

LA BANCA BIOLOGICA DEL REGISTRO NAZIONALE GEMELLI



Virgilia Toccaceli, Lorenza Nisticò, Cristina D'Ippolito, Rodolfo Cotichini,
Miriam Salemi e Maria Antonietta Stazi
Centro Nazionale di Epidemiologia, Sorveglianza e Promozione della Salute, ISS

RIASSUNTO - La Banca biologica del Registro Nazionale Gemelli è attiva presso il Reparto di Epidemiologia genetica del Centro Nazionale di Epidemiologia, Sorveglianza e Promozione della Salute dell'Istituto Superiore di Sanità, come risorsa strategica per la ricerca eziologica in campo biomedico. La Banca conserva materiale biologico (sangue, globuli bianchi, siero, plasma e DNA) e relative informazioni di salute e di stili di vita di gemelli (e non) donatori di varie età, residenti in Italia. La raccolta avviene attraverso progetti di ricerca e raduni territoriali di gemelli. La Banca attualmente conserva, nel rispetto della normativa e delle raccomandazioni etiche, campioni di oltre 1.200 individui.

Parole chiave: banca biologica, epidemiologia genetica, gemelli

SUMMARY (*The Italian Twin Registry Biobank*) - The Genetic Epidemiology Unit of the National Centre for Epidemiology, Surveillance and Health Promotion of the Istituto Superiore di Sanità has established the Biobank of the Italian Twin Registry as a strategic resource for biomedical research. The Biobank is an organized collection of donated biological material (blood, buffy coat, serum, plasma and DNA) connected to health, life-style, biological and genetic data, provided by twins (and singletons) of different ages, resident in Italy. The collection is organized through various research projects as well as "Twin day" events. The Biobank governance follows legal and ethical requirements and 1,200 specimens are presently stored.

Key words: biological repository, genetic epidemiology, twins

virgilia.toccaceli@iss.it

Negli ultimi decenni il materiale biologico umano (cellule, tessuti, DNA) è divenuto una risorsa fondamentale per la ricerca biomedica (1, 2). Nel contesto del velocissimo sviluppo delle biotecnologie, le banche biologiche, che per definizione collezionano materiale biologico e i relativi dati clinici ed epidemiologici, costituiscono un prezioso strumento per gli avanzamenti delle conoscenze, in particolare nel settore della genetica e dell'epidemiologia.

Con i progressi della genomica, infatti, la ricerca si è ampliata dallo studio delle malattie monogeniche alle malattie multifattoriali. La comprensione eziologica delle malattie multifattoriali rappresenta una sfida complessa poiché il processo causale di queste patologie coinvolge un ampio numero di fattori, tra

loro a volte semplicemente additivi a volte sinergici, quali suscettibilità genetica, stili di vita e influenze ambientali. In questo scenario la Banca biologica si rivela una risorsa strategica sia per indagare le basi molecolari di numerose patologie sia per valutare la proporzione del ruolo svolto da alcuni polimorfismi genetici e dall'ambiente (3) nell'insorgenza, ad esempio, del diabete, dell'obesità, delle malattie cardiovascolari e delle malattie neurologiche. È verosimile pensare che il miglioramento delle conoscenze sulle cause di malattie comuni a etiologia complessa possa condurre alla messa a punto di nuovi trattamenti, alla riduzione dei loro effetti indesiderati e, dove possibile, a una prevenzione più mirata, contribuendo a realizzare una finalità primaria quale la tutela della salute pubblica. ▶

La comprensione delle complesse interazioni che sottendono ai tre grandi gruppi di fattori (genetici, ambientali e di stili di vita) dipenderà sempre più dallo studio di vasti insiemi di documentate e aggiornate informazioni cliniche, biologiche e molecolari e dall'analisi di ampie collezioni di campioni provenienti sia da pazienti sia da soggetti sani.

Processi standardizzati e controllati di raccolta, lavorazione, immagazzinamento, fornitura di campioni e dei relativi dati di salute sono il "valore aggiunto" che le banche biologiche possono offrire alla ricerca scientifica.

