

TÍTULO: CONSERVACIÓN TEJIDO PULMONAR EN CONGELACIÓN RÁPIDA		
ARCHIVADO: PNT_8.2.004_v1.2_ES_TEJIDO_PULMONAR_CONGELACION_RAPI DA	Nº DE CÓDIGO: 8.2.003	
VERSIÓN: 1.2	FECHA DE EDICIÓN: 09/08/2016	PÁG. 1 DE 3

REVISADO POR: Laura Vidaña, Estefanía Piñero y Daniel Pons FECHA: 09/08/2016	FIRMA:
APROBADO POR: Cristina Villena FECHA: 09/08/2016	FIRMA:

1. OBJETIVO

Las muestras de tejido son recogidas del excedente del descarte quirúrgico de pacientes que han consentido y están de acuerdo en participar en la Plataforma Bio BANCO Pulmonar.

Las colecciones de tejido fresco congelado son un valioso recurso para la investigación. Las muestras de tejido son sólo aptas para estudios proteómicos y genómicos si han sido congeladas adecuadamente. El propósito de este documento es normalizar el procedimiento de congelación en la Plataforma Bio BANCO Pulmonar.

2. ALCANCE

Este procedimiento describe la manera de congelar rápidamente el tejido pulmonar. Este PNT no detalla los procesos para la seguridad e higiene laboral sobre materiales de riesgo biológico y/o productos químicos, y se recomienda que el personal siga las normas de Seguridad e Higiene establecidas en cada centro.

3. DOCUMENTACIÓN RELACIONADA

PNT_8.2.001_Recogida y transporte Tejido Pulmonar.doc
PNT_8.1.001_Etiquetado y Trazabilidad.doc

4. FUNCIONES Y RESPONSABILIDADES

El cumplimiento de este PNT recae sobre todos los miembros de la Plataforma Bio BANCO Pulmonar que son responsables de la congelación rápida del *tejido pulmonar fresco*.

5. MATERIAL Y EQUIPO

Los materiales, equipos y formas que se enumeran en la siguiente lista son sólo recomendaciones y pueden ser sustituidos por alternativas o productos equivalentes más adecuados para el lugar dónde se realiza la tarea o procedimiento.

Materiales y Equipos	Materiales y Equipos (específicos de centro)
Contenedor para transporte de nitrógeno líquido	
Nitrógeno líquido	
2-metilbutano (isopentano)	
Contenedor para isopentano (baño maría en N ₂ líquido o nieve carbónica)	Histobath o equivalente
Tubos 50 ml (o mín. de 10 ml)	
Criotubos 1,5 – 2 ml resistentes exposición N ₂ líquido y almacenaje final	
Papel de filtro para secado	
Recipiente adecuado para el tejido resecado (Placas Petri)	
Marcadores y bolígrafos	
Pinzas estériles	
Solución salina o PBS en frío (4°C) para el lavado de los fragmentos	

TÍTULO: CONGELACIÓN RÁPIDA DEL TEJIDO PULMONAR**ARCHIVADO:**

PNT_8.2.004_v1.2_ES_TEJIDO_PULMONAR_CONGELACION_RAPIDA

Nº DE CÓDIGO: 8.2.004

de tejido	
Tijeras para cortar el tejido	
Gradillas para criotubos y tubos 50ml (o 10ml)	
Guantes para proteger al personal de manipulación de tejidos	
Etiquetas suficientes y adecuadas para tubos de recogida	
Máscara de protección frente salpicaduras	
Bata de protección frente derrames y salpicaduras	
Máscara de protección para manejo de N ₂ líquido	
Guantes protección para manejo de N ₂ líquido	

6. DEFINICIONES

Crioconservación: Proceso de conservación de material biológico a muy bajas temperaturas por un periodo prolongado de tiempo.

7. PROCEDIMIENTOS

Este procedimiento tiene por objeto garantizar que las muestras de tejidos recogidas de pacientes que han consentido se conservaran de manera segura, oportuna y eficiente, evitando riesgos de contaminación y pérdida de integridad molecular. Para llevar a cabo técnicas genómicas y proteómicas es de vital importancia que el proceso de conservación de las muestras sea óptimo, garantizando así la calidad e integridad de éstas.

