

Banco Nacional de Cerebros UNPHU. Una realidad en República Dominicana y el Caribe

National Brain Bank-UNPHU. A reality in Dominican Republic and Caribbean

José Luna-Muñoz, Vanessa Esmeralda González-Chávez, José Guillén Sarita, Daisy Acosta, Nabil Itzi Luna-Viramontes, Ricardo Apátiga-Pérez, y Mar Pachecho-Herrero.

Fecha de recepción: 8 de marzo de 2023

Fecha de aceptación: 9 de abril de 2023

Fecha de publicación: 1 de julio de 2023

RESUMEN

El desarrollo de bancos de cerebros para el estudio de las enfermedades neurodegenerativas se ha presentado en el mundo como una llave imprescindible para el diagnóstico y la búsqueda de un biomarcador específico para las enfermedades neurodegenerativas, basados en el estudio molecular de las proteínas implicadas en ellas. La enfermedad de Alzheimer es la demencia más prevalente en la población adulta mayor. Hasta el momento no se ha desarrollado un modelo animal que ejemplifique un procesamiento molecular y neurodegenerativo igual que en el cerebro humano, por lo tanto, es imprescindible el estudio en el origen mismo: el humano a su fallecimiento. El desarrollo del Banco Nacional de Cerebros de la Universidad Nacional Pedro Henríquez Ureña (BNC-UNPHU), ha sido un logro inusitado por la visión y apoyo del Arq. Miguel Fiallo y su concepción por la Dra. Daisy Acosta. El objetivo del Banco de Cerebros es la obtención de tejido nervioso en óptimas condiciones para la investigación y desarrollar el estudio de las enfermedades neurodegenerativas en el país. Nuestros resultados han sido satisfactorios. Se ha logrado actualmente obtener y preservar 20 cerebros con un tiempo postmortem de menos de 12h. Se han caracterizado histopatológicamente mediante tinciones de la proteína tau y amiloide beta con la técnica de peroxidasa e inmunofluorescencia. Así mismo hemos tenido el apoyo de FONDOCYT para el desarrollo de un proyecto consorciados entre BNC-UNPHU, Pontificia Universidad Católica Madre y Maestra (PUCMM) y Biobanco Nacional de Demencias. México (BND).

Palabras clave: Donación de cerebros, banco de cerebros, demencia, tau, amiloide beta.

ABSTRACT

The development of brain banks for the study of neurodegenerative diseases has been presented in the world as an essential key for diagnosis and the search for a specific biomarker for neurodegenerative diseases, based on the molecular study of proteins. Alzheimer's disease is the most prevalent dementia in the older adult population. So far, an animal model that exemplifies the molecular and neurodegenerative

processing of the human brain has not yet been developed. Therefore, it is essential to study the origin of this disease in humans after death. The development of the National Brain Bank of the Pedro Henríquez Ureña National University (BNC-UNPHU) in the Dominican Republic has been an excellent achievement due to the vision and support of Architect Miguel Fiallo and Dr. Daisy Acosta. The objective of the brain bank is to obtain nerve tissue in optimal conditions for the research of neurodegenerative diseases in the country. Our results have been satisfactory: 20 brains have been obtained and preserved with a postmortem time of less than 12 hours. They have been histopathologically characterized by staining of tau protein and amyloid beta with the peroxidase technique and immunofluorescence. We have also had the support of FONDOCYT for the development of a consortium project between BNC-UNPHU, National Dementia Biobank from Mexico, and Pontificia Universidad Católica Madre y Maestra (PUCMM)

Keywords: Brain donation, Brain Bank, dementia, tau beta amyloid.

Introducción

El cerebro es un órgano vital que está implicado en la coordinación y funcionamiento de todos los órganos de nuestro cuerpo (Herbet & Duffau, 2020). A través de nuestros sentidos, el cerebro puede recibir todos los estímulos y tener respuesta ante cada uno de ellos. Estos estímulos externos al ser recibidos por el cerebro, favorecen la generación de respuestas ante cada situación o emoción. Cada estímulo externo siempre tendrá una evaluación o una respuesta inmediata. Esta masa encefálica está formada por la sustancia gris y la sustancia blanca. La sustancia gris es donde se encuentran todos los somas de las células neuronales (unidad celular funcional del cerebro) y en la sustancia blanca son todos los axones de esas neuronas que comunican entre neuronas del mismo hemisferio y a su vez comunican ambos hemisferios (Shah, Jhavar, Goel, & Goel, 2021). Sin embargo, en algunas ocasiones el cerebro sufre alteraciones que complican y comprometen su funcionamiento adecuado, tal es el caso de las enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer, Parkinson, Lewy, Pick demencia fronto-temporal, encefalopatía traumática crónica, priones entre otras. Muchas de ellas son exclusivas del ser humano. Se desconoce el por qué y cómo se desarrollan muchas enfermedades neurodegenerativas en el ser humano. Por tal motivo el desarrollo de los bancos de cerebros ha sido de gran importancia para poder buscar y

