



UNIVERSIDADE DOS AÇORES
Departamento de Biologia
Ponta Delgada

Mestrado em Ciências Biomédicas

Bruna da Conceição Correia Parreira

BIOBANCO “AZORBIO”: Organização de Recursos Biológicos para a Investigação

Volume I

Ponta Delgada

Outubro, 2012



UNIVERSIDADE DOS AÇORES
Departamento de Biologia
Ponta Delgada

Bruna da Conceição Correia Parreira

BIOBANCO “AZORBIO”: Organização de Recursos Biológicos para a Investigação

Volume I

Orientadores:

Doutor Jácome Bruges Armas

Prof^a. Doutora Maria Manuela Lima

Doutora Ana Rita Couto Rendeiro

*Dissertação apresentada à Universidade dos
Açores para a obtenção do grau de Mestre em
Ciências Biomédicas.*

Ponta Delgada

Outubro, 2012

Agradecimentos

Ao Doutor Jácome Bruges Armas, orientador desta tese e diretor do Serviço Especializado em Epidemiologia e Biologia Molecular, por todo o apoio e conhecimento que me transmitiu e por ter permitido a realização deste trabalho.

À Doutora Ana Rita Couto Rendeiro, orientadora desta tese, por toda a ajuda preciosa que me proporcionou e pela confiança que me transmitiu nos momentos de insegurança.

À Professora Doutora Maria Manuela Lima, orientadora desta tese, pela constante disposição em ajudar.

À Dr^a Mónica Seidi, ao Dr^o Raul, e a todos os profissionais de saúde envolvidos do Hospital de Santo Espírito da Ilha Terceira, pela seleção, convocação e consultas dos doentes.

À Lucrécia e ao Doutor João Monteiro, do gabinete de acreditação e qualidade do Hospital de Santo Espírito da Ilha Terceira, pela alteração de formato dos manuais de procedimentos.

A toda a equipa do SEEBMO que colaborou comigo, ao longo deste percurso, com as suas sugestões e opiniões. Em especial à Ana Rita Rendeiro, Isa Dutra, Marta Soares, Margarida Santos, Fabiana Rocha e Bruno Bettencourt por todas as revisões da tese e pelo incentivo nos momentos mais difíceis. Agradeço também à Raquel Meneses, Renato Sousa, Fernanda Moniz e Ana Fagundes pela ajuda inestimável na organização dos produtos biológicos.

A toda a minha família, em especial aos meus pais, pelo apoio incondicional no decorrer destes dois anos de tese. Um agradecimento muito especial ao meu irmão Luís Carlos e à minha cunhada Catarina Soledade por todo o apoio constante.

Por último, e em particular, ao meu marido Rui por todo o apoio e paciência nos momentos de insegurança.

Índice

RESUMO	6
ABSTRACT	7
LISTA DE ACRÓNIMOS	8
1. INTRODUÇÃO	11
1.1. Pertinência e objetivos da tese	11
1.2. Revisão da literatura	12
1.2.1. Biobanco e Biobanking de amostras biológicas humanas.....	12
1.2.2. Classificação e tipos de biobancos	12
1.2.3. Biobanking - redes internacionais	16
1.2.4. Boas práticas e diretivas de organização dos biobancos	17
1.3. Biobanking em Urologia	36
1.3.1. Litíase Urinária.....	37
2. MÉTODOS	40
2.1. Verificação das condições do AZORBIO.....	40
2.2. Consentimento informado	40
2.3. Folha informativa e questionário	41
2.4. Procedimentos Operacionais Padrão	41
2.5. Aferição dos procedimentos	41
3. RESULTADOS.....	42
3.1. Verificação das condições do AZORBIO.....	42
3.2. Consentimento informado	43
3.3. Folha informativa e questionário	43
3.4. Procedimentos Operacionais Padrão	44
3.4.1. Colheita, acondicionamento e transporte de amostras.....	44
3.4.2. Receção das amostras no SEEBMO- AZORBIO	45

3.4.3. Processamento e armazenamento das amostras no SEEBMO-AZORBIO	45
3.4.4. Controlo de qualidade das amostras.....	46
3.5. Aferição dos Procedimentos	47
3.5.1. Colheita, acondicionamento, transporte e receção das amostras	47
3.5.2. Processamento das amostras.....	47
3.5.3. Controlo de qualidade	48
3.5.3.1. Amostras de DNA	48
3.5.3.2. Amostras de RNA.....	49
3.5.4. Análise aos questionários.....	50
4. DISCUSSÃO	51
5. CONCLUSÕES.....	54
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55

RESUMO

Introdução: Os biobancos são essenciais em investigação, por possuírem coleções de amostras e dados armazenados de forma organizada. O biobanco Açores (AZORBIO) do Serviço Especializado de Epidemiologia e Biologia Molecular (SEEBMO) possui uma coleção de material biológico e dados associados de doentes açorianos com diversas patologias. A Litíase Urinária (LU) é uma entidade clínica de etiologia multifatorial, cujo desenvolvimento resulta de um processo complexo que envolve vários mecanismos fisiopatológicos.

Objetivo: Melhoria das condições de colheita, acondicionamento, transporte, receção, processamento e controlo de qualidade das amostras e dados destinados ao AZORBIO, através da aplicação de novos procedimentos padronizados.

Metodologia: Foi realizada uma revisão da literatura sobre normas e leis aplicáveis aos biobancos e foram verificadas as condições do AZORBIO. Foi elaborado um termo de consentimento informado e um questionário e foram estabelecidos procedimentos operacionais padrão para que todo o circuito de colheita, receção, processamento e armazenamento das amostras de LU seja uniformizado. Todos os procedimentos foram posteriormente aferidos com as primeiras amostras de LU recebidas no AZORBIO. As amostras de DNA e RNA foram submetidas a controlo de qualidade para verificar a concentração e pureza, integridade e funcionalidade.

Resultados e Conclusão: O AZORBIO apresenta as instalações e os equipamentos necessários para o seu funcionamento. A documentação produzida (consentimento informado, folha informativa, questionário e procedimentos operacionais padronizados) permitiu uniformizar todo o circuito para as amostras de LU. As amostras de DNA e RNA obtidas, através dos procedimentos realizados, apresentaram boa qualidade. Com este trabalho o AZORBIO, num futuro próximo, poderá garantir amostras e dados de qualidade de LU e conseqüentemente contribuir para o melhoramento dos cuidados de saúde e redução da morbilidade desta doença. Para além disso, os procedimentos aqui propostos poderão servir de base para outras patologias de interesse para o AZORBIO.

ABSTRACT

Introduction: The biobanks are essential in research, by having collections of samples and data stored in an organized manner. The biobank Azores (AZORBIO) of the Specialized Service of Epidemiology and Molecular Biology (SEEBMO) has a collection of biological material and associated data of Azorean patients with different pathologies. The pathology of interest, chosen for this thesis was the Urinary lithiasis (LU), a multifactorial clinical entity that results from several pathophysiologic mechanisms.

Objective: The application of new standardized procedures for collection, packaging, transportation, reception, processing, storage and quality control of the samples and data for the AZORBIO.

Methodology: Literature review of rules and laws applicable to biobanks. An informed consent form and a specific LU questionnaire were performed and standard operating procedures for the entire circuit were established. All procedures were subsequently assessed with the first ten samples received on AZORBIO. Nucleic acid samples were subjected to quality control to verify the concentration and purity, integrity and functionality.

Results and Conclusion: AZORBIO has the facilities and equipment necessary for its operation. The documentation produced (informed consent, informative document, questionnaire and standard operating procedures) contributed for the standardization of the entire circuit for samples of LU. Although the overall circuit assessment showed good quality results, minor changes were suggested to improve the final outcome. With this work the AZORBIO in the near future, will ensure good LU quality samples and data contributing to the improvement of health care and reduce morbidity of this disease. In addition, the procedures proposed here can be adapted to other pathologies of interest to AZORBIO.

LISTA DE ACRÓNIMOS

ABN: *Australasian Biospecimen Network* (Rede Australiana de Bioespécimes)

ADR: *The European Agreement concerning the International Carriage of Dangerous Goods by Road*
(Acordo Europeu relativo ao Transporte Internacional de Mercadorias Perigosas por Estrada)

AZORBIO: *Azores Biobank* (Biobanco Açores)

BBMRI: *Biobanking and BioMolecular Resources Research Infrastructure* (Infra-Estrutura de Investigação de Recursos Biomoleculares e de Bancos de Recursos Biológicos)

BIMS: *Biological Information Management System* (Sistema de gestão de informação biológica)

CLIA: *Clinical Laboratory Improvement Amendment* (Melhoria e Alteração dos Laboratórios Clínicos)

CNPD: Comissão Nacional de Protecção de Dados

DNA: *Deoxyribonucleic acid* (Ácido desoxirribonucleico)

EtBr: Brometo de Etídeo

FDA: *Food and Drug Administration* (Administração de Alimentos e Medicamentos)

GENECURE: *GENomic stratEgies for treatment and prevention of Cardiovascular death in Uraemia and end-stage RENal disease.*

GraPH-Int: *The Genome-based Research and Population Health International Network* (Investigação baseada no Genoma e Rede Internacional de Saúde Pública)

GRC: *Genomic Resource Center* (Centro de Recursos Genómicos)

HSEIT: Hospital de Santo Espírito da Ilha Terceira

HuGE-Net: *Human Genome Epidemiology Network* (Rede de Epidemiologia do Genoma Humano)

IARC: *International Agency for Research on Cancer* (Agência Internacional de Investigação de Cancro)

IATA: *International Air Transport Association* (Organização Internacional de Transporte Aéreo)

ICAO: *International Civil Aviation Organization* (Organização Internacional de Aviação Civil)

ICD: *International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems* (Classificação Estatística de Doenças e Problemas de Saúde Relacionados)

ICH: *International Conference on Harmonization of Technical Requirements* (Conferência Internacional de Harmonização de Requisitos Técnicos)

IMTT: Instituto da Mobilidade e dos Transportes Terrestres

ISBER: *International Society for Biological and Environmental Repositories* (Sociedade Internacional para Repositórios Biológicos e Ambientais)

ISO: *International Organization for Standardization* (Organização Internacional de Estandarização)

LIMS: *Laboratory Information Management Systems* (Sistemas de Gestão da Informação laboratorial)

LU: Litíase Urinária

MRC: *Medical Research Council* (Conselho de Investigação Médica)

MRPB: *Manchester Renal Patient BioBank*

NCI: *National Cancer Institute* (Instituto Nacional de Câncer)

OECD: *Organisation for Economic Cooperation and Development* (Organização para a Economia, Cooperação e Desenvolvimento)

OMS: Organização Mundial de Saúde

P³G: *Public Population Project in Genomics* (Rede Internacional para Estudos de Genómica Populacional)

PCR: *Polymerase Chain Reaction* (Reação em Cadeia da Polimerase)

PHG: *Public Health Genetics/Genomics* (Genética e Genómica de Saúde Pública)

POPs: Procedimentos Operacionais Padrão

ReGeNet: *REnal GENome NETwork*

RIN: *RNA Integrity Number* (Número de integridade do RNA)

RNA: *Ribonucleic acid* (Ácido Ribonucleico)

SEEBMO: Serviço Especializado de Epidemiologia e Biologia Molecular

UNCETDG: *Recommendations made by the Committee of Experts on the Transport of Dangerous Goods* (Recomendações para o transporte de mercadorias perigosas)

UNECE: *United Nations Economic Commission for Europe* (Comissão Económica das Nações Unidas para a Europa)

UPS: *Uninterruptible Power Supplies* (Fornecimento de Energia Interrupta)

1. INTRODUÇÃO

1. 1.Pertinência e objetivos da tese

A colaboração entre o SEEBMO e o serviço de Urologia do Hospital de Santo Espírito da Ilha Terceira (HSEIT), com o objetivo de estudar de forma aprofundada a patologia LU, foi a base para a realização desta tese. Pretendeu-se, através da aplicação das normas padronizadas, contribuir para a qualidade do funcionamento do AZORBIO. A compilação de material de investigação de qualidade desta patologia poderá vir a ser uma ferramenta de elevado valor para estudos de investigação. Assim, este trabalho permite que o AZORBIO contribua, num futuro próximo, para a melhoria dos cuidados de saúde e para a redução de morbilidade da LU. Desta forma os objetivos específicos deste trabalho consistiram em:

1. Elaborar, propor e implementar um modelo de consentimento informado para a LU;
2. Elaborar, propor e implementar um questionário que contenha informação pertinente para estudos da LU;
3. Aferir as condições de instalação e funcionamento do AZORBIO, através da verificação do cumprimento das normas;
4. Contribuir para a organização do material biológico no AZORBIO e introdução dos dados num programa (*LIMS-Laboratory Information Management Systems*);
5. Aferição de todos os procedimentos implementados.

