
8	Mama	+	+	+	+	+	+
9	Mama	+	+	+	+	(-)	+
10	Mama	+	+	+	+	+	+
11	Partes blandas	+	NR	+	+	(-)	NR
12	Ganglio	+	NR	+	+	+	NR
13	Testículo	+	NR	+	+	+	NR
14	Tiroides	+	NR	+	+	(-)	NR
15	Pulmón	+	NR	+	+	+	NR
16	Vejiga	+	NR	+	+	+	NR
17	Endometrio	+	NR	+	+	(-)	NR
18	Riñón	+	NR	+	+	(-)	NR
19	Ovario	+	NR	+	+	+	NR
20	Hueso	(-)	NR	+	+	+	NR
21	Mama	+	NR	+	NR	NR	+
22	Mama	+	NR	+	NR	NR	+
23	Mama	+	NR	+	NR	NR	(-)
24	Mama	+	NR	+	NR	NR	+
25	Mama	+	NR	+	NR	NR	+
26	Mama	+	NR	+	NR	NR	NR
27	Mama	+	NR	+	NR	NR	NR
28	Endometrio	+	NR	+	NR	NR	NR
29	Testículo	+	NR	+	NR	NR	NR
30	Tiroides	+	NR	+	NR	NR	NR

NR: no realizado

diecisiete cánceres de la mama, se realizó la determinación de receptores de estrógenos, resultando intensamente positivas en 13 de ellos.

Control de calidad ADN/ARN. En todos los casos se realizó extracción de ADN tanto del control como del tejido tumoral (Tabla 2). Inicialmente se realizó la amplificación del gen de la β -globina en 10 casos, observándose bandas de amplificación de productos tanto de 268 pb como 986 pb. En consideración a estos resultados se decidió continuar sólo con la extracción y amplificación de ARN, ya que las condiciones que se requieren para la obtención de ARN son de mayor exigencia. Para este propósito se realizó RT-PCR y posterior amplificación de un

fragmento del gen de la β -actina, observándose bandas intensas en la electroforesis en 29 de los 30 casos con amplicones de 540 pb y 838 pb (Figura 3). Sólo un caso resultó negativo, por lo cual se aumentó la cantidad de muestra en el proceso de extracción y cuya repetición fue positiva. Las diferencias observadas en las distintas concentraciones de ADN y ARN, guardó relación con los distintos tipos de tejidos. Así, los tejidos tumorales de carácter medular con abundantes células tumorales y escaso estroma aportan significativamente más que los tumores escirrosos en los que predomina el estroma. Como control de calidad también se utilizó la información obtenida de los casos que han sido utilizados en proyectos de investigación específicos

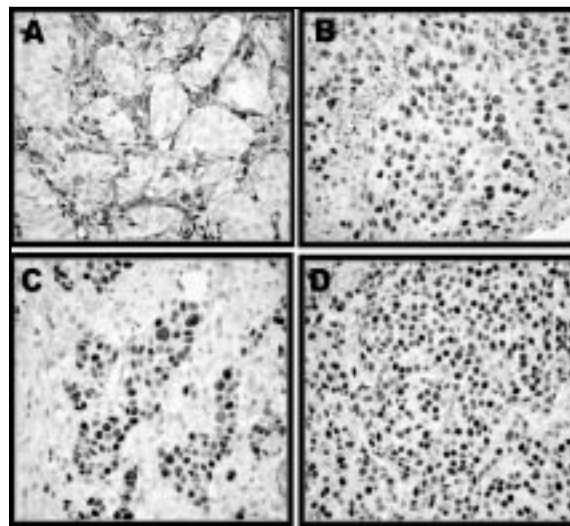


Figura 2. Expresión inmunohistoquímica positiva de A: Vimentina. B: Ki67. C: p53 y D: Receptores de estrógenos.

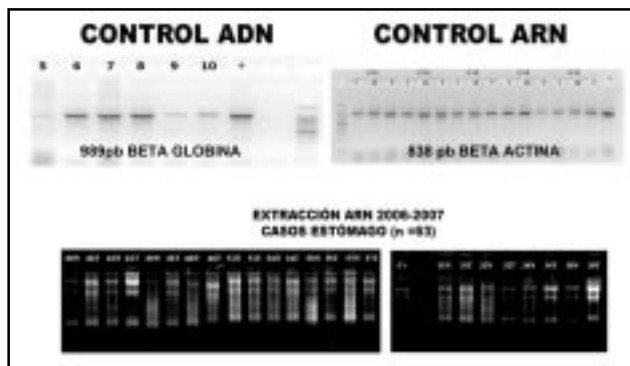


Figura 3. Amplificación β -globina (ADN) y de β -actina (RT-PCR) (ARN) en casos de control de calidad y de cánceres gástricos.