entender estas enfermedades que afectan el sistema nervioso central.

¿Qué es un banco de cerebros?

Definimos a un banco de cerebros como una unidad de almacenamiento de cerebros en óptimas condiciones, para favorecer la investigación; pero este se lleva más allá y no se enfoca solamente a obtener los encéfalos en óptimas condiciones si no que, adicionalmente, es una unidad de diagnóstico e investigación (Reyes-Pablo et al., 2020). Es complicado concebir un banco de cerebros sin estas dos premisas, que deben estar bien cimentadas dentro de la reglamentación en la formación de un banco. Debemos estar bien conscientes que un banco de cerebros se nutre de las donaciones voluntarias de las personas. La donación puede hacerse de dos formas; una de ellas es cuando el paciente decide donar su propio cerebro al fallecer y tiene la capacidad de decisión. Dejará a un familiar cercano que lleve a cabo esta voluntad. Cuando la persona tiene alguna enfermedad neurodegenerativa que impida esta decisión, el familiar más cercano en ascendencia (esposa, hijos, hermanos), podrán favorecer la disposición del cerebro del familiar a su fallecimiento. Para lograr este acto tan hermoso que es la donación del cerebro para la investigación; se deberá llenar una carta de intención con la firma de dos testigos y las generales

del donante (persona que fallece y se obtiene el cerebro). Por lo tanto, la forma de retribuir a este gesto es darles el diagnóstico confirmatorio de la enfermedad neurodegenerativa que haya desarrollado el paciente en vida. Los datos personales están resguardados con alta confidencialidad. Nunca hay que perder de vista que el Banco Nacional de Cerebros de la Universidad Nacional Pedro Henríquez Ureña (BNC-UNPHU), se basa en el beneficio para la sociedad.

El objetivo del BNC-UNPHU es obtener encéfalos (cerebros) de personas que desarrollaron alguna enfermedad neurodegenerativa y casos sin afecciones neurológicas, este tejido se debe mantener en óptimas condiciones para la investigación. Para lograr este objetivo se llevan a cabo una serie de actividades para lograr primeramente la concientización de la población y vean el beneficio que tiene para la familia del diagnóstico y para la sociedad ahondando más en el entendimiento de las enfermedades neurodegenerativas.

Material y métodos

El desarrollo de este proyecto tiene dos vertientes. La primera se enfoca en la sociedad para favorecer la concientización de donación de cerebros para la investigación y la segunda es la investigación que se realiza dentro del BNC-UNPHU y su relación con la Red Latinoamericana de Bancos de Cerebros.

Concientización de donación

Socialización del BNC-UNPHU en la comunidad universitaria

Se han realizado conferencias dentro de la comunidad universitaria y de académicos sobre el desarrollo del BNC-UNPHU y la enfermedad de Alzheimer (figura 1). Estas conferencias se presentan con cierta regularidad y se invitan a conferencistas internacionales para que haya intercambio de ideas y visiones con los estudiantes y académicos.

Figura 1 Conferencias en la UNPHU. Dr. Juan Llibre Rodríguez (Cuba), Dr. José Luna Muñoz (México), Dra. Ivonne Jiménez Velázquez (Puerto Rico), comunidad estudiantil de la UNPHU. Donde se habló de la enfermedad de Alzheimer estudios epidemiológicos y estudios neuropatológicos.



Se realizan conferencias mucho más especializadas para los académicos y médicos especialistas en neurología, psicología, psiquiatría, patólogos, geriatras y, muy importante también, se trasmite la información a los médicos generales (los cuales son el primer contacto con el paciente).

