

Oportunidades y limitaciones de las muestras de bancos de tejidos neurológicos para estudios moleculares

Isidro Ferrer

Instituto de Neuropatología, Servicio de Anatomía Patológica, Hospital Universitario de Bellvitge-Universidad de Barcelona-IDIBELL, Hospitalet de Llobregat; CIBERNED, Instituto Carlos III.

INTRODUCCIÓN

El estudio del sistema nervioso es complejo en gran parte debido a la complejidad del propio sistema constituido por diferentes tipos celulares organizados en diferentes regiones con funciones particulares.

Los primeros aspectos a considerar en un banco de tejidos neurológicos son: 1) la obtención de la información precisa sobre las características del donante, enfermedad neurológica y sintomatología clínica, así como de enfermedades o situaciones generales que puedan influir en el metabolismo del sistema nervioso; 2) las condiciones del estado agónico y del tiempo post-mortem incluyendo la temperatura de conservación; 3) la obtención estandarizada de las muestras según protocolos establecidos que permitan la optimización del material para estudios morfológicos, bioquímicos y moleculares; 4) el estudio neuropatológico preciso considerando las patologías frecuentemente múltiples en individuos de cierta edad, y el estadio de progresión de cada uno de los procesos patológicos; 5) el registro completo de todos estos datos; 6) la conservación y almacenamiento óptimos de todas las muestras obtenidas de cada una de las donaciones.

Los puntos a tener en cuenta por parte del solicitante o usuario de muestras de los bancos de tejidos neurológicos para investigación son: 1) conocimiento exacto del tipo de estudio que se desea realizar, sobre que regiones, en que estadios de determinada patología, y que métodos se pretenden utilizar; 2) las posibilidades y limitaciones que presenta una determinada muestra para cada tipo de estudio.

En ambas situaciones, donación y estudio de las muestras por los investigadores, son obligatorios: 1) el seguimiento sin excepciones de los códigos de conducta; 2) la aprobación por los Comités de Ética correspondientes de las metodologías de obtención de muestras y de cesión de muestras para investigación; 3) el compromiso de los receptores de las muestras acerca de su utilización limitada al estudio en curso y la destrucción o devolución de las muestras sobrantes.

Este capítulo comprende apartados referentes a la obtención de datos y optimización de las muestras, seguidos de consideraciones sobre indicaciones y limitaciones de los diferentes tipos de muestras.

Algunos puntos como los referidos a la numeración de los bloques de parafina o de las muestras congeladas que representan diferentes regiones son objeto de variaciones en cada uno de los bancos. El mensaje, sin embargo, persiste: la disección de las muestras en sobres de plástico separados, numerados e inmediatamente congelados es preferible a la congelación más antigua de bloques coronales del cerebro. La obtención de muestras precisas de los bloques congelados supone la fractura del bloque, la delimitación imprecisa de la región a examinar y el sometimiento a procesos de cambios de temperatura de las muestras para estudio y de los remanentes del bloque.

Por lo que se refiere a los bloques de parafina, es mejor la obtención de muchos bloques de diferentes regiones (aunque no sean necesarios para el estudio neuropatológico diagnóstico) con tiempos relativamente cortos de fijación en formaldehído tamponado al 4% durante tres o cuatro semanas, y su inclusión en parafina cuando se compara con la conservación del cerebro en formol durante largos periodos de tiempo.

Por último, es preciso un control de las condiciones de las muestras en los congeladores evitando incidencias de cambios de temperatura.

Las mejores garantías para estudios moleculares en muestras de tejidos nerviosos de los bancos de tejidos son: 1) la calidad de obtención y mantenimiento de las muestras por parte del banco, 2) el conocimiento de las oportunidades y limitaciones de las muestras frente a los distintos métodos de estudio, y 3) un adecuado intercambio de información entre los investigadores y los responsables científicos del biobanco para optimizar un particular estudio de investigación.

DONANTES

Las muestras de los Bancos de Tejidos Neurológicos se obtienen de diferentes modos en los distintos Bancos:

1. **Programas de donación en vida.** La donación se produce en vida del paciente y se formaliza con un documento de previsión de donación que es firmado por el donante previa información del significado de la donación. Una vez fallecido, se corrobora la donación y se pone en funcionamiento un sistema de traslado del difunto desde el lugar del fallecimiento (otro hospital o centro, o domicilio) al lugar donde se realiza la extracción del sistema nervioso. Una vez realizada la extracción, se devuelve el cadáver donde queda establecido por la familia. Los programas de donación en vida son siempre modificables y revocables según la última voluntad del individuo o de sus familiares.
2. **Programas de donación en el medio hospitalario en el contexto de la autopsia clínica** del paciente fallecido en el hospital previa autorización de los familiares. Los familiares o representantes legales autorizan la no destrucción de las muestras sobrantes del diagnóstico y, por el contrario, autorizan su utilización para investigación en proyectos que estén controlados por los Comités Éticos de los centros sanitarios.
3. **Donación relacionada con patología forense.** No se trataría de una donación especial. Sólo pueden obtenerse muestras para investigación cuando existe un protocolo establecido para este propósito.

Existen ventajas e inconvenientes de los dos sistemas principales.

La donación en vida se produce normalmente en el caso de pacientes de enfermedades del sistema nervioso en estadios muy avanzados (terminales) de la enfermedad. Las muestras obtenidas per-

miten un conocimiento y una relación clínica y patológica, pero pueden obtenerse pocos datos acerca del proceso de la enfermedad y de sus estadios iniciales.

La obtención de las muestras en el contexto hospitalario es indiscriminada. Se pueden obtener casos controles, casos avanzados y casos en estadios tempranos de las diferentes enfermedades neurodegenerativas que tiene periodos pre-clínicos durante muchos años. El mayor inconveniente es que en estos casos pre-clínicos o quizás limítrofes no hay una adecuada correlación clínica y patológica ya que el motivo de ingreso del paciente ha sido, con mucha probabilidad, otra patología más urgente y grave que ha puesto en segundo lugar una exploración neurológica sofisticada.

Parece entonces apropiado el potenciar y coordinar ambos procedimientos en el reclutamiento de muestras de tejido nervioso para investigación.