1.2. Revisão da literatura

1.2.1. Biobanco e *Biobanking* de amostras biológicas humanas

Um banco de produtos biológicos ou biobanco consiste em “qualquer repositório de amostras biológicas ou seus derivados, com ou sem tempo delimitado de armazenamento, quer utilize colheita prospectiva ou material previamente colhido, quer tenha sido obtido como componente da prestação de cuidados de saúde de rotina, quer em programas de rastreio, quer para investigação, e que inclua amostras que sejam identificadas, identificáveis, anonimizáveis ou anónimas.” (Lei nº 12/2005, artº 19º, nº1) [1]. O processo de congregação de amostras biológicas humanas (sangue, tecidos e fluidos corporais e seus derivados) em biobancos é designado por *Biobanking*. Atualmente, a prática é muito comum e contribui extraordinariamente para a compreensão e tratamento de numerosas doenças. De acordo com Shankar e Uday (2011), [2] a prática compreende quatro etapas principais. A primeira etapa compreende a colheita das amostras; estas podem ser obtidas durante procedimentos terapêuticos ou de diagnóstico ou serem colhidas para projetos de investigação específicos. A segunda etapa corresponde à preservação das amostras; as amostras são processadas e preservadas por fixação, congelamento ou podem referir-se a células vivas. A terceira etapa refere-se à etiquetagem, também conhecida por anotações; esta etapa permite a ligação aos dados associados ao doente, como tratamentos, prognóstico e informações sobre as amostras. Por último, a quarta etapa inclui a avaliação das amostras para investigação; as amostras são disponibilizadas aos investigadores num processo sistemático.

1.2.2. Classificação e tipos de biobancos

Os biobancos podem variar significativamente em dimensão, podem estar inseridos em instituições médicas e comportar simplesmente uma modesta quantidade de amostras, pertencer a laboratórios de investigação; em alguns países são de larga escala, sendo designados por biobancos nacionais [3].

Os biobancos podem também diferir em relação ao objetivo para o qual foi obtido o material biológico. Podem ter propósitos clínicos (transplantes, transfusões de sangue, diagnósticos genéticos), de investigação (estudos de farmacogenética, investigação de doenças neurodegenerativas) ou judiciais [4].

Existem vários tipos de biobancos cujas classificações variam consoante os autores. Por exemplo, de acordo com Riegman et al (2008), [5] os biobancos podem ser de três tipos: 1) biobancos populacionais; 2) biobanco de doenças específicas para estudos epidemiológicos e 3) biobancos de doenças específicas (banco de tumores). Por sua vez, Harris e seus colaboradores (2012) [6] classificam os biobancos de acordo com a sua finalidade. Segundo a tipologia dos autores, os biobancos podem incluir: 1) amostras residuais colhidas durante intervenções de cuidados de saúde, com finalidades terapêuticas e ou de diagnóstico, incluindo neste grupo as colheitas de amostras de tumores; 2) amostras colhidas durante ensaios clínicos; 3) amostras colhidas para projetos de investigação específicos; e 4) amostras colhidas para biobancos populacionais. Por outro lado, Zielhuis (2012) [7], simplificando a tipologia, refere a existência de apenas dois tipos: os populacionais e os clínicos.

Os biobancos populacionais comportam um elevado número de amostras de DNA (*Deoxyribonucleic acid*) de dadores saudáveis, os quais são representativos de um determinado país, região ou coorte étnica [5]. Geralmente, não possuem base hospitalar e possuem como principal objetivo a deteção de biomarcadores de suscetibilidade para a população em causa. Permitem verificar a evolução das alterações genéticas nas gerações subsequentes, facilitando assim um melhoramento na compreensão dos mecanismos patogénicos, que levam ao desenvolvimento de doenças causadas por fatores hereditários ou pela interação de fatores genéticos e ambientais [8]. Na Europa, os biobancos populacionais têm sofrido um desenvolvimento rápido desde a sequenciação do genoma humano.

Gradualmente fazem parte do sistema de saúde, não só criando novas oportunidades de investigação, como também a oportunidade de implementação de medidas efetivas de preservar a saúde na população europeia [9]. Calcula-se que no fim do ano de 2007, havia 125 biobancos populacionais em todo o mundo, maioritariamente na Europa e no Norte da América, mas também na Ásia [4]. O biobanco UK, o banco Nacional de ADN e o GenBank são exemplos de biobancos populacionais [4].

O Biobanco UK (www.ukbiobank.ac.uk), estabelecido no final dos anos 90, têm como objetivo conduzir a investigação de novos métodos de prevenção, diagnóstico e tratamento tanto das doenças genéticas, como das associadas aos estilos de vida. Está associado a seis centros de investigação e a 22 Universidades Britânicas [4, 10]. O Banco Nacional de ADN (<http://www.bancoadn.org/en/home.htm>), estabelecido em 2004 pela Fundação Genoma Espanha em colaboração com a Universidade de Salamanca, tem como finalidade apoiar a investigação na diversidade genética da população espanhola, e no desenvolvimento de novos tratamentos para doenças relacionadas com estilos de vida, incluindo a investigação farmacogenética. Foi constituída em 2006, uma rede de centros especializados e redes de investigação em doenças cardiovasculares (Barcelona), metabólicas (Barcelona), neurofisiátricas (Reus) e oncológicas (Salamanca). Estes centros colaboram com outros centros nacionais que conduzem investigação no mesmo ramo [4]. Por último, o biobanco GenBank (<http://www.geenivaramu.ee/en/>), foi criado através do projeto Genoma Estónia, com o objetivo de reunir amostras de aproximadamente um milhão de habitantes da Estónia e da Letónia [4].

Os biobancos de doenças específicas para estudos epidemiológicos têm a sua atividade focada nos biomarcadores de exposição. Utilizam um elevado número de amostras e normalmente seguem um coorte de casos e de expostos saudáveis para estudos com DNA da linha germinal, biomarcadores do

soro e dados específicos da doença [5]. Por outro lado, os biobancos de doenças específicas, normalmente com base hospitalar, possuem como alvo os biomarcadores da doença através da utilização de colheitas prospetivas e retrospectivas de amostras e seus derivados (DNA; RNA-*Ribonucleic acid* e proteínas), normalmente associadas a dados clínicos. As amostras e os dados, habitualmente, não são obtidos para um projeto de investigação concreto, mas sim resultam de procedimentos e de registos clínicos de cuidados médicos [5]. Da mesma forma, os biobancos clínicos, também focados em patologias específicas, permitem estudos de caso-controlo eficientes (investigação da interação genes-ambiente), assim como estudos de prognóstico (investigação das interações genes-tratamento) [7]. Um exemplo é o biobanco clínico da Holanda que reúne oito hospitais Universitários para a criação de uma infra-estrutura de investigação nacional para epidemiologia clínica. Esta iniciativa (“String of Pearls”) foi inicialmente centrada nos seguintes grupos de doenças: doenças neurodegenerativas; leucemia, artrite reumatoide, cancro intestinal hereditário, diabetes mellitus, insuficiência renal, acidente vascular cerebral e doença inflamatória do intestino [7]. Em Portugal, o biobanco do Instituto de Medicina Molecular da Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa aprovado em 2008 pela Comissão de Ética do Centro Hospitalar Lisboa Norte- Hospital de Santa Maria, serve de suporte para estudos de investigação molecular, clínica e epidemiológica em doenças que afetam as populações, como as doenças neurodegenerativas, oncológicas e reumáticas. É constituído por uma ampla coleção de amostras biológicas humanas criopreservadas (sangue, soro, urina, líquido cefalo-raquidiano, líquido sinovial, DNA, RNA e tecidos) ou fixadas (tecidos) e respetiva informação clínica. Nos Açores, nomeadamente na ilha Terceira, o SEEBMO do HSEIT recebe material biológico de diferentes grupos de doentes, desde 1998. O biobanco clínico deste serviço, designado de AZORBIO, possui uma coleção de material biológico e dados associados de diversos grupos de doentes. O objetivo principal do biobanco é armazenar material biológico para investigação no caso de obtenção de consentimento favorável por parte dos doentes.

1.2.3. *Biobanking* - redes internacionais

Com o objetivo de melhorar a investigação médica e biológica e para superar a fragmentação dos biobancos na Europa foi criada, em 2008, uma Infra-estrutura de Investigação de Recursos Biomoleculares e de Bancos de Recursos Biológicos (BBMRI) (<http://www.bbmri.eu>), que possui como principal objetivo a conexão dos biobancos existentes nos diferentes países da União Europeia numa só rede de investigação. A rede poderá ser a base de uma investigação integrada, levando assim a um melhor conhecimento dos fatores que afetam as diferenças na saúde nos países europeus, e também uma medida mais razoável visando melhorar a saúde da população europeia [4]. Os biobancos, associados à infra-estrutura, devem monitorizar os últimos desenvolvimentos a favor da harmonização, aderir a procedimentos padronizados internacionais e controlo de qualidade, fazendo os possíveis para que as redes entrem em contacto [5]. As coleções de dados estão disponíveis *online* e descrevem a maioria dos biobancos da Europa. A infra-estrutura integra uma elevada variedade de doenças, cujas classificações são baseadas na classificação de doenças e problemas de saúde relacionados (*ICD10-International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems*) (<http://apps.who.int/classifications/apps/icd/icd10online/>) [5]. De acordo com Wichmann (2011) [11], o catálogo possui dados de cerca de 261 biobancos localizados em 23 países diferentes, com um total de 16 milhões de amostras. O biobanco do SEEBMO, AZORBIO, está associado à BBMRI desde 2009, tendo sido o primeiro biobanco Português a estar ligado a esta infra-estrutura. Atualmente, já existem três organizações em Portugal associadas ao BBMRI: o SEEBMO, com DNA de sangue periférico, o laboratório de glicobiologia do Instituto de Tecnologia Química e Biológica, com plasma e fluido cérebro-espinal, e o banco de tumores do Hospital de São João do Porto.

Para além do BBMRI existem outras iniciativas internacionais na Fundação de Genética e Genómica de Saúde Pública (PHG), que promovem a tradução da ciência baseada no genoma em melhorias na

saúde populacional: Rede de Epidemiologia do Genoma Humano (HuGE-Net) (www.cdc.gov/genomics/); Rede Internacional para Estudos de Genómica Populacional (P³G) (<http://www.p3g.org/>); Investigação baseada no Genoma e Rede Internacional de Saúde Pública (GraPH-Int) e Centro de Recursos Genómicos (GRC) (<http://www.who.int/genomics/en/>) desenvolvida pela Organização Mundial de Saúde (OMS). O P³G possui uma série de material de referência *online* (o “Observatory”) com informações científicas e diretivas de *Biobanking* destinadas a facilitar o desenvolvimento, realização e harmonização de projetos de investigação. Inclui uma série de catálogos de biobancos populacionais em todo o mundo e permite uma rápida visualização sobre as semelhanças e diferenças entre eles [12].

1.2.4. Boas práticas e diretivas de organização dos biobancos

Os biobancos devem adotar e implementar boas práticas, incluindo políticas e procedimentos operacionais padronizados [13]. Os aspetos mais importantes a considerar quando se pretende estabelecer um biobanco estão descritos em diretivas e manuais de boas práticas elaboradas pelas mais variadas organizações (tabela 1). A Organização para a Economia, Cooperação e Desenvolvimento (OECD), com 34 países membros (incluindo Portugal) foi introduzida em 2001 e descreve diretivas aplicáveis a todos os tipos de biobanco [5]. A Sociedade Internacional para Repositórios Biológicos e Ambientais (ISBER) para além de descrever diretivas de todos os aspetos que permitam instalações apropriadas e favoreçam a harmonização possui também vários métodos que podem ser escolhidos de acordo com os objetivos do biobanco [14]. As Boas Práticas de Gestão de Recursos Biológicos do Instituto Nacional de Cancro (NCI) e a Agência Internacional de Investigação de Cancro (IARC) por sua vez estão mais focadas para o cancro [15].

Tabela 1. Diretivas, procedimentos e recomendações aplicáveis aos biobancos (BBMRI, Julho 2012).

Diretivas, procedimentos e recomendações aplicáveis aos biobancos
<p>Nome: <i>Tissue banking for Biomedical Research</i> (Biobanco de tecidos para investigação biomédica) Organização: <i>National Cancer Center</i> (Centro de investigação do Cancro) Site: http://www.bioethics-singapore.org/uploadfile/52533%20PMHT%20AppendixB-Dr%20Kon.pdf</p>
<p>Nome: <i>Biorepository Protocols</i> (Protocolos dos Biorepositórios) Organização: <i>Australian Biospecimen Network (ABN)</i> (Rede Australiana de produtos biológicos) Site: http://www.abrn.net/pdf/ABN_SOPs_Review_Mar07_final.pdf</p>
<p>Nome: <i>Biological resource centres: underpinning the future of life sciences and biotechnology</i> (Centros de recursos biológicos que sustentam o futuro das ciências da vida e da biotecnologia) Organização: <i>Organisation for Economic Cooperation and Development (OECD)</i> (Organização para a Economia, Cooperação e Desenvolvimento) Site: http://www.oecd.org/dataoecd/55/48/2487422.pdf</p>
<p>Nome: <i>OECD best practice guidelines for biological resource centres</i> (Diretivas de boas práticas OECD para centros de recursos biológicos) Organização: <i>Organisation for Economic Cooperation and Development (OECD)</i> (Organização para a Economia, Cooperação e Desenvolvimento) Site: http://www.oecd.org/dataoecd/7/13/38777417.pdf</p>
<p>Nome: <i>European Human Frozen Tumor Tissue Bank TUBAFROST</i> (Biobanco Europeu TUBAFROST de tecidos tumorais humanos congelados) Organização: <i>The European Human Tumour Frozen Tissue Bank (TUBAFROST)</i> (Biobanco Europeu de tecidos tumorais humanos congelados) Site: http://www.tubafrost.org/</p>
<p>Nome: <i>Common Minimal Standards for Biological Resource Centers</i> (Normas mínimas comuns para os Centros de Recursos Biológicos) Organização: <i>International Agency for Research on Cancer (IARC), World Health Organisation</i> Site: http://www.iarc.fr/en/publications/pdfs-online/wrk/wrk2/standardsBRC-1.pdf</p>
<p>Nome: <i>Human tissue and biological samples for use in research</i> (Amostras biológicas e tecidos humanos para uso em investigação) Organização: <i>Medical Research Council (MRC)</i> (Conselho de Investigação Médica) Site: http://www.pre.ethics.gc.ca/francais/pdf/links/HumanTissueandBiologicalSamplesforuseinResearch.pdf</p>
<p>Nome: <i>Best Practices for Repositories: Collection, Storage, and Retrieval of Human Biological Materials for Research</i> (Boas práticas para repositórios: Colheita, armazenamento, e recuperação de materiais biológicos humanos para investigação) Organização: <i>International Society for Biological and Environmental Repositories (ISBER)</i> (Sociedade Internacional de repositórios biológicos e ambientais) Site: http://www.redbiobancos.es/Pages%5CDocs%5CISBER_BEST_PRACTICES_2012.pdf</p>
<p>Nome: <i>NCI Best Practices for Biospecimen Resources</i> (Boas práticas de gestão dos produtos biológicos) Organização: <i>National Cancer Institute (NCI)</i> (Instituto Nacional do Cancro) Site: http://biospecimens.cancer.gov/bestpractices/2011-NCIBestPractices.pdf</p>
<p>Nome: <i>A Cold Greeting: an Introduction to Cryobiology</i> (Introdução à Criobiologia) Organização: <i>Biotech</i></p>
<p>Nome: <i>Specimen Collection, Preparation, and Handling</i> (Colheita, preparação e manuseamento das amostras) Organização: <i>Labcorp</i> Site: https://www.labcorp.com/wps/portal/provider/testmenu/</p>

1.2.4.1. Aspectos ético-legais

Os biobancos, por conterem amostras e dados de humanos, levantam uma série de questões éticas na sociedade atual. Nos últimos anos, os biobancos têm aumentado em número e complexidade, levando ao aparecimento de novas questões. Os temas éticos associados aos biobancos, devido à evolução constante da ciência e tecnologia, exigem uma avaliação constante [16].