La concientización de donación de cerebros para investigación se ha realizado mediante la difusión en programas de radio y televisión, donde se han presentado los directivos del BNC- UNPHU, hablando sobre esta unidad de diagnóstico e investigación, y sobre la donación de cerebros para la investigación. De esta manera, se puede llegar a la población de una forma inmediata y concisa, expresando la importancia de las investigaciones en las enfermedades neurodegenerativas, con una visión de la búsqueda de un biomarcador específico para el diagnóstico temprano, confirmatorio de la enfermedad de Alzheimer, algo que hasta el momento no se ha encontrado.

Desarrollo del museo itinerante del cerebro y las enfermedades neurodegenerativas

Se ha gestionado dentro del seno del BNC-UNPHU un museo itinerante, el cual es llevado en varias universidades del país para hacer la concientización de las enfermedades neurodegenerativas. Este museo cuenta con un cerebro humano intacto,

con médula. También cuenta con cortes coronales de cerebros con la enfermedad de Alzheimer, una columna vertebral, dos microscopios ópticos con los que se pueden observar tejidos de Alzheimer. Estos cortes fueron teñidos con la técnica de inmunoperoxidasa (ver más adelante) para evidenciar las lesiones características de la enfermedad. En las infografías se describe las generalidades del cerebro, neurona, historia del BNC-UNPHU; otro apartado se enfoca en la clínica y prevalencia de la enfermedad de Alzheimer, demencia frontotemporal, Parkinson, Huntington, encefalopatía por priones y neuropatología de cada una de estas enfermedades neurodegenerativas. Se cuenta con un área interactiva donde dos tabletas electrónicas muestran un programa interactivo de las generalidades del cerebro, áreas neuroanatómicas, imágenes de lesiones de Alzheimer, descripción de las enfermedades neurodegenerativas y una descripción corta de cada apartado. La sección fotográfica de microscopia confocal de lesiones de la enfermedad de Alzheimer. En el área social de este museo se muestran fotografías de pacientes con las enfermedades de Parkinson, Alzheimer y Huntington, con la finalidad de evidenciar la afectación y las necesidades del paciente en su vida cotidiana (Figura. 2).

Figura 2. Museo itinerante del BNC-UNPHU. Aspectos generales de los elementos que se exponen en el museo itinerante del Biobanco Nacional de Demencias. De la UNPHU. C) Participación en el Congreso de APAL 2022. D) universidad UASD Barahona



Protocolo de donación

El protocolo de donación se lleva en un orden específico. Para realizar la toma del encéfalo se requiere que la persona o los familiares llenen una carta de intención de donación del cerebro para investigación. Esta la pueden bajar de la página del BND-UNPHU (https://unphu.edu.do/wp-content/uploads/2022/11/CARTA-ABIERTA-A-DONANTES-POTENCIALES-Rev_AA_.pdf). También se debe llenar una historia de vida que es requerido para conservarla dentro del BNC-UNPHU, para tener referencia de padecimientos y estilo de vida correspondiente al encéfalo donado y mantenido en custodia dentro del acervo de investigación del Banco de Cerebros. Se conserva además la información personal y familiar bajo la ley de privacidad y protección de datos personales de la República Dominicana

(<https://rtccea.cepal.org/sites/default/files/201911/la%20protecci%C3%B3n%20de%20datos%20personales%20en%20rep%C3%BAblica%20dominicana.pdf>).

El BNC-UNPHU cuenta con infraestructura básica para la realización de toma, colecta, preservación y procesamiento del tejido nervioso.

Mecanismos de preservación

La obtención del cerebro se realiza durante las primeras 12 horas de tiempo postmortem. Se separan el tallo cerebral y cerebelo, se procuran los bulbos olfatorios. Se separan sagitalmente los hemisferios por la parte media del cuerpo calloso. En el hemisferio derecho en fresco se procede a realizar cortes coronales de la corteza frontal a occipital, en rebanadas de aproximadamente 1 cm de espesor. Se mantienen a -80°C . Este tejido se utiliza para hacer estudios bioquímicos y genéticos. El otro hemisferio se preserva en formalina al 10% se mantiene por aproximadamente tres semanas (Reyes-Pablo et al., 2020). Culminado el tiempo se procede a realizar los cortes coronales. Este método de fijación es indispensable para poder realizar el diagnóstico mediante técnicas específicas de peroxidasa e inmunofluorescencia (Heyderman, 1979; Im,

Mareninov, Diaz, & Yong, 2019). Donde se usan marcadores inmunológicos (anticuerpos) específicos para poder evidenciar las proteínas patológicas que se agregan en soma y parénquima neuronal, así como en otra población de células nerviosas como glía y microglía.