DATOS CLÍNICOS

- Datos personales
 - identificación o código del centro (biobanco)
 - identificación del paciente
 - sexo
 - edad
 - peso, altura e índice de masa corporal
 - fecha del fallecimiento (día/mes/año)
 - tiempo de post-mortem (tiempo entre el fallecimiento y procesamiento del sistema nervioso)
 - mantenimiento del cadáver (temperatura ambiente o refrigeración)
- Consentimiento
 - autopsia clínica (material no utilizado después del estudio diagnóstico)
 - autopsia forense
 - programa de donación en vida
 - consentimiento para estudios genéticos
 - limitaciones para determinados estudios
- Factores familiares, genéticos y ambientales
 - historia familiar
 - estudios genéticos
 - gestación (si procede)
 - ✓ complicaciones obstétricas conocidas
 - ✓ infecciones durante el periodo prenatal
 - factores ambientales
 - ✓ hábitos de fumador
 - ✓ abuso de alcohol
 - ✓ abuso de otras drogas
 - ✓ otros (condiciones laborales de riesgo, insecticidas)

- tratamientos
 - ✓ tipo y duración
 - ✓ tratamientos detallados durante los dos últimos meses
- Factores de riesgo: traumatismo, hipertensión, obesidad, hipercolesterolemia, diabetes
- Antecedentes de enfermedad infecciosa o contagiosa
- Enfermedad sistémica
- Principales síntomas y signos clínicos neurológicos y cronología:
 - fecha del último reconocimiento neurológico
 - signos focales o de lateralización
 - deterioro cognitivo y demencia: Mini Mental State Examination, memoria, lenguaje, praxias, gnosias, atención, funciones ejecutivas, fluctuaciones cognitivas
 - síntomas psiquiátricos: depresión, ansiedad, delirio, agitación apatía, irritabilidad, alteración en el comportamiento motor, desinhibición, alucinaciones (NPI: neuropsychiatric assessment in dementia)
 - signos motores:
 - ✓ parkinsonismo
 - ✓ ataxia
 - ✓ corea
 - ✓ mioclonias
 - ✓ amiotrofia
 - ✓ piramidalismo
 - signos sensitivos
 - signos autonómicos
 - epilepsia
 - trastornos del sueño
 - historia de caídas sin causa aparente
 - síncope
 - movimientos oculares anormales
 - otros
- Curso de la enfermedad:
 - agudo
 - subagudo
 - crónico
 - mejoras y recaídas
- Exámenes o exploraciones complementarias relevantes
 - bioquímica

- neuroimagen
- neurofisiología
- otros
- Diagnóstico clínico
- Estado agónico: cuidados intensivos, estado vegetativo
- Causa clínica de muerte

OBTENCIÓN Y PROCESAMIENTO DE MUESTRAS DE TEJIDO NERVIOSO PROCEDENTE DE AUTOPSIAS

Los protocolos, métodos y técnicas que se detallan a continuación deben de ser considerados como aconsejables y aproximativos, siendo deseable que puedan ser realizados de una manera similar en todos los biobancos que conforman la red de biobancos de tejidos nerviosos.

Es preciso señalar que el procesamiento y diagnósticos neuropatológicos no es el resultado de la mera aplicación de estos protocolos. Por el contrario, el examen por un especialista en neuropatología es crucial para la correcta interpretación y amplitud de los hallazgos.

Por tanto, *la dirección, procesamiento, supervisión y diagnóstico neuropatológico de los bancos de tejidos nerviosos debe de estar a cargo de un experimentado **especialista en neuropatología**.*

1. Extracción del sistema nervioso

1.a. Extracción del encéfalo.

Se realiza con el método clásico de apertura de la cavidad craneal y corte bajo el agujero occipital tomando la parte alta de la médula cervical.

Se ha de tener especial cuidado en seccionar anteriormente los nervios ópticos y los pares craneales de modo que quede parte de ellos en el encéfalo, especial cuidado en obtener intactos los bulbos y nervios olfatorios.

Se ha de obtener la hipófisis por separado.

Se han de obtener por separado muestras de otras regiones (p.e. ganglio de Gasser) cuando se considere oportuno.

Obtención de líquido cefalorraquídeo (LCR) puede llevarse a cabo del ventrículo medio por punción desde la cara basal del encéfalo e insertando una pipeta de plástico elevando un poco el quiasma para permitir el paso de la misma sin dañar el mismo. El mayor problema de la obtención de LCR es la contaminación por sangre. No es conveniente centrifugarlo ya que eliminamos posibles componentes celulares de la sangre conservando las proteínas contaminantes del plasma de modo que la muestra no es utilizable para posteriores estudios.

*Observación macroscópica externa obligatoria y peso del encéfalo fresco. Toma de **fotografías en fresco**.*

Medición del pH del encéfalo con tiras de medición insertadas en el encéfalo.

Puede hacerse la medición del pH del líquido cefalorraquídeo (LCR).

*Anotación del **peso del encéfalo y del pH del encéfalo o del LCR en fresco**.*

1.b. Extracción de la médula espinal.

Extracción por vía posterior o, más adecuadamente, por vía anterior con especial cuidado en obtener toda la longitud de la médula espinal desde la región cervical alta hasta la cola de caballo.

Extracción de los ganglios raquídeos y de segmentos apropiados de raíces anteriores y posteriores.

Extracción completa de la cola de caballo.

*Observación macroscópica externa obligatoria. Toma de **fotografías** en fresco.*

1.c. Extracción de órganos de los sentidos, sólo en el caso de autorización expresa: Globos oculares

2. Corte del encéfalo y de la médula espinal

Existen diferentes posibilidades de corte del encéfalo, algunas de ellas dependientes de la patología y de la lateralización del proceso neurológico. Los protocolos deben de adaptarse a las condiciones particulares de la enfermedad neurológica. Tiene poco sentido, por ejemplo, congelar cortes coronales de un hemisferio para estudios bioquímicos y fijar el otro en formol cuando se trata de un infarto cerebral unilateral.

El protocolo siguiente es considerado como habitual.

- Separar el tronco del encéfalo y cerebelo de los hemisferios cerebrales con un corte alto por encima de los tubérculos cuadrigéminos superiores.
- Separar el cerebelo del tronco del encéfalo seccionando los pedúnculos cerebelosos.
- Separar los hemisferios cerebelosos con un corte sagital y medio por el vermis.
- Separar los hemisferios cerebrales cortando exactamente por la línea media del cuerpo caloso.

En términos generales, el *tallado* es como sigue:

- El hemisferio cerebral izquierdo se fija en formol tamponado al 4%, mientras que el hemisferio cerebral derecho se procesa para su posterior congelación
- El hemisferio cerebeloso izquierdo se fija en formol tamponado al 4% y el hemisferio cerebeloso derecho se procesa para su posterior congelación
- El tronco del encéfalo se corta en secciones de unos 3 mm de espesor, la primera fijada en formol tamponado al 4% y la inmediata siguiente se congela, y así sucesivamente
- La médula espinal se corta en segmentos de unos 5 mm. La primera sección se fija en formol tamponado al 4% y la inmediata siguiente se congela, y así sucesivamente
- En la cola de caballo se identifican raíces anteriores y posteriores y se toman muestras de cada una de las regiones para estudio morfológico con fijación en formol o se congelan
- Las muestras adicionales: ganglios raquídeos, ganglio de Gasser, hipófisis (y eventualmente los bulbos y tractos olfatorios si se han roto en el momento de la extracción del encéfalo) se procesan para obtener muestras congeladas, y muestras fijadas en formol

Alternativamente, el tronco del encéfalo puede tallarse sagitalmente obteniendo secciones de unos tres mm de espesor y utilizando la de un lado para fijación en formol y la del otro para congelación. De este modo, no se pierden niveles para estudio morfológico y molecular. Este método permite también la obtención de al menos dos zonas de la sustancia negra, una rostral y otra caudal.