Il vasto spettro di collezioni oggi esistenti viene considerato un elemento di forza della ricerca e dell'industria in Europa (4), anche se occorre considerare la mancanza di un generalizzato consenso, sia a livello nazionale sia internazionale, sulle regole che, da un punto di vista etico e soprattutto legale (5), devono presiedere al governo di questi complessi strumenti. Nel nostro Paese, come in altri del mondo occidentale, non c'è ancora una normativa completa ed esaustiva né un consenso unanime che uniformi l'istituzione e il funzionamento delle banche biologiche per la ricerca; in Italia assistiamo, su questi temi, all'intenso lavoro del Comitato Nazionale per la Biosicurezza, le Biotecnologie e le Scienze della Vita, che si concretizza nella produzione di linee guida a supporto delle attività di ricerca che prevedono la raccolta e lo sfruttamento di queste collezioni (6).

Il Progetto Banca biologica e le strategie in atto

La costituzione della Banca biologica del Registro Nazionale Gemelli presso il Centro Nazionale di Epidemiologia, Sorveglianza e Promozione della Salute (CNESPS) dell'Istituto Superiore di Sanità (ISS) è stata avviata nel 2006 nell'ambito del progetto EuroClot (Genetic regulation of the end-stage clotting process that leads to thrombotic stroke), 6° Programma Quadro di Ricerca e Sviluppo Tecnologico dell'Unione Europea, dopo essere stata sottoposta al parere preventivo del Comitato Etico dell'ISS.

Per la complessità organizzativa tecnico-scientifica ed etico-legale, la Banca costituisce un vero e proprio progetto che richiede tempi e fasi di attuazione diversi e vede impegnate tutte le professionalità operanti nel Reparto di Epidemiologia genetica del CNESPS.

Infatti, gli studi epidemiologici - prospettici o caso-controllo - richiedono strategie di lungo periodo che danno ragione dell'allestimento di collezioni strutturate e permanenti. La raccolta, l'immagazzinamento, la conservazione in forma "anonimizzata reversibile" e l'uso di materiale biologico e dei dati connessi necessitano di "centralizzazione" sia da un punto di vista tecnico-scientifico sia etico-legale.

Il progetto prevede l'arruolamento di soggetti volontari con la raccolta di sangue e/o saliva (conservazione del materiale derivato: plasma, sieri, globuli bianchi e DNA) e di informazioni sullo stato di salute e gli stili di vita, generalmente fuori da ambiti clinici ma non esclusivamente.

Nel medio termine, la Banca permetterà di realizzare nuovi studi con un notevolissimo risparmio dei tempi tecnici di reclutamento, anche con il contributo di gruppi di ricerca esterni all'Istituto, favorendo un sensibile incremento della disponibilità in termini numerici e qualitativi di campioni e di dati a essi correlati. Studi caso-controllo annidati nella coorte degli arruolati potranno giovare di una notevole riduzione dei tempi tecnici che arruolamenti *ex novo* e raccolte prospettiche di campioni richiedono normalmente.

I risultati delle analisi del DNA e di altri parametri biologici indicati nei protocolli, insieme all'analisi dei dati clinici e degli stili di vita, contribuiranno a fornire risposte scientifiche sulle relazioni tra le nostre caratteristiche biologiche, sia normali sia patologiche, e i nostri geni, gli stili di vita e l'ambiente in cui viviamo.

Il materiale biologico viene immagazzinato negli appositi locali del CNESPS che, nel febbraio 2005, ha inaugurato la nuova sede per lo stoccaggio dei campioni. Infatti, già dagli anni '90, il Reparto di Malattie cerebro e cardiovascolari aveva iniziato con lungimiranza varie raccolte nell'ambito degli studi longitudinali, costituendo il *core* dell'attuale Banca.