7.1 CONGELACIÓN INMEDIATA DEL TEJIDO PULMONAR

1. Tratar el tejido como potencialmente infeccioso.
2. La congelación se llevará a cabo por el técnico de laboratorio o la persona entrenada para ello nombrada por el responsable de cada uno de los nodos de la Plataforma Biobanco Pulmonar.
3. Tener los criotubos etiquetados y preparar todo el material y equipos antes del aviso desde quirófano.
4. A menos de poder ser congelado inmediatamente, el tejido debería ser *procesado* dentro de los 30 minutos desde su resección. *Para asegurar dicho tiempo se realizará un registro manual o digital.*
5. *En el caso de que el tiempo transcurrido entre la resección del tejido pulmonar y el inicio de su conservación sea superior a 30 minutos, se anotará como "Incidencia" en la información asociada a dicha muestra o en el campo "observaciones". Si el tiempo es superior a 40 minutos no deberá recogerse tejido según este protocolo.*
6. No colocar el tejido directamente en el hielo.
7. Asegurarse que el tejido seccionado no se seque ni se contamine por contacto con otros tejidos o muestras. Utilizar pinzas y bisturís limpios y estériles. Evitar contaminaciones cruzadas entre muestras o entre zona tumoral y tejido normal.
8. El tejido congelado directamente es apto para la obtención de ADN, ARN y proteínas. No colocar la muestra en contacto con formol en ningún momento. No añadir suero en el proceso.
9. Colocar el tejido en PBS o solución salina pre-enfriada a 4°C en un recipiente estéril de unos 50 ml.
10. Lavar 3 veces en PBS o salino pre-enfriado en agitación 3-4 minutos o estático durante 10 minutos.
11. Secar ligeramente en papel de filtro.
12. Con ayuda de una tijera, fraccionar la pieza para obtener fragmentos de 0,3 x 0,3 x 0,3 cm.
13. Enfriar el isopentano suspendiendo su contenedor en nitrógeno líquido o nieve carbónica. El isopentano estará suficientemente frío cuando aparezcan formas de perlas y la solución adquiera un aspecto denso y un *color blanco*.
14. Con unas pinzas estériles colocar 1-3 fragmentos suficientemente separados en la pared de un criotubo de 1,5-2 ml con tampón de rosca.
NOTA: Si se colocan varios fragmentos en un mismo criotubo, cerciorarse que no se aglutinen en el fondo del criotubo.
15. Cerrar los criotubos y sumergirlos en el isopentano frío hasta su congelación (en 30 segundos debería ser suficiente).

16. Alternativamente a la congelación con isopentano, el criotubo con la muestra puede ser congelado sumergiéndolo inmediatamente en nitrógeno líquido. El espécimen debería estar congelado en 30-60 segundos. Esta alternativa no está recomendada si la muestra es grande pues necesita más tiempo y resultaría en una pérdida morfológica.
17. Una vez congelada, transferir la muestra a un congelador de -80°C. Para el transporte utilizar nitrógeno líquido o nieve carbónica.
18. Registrar la ubicación de la muestra guardada en el software de la Plataforma Biobanco Pulmonar.

8. REFERENCIAS, REGLAMENTOS Y DIRECTRICES APLICABLES

1. Declaration of Helsinki. <http://ohsr.od.nih.gov/helsinki.php3>
<http://www.wma.net/e/policy/b3.htm>
2. International Conference on Harmonisation (ICH) Good Clinical Practice (GCP) Guidelines, section 4.8. <http://www.ich.org>
http://www.ich.org/UrlGrpServer.jsr?@_ID=276&@_TEMPLATE=254
3. Meslin, E. and Quaid, K. Ethical issues in the collection, storage, and research use of human biological materials. J Lab Clin Med. 2004;144:229-34
4. Recommendation Rec (2006) 4 of the Committee of Ministers to member states on research on biological materials of human origin. 15-03-2006.
5. Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de protección de datos de carácter personal. BOE 298, de 14-12-1999.
6. Ley 41/2002, de 14 de noviembre, básica reguladora de la autonomía del paciente y de derechos y obligaciones en materia de información y documentación clínica. BOE 274, de 15-11-2002.
7. Ley 14/2007, de 3 de julio, de investigación biomédica. BOE 159, de 04-07-2007.
8. Código de Nuremberg. 1946.
9. Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial. Principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos. Iniciada: 1964.
10. Informe Belmont. Principios éticos y recomendaciones para la protección de las personas objeto de la experimentación. Comisión Nacional para la Protección de Personas Objeto de la Experimentación Biomédica y de la Conducta (EEUU).
11. Ding, L., et al. A Lung Tissue Bank for Gene Expresión Studies in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. COPD 2004;1(2):191-204.
12. Micke, P., et al. Biobanking of fresh frozen tissue: RNA is stable in nonfixed surgical specimens. Laboratory Investigation 2006; 86:202-211.
13. Sarriá, B., et al. Functional, biochemical and morphological studies on human bronchi after cryopreservation. Br J Pharmacol 1995;116:2569-2574.