Alternativamente, algunos bancos de cerebros prefieren congelaciones de uno u otro hemisferio a días alternos, de modo que en la mitad de los casos es el hemisferio derecho el congelado y el izquierdo en la otra mitad.

3. Fijación en formol, y examen y procesamiento posteriores

La fijación en formol al 4% tamponado ha de ser suficiente pero no excesivamente larga. La preparación del formol tamponado debe de hacerse con una periodicidad razonable para evitar su deterioro (una vez al mes). Se recomienda no pasar de las tres semanas para hacer el tallado de las muestras. El periodo prolongado en formol reduce la visualización de determinados anticuerpos a pesar de la utilización de métodos de facilitación antigénica.

Se realizan normalmente los cortes coronales clásicos de 1 cm de grosor como máximo y se colocan sucesivamente en una superficie plana desde el polo frontal hasta el polo occipital. Se **completa ahora el examen macroscópico del encéfalo (y de la médula espinal)**. Se toman **fotografías del cerebro fijado**.

Se toman las muestras para hacer bloques de parafina pequeños y grandes (hemisféricos) y eventualmente (en los laboratorios que tengan esta posibilidad) cortes para inclusión en celoidina.

3. 1. Los bloques pequeños de parafina considerados de rutina e indispensables en todos los casos se numeran. Es conveniente utilizar el mismo tipo de numeración en todos los biobancos de tejidos nerviosos, o en su caso conocer las equivalencias entre uno y otro banco.

- N1 Bulbo
- N2 Mesencéfalo (con sustancia negra)
- N3 Protuberancia (con locus ceruleus)
- N4 Vermis cerebeloso (superior)
- N5 Cerebelo y núcleo dentado
- N6 Hipocampo anterior y córtex entorrinal derecho
- N7 Hipocampo anterior y córtex entorrinal izquierdo
- N8 Estriado (caudado/putamen) anterior, incluye accumbens
- N9 Lóbulo frontal (corteza/sustancia blanca) área 8
- N10 Lóbulo occipital (área visual primaria y área visual de asociación)
- N11 Amígdala
- N12 Núcleo basal de Meynert/globus pálido
- N13 Hipotálamo/cuerpos mamilares
- N14 Cíngulo anterior
- N15 Hipocampo posterior derecho
- N16 Hipocampo posterior izquierdo
- N17 Corteza parietal (corteza/sustancia blanca) a nivel de esplenio
- N18a Corteza temporal anterior (circunvolución temporal media y superior)
- N18b Corteza temporal posterior (circunvolución media y superior) a nivel del núcleo geniculado

- N19 Cíngulo posterior
- N20a Tálamo medial-anterior y núcleo subtalámico
- N20b Tálamo posterior
- N21 Hipófisis
- N22 Bulbo y tracto olfatorio
- N23 Médula cervical (N23a, b, c)
- N24 Médula torácica (N24a, b, c)
- N25 Médula lumbar (N25a, b, c). Médula sacra N25d
- N26 Corteza frontal pre-central (área motora primaria)
- N27 Sustancia blanca del centro oval
- N28 Ganglios raquídeos (N28a, b, c)
- N29 Cola de caballo (N29m: anterior; N29p: posterior)

3.2. Los bloques pequeños de parafina considerados de reserva también se incluyen en este momento, pero no se cortan, en principio. Se conserva mejor y durante más tiempo el tejido en un bloque de parafina que en formol. Por ese motivo, es conveniente procesar en parafina la mayor parte del encéfalo con un tiempo corto de fijación en formol tamponado y conservar después los bloques de parafina.

- N30 Corteza frontal supra-orbitaria
- N31 Corteza frontal área 8
- N32 Corteza área motora primaria (N32m) y área sensorial primaria (N32s)
- N33 Corteza temporal posterior
- N34 Corteza parietal (giro angular)
- N35 Corteza insular anterior
- N36 Corteza insular posterior
- N37 Hipocampo
- N38 Caudado y putamen: regiones medias
- N39 Nucleos talámicos anteriores (N39a) y posteriores (N39p)
- N40 Núcleo de Meynert (resto)
- N41 Bulbo (resto N41a, b, c)
- N42 Protuberancia (resto N42a, b, c)
- N43 Mesencéfalo (resto N43a, b, c)
- N44 Médula espinal (secciones restantes N44a, b, c)
- N45 Ganglios raquídeos (restantes N45 a, b)
- N46 Resto de tractos ópticos y quiasma

Numeraciones siguientes para otras regiones (i.e. pares craneales identificados).

3.3. Bloques hemisféricos incluidos en parafina

Los bloques hemisféricos son fundamentales para tener una visión adecuada de la sustancia blanca cerebral.

Se toman, como mínimo dos bloques:

- Frontal
- Occipital

Pueden añadirse tantos como se crea oportuno para mejor visualización de la sustancia blanca de otras zonas

4. Congelación de las muestras

La congelación de las muestras debe de hacerse de inmediato después de la extracción del encéfalo y de la separación señalada en el punto 2.

La inclusión de un menor o un mayor tipo de muestras depende de la capacidad de cada biobanco ya que siempre debe de primar la rapidez del proceso.

4.1. Condición mínima estándar de rendimiento sub-óptimo

Se basa en la congelación de cortes coronales del hemisferio cerebral de 8-10 mm de grosor que se congelan sobre placa enfriada sobre nieve carbónica. Los bloques se guardan en bolsas de plástico herméticas y numeradas consecutivamente comenzando por el 1 que corresponde al corte más frontal.

Los cortes coronales de cerebelo se congelan y se guardan a continuación, así como los alternantes del tronco del encéfalo en su totalidad, y los correspondientes a la médula espinal, ganglios raquídeos y segmentos de la cola de caballo. El almacenamiento es inmediato y continuo a -80°C .

Inconvenientes: El mayor inconveniente de este tipo de almacenamiento es la disección de muestras de regiones específicas una vez congelado el corte coronal del cerebro. Se trata de un material congelado que ha de partirse a golpes de cincel o con herramientas parecidas; los trozos son irregulares y los contornos poco precisos. Es difícil saber con exactitud qué región se está obteniendo.