Técnicas usadas en el BNC-UNPHU

Inmunoperoxidasa.

La técnica de inmunoperoxidasa se basa en el uso de anticuerpos que reconocen la proteína patológica y es revelado con un anticuerpo secundario que tiene acoplada peroxidasa y mediante una reacción química de diaminobencidina y peróxido de hidrogeno, toma una coloración café donde el primer anticuerpo reconoció la proteína patológica (Heyderman, 1979).

Inmunofluorescencia.

Es semejante a la técnica de inmunoperoxidasa. La diferencia con la fluorescencia es el anticuerpo secundario, este acoplado a fluorocromos (Im et al., 2019), que al ser excitados por una luz ultravioleta (microscopio de epifluorescencia) o láser (microscopio confocal) dependiendo del fluorocromo se emite a diferente longitud de onda que va desde 350 nm (ultravioleta) hasta 650nm (rojo lejano). Esta técnica es muy utilizada en el BNC-UNPHU.

Microscopia confocal

El microscopio confocal es una unidad de análisis de microscopia fluorescente. Este equipo tiene acoplado un microscopio de epifluorescencia a un sistema de láser que excita a diferentes longitudes de onda y es detectado por un sistema digital. La ventaja de este equipo es que puede hacer cortes ópticos del tipo histológico del cerebro. En el análisis de muestras fluorescentes, los canales pueden ser analizados individual o secuencialmente. El análisis se realiza en 3D, tienen una gran definición las imágenes y se puede generar una amplificación extra. Tiene una resolución de 140 nanómetros (Elliott, 2020).

Entrenamiento del BNC-UNPHU

Se ha realizado un entrenamiento del procesamiento y actividades dentro del BNC-UNPHU a probables candidatos para que se hagan cargo del procesamiento de las muestras y que poco a poco se vaya haciendo independiente en actividad y en desarrollo de proyectos de investigación, manteniendo

la colaboración dentro de la red de neurobancos de América Latina (República Dominicana, México, Colombia, Brasil y Argentina), únicos países que ya cuentan con un recinto para la investigación y diagnóstico de las enfermedades neurodegenerativas.

Figura 3. Actividades dentro del BNC-UNPHU. A) M. en C. Nidia Esther de León, en su entrenamiento sobre los aspectos de manejo del cerebro una vez que está perfectamente fijado y se procederá a realizar los estudios de diagnóstico con marcadores específicos. B) Estudiantes de otras universidades de Santo Domingo, quienes han tenido el interés de aprender las técnicas de inmunotinción en los casos de Alzheimer. Corte de tejido cerebral para su posterior análisis. C-D) Estudiantes de Psicología que visitaron el BNC-UNPHU para conocer el procesamiento y mantenimiento de los especímenes en custodia. Se les dio una pequeña reseña de los cambios moleculares y celulares que ocurren en el cerebro de las personas que padecieron la enfermedad de Alzheimer y otras demencias, suscitándose el intercambio de ideas y cuestionamiento del origen de esta enfermedad neurodegenerativa.



Avances del BNC-UNPHU

La socialización del BNC-UNPHU ante la comunidad estudiantil, académica de la UNPHU y médicos especialistas, ha sido excelente en cuanto a la aceptación y participación dentro de las actividades desarrolladas en el BNC-UNPHU. Se ha desarrollado un curso de inmunohistoquímica e inmunofluorescencia para estudiantes de la UNPHU. Las visitas por parte de grupos de estudiantes con profesores de las carreras de Psicología y Medicina han sido constantes, en donde se les ha mostrado algunos especímenes con la patología de Alzheimer,

haciendo énfasis en los cambios anatomopatológicos del tejido. Dentro de estas visitas se les muestra el funcionamiento y actividad del BNC y se han desarrollado conversatorios de intercambio de ideas y el apoyo de los estudiantes para difundir y divulgar la actividad del banco de cerebros, buscando favorecer e incrementar el acervo de los especímenes (Figura. 3).