Cada País define as regras éticas que entende serem necessárias para proteger os seus cidadãos. Atualmente, são vários os países Europeus (Noruega, Portugal, Irlanda, Grécia e Hungria) que não possuem regulamentos específicos que abordem todas as questões e procedimentos de investigação genética em biobancos de DNA [3]. Em Portugal, a lei que regula a retenção de produtos biológicos e os princípios éticos a respeitar foi publicada em Janeiro de 2005 (Lei nº12/2005) [1]. Não havendo, em alguns casos, um quadro jurídico adequado e específico para os biobancos, estas questões são por vezes simplesmente abordadas e debatidas mas não regulamentadas [16].

1.2.4.1.1. Consentimento informado

O consentimento informado corresponde ao tema mais debatido na ética dos biobancos. O mesmo é necessário para participar em estudos, para incorporar amostras e dados no biobanco e para posterior utilização em investigação [17]. Segundo as boas práticas da ISBER (L2.200) [14], um consentimento informado para a colheita, retenção e uso de material biológico e dados associados é um processo que fornece aos dadores informação suficiente para permitir que estes façam uma escolha devidamente informada sobre a doação de material biológico e dados ao biobanco e, se aplicável, do uso desse material em investigações futuras. De acordo com este pressuposto, nenhuma pessoa deve participar, nem ser exposta a qualquer risco relacionado com investigação, sem o seu consentimento prévio e sem informação completa sobre o propósito da doação e os possíveis riscos e benefícios a ela associados [16]. No sistema jurídico Português a obrigação do

consentimento assenta no direito à integridade física e moral de cada indivíduo. Este direito está reconhecido no artº 25º da Constituição da República (Direito à Integridade Pessoal), e no artº 70º do Código Civil (Tutela Geral da Personalidade), no que diz respeito a ofensas à personalidade física e moral [18].

Atualmente não existe consenso sobre o tipo de consentimento ideal para ser utilizado em *Biobanking*. Alguns autores defendem a existência de uma forma de consentimento universal único [19, 20], de forma a ser mais prático e comparável em possíveis colaborações entre biobancos. Outros discordam e justificam que as diferenças geográficas, sociais e religiosas devem ser respeitadas, não sendo possível com este tipo de consentimento [21, 22].

De acordo com a documentação internacional ético-legal, existem vários tipos de consentimentos que podem ser utilizados na prática dos biobancos [19] (tabela 2).

Tabela 2. Modelos de consentimento informado, para investigação de amostras de biobancos, e respetiva definição. (Adaptado de Salvaterra, 2008).

Consentimento	Definição
Amplo	Permite o uso das amostras e dados, em qualquer tipo de investigação atual e futura.
Restrito	Permite o uso das amostras e dados, para um tipo específico de investigação atual e futura.
Específico	Permite o uso das amostras biológicas e dados na investigação para o qual o consentimento foi solicitado, proibindo estudos futuros não previstos no momento do consentimento original.

No caso do consentimento amplo, ao contrário do específico, há a vantagem de não ser necessário entrar novamente em contacto com os participantes, levando a que não cause perda de tempo, dinheiro e possível ansiedade às pessoas [23, 24]. Muitos autores concordam que o consentimento amplo é o mais adequado quando não se sabem os detalhes sobre a investigação para a qual as

amostras serão utilizadas. Porém, os mesmos autores indicam que quando se utiliza um consentimento amplo, as seguintes condições devem ser respeitadas: a investigação deve ser de grande interesse; deve ser garantido o máximo de proteção da privacidade dos dadores; os participantes devem ter a liberdade de revogar o consentimento a qualquer altura; e toda a investigação futura deve ser, previamente, aprovada por uma Comissão de Ética [25-32]. Vários países como na Alemanha, Islândia, Reino Unido, Suíça, Estónia, Japão e Letónia defendem a utilização de um modelo de consentimento amplo [33]. No entanto, na Itália, França e Suíça exigem explicitamente um consentimento informado específico. Em outros países, para a obtenção do consentimento, existe alguma flexibilidade legislativa, ditada pela ausência de normas formais impostas por lei. Países, como a Dinamarca, Holanda, Espanha e Noruega exigem um consentimento que seja informado e expresso, não clarificando ao certo o modelo de consentimento que deve ser utilizado para os biobancos. [34]. O mesmo acontece em Portugal, onde é necessário um consentimento informado escrito para obter e utilizar material biológico para um biobanco sem, no entanto, clarificar o modelo que deve ser empregue nesta prática. O termo de consentimento, de acordo com a lei Portuguesa, deve incluir informação sobre as finalidades do biobanco, o seu responsável, os tipos de investigação a desenvolver, os seus riscos e benefícios potenciais, as condições e a duração do armazenamento, as medidas que serão tomadas para garantir a privacidade e confidencialidade dos participantes e a previsão quanto à possibilidade de comunicação ou não dos resultados obtidos com esse material. O participante, familiares ou representante legal, em caso de morte ou incapacidade deste, têm o direito a retirar o consentimento, quanto ao armazenamento de material biológico, devendo, neste caso, as amostras e derivados serem definitivamente destruídos [1].

1.2.4.1.2. Privacidade e confidencialidade

O maior risco associado aos biobancos é a perda de privacidade dos dadores, sendo por isso a proteção da identidade um dos assuntos éticos mais fundamentais [25]. Na realidade os biobancos normalmente armazenam informação genética com ligação a um fenótipo particular. A ligação entre estes dois tipos de informação (informação genética e fenotípica), representa a maior ameaça à privacidade dos participantes [35, 36].

Uma das maiores preocupações dos participantes é que companhias de seguros e empregadores possam ter acesso a informações sobre a sua predisposição genética para determinadas doenças. Por essa e outras razões, os biobancos devem garantir proteção adequada dos dados [16]. Dados pessoais, de acordo com a Lei da Proteção de Dados Pessoais de 26 de Outubro (Lei nº 67/98) [37], correspondem a “qualquer informação, de qualquer natureza relativa a uma pessoa singular identificada ou identificável (titular dos dados), sendo considerada identificável a pessoa que possa ser identificada direta ou indiretamente, designadamente por referência a um número de identificação ou a um ou mais elementos específicos da sua identidade física, fisiológica, psíquica, económica, cultural ou social”. Já o termo “base de dados genética”, de acordo com a Lei nº12/2005 [1], corresponde a “qualquer registo, informatizado ou não, que contenha informação genética sobre um conjunto de pessoas ou famílias”. De acordo com a mesma lei, “as regras de criação, manutenção, gestão e segurança das bases de dados genéticas para prestação de cuidados de saúde e relativas à investigação em saúde são regulamentadas nos termos da legislação que regula a proteção de dados pessoais”. De acordo com a Lei nº 67/98 [37], a Comissão Nacional de Proteção de Dados (CNPd), entidade administrativa independente que funciona junto da Assembleia da República, é a “autoridade nacional que tem como atribuição controlar e fiscalizar o cumprimento das disposições legais e regulamentares em matéria de proteção de dados pessoais, em rigoroso respeito pelos direitos do homem e pelas liberdades e garantias consagradas na Constituição”. A

CNPD funciona desde 7 de Janeiro de 1994, sendo uma das mais antigas autoridades de proteção de dados da União Europeia.

A maior questão ética associada à harmonização dos biobancos é a proteção da privacidade dos participantes [25]. Em Portugal, a lei nº12/2005, de 26 de Janeiro [1], define que a transferência de material biológico para outras entidades nacionais ou estrangeiras deve sempre respeitar o propósito da criação do biobanco para o qual foi obtido o consentimento informado e ser aprovada pela Comissão de Ética responsável.

A forma de identificação das amostras com destino à investigação é um tema que permanece muito ambíguo. De acordo com a Conferência Internacional de Harmonização de Requisitos Técnicos (ICH), que reúne as autoridades reguladoras da Europa, Japão e USA [38], a identificação das amostras pode ser de quatro categorias:

1) *“Identified”* ou identificadas: as amostras e os dados estão identificados com informação pessoal do participante, como por exemplo o nome ou números de identificação (bilhete de identidade; segurança social; número de utente), sendo assim possível, através das amostras e dos dados, identificar o participante. O uso desta categoria permite ao participante monitorização e acompanhamento clínico, a possibilidade de retirar as suas amostras do biobanco e, se aplicável, a oportunidade de receber os resultados da investigação [13, 38].

2) *“Coded”* ou codificadas: são amostras e dados que não estão marcadas com nenhum tipo de informação pessoal do participante, mas sim com um ou mais códigos [13, 38].

a) *“Single-coded”* ou código único: As amostras e os dados estão marcados com um código único. Neste caso, só é possível identificar o participante através do código e com o acesso à informação

pessoal do participante. Normalmente o investigador clínico é o responsável pela ligação do código aos dados pessoais. Como o participante pode ser identificado, permite-lhe a monitorização e acompanhamento clínico, a possibilidade de retirar as suas amostras e dados do biobanco e, se aplicável, a oportunidade de receber os resultados da investigação [13, 38].

b) *“Double-coded”* ou código duplo: As amostras e os dados, inicialmente estão marcados com um primeiro código, e posteriormente são remarcados com um segundo código. Neste caso só é possível identificar o participante através dos dois códigos e com o acesso à informação pessoal deste. Neste caso, o investigador clínico é responsável pela ligação do primeiro código aos dados pessoais não tendo, normalmente, acesso à ligação com o segundo código. Sendo, contudo possível identificar os participantes é-lhes permitido a monitorização e acompanhamento clínico, a possibilidade de retirar as suas amostras do biobanco e, se aplicável, a oportunidade de vir a receber os resultados da investigação [13, 38].

3) *“Anonymized”* ou anonimizadas: as amostras e os dados estão inicialmente codificados por um ou mais códigos. Posteriormente as ligações existentes, que levam à identificação do participante, são totalmente eliminadas. Neste caso, já não é possível identificar o participante, e por isso torna-se impossível que estes retirem as suas amostras e dados do biobanco, que venham a ter conhecimento dos resultados de investigação e que tenham acompanhamento e monitorização clínica [13, 38].

4) *“Anonymous”* ou anónimas: são amostras e dados que nunca tiveram qualquer tipo de identificação pessoal do participante. Como as amostras e dados anónimos não permitem de forma alguma identificar os participantes, torna-se impossível que estes retirem as suas amostras e dados do biobanco, que venham a ter conhecimento dos resultados de investigação e que tenham acompanhamento e monitorização clínica [13, 38].

Como verificado anteriormente, o uso de amostras anónimas ou anonimizadas parece ser a melhor forma de proteção de privacidade dos participantes. No entanto, causa sérias limitações na investigação, especialmente em estudos epidemiológicos longitudinais [16]. Muitos autores recusam a anonimização completa e utilizam a codificação como forma de assegurar a privacidade dos participantes. Atualmente é acordado pela maioria dos autores de que a codificação simples, dupla, ou mesmo tripla, seja a escolhida por ser considerada segura o suficiente para assegurar aos participantes um nível satisfatório de privacidade [16, 23, 26, 39].

Em Portugal, a lei nº12/2005 de 26 de Janeiro [1] define que havendo absoluta necessidade de se usarem amostras identificadas ou identificáveis, estas devem ser codificadas, ficando os códigos armazenados separadamente, e sempre em instituições públicas. A mesma lei define que não é permitido o armazenamento de material biológico humano não anonimizado por parte de entidades com fins comerciais.