Por otra parte, los fragmentos restantes a menudo son difíciles de identificar por lo que el resto de la muestra coronal pierde en ocasiones su orientación.

La posibilidad de descongelar la muestra para su mejor disección y la posterior re-congelación de la muestra requerida y de la muestra restante debe de ser considerada prohibida. La descongelación y posterior congelación altera las moléculas de modo que aquel material descongelado y congelado no es ya fiable para ninguna investigación molecular o bioquímica

4.2. Condición intermedia

Se trata de diseccionar inmediatamente después de hacer los cortes coronales del cerebro aquellas regiones que tienen mayor demanda para estudios moleculares de las enfermedades neurodegenerativas más comunes, congelarlas en placa enfriada sobre nieve carbónica y guardarlas en bolsas de plástico numeradas para su identificación. El resto del cerebro y del cerebelo se conserva como en el apartado anterior.

De este modo, las muestras diseccionadas, congeladas y almacenadas en bolsas separadas son:

- Hipocampo (varios cortes de anterior a posterior: 1, 2, 3)
- Corteza entorrinal (de anterior a posterior: 1, 2, 3)
- Amígdala
- Caudado
- Putamen
- Globos pallidus
- Núcleo basal de Meynert
- Hipotálamo medial
- Tálamo medial
- Bulbo olfatorio
- Vermis cerebeloso
- Sustancia negra
- Resto de mesencéfalo
- Protuberancia (1,2, 3)
- Bulbo (1, 2, 3)
- Médula espinal (cervical 1, 2, 3; torácica 1, 2, 3; lumbar 1, 2, 3; sacra)
- Plexos coroides

Las muestras restantes de cortes coronales del cerebro y del cerebelo se conservan como en el apartado anterior (4.1) en bolsas con numeraciones sucesivas comenzando por el 1 la más anterior.

4.3. Condición óptima de número de muestras diseccionadas y congeladas

Se realiza la disección de las diferentes regiones sobre lonchas con selección de las muestras de tejido de unos 2x2 cm. Estas muestras se congelan rápidamente sobre una placa de acero anionizado enfriada con nieve carbónica y las muestras se almacenan en bolsas etiquetadas de cierre hermético y numeradas:

Las regiones aconsejadas son las siguientes:

AC1 Circunvolución frontal media (BA 8/9)

AC2 Circunvolución temporal media y superior (BA21)

AC3 Hipocampo anterior y circunvolución parahipocampal

AC4 Circunvolución parietal superior (BA40)

AC5 Hemi mesencefalo a nivel del III par craneal

AC6 Circunvolución frontal superior con la circunvolución del cíngulo (BA24 y 32)

AC7 Corteza occipital que incluya la cisura calcarina,

AC8 Estriado, incluido el núcleo basal de Meynert y el hipotálamo

AC9 Amígdala y corteza entorrinal anterior

- AC10 Tálamo y núcleo subtalámico
- AC11 Protuberancia a través de la mitad del Locus Coeruleus
- AC12 Bulbo a través del diámetro máximo de la oliva inferior y núcleo hipogloso
- AC13 Cerebelo con una sección completa del núcleo dentado
- AC14 Sustancia blanca profunda del lóbulo frontal
- AC15 Sustancia blanca profunda del lóbulo occipital
- AC16 Cabeza del núcleo caudado
- AC17 Tálamo medio (anterior al cuerpo geniculado lateral)
- AC18 Tálamo anterior y parte posterior del Putamen y Globus Pallidus
- AC19 Tálamo posterior (posterior al Cuerpo Geniculado Lateral)
- AC20 Lóbulo frontal anterior (BA10)
- AC21 Lóbulo Frontal (BA9)
- AC22 Lóbulo Frontal (BA8)
- AC23 Lóbulo Frontal (BA6)
- AC24 Lóbulo Frontal infero lateral (BA46)
- AC25 Lóbulo Frontal inferior (BA47)
- AC26 Lóbulo Frontal (BA45)
- AC27 Circunvolución del cíngulo, anterior (BA24)
- AC28 Circunvolución del Cíngulo, posterior (BA 32)
- AC29 Área motora. Circunvolución precentral (BA4)
- AC30 Área somatoestésica primaria. Circunvolución postcentral (BA 3/1/2/5)
- AC31 Lóbulo parietal superior (BA7)
- AC32 Lóbulo parietal lateral (BA39)
- AC33 Lóbulo parietal inferior (BA37)
- AC34 Lóbulo temporal anterior (BA38)
- AC35 Circunvolución temporal superior parte posterior (BA22)
- AC36 Circunvolución temporal media parte posterior (BA21)
- AC37 Circunvolución temporal inferior parte posterior (BA20)
- AC38 Hipocampo anterior y circunvolución parahipocampal (BA28, 36)
- AC39 Hipocampo posterior y circunvolución parahipocampal (BA28, 36)
- AC40 Corteza calcarina BA17
- AC41 Lóbulo Occipital BA18, 19 superior
- AC42 Lóbulo Occipital BA 18, 19 inferior
- AC43 Sustancia blanca del lóbulo frontal X2 (anterior a la a nivel de la amígdala)
- AC44 Sustancia blanca parietal a nivel del esplenium

- AC45 Sustancia blanca Occipital a nivel de la corteza calcarina
- AC46 Sustancia blanca temporal a nivel del cuerpo geniculado lateral
- AC47 Vermis cerebeloso
- AC48 Resto de hemisferio cerebeloso
- AC49 Resto del puente
- AC50 Resto del bulbo
- AC51 Médula espinal, nivel cervical
- AC52 Médula espinal, nivel torácico
- AC53 Médula espinal, nivel lumbar
- AC54 Bulbo olfatorio
- AC55 Duramadre
- AC56 Sustancia blanca sub-ependimaria, asta anterior del ventrículo lateral
- AC57 Hipófisis
- AC58 Ganglio sensitivo dorsal

Ventajas e inconvenientes: La mayor ventaja de este procedimiento es el de disponer de cortes seleccionados y ya preparados para estudios moleculares y bioquímicos. El mayor inconveniente es el tiempo necesario para hacer todo el procesamiento en un corto tiempo lo que requiere la presencia activa y eficiente de mayor número de personas diseccionando, etiquetando y guardando. Todo este proceso debe de hacerse rápidamente sin importante diferencia de tiempo entre el primer bloque y el último.

5. Muestras crioprotegidas

Este tipo de muestras es útil para estudios de inmunohistoquímica cortadas en criostato y procesadas por flotación libre, y para algunos casos de hibridización *in situ*.