L'accesso ai locali della Banca è regolato da chiave elettronica. Sieri, plasma, globuli bianchi, sangue intero e DNA sono immagazzinati in contenitori di azoto liquido (Figura 1) e in congelatori a -80 °C o a -20 °C (Figura 2). La presenza di telecamere a circuito chiuso garantisce il controllo degli operatori e la salvaguardia per fuoriuscite accidentali di azoto. I campioni sono mappati da un software che ne permette la localizzazione e il riconoscimento. Il personale autorizzato può



Figura 1 - Contenitori di azoto liquido nella Banca biologica del CNESPS, ISS

collegarsi da remoto, tramite password, e operare sui contenitori, sui sistemi di allarme e sul funzionamento degli impianti.

Attualmente, la Banca biologica del Registro conserva materiale raccolto da 1.200 persone gemelle e non, di varie fasce di età, residenti in diverse aree geografiche del Paese, che hanno donato partecipando a vari progetti di ricerca. Tra i progetti di maggior rilievo, il Progetto internazionale EuroClot, che nel 2006 ha raccolto sangue intero (in gran parte separato in DNA, globuli bianchi, siero e plasma) di 248 gemelli per lo studio dei fattori di rischio cardiovascolare per l'ictus; il Progetto internazionale GEHA (GEnetics of Healthy Ageing), che dal 2004 ha raccolto sangue intero e tamponi buccali di saliva da 297 persone fra coppie di gemelli o fratelli ultranovantenni e da individui (controlli) non parenti dei soggetti longevi di età compresa tra i 50 e i 70 anni, per un totale di circa 1.400 campioni immagazzinati di siero, globuli bianchi e sangue.

Nell'ambito dello studio italiano multicentrico "Diabete tipo 1 nei gemelli", in collaborazione con la Società Italiana di Endocrinologia e Diabetologia Pediatrica (SIEDP), nel 2008 sono stati raccolti campioni di saliva da 41 coppie di gemelli, di cui almeno un gemello affetto da diabete tipo 1 insorto in età pediatrica; la raccolta è ancora in corso.

Uno studio sulla funzionalità tendinea della spalla e fattori genetici, condotto in collaborazione con la Clinica Ortopedica dell'Università Sapienza di Roma,



Figura 2 - Congelatori a -80 °C nella Banca biologica del CNESPS, ISS

ha permesso nel 2008 l'arruolamento di 29 coppie di gemelli ultracinquantenni residenti a Roma; tutti i 58 gemelli hanno donato un campione di saliva per la conservazione del DNA nella Banca biologica.

È in corso una vasta raccolta di materiale biologico presso mamme di gemelli con meno di 5 anni, nell'ambito dello studio "Acido folico e gravidanze gemellari", avviato nel 2007, che intende verificare l'eventuale ruolo dell'acido folico, assunto prima del concepimento e durante la prima fase della gravidanza, nell'instaurarsi di gravidanze gemellari. Sono stati raccolti 174 campioni di saliva e questo studio, a oggi, rappresenta insieme al progetto GEHA la più ampia "apertura" della Banca a collezioni e obiettivi che riguardano anche altri gruppi di popolazione oltre quella gemellare.

Il Registro ha coniato uno slogan rivelatosi molto efficace nell'incontrare la sensibilità della popolazione gemellare italiana: "Fai crescere la Ricerca... il tuo DNA mettilo in Banca!" e dal 2008, nell'ambito dell'attività di arruolamento continuo (7), ha diffuso questo messaggio per una campagna di raccolta della saliva tramite invio postale. È stato fornito ampio materiale informativo sul progetto Banca biologica e sui diritti dei donatori, insieme a un semplice kit di auto-raccolta (Oragene Kit) che ha mostrato una buona performance anche per la resa di DNA estratto (Figura 3). A fine 2008 sono già state raccolte, a fronte di più di 1.500 richieste di donazioni, 266 campioni di saliva tra giovani gemelli italiani delle corti di nascita 1983 e 1984. ►