1.2.4.1.3. Proprietários das amostras

Em relação aos proprietários do material doado, alguns autores defendem que as amostras e dados, com exceção das totalmente anonimizadas, devem pertencer ao dador [40, 41]. A maioria dos biobancos consente em não ser proprietário, mas sim em ter a custódia do material doado [42-44]. De acordo com O'Brien (2009) [45], o material dos biobancos deve ter propriedade partilhada entre os dadores, investigadores e instituições. No entanto, este assunto permanece incerto e insuficientemente discutido [3, 16]. Na situação atual, na maioria dos países, está acordado que as amostras pertencem ao dador o qual, num espírito de solidariedade e através de um consentimento informado, as disponibiliza para a investigação. O investigador é reconhecido como quem tem a custódia das amostras, sendo responsável pela sua manutenção apropriada enquanto responsável pela investigação [3]. Em Portugal, a lei nº12/2005 de 26 de Janeiro [1] decreta que o material

biológico armazenado é considerado propriedade da pessoa dadora ou, depois da sua morte ou incapacidade, dos seus familiares. Compete aos investigadores responsáveis, pela coleção e manutenção do biobanco, zelar pela conservação e integridade das amostras e informar os dadores de quem foi obtido o consentimento de qualquer perda, alteração ou destruição, assim como da sua decisão de abandonar um tipo de investigação ou de fechar o biobanco.

1.2.4.1.4. Divulgação dos resultados de investigação

A divulgação dos resultados, obtidos das investigações realizadas com o material doado, corresponde a outro dos assuntos debatidos. Eticamente, os dadores de amostras têm o “direito de saber ou não saber” os resultados das investigações para os quais as suas amostras foram utilizadas. Ou seja, devem ter a oportunidade de decidir se querem ou não ter conhecimento dos resultados [16]. Embora muitos participantes tenham interesse em saber os resultados da investigação, a maioria dos biobancos não os fornece [46]. Muitas vezes porque os resultados podem vir a ser mal interpretados, causando ansiedade nos participantes [23, 25, 26, 28, 47], e também porque a não divulgação fornece uma certa proteção contra possíveis resultados incorretos [16]. A maioria dos autores concorda que os resultados só devem ser comunicados aos participantes caso sejam de elevada importância clínica. Nestes casos, os resultados deverão ser comunicados apropriadamente por uma pessoa competente [16].

Em Portugal, a lei [1] não menciona a obrigatoriedade de comunicação ou não dos resultados da investigação. No entanto, se estiver prevista a comunicação de resultados, deve ser envolvido nesse processo um médico especialista em genética.

1.2.4.1.5. Envolvimento de menores e doentes incapacitados em investigação

O envolvimento de menores em investigação levanta determinados dilemas éticos e por isso muitos biobancos não englobam amostras deste grupo. No entanto, como pode prejudicar a investigação, alguns autores ponderam a ideia do envolvimento se o risco associado for o menor possível [48-51]. De acordo com Hens (2011) [52], antes de envolver um menor no biobanco é necessário atender a três requisitos principais: permissão por parte de um representante legal; permissão do menor; e avaliação precisa dos riscos/benefícios e da importância da investigação. De acordo com Davidson (2009) [54], os pais do menor têm o direito de decidir envolver ou não os seus filhos, dando consentimento no lugar destes, embora, sempre que possível, este deve ser pedido ao próprio [54].

No caso dos resultados da investigação, normalmente os pais têm interesse em saber tudo o que diga respeito aos seus filhos [55]. No entanto, alguns autores defendem que o menor quando atingir a maioridade, é que deve decidir se quer ou não a divulgação dos resultados [16]. Da mesma forma, os princípios éticos aplicados aos menores são também aplicados aos participantes incapacitados, como por exemplo os que sofrem de doenças psiquiátricas [28, 56].

1.2.4.1.6. Comercialização

Um exemplo típico de comercialização ocorre na investigação farmacogenómica suportada pelas companhias farmacêuticas [28, 57]. Estas suportam a investigação que pode vir a melhorar o tratamento de muitas doenças [47, 58]. No entanto, de acordo com alguns autores, a comercialização nos biobancos pode, em alguns casos, diminuir a confiança pública [28, 59].

1.2.4.2. Infra-estruturas e instalações

Diretivas e boas práticas de repositórios biológicos contêm todos os aspetos das infra-estruturas de um biobanco, e fornecem a base para a gestão de um biobanco de produtos biológicos de origem humana. Um biobanco deve possuir vários elementos que garantam a segurança dos equipamentos e do material armazenado, para além de que deve fornecer um ambiente eficiente e de segurança para o pessoal do biobanco [61]. As infra-estruturas dos biobancos dependem dos tipos de materiais a serem armazenados, das condições necessárias de armazenamento, do período de retenção e do uso pretendido destes materiais [62]. No geral, nas instalações de armazenamento de um biobanco devem existir: (1) ar condicionado que mantenha a temperatura ambiente da sala nos $\leq 22^{\circ}\text{C}$, de forma a prevenir o excesso de desgaste dos congeladores e a falha precoce destes [61, 62]; (2) um sistema que limite o acesso a pessoal autorizado protegendo contra a intromissão de intrusos; (3) uma fonte constante de energia elétrica que suporte falhas da energia entre 48 e 72 horas; (4) congeladores de reserva, para substituição, no caso de avaria de algum dos equipamentos de frio [61]; (5) sistemas de segurança nos congeladores, com sistema de monitorização acoplado e sistemas de alarme (24 horas por dia e 7 dias por semana) de forma a assegurar que o pessoal responsável possa tomar as ações necessárias num período de tempo que previna ou minimize a perda ou o dano dos materiais guardados [62]; e (5) sensor dos níveis de oxigénio, para os biobancos providos de contentores de azoto, sabendo que o nível normal de oxigénio do ar deve ser de aproximadamente 21% [61].

1.2.4.3. Sistemas de informação

Para a realização de estudos de investigação, é necessário para além de material biológico (amostras), uma enorme quantidade de dados relacionados com os doentes (registos clínicos, análises de laboratório, informações sobre estilos de vida, informação genética, e outros). Os biobancos, como armazenam uma grande quantidade de dados, necessitam de um sistema de

informação eficiente e eficaz [63]. De acordo com a OECD [60], os biobancos devem estar equipados com um sistema de informação que faça toda a gestão das amostras. Isso implica um sistema que registre dados de todas as fases de manuseamento das amostras desde a sua entrada até saída do biobanco. Um bom sistema de informação deve permitir a rastreabilidade das amostras e das análises efetuadas, bem como de controlos de qualidade realizados. Deve permitir a codificação das amostras, de modo a proteger a privacidade dos participantes. Este processo de codificação é essencial para possibilitar a distribuição e utilização das amostras em estudos de investigação.

Os *softwares* que ajudam a informatizar todas as operações realizadas num biobanco incluem o *LIMS* (Sistema de Gestão da Informação Laboratorial) e o *BIMS* (Sistema de Gestão de Informação Biológica). Um *LIMS* permite o armazenamento dos dados (clínicos, demográficos e outros), a identificação de informações necessárias para determinado estudos, o rastreamento das amostras quanto à sua localização de armazenamento, a segurança dos dados e a proteção da privacidade dos participantes [64, 65].

1.2.4.4. Procedimentos operacionais padrão (POPs)

Os biobancos devem conter procedimentos padronizados onde todos os circuitos de trabalho a efetuar estão documentados. Estes devem fornecer instruções sistemáticas, detalhadas e lógicas, e possuir pormenores suficientes para permitir que qualquer pessoa compreenda e execute os procedimentos com consistência. Idealmente possuem indicações, fáceis de seguir, onde os componentes ou materiais necessários estão mencionados. Não são manuais de laboratório com discussões extensivas e com muita teoria, mas sim instruções operacionais [66]. A sua importância prende-se com o facto de que pequenas diferenças nos POPs podem produzir resultados não interpretáveis, devido a variações nos diversos passos no processo de colheita e manuseamento das amostras. As amostras de casos e de controlos devem ser sempre manuseadas de forma idêntica no que diz respeito aos procedimentos de colheita, processamento, armazenamento e transporte. Isso é

imprescindível para que os investigadores possam ter a certeza que as diferenças encontradas entre os dois grupos de amostras sejam devido a diferenças reais, entre o estado de doença e não doença, e não de viés na manipulação das amostras [66]. Quando isso não é possível, é indispensável que toda a informação referente a processos diferentes esteja documentada, para que os investigadores utilizem estes dados para eliminar quaisquer fatores potenciais de confusão e possam explicar determinados resultados [66].

Algumas das variações que podem causar resultados com impacto analítico são: (1) o tipo de aditivo utilizado nos tubos de colheita do sangue; (2) o tempo e temperatura de processamento das amostras; (3) a presença de hemólise; (4) os parâmetros de armazenamento das amostras; e (5) o número de ciclos de congelamentos/descongelamentos [67, 68]. Este tipo de diferenças entre as amostras pode ter um impacto significativo na estabilidade das proteínas e de outras moléculas de interesse contidas na amostra. Sabe-se que a temperatura em que se encontra o produto biológico colhido, e o tempo decorrido desde a colheita até ao processamento e armazenamento no biobanco, podem influenciar a qualidade da amostra biológica e dos produtos finais obtidos [69]. As células permanecem estáveis à temperatura ambiente até 48 horas após a colheita, sendo que após esse tempo, para continuarem viáveis, é necessário que sejam cultivadas ou criopreservadas em azoto líquido. Se a integridade das células estiver comprometida as proteínas são sensíveis à degradação pelas proteases [69]. Portanto, a exposição excessiva à temperatura ambiente provoca a degradação das proteínas e de outros biomarcadores celulares. De acordo com esse pressuposto, para estudos biomoleculares as amostras devem ser processadas rapidamente [70]. No caso de hemólise, a libertação de material celular no plasma ou no soro pode introduzir fatores de confusão [66], sobretudo em estudos de proteómica. Por essa razão é recomendável que esta informação esteja devidamente documentada [66].

1.2.4.4.1. Colheita

As amostras biológicas quando removidas do organismo sofrem uma quantidade de alterações que normalmente não ocorrem no corpo humano [71]. Após a colheita, na tentativa de garantir a integridade das amostras, devem ser seguidos determinados procedimentos de modo a minimizar ao máximo os efeitos causados pela manipulação das amostras [64]. Existe uma variedade de protocolos para a colheita de diferentes tipos de produtos biológicos. As diretivas da ISBER apresentam informação prática e eficaz sobre colheita, armazenamento e distribuição de materiais biológicos para investigação. O tipo de protocolo utilizado deve ser adaptado às necessidades específicas de cada estudo e de cada biobanco. As amostras podem ser colhidas de formas diferentes, podendo variar de acordo com a quantidade necessária, distância do centro de recolha, local de processamento e do tipo de biobanco [14]. De acordo com Riegman (2008) [5], é recomendável que os produtos biológicos com destino a um biobanco tenham um âmbito de aplicação o mais alargado possível, de modo que sejam utilizados nos mais variados estudos. O sangue é um bom produto biológico a obter na prática dos biobancos por ser de fácil acesso, a colheita ser de baixo custo, poder obter-se plasma, soro, células nucleadas e eritrócitos, e várias biomoléculas, como DNA, RNA, proteínas e produtos do metabolismo, que podem ser utilizadas em diversos estudos de genoma, proteoma e metaboloma. Da mesma forma a urina é um fluido biológico, adequado para diversos ensaios, contendo uma série de biomoléculas, como eletrólitos e produtos do metabolismo. É importante como fonte de biomarcadores de doenças renais e, tal como o sangue, é de fácil obtenção e de baixo custo a sua colheita [69].

1.2.4.4.2. Transporte

Os materiais biológicos, após a colheita, devem ser enviados para o biobanco pelo meio de transporte mais adequado. Na preparação do material biológico para o transporte é importante considerar-se o tempo de transporte, distância, clima, estação do ano, método de transporte e

regulamentos, assim como o tipo e a quantidade de produto a enviar [62]. O transporte e transferência eficiente de materiais infecciosos requerem uma boa coordenação entre o remetente, transportador e o destinatário, de forma a garantir que o material seja transportado de forma segura e que chegue ao seu destino em boas condições. Esta coordenação depende de uma comunicação permanente e de uma boa relação de trabalho entre as três partes [72].

As amostras de origem humana podem ser consideradas “Mercadorias Perigosas”, e por isso o seu envio está estritamente regulado por diversos regulamentos nacionais e internacionais (tabela 3) [62, 72]. A regulamentação internacional relativa ao transporte de substâncias infecciosas por qualquer meio de transporte baseia-se nas recomendações das Nações Unidas para o transporte de mercadorias perigosas (UNCETDG) [62, 72]. Alguns países adotam a regulamentação modelo das Nações Unidas na sua totalidade como norma nacional para mercadorias perigosas, e outros aplicam a norma mas com algumas ligeiras variações. As autoridades nacionais de cada país devem informar sobre os requisitos estabelecidos na normativa nacional [72]. O Instituto da Mobilidade e dos Transportes Terrestres (IMTT) é que regula o transporte rodoviário e ferroviário de mercadorias perigosas em Portugal.

De acordo com as Boas Práticas da OECD, [60] todos os centros de investigação biológica para garantirem a segurança no acondicionamento e transporte do material biológico devem seguir os regulamentos relativos ao transporte de substâncias infecciosas (WHO/HSE/IHR/2010.8), publicados pela OMS (tabela 3). Estes facultam as orientações práticas para o cumprimento da regulamentação internacional relativa ao transporte de substâncias infecciosas, para todos os meios de transporte [72].

Tabela 3. Regulamentos nacionais e internacionais relativos ao transporte de substâncias perigosas.