Secciones de 10x10x2mm se fijan en paraformaldehído tampón fosfato al 4% durante 24 horas, después se crioprotegen con sacarosa en agua al 30% hasta que las secciones se hundan (unas 24 horas) y, se congelan y se almacenan en bolsas de plástico con cierre hermético y numeradas a -80°C hasta su uso.

Las muestras susceptibles de ser conservadas en estas condiciones son variables; las más comunes son:

- Hipocampo
- Amígdala
- Mesencéfalo
- Protuberancia
- Bulbo
- Estriado
- Corteza frontal (área 8)

6. Obtención de muestras y procesamiento para microscopía electrónica

La obtención de pequeños bloques para microscopía electrónica debe de tener en cuenta un tiempo de post-mortem corto (dos o tres horas máximo), y un estado pre-mortem sin grandes problemas de hipoxia, acidosis ni alteraciones metabólicas severas.

Es importante también el tener criterios objetivos para poder posteriormente seccionar las muestras para su inclusión conservando la orientación óptima de los bloques.

Los bloques de tejido han de tener un máximo de 1 mm³

6.1. Fijación para microscopía electrónica convencional

Fijación en glutaraldehído al 2.5% en tampón fosfato durante 24 horas, lavado en tampón fosfato-sacarosa (pH 7, 200-400 mOsm), post-fijación en tetróxido de osmio al 1% durante 2 horas, lavados e inclusión en resina.

6.2. Fijación para microscopía electrónica (me) que permite inmunohistoquímica-me

Fijación en paraformaldehído al 4%-glutaraldehído al 0.1% durante 24 horas, lavado en tampón fosfato-sacarosa, y procedimiento siguiente como en el apartado anterior.

7. Otras muestras relacionadas con el biobanco de tejido nervioso

Es conveniente recoger otras muestras relacionadas con el sistema nervioso durante el proceso de la autopsia.

Líquido cefalorraquídeo (LCR): El mayor problema es la obtención casi siempre contaminada de LCR por sangre en el momento de la autopsia. La obtención de LCR antes de la apertura del cráneo es una posibilidad aunque de difícil realización. La punción intraventricular una vez extraída la calota tiene riesgos claros de contaminación. La conservación de LCR debe hacerse inmediatamente a -80°C.

Suero: puede extraerse de un vaso, centrifugarlo y conservarlo congelado a -80°C alicuotado en criotubos de 2ml.

ARN periférico: puede extraerse sangre y conservarla en tubos PAXgene Blood RNA para su conservación y posterior procesamiento para obtener ARN de células sanguíneas.

ADN: en algunos bancos se extrae ADN de una región del encéfalo (p.e. cerebelo) y se conserva para estudios de riesgo conocido de enfermedad neurodegenerativa (p.e. APOE).

La obtención de estas muestras, aunque relacionadas con el sistema nervioso, debe de estar especificada en el documento de donación que debe de firmar el donante o sus representantes legales.

8. Métodos básicos para el diagnóstico neuropatológico morfológico en biobancos

El examen neuropatológico microscópico riguroso es fundamental en el funcionamiento ordinario del biobanco de tejidos nerviosos. Para ello, hay que estandarizar los estudios y utilizar metodologías semejantes en los diferentes biobancos.

El examen neuropatológico de rutina se realiza sobre los bloques pequeños de parafina señalados en el apartado 3.1 y sobre los bloques hemisféricos señalados en el apartado 3.3.

8.1. Aplicación de técnicas de rutina

Las técnicas pueden ser modificadas de acuerdo con la patología pero el **examen de rutina en un adulto con o sin enfermedad neurodegenerativa** (los considerados controles porque no han presentado alteración neurológica también se procesan del mismo modo) puede seguir el siguiente protocolo:

Todas las secciones (N1-N29) y las secciones hemisféricas se tiñen con **hematoxilina y eosina**, y con un método de mielina (usualmente **Klüver-Barrera**)

Se aplica **en todos los casos, pero no en todas las secciones técnicas de inmunohistoquímica** para proteína glial fibrilar ácida (**GFAP**), microglia (usualmente **CD68**), proteína tau fosforilada (frecuentemente anticuerpo **AT8**), **tau3R** y **tau4R**, **ubiquitina**, **-sinucleína**, **B-cristalina**, neurofilamentos fosforilados (usualmente anticuerpo **RT97**), **TDP-43** y **-amiloide**.

Una sugerencia de aplicación mínima de técnicas de inmunohistoquímica en examen de rutina se señala a continuación:

Bloques según numeración del apartado 3.1 y tinciones en cada una de las regiones:

N1	α -sinucleína, AT8
N2	α -sinucleína, AT8
N3	α -sinucleína, AT8
N4	RT97
N6	α -sinucleína, β -amiloide, AT8, tau4R, tau3R, ubiquitina
N7	α -sinucleína, β -amiloide, AT8, tau4R, tau3R, ubiquitina
N8	AT8
N9	AT8, ubiquitina, TDP-43, RT97, β -amiloide
N10	α -sinucleína, β -amiloide, AT8
N11	α B-cristalina, α -sinucleína, AT8
N15	β -amiloide, AT8, TDP-43
N16	β -amiloide, AT8, TDP-43
N17	β -amiloide
N22	AT8, α -sinucleína
N23	RT97, TDP-43
N24	RT97, TDP-43
N25	RT97, TDP-43
N29	RT97

La aplicación de GFAP y de CD68 se valorará en función de las alteraciones encontradas en la primera observación.

8.2. Estadios y aplicaciones en patologías específicas

8.2.1 Estadios de la enfermedad

Se llevarán a cabo las técnicas necesarias en las regiones oportunas para identificar el estadio de extensión de la enfermedad.

8.2.2. Patologías específicas

El estudio de distintas regiones y técnicas es variable según las patologías, y su empleo depende exclusivamente del especialista en neuropatología que examine el caso.

A modo de ejemplos, deberán utilizarse marcadores de:

- Proteína priónica (clones 3F4 y 1E4) con y sin pre-incubación con proteinasa K en la sospecha de enfermedades priónicas.
- Marcadores linfocitarios y del sistema mononuclear fagocítico en enfermedades inflamatorias.
- Otros marcadores de amiloides diferentes de α -amiloide y de PRP cuando las tinciones de α -amiloide y de PRP sean negativas en presencia de angiopatía amiloide.
- Extensión del estudio con TDP-43 y con TDP-43 fosforilado en demencias frontotemporales (DFTL) no-tau y con inclusiones inmunorreactivas para ubiquitina
- Igualmente, en enfermedad de neurona motora asociada a o no a DFTL, y en esclerosis lateral amiotrófica (ALS).
- Anticuerpo anti-FUS en DFTL ubiquitina+ TDP-43-, NIFID y en ALS no-TDP-43.
- Anticuerpos anti-poliglutaminas en enfermedades por exceso de tripletes, y marcadores específicos para enfermedades con exceso de repeticiones: huntingtina, ataxina 1, 2, 3, entre otras.
- Tinciones de lípidos, carbohidratos y estudios de autofluorescencia en determinadas enfermedades metabólicas.
- Tinciones de pigmentos, hierro, calcio frente a determinados depósitos.
- Marcadores de matriz extracelular, colágenos y Notch en determinadas patologías vasculares.