La UNPHU ha adicionado a República Dominicana una nueva línea de investigación en las neurociencias, ha sido punta de lanza en esta rama

de la investigación en las enfermedades neurodegenerativas; trabajando y dando la oportunidad a muchos estudiantes que están interesados en la investigación de la neuropatología de las demencias. Este gran logro de la ciencia dominicana ha sido gracias a la visión futurista del Arq. Miguel Fiallo

Calderón Rector de la UNPHU, quien ha favorecido el desarrollo de la idea de la Dra. Daisy Acosta apoyada por el Dr. José Felipe Guillen Sarita, director de proyectos especiales de la UNPHU (Figura 4).

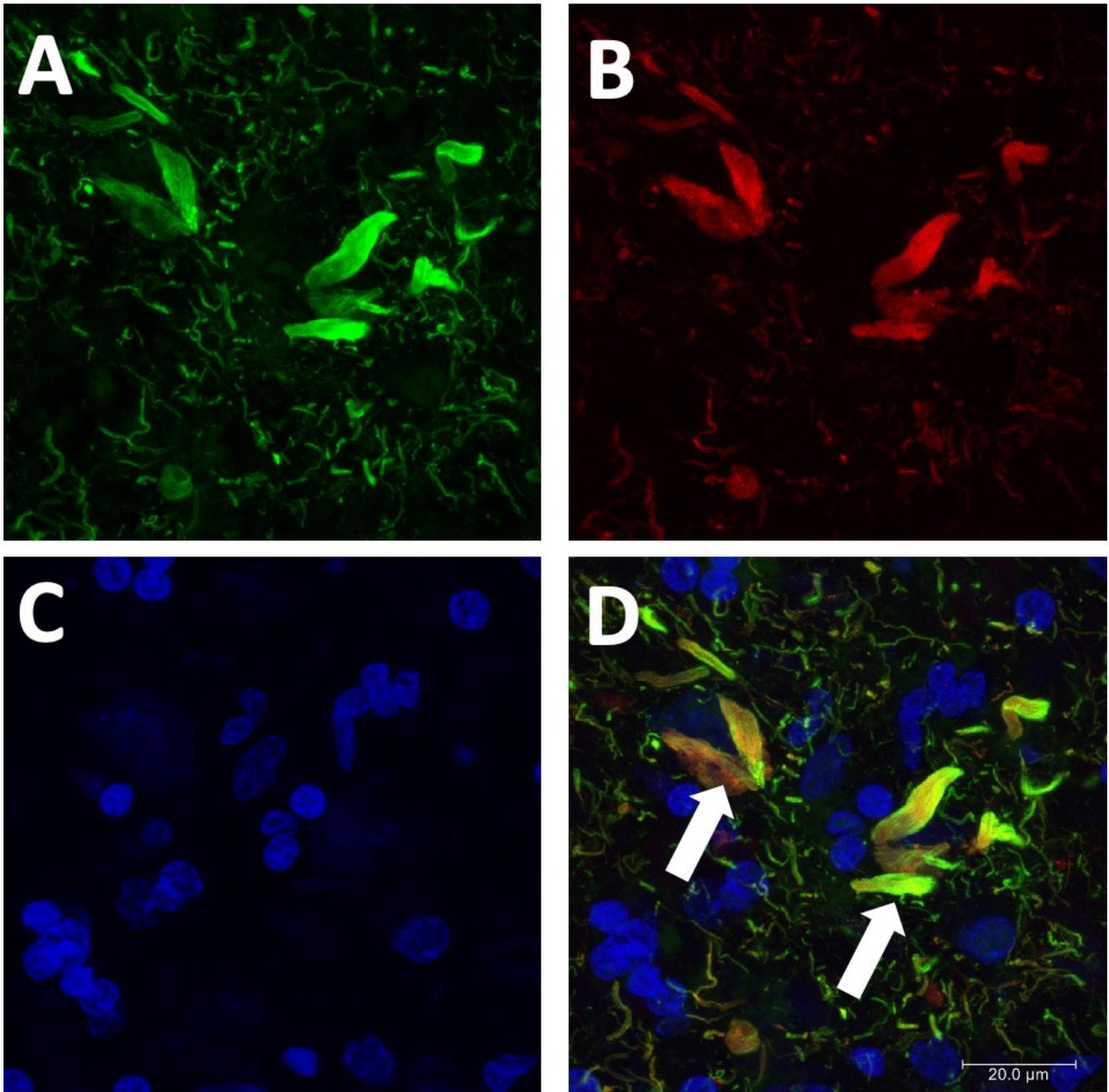
Figura 4. Directivos del Proyecto y puesta en marcha del BNC-UNPHU. A) Arq. Miguel Fiallo Calderón, en la dirección de la UNPHU, dando el apoyo total al desarrollo del Banco de Cerebros. B) Daisy Acosta investigadora de la UNPHU, especialista en la enfermedad de Alzheimer, quien ha visto formado su sueño en el BNC-UNPHU. C) Dr. José Felipe Guillen Sarita, promotor y divulgador del BNC-UNPHU. Director de proyectos especiales de la UNPHU.