Regulamentação relativa ao transporte de substâncias perigosas
Comissão Económica das Nações Unidas para a Europa (UNECE) Recomendação das Nações Unidas para o transporte de mercadorias perigosas - Regulamento Modelo. http://www.unece.org/fileadmin/DAM/trans/danger/publi/unrec/rev17/English/00ERev17_Recommendations.pdf
Organização Internacional de Aviação Civil (ICAO) Agência Especializada das Nações Unidas. http://legacy.icao.int/icao/en/m_publications.html
Associação Internacional de Transporte Aéreo (IATA) Organização comercial em Montreal para as companhias aéreas. Publica regulamentos de mercadorias perigosas que incorporam as disposições da ICAO. http://www.iata.org/ps/publications/Pages/index.aspx
Instituto Nacional de Aviação Civil (INAC) Orgão do estado detentor das atribuições da “autoridade aeronáutica”. Coordena, fiscaliza, controla, supervisiona e inspeciona todas as atividades relacionadas com a aviação civil em todo o espaço nacional. http://www.inac.st/
Guia de regulamentos relativos ao transporte de substâncias infecciosas 2011-2012 (WHO/HSE/IHR/2010.8) Diretivas publicadas pela OMS, baseadas em vários regulamentos nacionais e internacionais. São relativas ao transporte de substâncias infecciosas e amostras de doentes por todos os meios de transporte. http://www.who.int/ihr/publications/who_hse_ihr_20100801_en.pdf
Instituto da Mobilidade e dos Transportes Terrestre (IMTT) Entidade Nacional Portuguesa competente para efeitos de execução do Decreto-Lei nº41-A/2010 que regula o transporte rodoviário e ferroviário de mercadorias perigosas. http://www.imtt.pt/sites/IMTT/Portugues/Paginas/IMTTHome.aspx
Regulamentação do transporte de mercadorias perigosas por estrada: Acordo Europeu relativo ao Transporte Internacional de Mercadorias Perigosas por Estrada (ADR) http://www.imtt.pt/sites/IMTT/Portugues/TransportesRodoviaros/TransporteMercadoriasPerigosas/RegulamentacaoTecnica/Documents/ADR%202011/ADR2011_Parte1.pdf

As substâncias infecciosas, de acordo com a guia da OMS, são substâncias para as quais se sabe ou se suspeita de conter agentes patogénicos. As substâncias infecciosas dividem-se em categorias A e B. As substâncias infecciosas de categoria A correspondem às substâncias que causam incapacidade permanente ou colocam a vida de seres humanos ou animais em risco. A designação apropriada para estas substâncias é: UN 2814 “Substância Infecciosa que afeta os seres humanos” [62, 72]. A

substância infecciosa da categoria B corresponde a todas as outras substâncias infecciosas que não cumprem os critérios para a sua inclusão na categoria A. A designação apropriada para o transporte destas substâncias é UN 3373 “Substância biológica, categoria B” [72]. Muitos dos produtos biológicos humanos, como o sangue, tecidos, saliva ou urina não contaminados por vírus de elevada patogenicidade pertencem a esta categoria [62].

É da responsabilidade do remetente garantir a correta classificação, embalagem, etiquetagem e documentação de todas as substâncias infecciosas destinadas a transporte. A embalagem, que transporta os produtos biológicos, deve ser desenhada de forma a impedir danos durante o transporte e a garantir a integridade dos materiais. Os requisitos da embalagem são determinados pela UNCETDG, e para as substâncias infecciosas da categoria B constam as instruções de embalagem P650. Os remetentes destas substâncias devem-se assegurar que as embalagens sejam preparadas de tal modo que cheguem ao seu destino final em bom estado e que, durante o transporte, não apresentem perigo para os seres humanos e animais [72]. O sistema de embalagem tripla deverá ser utilizado para todas as substâncias infecciosas sendo constituído por: 1) embalagem ou recipiente primário, impermeável que contém a amostra, envolvido com material absorvente para no caso de rutura, a amostra ser totalmente absorvida; 2) embalagem secundária, impermeável e duradoura que encerra e protege os recipientes primários; e 3) embalagem terciária ou exterior de material amortizado adequado, onde é colocada a embalagem secundária. Esta embalagem protege contra danos exteriores que possam ocorrer durante o transporte [62, 72].

1.2.4.4.3. Receção, processamento e armazenamento

Todas as amostras recebidas do exterior devem ser confirmadas no biobanco e deve ser mantido um registo de entrada. A documentação, referente às amostras recebidas, deve incluir data e hora de entrada no biobanco, verificação das condições da embalagem e da temperatura do transporte,

verificação da quantidade e qualidade dos produtos biológicos recebidos e as possíveis não conformidades [14]. Os produtos biológicos devem ser processados, de acordo com protocolos padronizados, de modo a impedir que sejam introduzidas variáveis que possam pôr em causa os estudos de investigação [64].

Relativamente ao armazenamento, é recomendado que as amostras sejam guardadas em alíquotas para evitar descongelamentos repetidos. Alguns investigadores [68, 73] já demonstraram que o número de ciclos de congelamento/descongelamento das amostras tem um efeito negativo na qualidade das amostras. Para além disso é indicado como medida de segurança que sejam guardadas duas alíquotas da mesma amostra em arcas diferentes [62]. As boas práticas da ISBER, como mencionado anteriormente, apresentam informação prática sobre colheita, armazenamento e distribuição de materiais biológicos para investigação [14].

1.2.4.4.4. Controlo de qualidade

Em *Biobanking* é necessário haver metodologias que permitam distinguir uma boa amostra de uma má amostra. Esta possibilidade não só é importante para escolher as amostras para inclusão ou exclusão em determinado estudo, como também para ter a certeza que os protocolos estão sendo seguidos [71]. Segundo as boas práticas da ISBER (D7.400) [14], os ácidos nucleicos (DNA e RNA), devem ser avaliados quanto à integridade e fragmentação (peso molecular, número de integridade do RNA (RIN), quantidade/concentração e pureza. De acordo com as diretivas OECD, [60] as metodologias de controlo de qualidade devem ser aplicadas de acordo com o material biológico a avaliar, e em cada caso, os controlos de qualidade devem ser bem estabelecidos e seguidos rigorosamente. O controlo de qualidade de amostras de fluídos tais como a urina, soro e plasma, é habitualmente efetuado através da quantificação de componentes específicos, de forma a avaliar a degradação destes ao longo do tempo (integridade) [14].

Existem atualmente diversos programas de gestão da qualidade disponíveis [64], que podem ser empregues nos biobancos tais como: ISBER (<http://www.isber.org/>); Boas Práticas de Laboratório (http://www.oecd.org/document/63/0,3746,en_2649_34377_2346175_1_1_1_1,00.html); Melhoria e Correção dos Laboratórios Clínicos (CLIA) (<http://wwwn.cdc.gov/clia/>); Organização Internacional para Estandarização (ISO 9000) (<http://www.iso.org>); Administração de alimentos e medicamentos (FDA) Regulação do Sistema de Qualidade, Código de Regulamentos Federais 21, parte 820 (<http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/cfrsearch.cfm?cfrpart=820>).

1.3. Biobanking em Urologia

O “Renal Biobank Catalogue”, desenvolvido através do projeto GENECURE (GENomic stratEGies for treatment and prevention of Cardiovascular death in Uraemia and end-stage RENal disease) em colaboração com o P³G, contém informações padronizadas que descrevem estudos relacionados com as doenças renais [12]. Da mesma forma, o projeto ReGeNet (RENal GENome NETWORK) (<http://www.regenet.eu/>), estabelecido em 2003, tem como objetivo promover e facilitar estudos clínicos, epidemiológicos e genéticos no domínio da urologia. Este projecto envolve vários institutos de investigação e empresas de toda a Europa.

O MRPB (Manchester Renal Patient BioBank) (<http://www.kidneysforlife.org/research/manchester-renal-patient-biobank-mrpb/>) é um dos biobancos específico às doenças renais. Este foi estabelecido com o intuito de armazenar amostras e dados de doentes com doenças renais para rastreio genético, estudos de proteómica, metabolómica e deteção de biomarcadores.

1.3.1. Litíase Urinária

A LU é uma entidade clínica muito comum caracterizada pela presença de cálculos no trato urinário [74]. A sua prevalência é elevada estimando-se que atinga entre 1 a 20% da população em geral, variando com a localização geográfica. Na Europa pensa-se que a prevalência seja de 2 a 8%, embora num estudo realizado na Grécia foi encontrada uma prevalência de 15% [75]. Em Portugal a prevalência é desconhecida, embora um estudo realizado com 43,000 indivíduos revelou que cerca de 7% destes teve pelo menos uma cólica renal em toda a sua vida [76]. Nos Açores, até à data, não foram publicados estudos epidemiológicos da LU. Atinge maioritariamente indivíduos jovens do sexo masculino com idades entre 20 e 40 anos, sendo mais frequente em caucasianos, seguidos dos hispânicos, negroides e asiáticos [74, 77]. A recorrência é elevada, estimando-se que cerca de 40% dos doentes não tratados apresentam recorrência em 3 anos [78]. Atualmente é responsável por uma elevada taxa de morbilidade, sobretudo nos casos recorrentes, acarretando elevados encargos financeiros ao sistema de saúde [79].

Os cálculos renais, de acordo com a sua composição, podem ser de origem cálcica ou não cálcica. Os cálculos de cálcio constituem a grande maioria dos cálculos urinários, onde os de oxalato de cálcio são os mais frequentes, seguidos dos mistos de oxalato e fosfato de cálcio. Os restantes tipos são de estruvite, ácido úrico, cistina e outros com incidência residual (tabela 4).

Tabela 4. Classificação dos cálculos renais quanto à composição, causa e frequência (adaptado de [80]).

Composição do cálculo	Causa	Frequência
Oxalato de cálcio, fosfato ou ambos	Anomalia metabólica	60-80%
	Idiopática	25%
Estruvite (triplo-fosfato)	Infeção	10-15%
Ácido úrico	Hiperuricémia e hiperuricosúria	5-10%
	Idiopática	50%
Cistina	Disfunção nos túbulos renais	1%
Outros		1%

A formação dos cálculos é um processo complexo que resulta da precipitação de sais minerais na urina, podendo estar relacionada com causas metabólicas, infecciosas, anatómicas e idiopáticas [74, 81].

Existe claramente a existência de fatores genéticos, no entanto, fatores ambientais e hábitos pessoais parecem desempenhar importância fundamental [78]. Um aumento do risco é observado em pessoas que trabalham em ambientes quentes [82], ou que têm determinadas profissões, como o caso dos taxistas que tendem a diminuir a ingestão de fluidos para evitarem demasiadas paragens. A etnicidade também parece estar relacionada, pois de acordo com López (2010) [83], independentemente da área geográfica em causa, a doença é mais comum em caucasianos brancos do que em negros, embora haja um aumento significativo da doença em afro-americanos que seguem os hábitos alimentares dos caucasianos. De facto, não existem dúvidas de que a dieta desempenha um papel fundamental no desenvolvimento da LU [79, 83, 84]. Vários fatores dietéticos parecem modificar o risco de desenvolver cálculos. Os nutrientes que têm sido implicados na doença incluem o cálcio, proteína animal, [85] oxalato, [86] sódio, [87] sacarose, [88] frutose, [89] deficiência em magnésio, [90] e potássio [91]. O risco de LU é superior em pessoas com história familiar da doença [92], embora a ocorrência verificada entre familiares (agregação familiar) possa não implicar necessariamente transmissão hereditária, mas sim ser efeito dos fatores ambientais partilhados pelos membros da mesma família, principalmente os relacionados com hábitos alimentares. Algumas condições monogénicas, como cistinúria, hiperoxalúria primária e doença de Dent têm sido indicadas como responsáveis pelo desenvolvimento de certos tipos de cálculos (tabela 5) [93].

Tabela 5. Fenótipos associados à Urolitíase, genes envolvidos, localizações cromossômicas e referência OMIM.

Fenótipo	Gene	Localização cromossômica	# OMIM
Deficiência de adenina fosforibosiltransferase	<i>APRT</i>	16q24	614723
Nefrolitíase, ácido úrico, suscetibilidade	<i>ZNF365</i>	10q21.2	605990
Doença de Dent 1	<i>CLCN5</i>	Xp11.23-p11.22	300009
Hiperglicinúria	<i>SLC6A20</i>	3p21.31	138500
	<i>SLC6A19</i>	5p15.33	
	<i>SLC36A2</i>	5q33.1	
Alcaptonúria	<i>HGD</i>	3q13.33	203500
Hipouricemia renal	<i>SLC22A12</i>	11q13.1	220150
Hiperoxalúria primária, tipo 2	<i>GRHPR</i>	9p13.2	260000
Hiperoxalúria primária, tipo 1	<i>AGXT</i>	2q37.3	259900
Nefrolitíase/osteoporose, hipofosfatêmica 1	<i>SLC34A1</i>	5q35.3	182309
Xantinúria, tipo 1	<i>XDH</i>	2p23.1	278300
Superactividade de Fosforibosilpirofosfatase; Gota	<i>PRPS1</i>	Xq22.3	311850
Cistinúria	<i>SLC3A1</i>	2p21	220100
	<i>SLC7A9</i>	19q13.11	

Outras patologias como o hiperparatiroidismo, [94] aumento do índice de massa corporal, [95] gota [96] e diabetes mellitus [97] também têm sido associadas à formação dos cálculos. Mais recentemente tem sido sugerido o envolvimento do “microbioma” no desenvolvimento dos cálculos de oxalato de cálcio [98]. Um estudo realizado, em 2008, por Kaufman [99] sugere que a colonização pela bactéria intestinal *Oxalobacter formigenes*, responsável pela degradação de oxalato, reduz significativamente o risco de desenvolvimento de cálculos de oxalato de cálcio. Estudos em doentes com Urolitíase e fibrose cística mostraram que o uso frequente e prolongado de antibióticos pode eliminar irreversivelmente a colonização desta bactéria do intestino [100].