(cáncer gástrico n =63; cáncer de colon n =30), en los cuales se realizaron técnicas de extracción de ARN y en los que se obtuvo el producto requerido.

Entre los resultados del BT, también podemos mencionar la participación en proyectos de investigación, tesis de magister y doctorados, la creación de una página web (www.bancodetumores.cl) y el apoyo a la creación de otros BT como el BT del Hospital de San Felipe.

DISCUSIÓN

Se muestran los resultados obtenidos en el ejercicio del BT en un periodo inicial de tres años. Se debe destacar que la mayor dificultad observada guarda

relación con la estandarización de los procesos y, por sobre todo, la obtención del consentimiento informado. El tiempo que se requiere para contactar a los pacientes, informarlos y solicitar la donación de los tejidos remanentes de su biopsia, se puede transformar en una tarea a veces muy difícil de lograr.

Desde el punto de vista técnico, nuestros resultados muestran que es posible lograr el almacenamiento de una gran cantidad de tejidos tumorales y sus respectivos controles en periodos relativamente cortos de tiempo. Esto se basa casi exclusivamente en dos elementos que a nuestro juicio deben estar presentes desde el inicio del funcionamiento del BT y son: la participación y compromiso de los patólogos y la presencia de un tecnólogo médico dedicado a procesar las muestras en forma inmediata.

Uno de los puntos importantes guarda relación con la calidad de las muestras, por lo cual, el control de todas las etapas y procesos desde la obtención hasta su utilización final, permiten asegurarle al investigador que las muestras responderán a sus expectativas^{26,27}. Nuestros resultados muestran un alto grado de conservación estructural y funcional del ADN, ARN, así como de su inmunorreactividad. No logramos demostrar algún efecto deletéreo significativo relacionado con el tiempo de almacenamiento al comparar los resultados entre muestras obtenidas dos años atrás con las recientes. Prueba de ello son algunas publicaciones que nuestro grupo ha podido realizar utilizando este tipo de muestras, algunas almacenadas por prolongados períodos de tiempo en el BT²⁸⁻³³.

Las medidas que se dispongan para asegurar la calidad de las muestras nunca serán suficientes, por lo cual, la diversificación de los lugares de almacenamiento, así como la existencia de equipos alternativos de respaldo, pueden minimizar las pérdidas en caso de alguna anomalía.

Entre los objetivos del BT está prestar apoyo, colaborar o desarrollar estudios e investigaciones que se realicen tanto en la institución como en los centros asociados. Los resultados de las investigaciones como proyectos, presentaciones, publicaciones, etc., serán los mejores indicadores de calidad de la gestión del BT. Estas estrategias deben contemplarse desde el inicio y deben ser enfocadas a la difusión entre la comunidad científica de la existencia del BT,

de la cantidad y características del material almacenado, así como de las facilidades para su utilización. Como en nuestro país aún no existe una instancia coordinadora, Internet pudiese ser la mejor vía de comunicación y una muestra de ello es nuestra página web: www.bancodetumores.cl, creada recientemente. La segunda vía es algo más compleja y es la creación de una red de BT que pudiese asumir algunas funciones técnicas, administrativas y de coordinación^{27,34,35}, tal y como son una realidad en múltiples países como la Red de Banco de Tumores en España^{22,36}, el Tubafrost en Europa³⁶ y del Instituto Nacional del Cáncer en Estados Unidos de Norteamérica^{34,37}.

Aun cuando la metodología presentada no es innovadora ni pretende ser original, en nuestro país la experiencia en BT aún es muy escasa y no tenemos conocimiento de la existencia de otros BT con una estructura técnica y administrativa como la presentada. Nuestra experiencia demuestra la factibilidad técnica y económica de crear BT a nivel local en la mayoría de los Servicios de Anatomía Patológica, tanto en el sistema público como privado de salud, e insistimos en el rol del patólogo como el profesional mejor calificado para determinar la cantidad y calidad de muestra que puede ser entregada al BT^{4,38}.