Figura 3 - Kit per la collezione di saliva per via postale

Tra le iniziative per implementare la Banca biologica, di notevole rilievo si sono dimostrati i raduni che il Registro Nazionale Gemelli promuove in varie città italiane, con il contributo operativo dell'AVIS (Associazione Volontari Italiani Sangue) e degli enti locali quali Comuni e Provincie. Gli obiettivi principali che questi raduni si prefiggono sono la divulgazione delle ricerche scientifiche sui gemelli e dei loro risultati e la cultura della donazione di sangue a fini sia solidaristici trasfusionali sia di ricerca. I gemelli di ogni fascia d'età e i loro accompagnatori vengono sensibilizzati a questi argomenti, promuovendo la loro partecipazione attiva ai progetti di studio in corso. Oltre, quindi, all'iscrizione al Registro, alla raccolta di informazioni con questionari sugli stili di vita e le abitudini dei gemelli, si chiede loro la donazione di saliva con il kit per l'auto-raccolta. Viene proposta anche una donazione di sangue che rimanda, in questo caso, a tempi successivi presso le sedi AVIS locali. I raduni, finora realizzati dall'autunno 2007 a marzo 2009, si sono svolti con successo a Ferrara, Pisa, Reggio Calabria, Porto Recanati (Figura 4), Brescia; più di 200 gemelli di tutte le età hanno scelto di donare un campione di saliva da cui è stato estratto il DNA, ora conservato nella Banca biologica del Registro.

Gli aspetti di governance etico-legale

L'avvio e la conduzione del progetto Banca biologica si conforma alle linee guida, ai principi e alle raccomandazioni etiche definite da organismi internazionali quali la World Medical Association (8), l'UNESCO (9), il Consiglio d'Europa (10) e la Human Genome Organization (11). In particolare, per quanto riguarda il consenso informato dei partecipanti, la Banca del Registro Gemelli ha operato la scelta cautelativa, già espressa dal Consiglio d'Europa (10), di rimandare a un rinnovo del consenso per l'uso dei campioni in ricerche non definite al momento della raccolta, promuovendo, quindi, il rispetto della dignità degli individui partecipanti e della loro autonomia di scelta consapevole accanto alle necessità della ricerca epidemiologica. Gli studi condotti dal Reparto, e in particolare quelli che prevedono l'uso di materiale biologico, sono previamente sottoposti al vaglio del Comitato Etico dell'ISS.

I contatti con i partecipanti agli studi e ogni operazione che riguardi i campioni biologici e i dati correlati si realizza nel rispetto delle disposizioni legali sul trattamento dei dati personali e in particolare, sul trattamento dei dati genetici (12, 13). Attualmente, in attesa di un'eventuale evoluzione



Figura 4 - Donazione di saliva, raduno dei gemelli a Porto Recanati, 20 luglio 2008

della normativa, nessun campione immagazzinato nella Banca può essere utilizzato senza il consenso studio-specifico del donatore e i campioni non possono essere commercializzati, né utilizzati con finalità di lucro.

I dati personali dei donatori vengono conservati nel rispetto delle norme di sicurezza per gli archivi informatici e cartacei, dettate dal DLvo 196/03 e dal Codice Deontologico e di buona condotta per i trattamenti di dati personali per scopi statistici e scientifici (2004). I dati identificativi dei donatori sono separati dai campioni ai quali viene assegnato un codice alfanumerico e il trattamento è avviato solo dopo l'espletamento delle procedure di consenso informato anche a fini legali. Il collegamento tra i codici e i dati identificativi dei partecipanti avviene solo per motivate ragioni di tipo tecnico-scientifico, a opera del personale addetto ed espressamente autorizzato.

I campioni biologici vengono conservati per un periodo di 15 anni; ogni partecipante ha facoltà di esercitare il diritto di recesso dalla Banca in qualsiasi momento, inviando una richiesta scritta al suo Responsabile, chiedere la distruzione del proprio campione biologico o la sua completa anonimizzazione (per cui diverrà impossibile collegare il materiale biologico a una specifica persona). Tutti i dati personali e sensibili collegati al campione biologico vengono a loro volta cancellati o resi completamente anonimi.