Embora nos últimos anos tenham sido alcançados vários progressos na compreensão da etiologia, fisiopatologia, tratamento e prevenção da doença, vários aspetos continuam controversos e por desvendar [83]. A morbidade e o elevado custo associado à LU leva a que os investigadores tenham interesse na patologia na tentativa de diminuir a sua elevada incidência e recorrência [74].

2. MÉTODOS

Este trabalho teve como base uma revisão bibliográfica sobre os biobancos que armazenam dados e amostras de origem humana. Foram consultadas diretivas europeias e internacionais, bem como a legislação portuguesa envolvida na prática de *Biobanking*. Foi elaborado um consentimento informado, um questionário e procedimentos operacionais padronizados, que foram posteriormente aferidos pela análise das 10 primeiras amostras de LU recebidas no SEEBMO.

2.1. Verificação das condições do AZORBIO

Foi realizado um levantamento das infra-estruturas e dos equipamentos de base e manutenção do AZORBIO, de modo a verificar se estão de acordo com a norma ISBER. Foram verificados os seguintes conteúdos da norma: B2.000) Ventilação, aquecimento e ar condicionado; B3.000) Iluminação; B4.000) Pavimentos; B5.000) Energia de reserva; B6.000) Acesso; B7.000) Sistemas de segurança; B8.000) Prevenção de incêndios; e B9.000) Plano de emergência.

Realizou-se também o levantamento de todas as amostras criopreservadas no AZORBIO no que diz respeito à sua codificação e localização.

2.2. Consentimento informado

O modelo de consentimento informado foi elaborado tendo em conta a legislação nacional (Lei nº. 12/2005 de 26 de Janeiro).

2.3. Folha informativa e questionário

Foi elaborado um documento informativo e um questionário específico da LU de modo a obter dados relevantes relacionados com a doença.

2.4. Procedimentos Operacionais Padrão

Foram elaborados todos os procedimentos a efetuar no que diz respeito a:

- a) colheita, acondicionamento e transporte;
- b) receção no SEEBMO- AZORBIO;
- c) processamento e armazenamento;
- d) controlo de qualidade das amostras.

Os procedimentos foram elaborados com base nas normas ISBER, IARC, NCI, OECD, e outras aconselhadas pelo BBMRI. Para os procedimentos relacionados com o transporte foram ainda verificadas as condições necessárias indicadas pela OMS (WHO/HSE/IHR/2010.8).

2.5. Aferição dos procedimentos

Foram aferidos todos os procedimentos e toda a documentação nas primeiras amostras de LU recebidas no SEEBMO. As amostras de DNA e RNA foram submetidas a controlo de qualidade no que diz respeito a concentração e pureza, integridade e funcionalidade para verificar que os procedimentos são os adequados. Os dados associados às amostras foram analisados de forma a detetar possíveis lacunas nos questionários.

3. RESULTADOS

3.1. Verificação das condições do AZORBIO

As instalações do AZORBIO estão climatizadas com uma temperatura de $\leq 22^{\circ}\text{C}$ (B2.100) e contém ventilação suficiente (B2.200), para o bom funcionamento dos equipamentos e para o bem-estar dos técnicos. Possui iluminação suficiente (B3.100) e pavimentos facilmente laváveis (B4.000). Estão dotadas de UPS (*Uninterruptible Power Supplies*) (B5.100) e gerador (B5.200), com capacidade para manutenção e estabilização da energia. Contudo carece de um sistema que limite o acesso a pessoas não autorizadas (B6.000) e um sistema para detecção de intrusos (B7.100). O AZORBIO contém refrigeradores a $+4^{\circ}\text{C}$, arcas congeladoras a -80°C e -150°C e contentores de azoto líquido a -190°C , com um sistema de monitorização acoplado que dispara um alarme local e remoto (email e telefónico 24 horas por dia e 7 dias por semana) quando a temperatura atinge um valor crítico (previamente definido para cada uma das arcas) (B.7.000). O sistema permite que sejam tomadas as precauções necessárias em tempo real, de modo a proteger os materiais armazenados.

Como o biobanco contém contentores de azoto, é importante referir a ausência de sensor para os níveis de oxigénio (C2.400) nas instalações do AZORBIO.

Relativamente à prevenção de incêndios (B8.000) e ao plano de emergência (B9.000), verificou-se que o biobanco contém os extintores de pó químico seco, no entanto carece de um sistema de detecção de fogos (B8.000) e um plano de emergência para estes casos.

A coleção de amostras biológicas humanas criopreservadas no biobanco foi reorganizada nos equipamentos de frio, e foram elaborados planos das arcas para auxiliar na configuração de um *LIMS* comercial versão 6.0 da *LabWare* que se encontra no SEEBMO em fase de desenvolvimento e experimentação. Este permite o armazenamento de toda a informação associada às amostras, bem

como toda a sua gestão. O acesso à base de dados está limitado através de níveis de acesso definidos de acordo com as funções desempenhadas no SEEBMO.

3.2. Consentimento informado

O termo de consentimento informado (IMP.EBM.001.01) é restrito para os estudos relacionados com a LU, permitindo a utilização das amostras e dos dados em investigações atuais e futuras. Inclui informação sobre as finalidades do biobanco, o seu responsável, os tipos de investigação a desenvolver, a duração do armazenamento, as medidas tomadas para garantir a privacidade e a confidencialidade dos participantes e a previsão quanto à possibilidade de comunicação ou não de resultados obtidos. O consentimento informado foi submetido à Comissão de Ética do HSEIT, com obtenção de parecer favorável, a partir de 3 de Fevereiro de 2012.

3.3. Folha informativa e questionário

A folha informativa (IMP.EBM.008.01), cedida aos doentes que aceitem participar no estudo, contém informações básicas sobre o projeto, tais como: o nome do projeto, o seu responsável e participantes, os objetivos, a metodologia e um breve resumo da doença.

O questionário (IMP.EBM.002.01) comporta questões que possam eventualmente ter associação com a doença, como: características sócio-demográficas, medidas antropométricas, características sócio-económicas, comportamentos e hábitos pessoais, hábitos alimentares e informação de saúde.

A folha informativa e o questionário foram submetidos à Comissão de Ética do HSEIT, com obtenção de parecer favorável, a partir de 3 de Fevereiro de 2012.

3.4. Procedimentos Operacionais Padrão

Estes comportam toda a informação necessária de forma a assegurar a integridade das amostras a longo prazo. Cada procedimento, antes de sua implementação, foi revisto pelo pessoal envolvido e aprovado pelo diretor do AZORBIO. Para a implementação do circuito de recolha de amostras, foi ainda realizada uma reunião com os profissionais de saúde do HSEIT envolvidos no projeto, de forma a dar a conhecer os procedimentos que devem ser seguidos.

3.4.1. Colheita, acondicionamento e transporte de amostras

Este procedimento (anexo 1 do volume II) tem como objetivo orientar a colheita, acondicionamento e transporte de material biológico obtido de doentes com LU para o biobanco. Os documentos associados a este procedimento incluem diversos impressos e instruções operacionais (Tabela 6) que são apresentados no volume II nos anexos 2 ao 11.

Tabela 6. Documentos associados ao procedimento “Colheita, acondicionamento e transporte de amostras para investigação em LU”.

Tipo de Documento	Nº documento	Tema
Procedimento	PRD.EMB.002.01	Colheita, acondicionamento e transporte (geral)
Impresso	IMP.EBM.001.01	Termo de consentimento informado
Impresso	IMP.EBM.002.01	Questionário
Impresso	IMP.EBM.008.01	Folha informativa
Impresso	IMP.EBM.003.01	Documento de transporte
Instrução Operacional	IOP.EBM.001.01	Recomendações da colheita
Instrução Operacional	IOP.EBM.002.01	Identificação do material biológico
Instrução Operacional	IOP.EBM.003.01	Recolha de sangue
Instrução Operacional	IOP.EBM.004.01	Recolha de urina
Instrução Operacional	IOP.EBM.005.01	Acondicionamento
Instrução Operacional	IOP.EBM.006.01	Condições de transporte

3.4.2. Receção das amostras no SEEBMO- AZORBIO

Este procedimento (anexo 12 do volume II) tem como objetivo orientar a receção de amostras biológicas e dados de doentes de LU no biobanco. Os documentos associados a este procedimento incluem diversos impressos e instruções operacionais (Tabela 7) que são apresentados no volume II nos anexos 2, 4, 5 e do 13 ao 17.

Tabela 7. Documentos associados ao procedimento “Receção das amostras no SEEBMO-AZORBIO”.

Tipo de Documento	Nº documento	Tema
Procedimento	PRD.EMB.003.01	Receção das amostras (geral)
Impresso	IMP.EBM.001.01	Termo de consentimento informado
Impresso	IMP.EBM.002.01	Questionário
Impresso	IMP.EBM.003.01	Documento de transporte
Impresso	IMP.EBM.004.01	Folha diária das amostras
Impresso	IMP.EBM.005.01	Documento de verificação
Impresso	IMP.EBM.006.01	Documento de registo de incidências
Instrução Operacional	IOP.EBM.007.01	Verificação a Seguir no Secretariado
Instrução Operacional	IOP.EBM.008.01	Verificação a Seguir no laboratório

3.4.3. Processamento e armazenamento das amostras no SEEBMO-AZORBIO

Este procedimento (anexo 18 do volume II) tem como objetivo orientar o processamento das amostras biológicas de doentes de LU no biobanco. Os documentos associados a este procedimento incluem diversos impressos, instruções operacionais e protocolos (Tabela 8) que são apresentados no volume II nos anexos 19 ao 29.

Tabela 8. Documentos associados ao procedimento “Processamento e armazenamento das amostras no SEEBMO-AZORBIO”.

Tipo de Documento	Nº documento	Tema
Procedimento	PRD.EBM.004.01	Processamento e armazenamento (geral)
Impresso	IMP.EBM.007.01	Informação do processamento
Protocolo	PRT.EBM.001.01	Extração automática do DNA
Protocolo	PRT.EBM.002.01	Separação do Plasma
Protocolo	PRT.EBM.003.01	Extração manual do DNA (Método de “Salting-out”)
Protocolo	PRT.EBM.004.01	Preparação de soluções para a extração manual do DNA
Protocolo	PRT.EBM.005.01	Separação do soro
Protocolo	PRT.EBM.006.01	Extração de RNA
Protocolo	PRT.EBM.007.01	Preparação de soluções para a extração de RNA
Protocolo	PRT.EBM.008.01	Separação de urina
Instrução operacional	IOP.EBM.009.01	Aliquotagem, etiquetagem e armazenamento das amostras biológicas
Instrução operacional	IOP.EBM.011.01	Equipamento de criopreservação

3.4.4. Controlo de qualidade das amostras

Este procedimento (anexo 30 do volume II) tem como objetivo orientar a verificação da qualidade das amostras de DNA e RNA do AZORBIO. Os documentos associados a este procedimento incluem protocolos e instruções operacionais (Tabela 9) que são apresentados no volume II nos anexos 31 ao 40.

Tabela 9. Documentos associados ao procedimento “Controlo de qualidade das amostras de DNA e RNA”.

Tipo de Documento	Nº documento	Tema
Procedimento	PRD.EBM.005.01	Controlo de qualidade (geral)
Protocolo	PRT.EBM.009.01	Concentração e pureza do DNA
Protocolo	PRT.EBM.010.01	Integridade do DNA
Protocolo	PRT.EBM.011.01	Funcionalidade do DNA
Protocolo	PRT.EBM.012.01	Concentração do RNA (Kit RNeasy)
Protocolo	PRT.EBM.013.01	Concentração e pureza do RNA
Protocolo	PRT.EBM.014.01	Integridade do RNA
Protocolo	PRT.EBM.015.01	Digestão do RNA com DNase
Protocolo	PRT.EBM.016.01	Purificação do RNA
Protocolo	PRT.EBM.017.01	Funcionalidade do RNA
Instrução Operacional	IOP.EBM.0.10.01	Purificação do RNA

3.5. Aferição dos Procedimentos

3.5.1. Colheita, acondicionamento, transporte e receção das amostras

Os produtos biológicos, dos primeiros 10 doentes com LU, foram transportados nas embalagens apropriadas (UN 3373) e recebidos no SEEBMO acompanhados do consentimento informado, documento de transporte e do questionário devidamente preenchidos. Os questionários e os consentimentos informados encontram-se sob a proteção do diretor do SEEBMO.

Na verificação das amostras (utilização do impresso IMP.EBM.005.01), confirmou-se que os produtos biológicos foram recebidos no intervalo de tempo estabelecido (até 2 horas após a colheita), tipo de tubo e volume pretendido. Foram detetadas e documentadas (utilização do impresso IMP.EBM.006.01) 2 incidências relativas a “erro com o produto biológico” e 1 relativa a “erro com a documentação”.