De esta manera, podemos concluir que los BT en Chile pueden llegar a constituirse en una poderosa herramienta capaz de apoyar e incentivar la investigación básica y clínica.

REFERENCIAS

1. KLEIN G, REVESZ L, KLEIN E. Experiences with a frozen tumor bank. *Transplant Bull* 1957; 4: 31-3.
2. STEVENSON RE. Tumor cell and tissue banking. *Transplant Proc* 1976; 8 (2 Suppl 1): 229-31.
3. OOSTERHUIS JW, COEBERGH JW, VAN VEEN EB. Tumor banks: well-guarded treasures in the interest of patients. *Nat Rev Cancer* 2003; 3: 73-7.
4. JANIN A. [Cryopreserved tumor cell and tissue bank. An essential role for pathologists in cancer research (Recommendations ANAES)]. *Ann Pathol* 2000; 20 Suppl: S59-60.
5. GONZÁLEZ CASBAS JM, CALDERAY DOMÍNGUEZ M. [Requests for utilization of a semen bank among oncological patients. Semen cryopreservation prior to chemotherapy, radiotherapy and surgery]. *Arch Esp Urol* 2004; 57: 1017-20.
6. AGARWAL A, RANGANATHAN P, KATTAL N, PASQUALOTTO F, HALLAK J, KHAYAL S ET AL. Fertility after cancer: a prospective review of assisted reproductive outcome with banked semen specimens. *Fertil Steril* 2004; 81: 342-8.
7. LEE D, OUHIBI N, BATTAGLIA D. Cryopreservation of ovarian tissue: banking reproductive potential for the future. *Curr Womens Health Rep* 2001; 1: 152-6.
8. PEGG DE. The role of vitrification techniques of cryopreservation in reproductive medicine. *Hum Fertil (Camb)* 2005; 8: 231-9.
9. FAHY GM, WOVK B, WU J, PHAN J, RASCH C, CHANG A ET AL. Cryopreservation of organs by vitrification: perspectives and recent advances. *Cryobiology* 2004; 48: 157-78.
10. ROA JC, ROA I, CORREA P, VO Q, ARAYA JC, VILLASECA M ET AL. Microsatellite instability in preneoplastic and neoplastic lesions of the