9. Métodos básicos para el diagnóstico neuropatológico molecular en biobancos

Las técnicas mencionadas son usualmente suficientes para identificar los diagnósticos neuropatológicos. Sin embargo, existe alguna excepción que es preciso mencionar.

9.1. Enfermedades priónicas

Aunque existen predicciones morfológicas acerca de los subtipos de enfermedad de Creutzfeldt-Jakob basados únicamente en la morfología y distribución de las lesiones junto al tipo de depósito de proteína priónica, es importante el conocimiento del patrón de bandas de PrP con y sin tratamiento con proteinasa K analizado con electroforesis en gel y western blotting.

Así mismo, es aconsejable conocer la composición del codon 129. Las clasificaciones de subtipos de enfermedad de Creutzfeldt-Jakob se basan en criterios morfológicos, genéticos y bioquímicos.

9.2. Enfermedades metabólicas

Manifestado más frecuentemente en la infancia, este grupo de enfermedades difícilmente puede diagnosticarse con el mero examen neuropatológico, aún acompañado por la identificación de perfiles específicos de depósito en el examen de microscopio electrónico.

El examen neuropatológico es, sin embargo, fundamental para corroborar una sospecha diagnóstica o para orientar los estudios bioquímicos, enzimáticos y genéticos necesarios para llegar al correcto diagnóstico de la enfermedad.

10. Aspectos específicos. Biobancos pediátricos y biobancos de enfermedades psiquiátricas

10.1. Biobancos pediátricos

Los biobancos de tejidos nerviosos en pediatría constituyen un caso particular pero no excepcional. Independientemente de los aspectos legales de donación, ello viene dado por el tipo de patología y por el tamaño y consistencia de los encéfalos, especialmente en el periodo perinatal.

10.1.1. El examen y procesamiento del sistema nervioso central debe de adaptarse al tamaño y fragilidad de la muestra.

- El examen macroscópico es fundamental para la identificación de malformaciones y para la interpretación de lesiones relacionadas con daño perinatal
- El procesamiento y obtención de muestras para fijación en formol e inclusión en parafina puede ser más sencillo ya que pueden hacerse cortes grandes que permitan el estudio de un hemisferio completo o, en su caso, el estudio de varias regiones del encéfalo en un solo bloque
- La obtención de muestras para congelación es más compleja ya que no es fácil separar determinadas regiones. A modo de ejemplo, el muestreo señalado en el apartado 4.3 es imposible en la práctica

10.1.2. Los estudios bioquímicos y genéticos son frecuentemente necesarios para corroborar o identificar un diagnóstico preciso.

10.2. Biobancos de enfermedades psiquiátricas

No tienen por qué existir diferencias entre un banco de enfermedades “neurológicas” y un banco de enfermedades “psiquiátricas”. Quizás puntualizar dos aspectos:

- ✓ Los diagnósticos neuropatológicos han de ser muy especialmente tenidos en cuenta en el momento de ceder muestras a terceros ya que las patologías adicionales o subyacentes en personas mayores pueden distorsionar los resultados de posibles investigaciones. No infrecuentemente, pacientes mayores ingresados o no en centros psiquiátricos, tienen patologías de enfermedades neurodegenerativas adicionales. Los estudios en estos casos deben de tener en cuenta que los controles no son solo por edad y sexo sino y muy especialmente por patologías asociadas (por ejemplo, enfermedad de Alzheimer estadio II, IV o V). Evidentemente, esto no es exclusivo en el estudio de enfermedades psiquiátricas, pero a menudo se minimizan las patologías degenerativas asociadas.
- ✓ La disección y almacenamiento del mayor número de muestras congeladas es muy aconsejable en el caso de enfermedades psiquiátricas. Cabe esperar importantes resultados derivados de los estudios bioquímicos y moleculares que de los morfológicos.

11. Registro de las muestras en el biobanco

El registro debe de contemplar aquellos datos que pueden ser necesarios para la correcta identificación del tipo de muestra deseada para una determinada investigación y el seguimiento de una determinada muestra en el banco.

El registro de las muestras comprende los siguientes datos:

- Datos personales
 - ✓ identificación o código del centro (biobanco)
 - ✓ identificación del paciente
 - ✓ sexo
 - ✓ edad
- **Diagnósticos clínicos neurológicos (enlace con el PROTOCOLO DE DATOS CLINICOS)**
- Hipertensión, diabetes, hipercolesterolemia, obesidad
- Estado agónico
- Mantenimiento del cadáver (temperatura, refrigeración)
- Tiempo de post-mortem (tiempo entre el fallecimiento y la obtención de los órganos nerviosos)
- pH del cerebro en fresco
- Tipos y condiciones de las muestras (muestras en formol y parafina, muestras congeladas, muestras crioprotegidas, muestras para microscopía electrónica (regiones))
- Enumeración de los bloques de parafina
- Enumeración de los bloques congelados
- Otras muestras: LCR, suero, ARN periférico, ADN, otras
- Examen macroscópico (incluyendo el peso del encéfalo)
- Examen microscópico
- **Diagnósticos neuropatológicos:** debe de tenerse en cuenta que en la mayoría de los casos adultos es raro encontrar una patología única. Este aspecto es importante en el campo de la investigación ya que patologías combinadas pueden distorsionar las observaciones de un estudio, e invalidar los resultados del mismo. **Estadio de la enfermedad** según las clasificaciones consensuadas.

El registro detallado de las muestras permite optimizar la cesión de una determinada muestra y saber en todo momento cual es el tipo de muestra disponible para estudio. La utilización total de una determinada muestra debe de registrarse como cedida, terminada y por tanto no disponible.