3.5.2. Processamento das amostras

As amostras de sangue e urina foram processadas de acordo com o procedimento processamento e armazenamento (PRD.EBM.004.01). Foram armazenadas 20 amostras de DNA, 39 alíquotas de plasma, 34 de soro, 64 de urina e 20 de RNA. Os dados do questionário que acompanham a amostra serão posteriormente inseridos no *software LIMS* (em fase de implementação e desenvolvimento).

3.5.3. Controlo de qualidade

3.5.3.1. Amostras de DNA

O controlo de qualidade efetuado ao DNA (PRT.EBM.009.01) obtido por extração automática revelou concentrações entre 25,5-86,5 ng/μl e rácios entre 0,883-2,429 (260/280nm). Os obtidos por extração manual apresentam concentrações entre 110,5-580,5 ng/μl e rácios 1,238-2,070. Verificou-se no DNA (PRT.EBM.010.01) obtido por extração automática uma boa integridade (bandas no gel bem definidas e sem arrastamento), no entanto as amostras obtidas por extração manual apresentam demasiada degradação (figura 1).

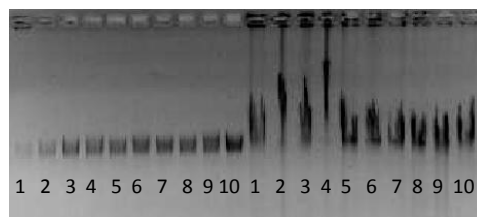


Figura 1. Avaliação da integridade: gel de agarose (0.7%) corado com Brometo de Etídeo (EtBr) de 10 amostras de DNA extraídos por método automático (esquerda) e manual (direita).

As amostras extraídas manualmente, por não apresentarem banda definida no gel de agarose (Figura 1, direita), foram amplificadas por PCR (Polymerase Chain Reaction) multiplex e submetidas a eletroforese (PRT.EBM.011.01) (figura 2). Este controlo de qualidade mediante a amplificação de 6 fragmentos de DNA de grande tamanho permitiu avaliar se o DNA fragmentado é funcional.

Através da análise do gel (PRT.EBM.011.01), verifica-se que todas as amostras de LU apresentam boa funcionalidade, podendo ser classificadas como amostras de boa qualidade.

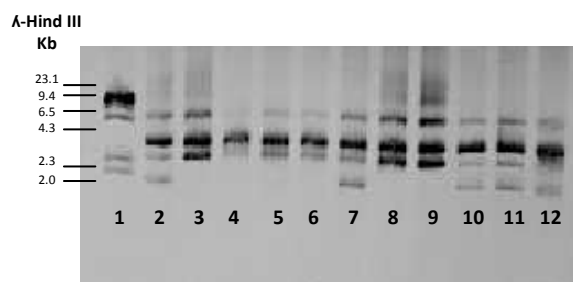


Figura 2. Avaliação da funcionalidade: gel de agarose (50% Hi-Gel Matrix) corado com EtBr de: poço 1-MM λ -*Hind III*; poço 2-amostra 10 da figura 1; Poços 3 a 12-amostras de LU obtidas por extração manual.

3.5.3.2. Amostras de RNA

O controlo de qualidade efetuado aos RNAs (PRT.EBM.013.01) revelou concentrações entre 40,0 e 105,2 ng/ μ l e rácios entre 1,959-2,184 (260/280nm). Relativamente à integridade (PRT.EBM.014.01) e possíveis contaminações com DNA, o gel da figura 3 mostra 2 bandas 23S e 16S definidas que não apresentam contaminação com DNA.

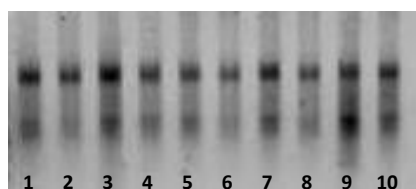


Figura 3. Avaliação da Integridade - Gel de agarose (1.7%) corado com EtBr das amostras de RNA extraídas de tubos PAXgene.

Embora as 10 amostras de RNA estejam íntegras e livres de contaminações com DNA, o controlo de qualidade para verificar a funcionalidade do RNA (PRT.EBM.017.01) é sempre efetuado. A funcionalidade do RNA foi verificada através do controlo da β -actina, mostrando que todas as 10 amostras de RNA são funcionais (figura 4).

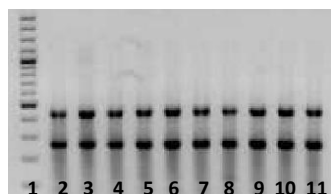


Figura 4. Avaliação da funcionalidade - Gel de agarose (1.7%) corado com EtBr de 10 amostras de RNA.

3.5.4. Análise aos questionários

Em relação à análise das respostas dos doentes face aos questionários (IMP.EBM.002.01), foram encontradas 5 questões mal formuladas. Na questão D2 (uso de computador) nos “Comportamentos e Hábitos Pessoais” 4 dos doentes responderam “não utiliza”, e na questão E4 (consumo de leite) nos “Hábitos Alimentares” 1 dos doentes respondeu “não consome”; essas opções não fazem parte do questionário. Na questão E3 (consumo de café) nos “Hábitos Alimentares” a opção “menos de uma chávena” não parece bem aplicada. Na tabela E7 referente aos “Hábitos Alimentares” e na questão F12 (consumo de antibióticos) na “Informação de Saúde” os termos “muito frequente”, “frequente”, “pouco frequente” e “raramente”, podem induzir em erro.

4. DISCUSSÃO

A análise da literatura efetuada neste estudo revela que os biobancos devem funcionar de acordo com princípios ético-legais, regras internas de funcionamento, procedimentos normalizados de colheita de amostras e dados, controlos de qualidade, assim como condições apropriadas de armazenamento. Em Portugal não existem normas específicas para *Biobanking*, mas simplesmente uma normalização mínima legal para o uso e armazenamento de material biológico em biobancos (Lei nº. 12/2005 de 26 de Janeiro), ao contrário de alguns países onde existem normas legais e específicas. Verifica-se um grande esforço, por parte da comunidade científica, para normalizar ao máximo a prática de *Biobanking*. Diversas organizações como a ISBER, IARC, OECD, NCI, ABN e outras, têm estabelecido diretivas, procedimentos e recomendações específicas, mas apesar de todas essas iniciativas e da clara relevância dos biobancos, a normalização ainda permanece relativamente fragmentada. Verifica-se falta de consenso no tipo de consentimento informado, heterogeneidade dos protocolos utilizados para a colheita, transporte, armazenamento e processamento das amostras. De acordo com Vaught (2006) [101], esta falta de normalização, pode conduzir a variações na qualidade das amostras, o que dificulta a execução de estudos comparativos, que são fundamentais em investigação.

Da avaliação de todo o circuito de trabalho verificou-se que o AZORBIO possui as infra-estruturas e os equipamentos gerais necessários para o seu bom funcionamento. Contudo, recomenda-se a implementação de um sistema que limite o acesso a pessoal autorizado, protegendo o biobanco contra a intromissão de intrusos, e a instalação de sensores dos níveis de oxigénio que devem ser instalados quando existem contentores de azoto. Para além disso, como medida de prevenção recomenda-se a instalação de um sistema de deteção de fogos e a elaboração de um plano de emergência no caso de incêndio.

A realização do termo de consentimento informado para os doentes de LU foi de encontro ao artº 19º, nº5 da Lei nº12/2005 que não deixa quaisquer dúvidas quanto à necessidade de obtenção do consentimento informado escrito, para a colheita e utilização de amostras em biobancos, embora a mesma Lei não clarifique o tipo de consentimento que deva ser empregue. Foi realizado um termo de consentimento informado, específico para a LU, que permite a utilização das amostras e dos dados em investigações futuras.

Verificou-se através do controlo de qualidade que no geral as amostras de DNA e RNA apresentam boa qualidade. Porém, embora classificadas deste modo, é importante realçar o facto das amostras extraídas por extração manual terem apresentado demasiada fragmentação, sugerindo-se por isso que o protocolo seja avaliado. Em relação às amostras de plasma, soro e urina, recomenda-se que no futuro o controlo de qualidade se estenda também a essas amostras.

Relativamente às lacunas detetadas nos questionários respondidos, recomenda-se que algumas questões sejam reformuladas de forma a clarificar a recolha dos dados. Na questão D2 (uso de computador) aconselha-se a colocar a opção “não utiliza”, para as pessoas que não utilizam computadores. Na questão E3 (consumo de café) deverá ser substituída a opção “menos de uma chávena” para “1 chávena por dia”. Na questão E4 (consumo de leite) aconselha-se a colocar a opção “não bebe”, para as pessoas que não consomem leite. Na tabela F7 sugere-se que seja quantificado o número de vezes para os termos “muito frequente”, “frequente” e “raramente”, pois estes podem ter diferentes significados para os doentes, obtendo-se informações que não podem ser posteriormente comparadas. O mesmo se verifica na questão F12 (consumo de antibióticos), onde se sugere que seja definido o termo “frequente” e “muito frequente” tendo em conta a questão F4 (frequência de infeções urinárias).

Como a pesquisa médica é uma área em constante evolução, não podemos prever as técnicas que estarão disponíveis no futuro e por isso não podemos antever quais as amostras do biobanco serão solicitadas e que qualidade será exigida a estas amostras. Como é óbvio, não podemos assegurar que os métodos atuais escolhidos para controlo de qualidade, recolha, processamento e armazenamento sejam suficientes no futuro. Porém, podemos e devemos utilizar as melhores condições disponíveis atuais e evoluir de acordo com as novas tecnologias que se forem desenvolvendo. As avaliações de controlo de qualidade do DNA no AZORBIO evoluíram de medições da concentração e pureza do DNA, para verificação da integridade em gel de agarose e da funcionalidade através de PCR multiplex.

5. CONCLUSÕES

A elaboração deste trabalho contribuiu para o aperfeiçoamento do biobanco AZORBIO tanto através do estabelecimento de procedimentos operacionais padronizados, com todo o circuito realizado no centro de recolha e no SEEBMO, como pela organização das amostras biológicas já armazenadas. Os resultados obtidos permitem o melhoramento da coleção de amostras do AZORBIO através do acréscimo de dados e amostras de doentes com LU. Quer o questionário quer as amostras, contribuirão no futuro para eventuais estudos genéticos e/ou epidemiológicos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. *Lei nº12/2005, "Informação genética e Informação de Saúde", in DR série I-A. 26 de Janeiro de 2006. p. 606-611.*
2. Shankar, S., Uday, Y., *Biobanking: Basic concepts and role in rheumatology*. Indian Journal of Rheumatology, 2011. **6**(3): p. 129-137.
3. *Guidelines for health professionals about DNA/Biobanking in Europe*. EuroGen guide 2010 [cited 2012 Maio].
4. Sak, J., et al., *Population biobanking in selected European countries and proposed model for a Polish national DNA bank*. J Appl Genet, 2012. **53**(2): p. 159-65.
5. Riegman, P.H., et al., *Biobanking for better healthcare*. Mol Oncol, 2008. **2**(3): p. 213-22.
6. Harris, J.R., et al., *Toward a roadmap in global biobanking for health*. Eur J Hum Genet, 2012.
7. Zielhuis, G.A., *Biobanking for epidemiology*. Public Health, 2012. **126**(3): p. 214-6.
8. Inczedy-Farkas, G., et al., *[SCHIZOBANK - The Hungarian national schizophrénia biobank and its role in schizophrénia research and in personalized medicine]*. Orv Hetil, 2010. **151**(35): p. 1403-8.
9. Litton, J.E., *Biobank informatics: connecting genotypes and phenotypes*. Methods Mol Biol, 2011. **675**: p. 343-61.
10. Yuille, M., et al., *The UK DNA banking network: a "fair access" biobank*. Cell Tissue Bank, 2010. **11**(3): p. 241-51.
11. Wichmann, H.E., et al., *Comprehensive catalog of European biobanks*. Nat Biotechnol, 2011. **29**(9): p. 795-7.
12. *P3G Observatory*. 2005 [cited 2012 Agosto].
13. Hewitt, R.E., *Biobanking: the foundation of personalized medicine*. Curr Opin Oncol, 2011. **23**(1): p. 112-9.
14. *2012 Best Practices for Repositories- Collection, Storage, Retrieval, and Distribution of Biological Materials for Research*. 2012, Biopreservation and Biobanking. p. 79-161.
15. NCI, *NCI Best Practice for Specimen Resources*. 2007.
16. Budimir, D., et al., *Ethical aspects of human biobanks: a systematic review*. Croat Med J, 2011. **52**(3): p. 262-79.
17. Alonso, M.A., et al., *Recomendaciones sobre los aspectos éticos de las colecciones de muestras y bancos de materiales humanos con fines de investigación biomédica*. Rev Esp Salud Pública, 2007. **81**(2): p. 95-111.
18. Oliveira, G., *"Estrutura jurídica do acto médico, consentimento informado e responsabilidade médica"*, in *Revista de Legislação e Jurisprudência*. 1992/1993, nº 3815, pag 33-34; nº 3816, pag 72-73; nº 3819, pag 167-170.
19. Salvaterra, E., et al., *Banking together. A unified model of informed consent for biobanking*. EMBO Rep, 2008. **9**(4): p. 307-13.
20. Beskow, L.M., et al., *Developing a simplified consent form for biobanking*. PLoS One, 2010. **5**(10): p. e13302.
21. Hoeyer, K., *Donors perceptions of consent to and feedback from biobank research: time to acknowledge diversity?* Public Health Genomics, 2010. **13**(6): p. 345-52.