- gallbladder. *J Gastroenterol* 2005; 40(1): 79-86.
11. JARA L, AMPUERO S, SANTIBANEZ E, SECCIA L, RODRIGUEZ J, LAY-SON MB ET AL. Molecular analysis of the eighteen most frequent mutations in the BRCA1 gene in 63 Chilean breast cancer families. *Biol Res* 2004; 37: 469-81.
 12. NABER SP, SMITH LL, JR., WOLFE HJ. Role of the frozen tissue bank in molecular pathology. *Diagn Mol Pathol* 1992; 1: 73-9.
 13. TSCHULIK A, ZATLOUKAL K. [The increasing importance of tumor and tissue banks in the light of genomic and proteomic research]. *Pathologie* 2001; 22: 310-5.
 14. YANAGISAWA K, SHYR Y, XU BJ, MASSION PP, LARSEN PH, WHITE BC ET AL. Proteomic patterns of tumour subsets in non-small-cell lung cancer. *Lancet* 2003; 362: 433-9.
 15. BUESA C, MAES T, SUBIRADA F, BARRACHINA M, FERRER I. DNA chip technology in brain banks: confronting a degrading world. *J Neuropathol Exp Neurol* 2004; 63: 1003-14.
 16. YANG J, XU G, ZHENG Y, KONG H, WANG C, ZHAO X ET AL. Strategy for metabonomics research based on high-performance liquid chromatography and liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *J CHROMATOGR A* 2005; 1084: 214-21.
 17. ODUNSI K, WOLLMAN RM, AMBROSONE CB, HUTSON A, McCANN SE, TAMMELA J ET AL. Detection of epithelial ovarian cancer using 1H-NMR-based metabonomics. *Int J Cancer* 2005; 113: 782-8.
 18. MORENTE MM, ALONSO S. Current challenges of human tumour banking. *Hematol Oncol* 2005; 23: 54-6.
 19. PERO RW, OLSSON A, BRYNGELSSON C, CARLSSON S, JANZON L, BERGLUND G ET AL. Quality control program for storage of biologically banked blood specimens in the Malmo Diet and Cancer Study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1998; 7: 803-8.
 20. PEGG DE. The current status of tissue cryopreservation. *Cryo Letters* 2001; 22: 105-14.
 21. BECICH MJ. The role of the pathologist as tissue refiner and data miner: the impact of functional genomics on the modern pathology laboratory and the critical roles of pathology informatics and bioinformatics. *Mol Diagn* 2000; 5: 287-99.
 22. MORENTE M. [Tumour banks network: the Spanish model]. *Med Sci (Paris)* 2006; 22 (Spec No 1): 32-4.
 23. STEINAU M, RAJEEVAN MS, UNGER ER. DNA and RNA references for qRT-PCR assays in exfoliated cervical cells. *J Mol Diagn* 2006; 8: 113-8.
 24. WATZINGER F, LION T. Multiplex PCR for quality control of template RNA/cDNA in RT-PCR assays. *Leukemia* 1998; 12: 1984-6; discussion 1987-93.
 25. LUPBERGER J, KREUZER KA, BASKAYNAK G, PETERS UR, LE COUTRE P, SCHMIDT CA. Quantitative analysis of beta-actin, beta-2-microglobulin and porphobilinogen deaminase mRNA and their comparison as control transcripts for RT-PCR. *Mol Cell Probes* 2002; 16: 25-30.
 26. FLORELL SR, COFFIN CM, HOLDEN JA, ZIMMERMANN JW, GERWELS JW, SUMMERS BK ET AL. Preservation of RNA for functional genomic studies: a multidisciplinary tumor bank protocol. *Mod Pathol* 2001; 14: 116-28.
 27. BARDSLEY JS, JR. Establishment of human tissue banks. *Hum Exp Toxicol* 1994; 13: 435-7.
 28. ROA JC, ANABALON L, ROA I, MELO A, ARAYA JC, TAPIA O ET AL. Promoter methylation profile in gallbladder cancer. *J Gastroenterol* 2006; 41: 269-75.
 29. ROA JC, ANABALON L, ROA I, TAPIA O, MELO A, VILLASECA M ET AL. [Promoter methylation profile in gastric cancer]. *Rev Méd Chile* 2005; 133: 874-80.
 30. MELO A, ROA I, MONTENEGRO S, CAPURRO I, ROA JC. [Detection of human papilloma virus in cytologic samples or biopsies of the cervix]. *Rev Méd Chile* 2005; 133: 639-44.
 31. ROA JC, ARETXABALA X, MELO A, FARIA G, ARAYA JC, VILLASECA MA ET AL. [Detection of bone marrow micrometastases in patients with gallbladder cancer]. *Rev Méd Chile* 2004; 132: 1489-98.
 32. ROA JC, ANABALON L, TAPIA O, MARTINEZ J, ARAYA JC, VILLASECA M ET AL. [Promoter methylation profile in breast cancer]. *Rev Méd Chile* 2004; 132: 1069-77.
 33. ARTIGAS CG, MELO A, ROA JC, PAEZ E, VITINI C, ARRIAGADA M ET AL. [Detection of BCR-ABL gene sequences using RT-PCR in patients with leukemia in the IX region. Chile]. *Rev Méd Chile* 2002; 130: 623-30.
 34. CLAUSEN KP, GRIZZLE WE, LIVOLSI V, NEWTON WA, JR., AAMODT R. Special communication. The Cooperative Human Tissue Network. *Cancer* 1989; 63: 1452-5.
 35. ORR S, ALEXANDRE E, CLARK BJ, GRAY N, HELIN H, RAVID R ET AL. Fourth meeting of the European Network of Research Tissue Banks - future strategy to increase collaborations in the supply of human tissue for biomedical research. In: *Cell Tissue Bank* 2005; 6: 131-8; 2005.
 36. 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.
 37. GRIZZLE WE, AAMODT R, CLAUSEN K, LIVOLSI V, PRETLOW TG, QUALMAN S. Providing human tissues for research: how to establish a program. *Arch Pathol Lab Med* 1998; 122: 1065-76.
 38. SASTRE-GARAU X. [Cryopreserved tumor bank in the Pathology laboratory]. *Ann Pathol* 1995; 15: 233-4.