E. DIAGNÓSTICOS NEUROPATOLÓGICOS

- Se contempla la nomenclatura en inglés para facilitar el intercambio de información con otros centros
- Es muy probable que un caso tenga varios diagnosticos neuropatológicos que deben de ordenarse por orden de importancia
- Se recomienda la inclusión de todos los diagnósticos neuropatológicos en el resumen de diagnostico neuropatológico final

No neuropathological lesions

A. Degenerative diseases of the central nervous system

Alzheimer disease and amyloid angiopathies

Alzheimer disease stage I/II = NFT Braak stage I-II

Alzheimer disease stage III/IV = NFT Braak stage III-IV

Alzheimer disease stage V/VI = NFT Braak stage V/VI

Alzheimer disease -amyloid: stages A, B, C

Alzheimer disease only amyloid plaques

Amyloid angiopathies non-alzheimer

Familial Alzheimer disease

Down syndrome

Tauopathies

Pick disease

Corticobasal degeneration

Progressive supranuclear palsy

Argyrophilic grain disease

Myotonic dystrophy type I

Frontotemporal lobar degeneration tau+

Familial frontotemporal lobar degeneration tau+

Other tauopathies including atypical tauopathies (tauopathy with globular inclusions in oligodendrocytes)

Frontotemporal lobar degeneration tau-

Frontotemporal lobar degeneration tau-, ubiquitin-ir, TDP-43+

Frontotemporal lobar degeneration tau-, ubiquitin-ir, TDP-43-, FUS+

Frontotemporal lobar degeneration with motor neuron disease

Frontotemporal lobar degeneration with no inclusions

NIFID

BIBD (basophilic inclusion body disease)

Alpha-synucleinopathies

Lewy body disease stage 1/2

Lewy body disease stage 3/4

Lewy body disease stage 5/6

Amygdala-predominant Lewy body disease

Atypical Lewy body disease

Familial Parkinson disease **including PD without Lewy bodies**

Multiple system atrophy

Prionopathies

Creutzfeldt-Jakob disease

Variant Creutzfeldt-Jakob disease

Familial Creutzfeldt-Jakob disease: genetic Creutzfeldt-Jakob disease

Fatal familial insomnia

Gerstmann-Sträussler-Scheinker syndrome

Huntington disease

Other degenerative diseases of the basal ganglia

Spinocerebellar ataxias

Autosomal dominant spinocerebellar atrophy 1 (SCA1)

Autosomal dominant spinocerebellar atrophy 2 (SCA2)

Autosomal dominant spinocerebellar atrophy 3 (SCA3)

Other autosomal dominant spinocerebellar atrophies

Dentatorubropallidoluysian atrophy (DRPLA)

Friedreich ataxia

Other autosomal recessive and sporadic ataxias

Motor neuron diseases

Sporadic amyotrophic lateral sclerosis (ALS)

Familial ALS

Lower motor neuron diseases

Upper motor neuron diseases

Primary axonal diseases with spheroids

Hallervorden-Spatz disease

Neuroaxonal dystrophies

TDP-43 pathology (other than disease-specific: FTLD-TDP-43+, ALS)

B. Cerebrovascular and circulatory diseases

Global ischemia

Focal ischemia: unique infarction

Lacunae

Status cribosus

Multi-infarct encephalopathy

Atherosclerosis (AT)

Small vessel disease (SVD)

Binswanger encephalopathy

CADASIL

Haemorrhage extradural and subdural

Haemorrhage subarachnoidal

Haemorrhage intraparenchymal

Aneurisms and vascular malformations

Vasculitis

Degenerative vascular diseases (other than amyloid angiopathy, AT and SVD)

Gas and fat embolism

C. Nutritional and toxic diseases

Wernicke encephalopathy

Pellagra

Vitamin B12 and folate deficiency

Late effects of alcohol in adults

Fetal alcohol syndrome

Marchiafava-Bignami

Central pontine and extrapontine myelinolysis

Hepatic encephalopathy

Other toxics

D. Metabolic diseases

Lipidoses (excepting Krabbe and metachromatic leukodystrophy)

Neuronal ceroid lipofuscinoses

Mucopolysaccharidoses

Polyglucosan diseases

Glycogenoses

Mucolipidoses

Leukodystrophies

Adrenoleukodystrophy and other peroxisomal diseases

Disorders of amino acids

Mitochondrial disorders

E. Inflammatory diseases

Multiple sclerosis

Acute disseminated encephalomyelitis

Guillain-Barre syndrome

F. Viral infectious diseases

Herpes virus infection

Cytomegalovirus infection

Progressive multifocal encephalitis

Retrovirus infection: HIV

Other viral diseases

G. Non-viral infections

Bacterial meningitis

Septic encephalitis and abscess

Whipple disease

Mycobacterial diseases: tuberculosis

Nocardiosis, actinomycosis

Neurosyphilis

Other bacterial diseases

Toxoplasmosis

Other protozoal infections

Arthropod infections

Metazoal infections

Fungal infections

H. Primary brain and spinal cord malformations including disorders of cell migration

I. Secondary malformations and destructive pathologies in the perinatal period

J. Trauma

K. Tumors

Primary tumors of the nervous system

Secondary malignancies

L. Paraneoplastic diseases

M. Muscular diseases

N. Diseases of the peripheral nervis

Inflammatory neuropathy

Amyloid neuropathy

Leprosy neuropathy

Neuropathy associated to lysosomal storage diseases

Axonal neuropathy

Segmental demyelination

Mixed axonal and myelin neuropathy

Hypertrophic neuropathy (onion bulb formation)

J. Undetermined and non-specific lesions

Hippocampal sclerosis

Subcortical gliosis of unknown origin

Demyelination of the white matter of the centrum semi-ovale

Calcifications

K. Disorders or lesions not categorized in the previous paragraphs

F. LIMITACIONES METODOLÓGICAS EN LOS ESTUDIOS MOLECULARES

La descongelación y congelación repetida inutiliza la muestra congelada para estudios moleculares. En cualquier caso, las muestras deben de ser empleadas una sola vez una vez descongeladas.

1. Técnicas morfológicas, inmunohistoquímica y hibridación *in situ*

- Todas estas técnicas pueden ser utilizadas en material post-mortem, pero el resultado depende de la preservación del tejido, a su vez dependiente de varios factores: el estado agónico, el tiempo post-mortem, el tiempo de fijación del tejido en el fijador, la calidad del fijador, la temperatura y la vulnerabilidad individual de las proteínas y de los ARNs.
- El procesamiento de los cortes puede ser válido en secciones de parafina, en secciones de vibratomo o en secciones de criostato de material congelado o de material crioprotegido.
- La eliminación de autofluorescencia de lipofuscina para microscopia de fluorescencia y para microscopia confocal puede hacerse mediante el pre-tratamiento de las secciones con una solución de sudan negro saturada seguida de eliminación del colorante sobrante con alcohol
- Los estudios de densitometría de las inmunotinciones y de los marcajes de hibridación *in situ* de ARNs pueden ser especialmente difíciles debido a la variabilidad de las condiciones de las muestras. Los controles positivos y negativos, y un estudio previo de la degradación de las señales con modelos de muestras que imitan distintos tiempos de post-mortem y distintos tiempos de fijación en formol son útiles y frecuentemente necesarios para obtener resultados fiables.