Los proyectos de investigación se han llevado a cabo con la colaboración del Dr. José Luna Muñoz, director del Biobanco Nacional de Demencias en México en la universidad Politécnica de Pachuca. Las investigaciones se han centrado en el descubrimiento de una proteína de empalme alternativo (es un proceso celular en el que los exones de un mismo gen se combinan diferencialmente y que resultan en transcritos de ARNm (mensajero del ácido ribonucleico). Estos ARNm se traducen para producir diferentes isoformas de la proteína) en el caso de la proteína tau se forman 6 isoformas, que difieren en su porción amino-ter-

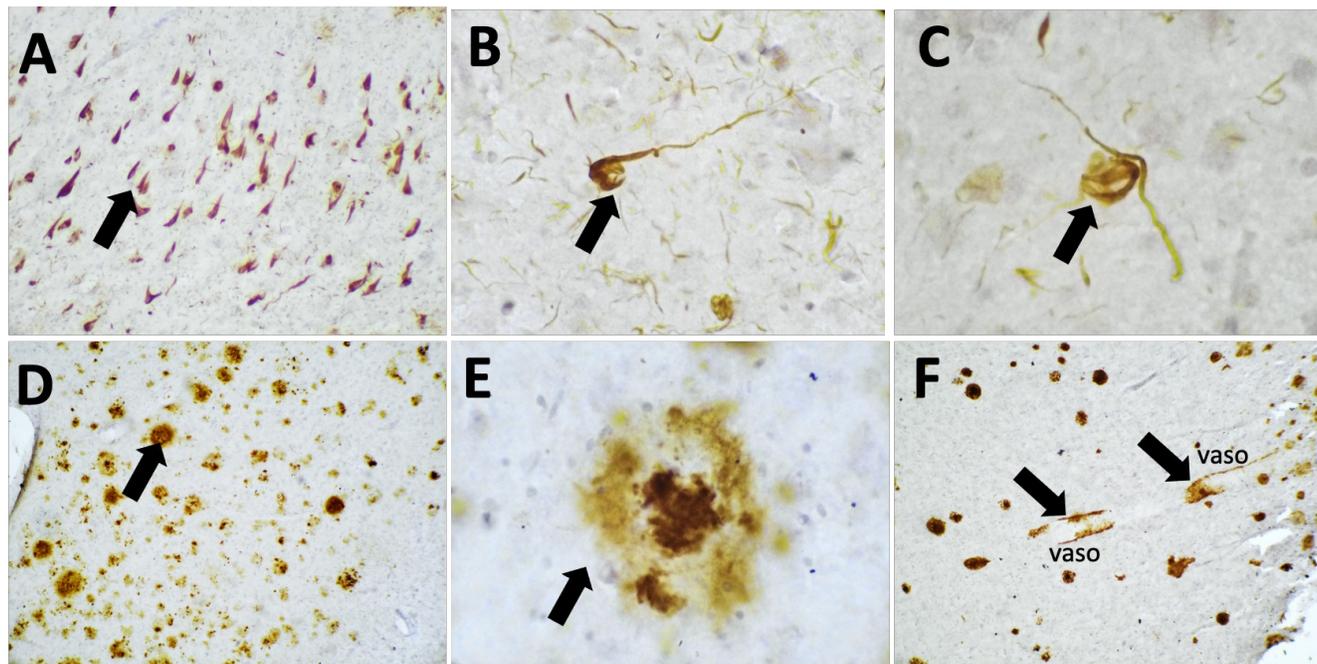
minal por 1,2 o ningún inserto de aminoácidos y por la inclusión del segundo dominio repetido de su porción carboxilo terminal, quedando tres isoformas con 3 dominios repetidos (3R) y tres con cuatro dominios repetidos, lo que se traduce en isoformas de diferente tamaño (Corsi, Bombieri, Valenti, & Romanelli, 2022). Los resultados de este estudio son los siguientes: La proteína de empalme alternativo tiene una estrecha asociación con las marañas neurofibrilares constituidas de la proteína tau, correlaciona con el deterioro cognitivo. Esta proteína de empalme alternativo se asocia al procesamiento inicial de la proteína tau (figura 5).