Da uno studio pilota recentemente condotto dal Registro Gemelli emerge un'evidenza degna di ulteriori approfondimenti: i giovani gemelli italiani sembrano avere una propensione alla donazione per la ricerca improntata molto più a una visione pragmatica che non a una esclusivamente morale. "Noi contribuiamo alla ricerca donando un campione biologico, i ricercatori contribuiscano con la loro *expertise* al raggiungimento degli obiettivi" sembra l'idea di fondo prevalente; si tratta di una riflessione certamente preliminare ma di sicuro interesse per le future politiche di governo della ricerca. Un filone di ricerca etico-sociologica è attivo presso il Registro Nazionale Gemelli per indagare opinioni, desideri e preoccupazioni della popolazione gemellare ma anche della popolazione generale che, oggi più che mai, si rivela indispensabile per il progresso delle conoscenze nel settore biomedico. ■

Riferimenti bibliografici

1. Godard B, Schmidtke J, Cassima JJ, *et al.* Data storage and DNA banking for biomedical research: informed consent, confidentiality, quality issues, ownership, return of benefits. A professional perspective. *Eur J Human Genetics* 2003;11(suppl. 2):88-122.
2. IDC. Biobanks: accelerating molecular medicine. Challenges facing the global biobanking community. Special study n. 4296. IDC: Framingham, MA, USA;2004.
3. Carter AM, Cymbalista CM, Spector TD, *et al.* Heritability of Clot Formation, Morphology and Lysis. The EuroCLOT Study. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* 2007;27(12):2783-9.
4. Zatloukal K, Yuille M. Information on the proposal for European research infrastructure. European Bio-banking and Biomolecular Resources (BBMRI). February 5, 2007.
5. Cambon-Thomsen A, Rial-Sebbag E, Knoppers BM. Trend in ethical and legal frameworks for the use of human biobanks. *Eur Respir J* 2007;30:373-82.
6. Presidenza Consiglio dei Ministri. Comitato Nazionale per la Biosicurezza e le Biotecnologie. *Linee guida per l'istituzione e l'accreditamento delle biobanche. Rapporto del Gruppo di lavoro.* 19 aprile 2006.
7. Patriarca V, Fagnani C, Di Lonardo A, *et al.* *Registro Nazionale Gemelli: istituzione, linee di ricerca, procedure generali e strumenti operativi di gestione.* Roma: Istituto Superiore di Sanità;2007 (Rapporti ISTISAN 07/55).
8. World Medical Association. Declaration of Helsinki "On ethical principles for medical research involving human subjects", ultima rev. Edimburgo 2000 (note of clarification on par. 29 in 2002, and in 2004 for par. 30). Disponibile all'indirizzo: <http://www.wma.net/e/ethicsunit/helsinki.htm>
9. UNESCO. *International declaration on human genetic data.* 6 ottobre 2003. Disponibile all'indirizzo: http://portal.unesco.org/shs/en/ev.php-URL_ID=1882&URL_DO=DO_TOPIC&URL_SECTION=201.html
10. Council of Europe, Recommendation of the Committee of Ministers to member states "on research on biological materials of human origin" (Adopted on 15 March 2006; the 958th meeting of the Ministers' Deputies). Rec. 2006 (4). Disponibile all'indirizzo: <https://wcd.coe.int/ViewDoc.jsp?id=977859>
11. Human Genome Organization (HUGO). *International Ethics Committee Statement on DNA sampling: control and access.* London;1998.
12. Italia. Decreto Legislativo 30 giugno 2003, n. 196. Codice in materia di protezione dei dati personali. *Gazzetta Ufficiale* n. 174, 29 luglio 2003.
13. Autorità Garante per la protezione dei dati personali. Autorizzazione al trattamento dati genetici 22 febbraio. 2007. *Gazzetta Ufficiale* n. 65, 19 marzo 2007.