2. Técnicas de western blotting

- La vulnerabilidad de las proteínas es variable con el post-mortem. El patrón más esperable es la degradación de proteínas con el post-mortem lo que hace disminuir la señal. Es fundamental tener un patrón de vulnerabilidad para una particular proteína en los estudios densitométricos, y la similitud de condiciones de todas las muestras procesadas en paralelo.
- Los controles de carga deben contemplar proteínas estables en diferentes condiciones y especialmente que sean resistentes en las condiciones particulares de determinadas enfermedades neurológicas: no es correcto utilizar un marcador de carga que es vulnerable a la enfermedad que se pretende estudiar. La utilización de dos o tres marcadores es fundamental y los resultados deben ser superponibles cualquiera que sea el marcador patrón. También puede utilizarse la normalización de carga con la densitometría de la tinción de Coomassie.
- En el caso de estudio de geles bidimensionales no es infrecuente encontrar un mayor número de puntos acompañando un cierto incremento del tiempo de post-mortem. Ello se debe no tanto a la producción de proteínas nuevas, como a la aparición de formas fragmentadas resultantes de actividad proteolítica.
- La validación de las pruebas en diferentes situaciones y con distintas muestras es obligatoria para verificar la veracidad de los resultados.

3. Modificaciones post-transcripcionales de proteínas

- Muchas proteínas presentan cambios post-transcripcionales en distintas enfermedades neurológicas. Estos cambios son relativamente resistentes al estado post-mortem y pueden ser examinados en homogenados totales, en fracciones enriquecidas en orgánulos o en filamentos y también llevar a cabo estudios de solubilidad. De hecho, el estudio del patrón de tau fosforilado constituye una técnica de diagnóstico molecular de tauopatías.
- Los cambios relacionados con daño oxidativo o de nitración mediante proteómica redox también son posibles en material congelado, aunque solamente con tiempos cortos de post-mortem.

4. Interacciones de proteínas

- El estudio de interacciones de proteínas puede ser difícil y su fiabilidad depende, como en otras ocasiones, en el grado de reproducibilidad mediante la utilización de diferentes métodos como inmunoprecipitación directa e inversa y pull-down.
- La utilización de técnicas de FRET no ha dado resultados satisfactorios en una escala reproducible.

5. Conservación de ARN

- La utilización de conservantes de mRNA (Trizol, HOPE) no es indispensable
- El tejido congelado permite el estudio de mRNAs aunque deben de tenerse en cuenta aspectos determinantes: 1) el ARN puede degradarse con el estado agónico y también con el periodo post-mortem, 2) existen diferencias regionales en la alteración del ARN en un mismo cerebro que son variables de un caso a otro, 3) es necesario el estudio individualizado de cada muestra por lo que se refiere al índice de conservación de ARN (RIN) que no debiera ser inferior a 6.8 e igual para todas las muestras del estudio, 4) debe de existir homogeneidad en los ciclos del termociclador en el procesamiento de las muestras en las PCR.
- La normalización mediante controles endógenos es incuestionable, pero el tipo de control endógeno puede ser, a su vez vulnerable a un determinado proceso patológico, y por tanto convertirse en un inadecuado control endógeno. Gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa, beta-actina y tubulinas alfa y beta se han utilizado como marcadores endógenos. Parece más apropiado, en función de su menor variación en procesos neurodegenerativos, la utilización de beta-glucuronidasa, alanyl-tRNA synthetase o de aminopeptidase P 1. Al igual que suceder con el estudio de proteínas en western blots, es recomendable la utilización de dos o tres marcadores endógenos para cada prueba.
- La conservación de ARN pequeños (small RNA, miRNAs) es mejor que la de mRNA, pero no existen estudios que permitan un seguimiento de la conservación de ARN pequeños en las muestras post-mortem de tejido nervioso. La validación en experimentos repetidos, la validación de posibles ARN diana y los efectos de sobre-expresión y de anulación en modelos celulares son factores decisivos en la evaluación de los ARN pequeños.
- Se ha señalado la posibilidad de estudio de mRNA y de pequeños ARN en muestras fijadas en formol e incluidas en parafina pero no existe una evidencia de que esto sea cierto en las muestras post-mortem de tejido nervioso.

6. Conservación de ADN y estudio de la regulación de traducción del ADN

- El material fresco congelado a -80°C permite un estudio de ADN aunque el material se haya conservado de este modo durante varios años.
- EL ADN se degrada con la fijación en formol y es mayor con el mayor tiempo de fijación. No es aconsejable el estudio de polimorfismos ni de SNPs en material formolado: no es fiable.
- Las muestras congeladas también permiten el estudio de metilación de ADN sin problemas.
- La metilación de histonas parece que puede ser examinada con cierta fiabilidad en el material post-mortem de tejido nervioso. Sin embargo, la acetilación de histonas sufre cambios durante el estado agónico y en el tiempo post-mortem probablemente semejantes a las que ocurren en las zonas de penumbra de un infarto actuando como mecanismos compensatorios. Estas respuestas son variables de un caso a otro e imposibilitan un escenario estable para el estudio comparativo de acetilación de histonas con material post-mortem de tejido nervioso.

7. Estudios de actividades enzimáticas

- Las actividades enzimáticas se degradan con el estado agónico y especialmente con el post-mortem, pero la degradación es variable de un sistema a otro. Se han realizado estudios de actividad de complejos de la cadena respiratoria sobre material congelado con tiempos cortos de post-mortem con resultados satisfactorios. Sin embargo, el estudio de consumo de oxígeno y respiración mitocondrial se ven enormemente reducidos en las mismas muestras; y el examen de producción de ATP en las mismas muestras es prácticamente nulo.
- Otras actividades enzimáticas pueden estudiarse con mejores resultados y las actividades del proteasoma, por ejemplo, están conservadas.
- El material formolado no permite estudios funcionales.

8. Estudio de lípidos

- El material fresco y congelado a -80°C es útil para estudio de lipidómica en homogenados totales y en fracciones enriquecidas en balsas lipídicas.

9. Estudio del metaboloma

- El examen de metabolitos es todavía un método reciente con poca experiencia en el análisis de muestras post-mortem de cerebro humano. La enorme cantidad de datos, la dificultad de nombrar los distintos metabolitos por ausencia de disponibilidad de patrones son factores importantes. El papel del estado agónico y del post-mortem es desconocido. De momento, algunos estudios preliminares permiten visualizar grupos diferenciables entre controles y procesos patológicos, pero las publicaciones al respecto son limitadas.