Figura 5. Expresión de la proteína de empalme alternativo y su relación con la proteína tau. A) Proteína de empalme alternativo tiene afinidad por marañas neurofibrilares, B) proteína tau fosforilada. C) tinción de núcleos. D) sobreposición de los tres canales para observar la estrecha asociación de los marcadores (flechas).



Las tinciones básicas de inmunoperoxidasa, han evidenciado en la mayoría de los casos, la presencia de marañas neurofibrilares evidenciadas con anticuerpos dirigidos contra la proteína tau fosforilada. Las placas amiloide se observaron abundantemente y también se observó una angiopatía amiloide (Figura 6).

Figura 6. Lesiones características de un caso con la enfermedad de Alzheimer. A, B, C) Marañas neurofibrilares (flechas) evidenciadas con un anticuerpo dirigido con la proteína tau. D, E) Placas de amiloide (flechas) evidenciadas con el anticuerpo contra el péptido beta amiloide. F) Depósitos de amiloide beta en vasos sanguíneos (angiopatía amiloide) en el cerebro de una persona con la enfermedad de Alzheimer.



Conclusiones

El Banco Nacional de Cerebros ha ido tomando terreno en la concientización de la donación de cerebros, gracias a la divulgación en TV, prensa y redes sociales, donde los académicos, estudiantes y sociedad han logrado visualizar la importancia de la donación en el diagnóstico, y cuánto favorecerá este hecho para encontrar un biomarcador específico para la enfermedad de Alzheimer.

Las investigaciones derivadas de los espe-

címenes en custodia dentro del BNC, se han favorecido con 17 publicaciones en los dos últimos años, todas enfocadas al estudio de la neuropatología de la enfermedad de Alzheimer.

El BND-UNPHU ha abierto una nueva área de investigación en las neurociencias en República Dominicana, y con ello da una oportunidad a estudiantes dominicanos a seguir estas líneas de investigación.

Referencias

- Corsi, A., Bombieri, C., Valenti, M. T., & Romanelli, M. G. (2022). Tau Isoforms: Gaining Insight into MAPT Alternative Splicing. *Int J Mol Sci*, 23(23). doi:10.3390/ijms232315383
- Elliott, A. D. (2020). Confocal Microscopy: Principles and Modern Practices. *Curr Protoc Cytom*, 92(1), e68. doi:10.1002/cpcy.68
- Herbet, G., & Duffau, H. (2020). Revisiting the Functional Anatomy of the Human Brain: Toward a Meta-Networking Theory of Cerebral Functions. *Physiol Rev*, 100(3), 1181-1228. doi:10.1152/physrev.00033.2019
- Heyderman, E. (1979). Immunoperoxidase technique in histopathology: applications, methods, and controls. *J Clin Pathol*, 32(10), 971-978. doi:10.1136/jcp.32.10.971
- Im, K., Mareninov, S., Diaz, M. F. P., & Yong, W. H. (2019). An Introduction to Performing Immunofluorescence Staining. *Methods Mol Biol*, 1897, 299-311. doi:10.1007/978-1-4939-8935-5_26

- Reyes-Pablo, A. E., Campa-Cordoba, B. B., Luna-Viramontes, N. I., Ontiveros-Torres, M. A., Villanueva-Fierro, I., Bravo-Munoz, M., . . . Luna-Munoz, J. (2020). National Dementia BioBank: A Strategy for the Diagnosis and Study of Neurodegenerative Diseases in Mexico. *J Alzheimers Dis*, 76(3), 853-862. doi:10.3233/JAD-191015
- Shah, A., Jhavar, S., Goel, A., & Goel, A. (2021). Corpus Callosum and Its Connections: A Fiber Dissection Study. *World Neurosurg*, 151, e1024-e1035. doi:10.1016/j.wneu.2021.05.047