22. Artizzu, F., *The informed consent aftermath of the genetic revolution. An Italian example of implementation*. Med Health Care Philos, 2008. **11**(2): p. 181-90.
23. Greely, H.T., *The uneasy ethical and legal underpinnings of large-scale genomic biobanks*. Annu Rev Genomics Hum Genet, 2007. **8**: p. 343-64.
24. Jones, D.A. and C. MacKellar, *Consent for biobank tissue in somatic-cell nuclear transfer*. Lancet, 2009. **374**(9693): p. 861-3.
25. Hansson, M.G., *The need to downregulate: a minimal ethical framework for biobank research*. Methods Mol Biol, 2011. **675**: p. 39-59.
26. Hansson, M.G., *Ethics and biobanks*. Br J Cancer, 2009. **100**(1): p. 8-12.
27. Hansson, M.G., et al., *Should donors be allowed to give broad consent to future biobank research?* Lancet Oncol, 2006. **7**(3): p. 266-9.
28. Chalmers, D., *Genetic research and biobanks*. Methods Mol Biol, 2011. **675**: p. 1-37.
29. Knoppers, B.M., *Biobanks: simplifying consent*. Nat Rev Genet, 2004. **5**(7): p. 485.
30. Petrini, C., *A bibliography concerning informed consent and biobanking: documents from national and international bodies*. J Int Bioethique, 2009. **20**(3): p. 97-105, 151-2.
31. Shickle, D., *The consent problem within DNA biobanks*. Stud Hist Philos Biol Biomed Sci, 2006. **37**(3): p. 503-19.
32. Clayton, E.W., *Informed consent and biobanks*. J Law Med Ethics, 2005. **33**(1): p. 15-21.
33. Maschke, K.J., *Navigating an ethical patchwork--human gene banks*. Nat Biotechnol, 2005. **23**(5): p. 539-45.
34. Knoppers, B.M., *Biobanking: international norms*. J Law Med Ethics, 2005. **33**(1): p. 7-14.
35. Cambon-Thomsen, A., *The social and ethical issues of post-genomic human biobanks*. Nat Rev Genet, 2004. **5**(11): p. 866-73.
36. Roden, D.M., et al., *Development of a large-scale de-identified DNA biobank to enable personalized medicine*. Clin Pharmacol Ther, 2008. **84**(3): p. 362-9.
37. *Lei nº 67/98 "Lei da protecção de dados pessoais"*, in DR I Série A. 26 de Outubro de 1998. p. 5536-5546,.
38. Guideline, I.H.t., *Definitions for genomics biomarkers, pharmacogenomics, pharmacogenetics, genomic data and sample coding categories*. E15, 2007. vol. 73 The US Federal Register 2008: p. 19074-19076.
39. Hansson, M.G., *Combining efficiency and concerns about integrity when using human biobanks*. Stud Hist Philos Biol Biomed Sci, 2006. **37**(3): p. 520-32.
40. Simon, J. and J. Robiński, *Property, personality rights and data protection with regard to biobanks--a layered system*. J Int Bioethique, 2009. **20**(3): p. 47-56.
41. Simon, J. and J. Robiński, *Framework for setting up and operating biobanks*. J Int Bioethique, 2009. **20**(3): p. 17-46, 145.
42. Engels, E.M., *Biobanks as basis for personalised nutrition? Mapping the ethical issues*. Genes Nutr, 2007. **2**(1): p. 59-62.
43. Yassin, R., et al., *Custodianship as an ethical framework for biospecimen-based research*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2010. **19**(4): p. 1012-5.

44. Capron, A.M., et al., *Ethical norms and the international governance of genetic databases and biobanks: findings from an international study*. Kennedy Inst Ethics J, 2009. **19**(2): p. 101-24.
45. O'Brien, S.J., *Stewardship of human biospecimens, DNA, genotype, and clinical data in the GWAS era*. Annu Rev Genomics Hum Genet, 2009. **10**: p. 193-209.
46. Murphy, J., et al., *Public expectations for return of results from large-cohort genetic research*. Am J Bioeth, 2008. **8**(11): p. 36-43.
47. Cambon-Thomsen, A., E. Rial-Sebbag, and B.M. Knoppers, *Trends in ethical and legal frameworks for the use of human biobanks*. Eur Respir J, 2007. **30**(2): p. 373-82.
48. Ross, L.F., *Ethical and policy issues in pediatric genetics*. Am J Med Genet C Semin Med Genet, 2008. **148C**(1): p. 1-7.
49. Avard, D., et al., *Researchers' perceptions of the ethical implications of pharmacogenomics research with children*. Public Health Genomics, 2009. **12**(3): p. 191-201.
50. Kaiser, J., *Genetics. U.S. hospital launches large biobank of children's DNA*. Science, 2006. **312**(5780): p. 1584-5.
51. Merlo, D.F., et al., *Ethics in studies on children and environmental health*. J Med Ethics, 2007. **33**(7): p. 408-13.
52. Hens, K., E. Levesque, and K. Dierickx, *Children and biobanks: a review of the ethical and legal discussion*. Hum Genet, 2011. **130**(3): p. 403-13.
53. *Decreto-Lei n.º 496/77 in Ministério da Justiça 25 de Novembro*.
54. Davidson, A.J. and M. O'Brien, *Ethics and medical research in children*. Paediatr Anaesth, 2009. **19**(10): p. 994-1004.
55. Kaufman, D., et al., *Ethical implications of including children in a large biobank for genetic-epidemiologic research: a qualitative study of public opinion*. Am J Med Genet C Semin Med Genet, 2008. **148C**(1): p. 31-9.
56. Molnar, M.J. and P. Bencsik, *Establishing a neurological-psychiatric biobank: banking, informatics, ethics*. Cell Immunol, 2006. **244**(2): p. 101-4.
57. Joly, Y. and B.M. Knoppers, *Pharmacogenomic data sample collection and storage: ethical issues and policy approaches*. Pharmacogenomics, 2006. **7**(2): p. 219-26.
58. Andrews, L.B., *Harnessing the benefits of biobanks*. J Law Med Ethics, 2005. **33**(1): p. 22-30.
59. Kaufman, D.J., et al., *Public opinion about the importance of privacy in biobank research*. Am J Hum Genet, 2009. **85**(5): p. 643-54.
60. *OECD Best Practice Guidelines for Biological Resource Centers*. 2007, (online) <http://www.oecd.org/dataoecd/7/13/38777417.pdf>: Paris.
61. Betsou, F., et al., *Compiled Standard model for Biobanks, based on ISO/IEC 17025, OECD, REC(2006), ISBER, NCI, ISO Guide 34*. Quality Assurance Journal, 2008.
62. Caboux, E., A. Plymoth, and P. Hainaut, *Common minimum technical standards and protocols for biological resource centres dedicated to cancer research*. IARC, 2007.
63. Eder, J., et al., *Data Management for Federated Biobanks*. Lecture Notes in Computer Science, 2009. **5690/2009**: p. 184-195.
64. *NCI Best Practices for Biospecimen Resources*. 2011.

65. Vegvari, A., et al., *Biobank resources for future patient care: developments, principles and concepts*. J Clin Bioinforma, 2011. **1**(1): p. 24.
66. Tuck, M.K., et al., *Standard operating procedures for serum and plasma collection: early detection research network consensus statement standard operating procedure integration working group*. J Proteome Res, 2009. **8**(1): p. 113-7.
67. McLerran, D., et al., *Analytical validation of serum proteomic profiling for diagnosis of prostate cancer: sources of sample bias*. Clin Chem, 2008. **54**(1): p. 44-52.
68. Rai, A.J., et al., *HUPO Plasma Proteome Project specimen collection and handling: towards the standardization of parameters for plasma proteome samples*. Proteomics, 2005. **5**(13): p. 3262-77.
69. Elliott, P. and T.C. Peakman, *The UK Biobank sample handling and storage protocol for the collection, processing and archiving of human blood and urine*. Int J Epidemiol, 2008. **37**(2): p. 234-44.
70. Komaromy-Hiller, G., K.L. Nuttall, and E.R. Ashwood, *Effect of storage on serum vitamin B12 and folate stability*. Ann Clin Lab Sci, 1997. **27**(4): p. 249-53.
71. Baker, M., *Biorepositories: Building better biobanks*. Nature, 2012. **486**(7401): p. 141-6.
72. WHO, *Guidance on regulations for the transport of Infectious substances 2011-2012*. 2010.
73. Grizzle, W.E., et al., *the need for review and understanding of SELDI/MALDI mass spectroscopy data prior to analysis*. Cancer Inform, 2005. **1**: p. 86-97.
74. Barros, E., et al., *Nefrolitíase*, in *Nefrologia Rotinas, Diagnóstico e Tratamento.*, E. Barros, et al., Editors. 1999, ArtMed: São Paulo. p. 375-388.
75. Stamatiou, K.N., et al., *Prevalence of urolithiasis in rural Thebes, Greece*. Rural Remote Health, 2006. **6**(4): p. 610.
76. Reis-Santos, J.M., *The epidemiology of stone disease in Portugal.*, in *Renal Stone Disease - Proceedings of the 7th European Symposium on Urolithiasis.*, J.P.D. P, Editor. 1997, Elsevier: Paris.
77. Romero, V., H. Akpınar, and D.G. Assimos, *Kidney stones: a global picture of prevalence, incidence, and associated risk factors*. Rev Urol, 2010. **12**(2-3): p. e86-96.
78. Johri, N., et al., *An update and practical guide to renal stone management*. Nephron Clin Pract, 2010. **116**(3): p. c159-71.
79. Agarwal, M.M., et al., *Preventive fluid and dietary therapy for urolithiasis: An appraisal of strength, controversies and lacunae of current literature*. Indian J Urol, 2011. **27**(3): p. 310-9.
80. Parmar, M.S., *Kidney stones*. BMJ, 2004. **328**(7453): p. 1420-4.
81. Barata, H.S., *Litíase urinária: etiologia, investigação metabólica e tratamento clínico*, in *Urologia Princípios e Prática*, H.S. Barata and G.F. Carvalhal, Editors. 1999, Artes Médicas Sul: Porto Alegre. p. 539-555.
82. Atan, L., et al., *High kidney stone risk in men working in steel industry at hot temperatures*. Urology, 2005. **65**(5): p. 858-61.
83. Lopez, M. and B. Hoppe, *History, epidemiology and regional diversities of urolithiasis*. Pediatr Nephrol, 2010. **25**(1): p. 49-59.
84. Grases, F., A. Costa-Bauza, and R.M. Prieto, *Renal lithiasis and nutrition*. Nutr J, 2006. **5**: p. 23.

85. Robertson, W.G., M. Peacock, and A. Hodgkinson, *Dietary changes and the incidence of urinary calculi in the U.K. between 1958 and 1976*. J Chronic Dis, 1979. **32**(6): p. 469-76.
86. Larsson, L. and H.G. Tiselius, *Hyperoxaluria*. Miner Electrolyte Metab, 1987. **13**(4): p. 242-50.
87. Muldowney, F.P., R. Freaney, and M.F. Moloney, *Importance of dietary sodium in the hypercalciuria syndrome*. Kidney Int, 1982. **22**(3): p. 292-6.
88. Curhan, G.C., et al., *Comparison of dietary calcium with supplemental calcium and other nutrients as factors affecting the risk for kidney stones in women*. Ann Intern Med, 1997. **126**(7): p. 497-504.
89. Taylor, E.N. and G.C. Curhan, *Fructose consumption and the risk of kidney stones*. Kidney Int, 2008. **73**(2): p. 207-12.
90. Reungjui, S., et al., *Magnesium status of patients with renal stones and its effect on urinary citrate excretion*. BJU Int, 2002. **90**(7): p. 635-9.
91. Lemann, J., Jr., et al., *Potassium administration reduces and potassium deprivation increases urinary calcium excretion in healthy adults [corrected]*. Kidney Int, 1991. **39**(5): p. 973-83.
92. Koyuncu, H.H., et al., *Family history in stone disease: how important is it for the onset of the disease and the incidence of recurrence?* Urol Res, 2010. **38**(2): p. 105-9.
93. Griffin, D.G., *A review of the heritability of idiopathic nephrolithiasis*. J Clin Pathol, 2004. **57**(8): p. 793-6.
94. D'Angelo, A., et al., *Calcitropic hormones and nephrolithiasis*. Miner Electrolyte Metab, 1997. **23**(3-6): p. 269-72.
95. Taylor, E.N., M.J. Stampfer, and G.C. Curhan, *Obesity, weight gain, and the risk of kidney stones*. JAMA, 2005. **293**(4): p. 455-62.
96. Kramer, H.J., et al., *The association between gout and nephrolithiasis in men: The Health Professionals' Follow-Up Study*. Kidney Int, 2003. **64**(3): p. 1022-6.
97. Taylor, E.N., M.J. Stampfer, and G.C. Curhan, *Diabetes mellitus and the risk of nephrolithiasis*. Kidney Int, 2005. **68**(3): p. 1230-5.
98. Sayer, J.A., *The genetics of nephrolithiasis*. Nephron Exp Nephrol, 2008. **110**(2): p. e37-43.
99. Kaufman, D.W., et al., *Oxalobacter formigenes may reduce the risk of calcium oxalate kidney stones*. J Am Soc Nephrol, 2008. **19**(6): p. 1197-203.
100. Sidhu, H., et al., *Absence of Oxalobacter formigenes in cystic fibrosis patients: a risk factor for hyperoxaluria*. Lancet, 1998. **352**(9133): p. 1026-9.
101. Vaught, J.B., *Biorepository and biospecimen science: a new focus for CEBP*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2006. **15**(9): p. 1572-3.