KÁTIA CRISTINA DE OLIVEIRA

Análise estereológica *postmortem* do córtex orbitofrontal de indivíduos acometidos por transtorno obsessivo-compulsivo ou por transtorno afetivo bipolar

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Ciências

Programa de Patologia

Orientador: Prof. Dr. Carlos Augusto Gonçalves Pasqualucci

São Paulo
2013

KÁTIA CRISTINA DE OLIVEIRA

Análise estereológica *postmortem* do córtex orbitofrontal de indivíduos acometidos por transtorno obsessivo-compulsivo ou por transtorno afetivo bipolar

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Ciências

Programa de Patologia

Orientador: Prof. Dr. Carlos Augusto Gonçalves Pasqualucci

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 6018, de 13 de Outubro de 2011.

A versão original está disponível na Biblioteca FMUSP)

São Paulo
2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Oliveira, Kátia Cristina de
Análise estereológica *postmortem* do córtex orbitofrontal de indivíduos acometidos por transtorno obsessivo-compulsivo ou por transtorno afetivo bipolar / Kátia Cristina de Oliveira. -- São Paulo, 2013.
Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Programa de Patologia.
Orientador: Carlos Augusto Gonçalves Pasqualucci.

Descritores: 1.Encéfalo 2.Córtex cerebral 3.Contagem de células 4.Pesquisa biomédica 5.Transtorno obsessivo-compulsivo/fisiopatologia 6.Transtorno bipolar/fisopatologia

USP/FM/DBD-334/13

DEDICATÓRIA

Áquela que sempre soube me dar o SIM necessário. Sentiu-se feliz e orgulhosa diante de todas as minhas vitórias e entendeu e acalmou nos meus momentos de frustrações. Minha amiga, companheira e muitas vezes foi, também, secretária e motorista. Compreendeu a distância de um oceano para que eu pudesse realizar meu doutorado sanduíche. Á minha amada mãe Lucinéia

Áquele que, infelizmente, não está conosco, mas que foi um apoiador de sonhos, de todos os filhos. Hoje, é inspiração de perseverança, positividade e amor pela vida. Com certeza, deve interceder todos os dias por mim. Ao meu amado pai José Aparecido

Paciência, amor, carinho, compreensão, cumplicidade e amizade. Não há como definir tudo o que representa em uma só palavra. Nem tão pouco agradecer pelo seu incentivo, diário, para que eu continue a caminhada. Suportou a distância e manteve-se sempre perto, mesmo quando tão longe. Hugo, meu amor, você vai além das expectativas e merece essa dedicatória!

Juntos brincamos e brigamos, mas também crescemos... em todos os sentidos. Compartilhamos momentos de alegrias e de tristezas, mas que nos levaram a ser o que, hoje, somos. Tenho orgulho de vocês! Aos meus irmãos Felipe, Bruno, Monique e Vítor,

Sempre orou e torceu por mim. Apoiadora de atividades físicas, de trabalho voluntário e que soube viver o tempo que lhe foi possível. Á minha querida avó Iracy

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao meu orientador Prof. Dr. Carlos Augusto Pasqualucci. Antes de qualquer outro agradecimento, devo agradecer pelas suas palavras. Palavras que compartilham conhecimento e sabedoria e sobretudo, bom senso. Palavras que colheram sorrisos; que me proporcionaram esperança e motivação. Palavras de críticas, nunca destrutivas, mas que sempre me impulsionaram a refletir, pensar e melhorar. Um conselheiro nos momentos mais conflitantes. Um exemplo de professor e orientador. Agradeço por me guiar durante esses quatro anos, e pelas horas e dias desprendidas na revisão final.

Á Prof. Dra. Lea Tenenholz Grinberg. É difícil definir em poucas palavras o que representa, não somente na minha carreira, mas na minha vida. E mais difícil ainda, é agradecer com um simples obrigado. Agradeço pelas portas abertas, pela oportunidade que me foi dada. Sua maneira acolhedora como recebia os alunos de graduação e o entusiasmo como nos mostrava os primeiros passos para fazer pesquisa, me levou a mergulhar nesse mundo por longos oito anos. Agradeço por ter me impulsionado a aceitar o desafio, que foi toda a evolução desse trabalho. Obstáculos surgiram, muralhas foram quebradas e seu apoio sempre foi presente, mesmo na distância, assim como seus elogios e conselhos. Obrigada por ser um exemplo de pessoa e profissional.

Ao Prof. Beny Lafer, meu co-orientador. Agradeço, principalmente, por me receber, por acreditar na multidisciplinariedade e compor seu grupo com profissionais de diversas áreas e de diferentes perfis. Isto proporcionou a mim, uma biomédica, a oportunidade de aprender e estudar um pouco de psiquiatria. Confesso que me apaixonei pela área e tenho muita vontade de poder contribuir sempre. Muito grata por ter se colocado disponível em diversos momentos. Por ter investido nesse projeto e ter contribuído para a resolução de problemas, discussão de resultados e, sobretudo, por confiar no meu trabalho.

Ao Professor Helmut Heinsen da Universidade de Würzburg, apenas, tenho muito a agradecer, por me receber em seu laboratório de braços abertos e com gana de ensinar tudo o que fosse possível sobre morfologia, citoarquitetura, documentação científica,

emblocamento em celoidina e estereologia. Sinto-me honrada por ter aprendido com esse "mestre", que não há idade e nem tempo certo para ir à bancada, quando se pretende responder uma pergunta, ou ao menos chegar perto disso. O seu amor pelo o que faz, me contagiou! Além disso, me sinto honrada, por ter confiado á mim, técnicas realizada por poucos e dicas valiosas para a minha formação.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, à Deus pelas oportunidades e pelos presentes que foram colocados na minha vida.

Aos familiares dos pacientes falecidos, que mesmo no momento de dor, foram solidários e desejaram contribuir com a pesquisa para o bem dos demais.

Agradeço á todos e direta ou indiretamente contribuíram para a conclusão desse trabalho. Todos os auxílios foram preciosos e necessários para que pudesse chegar a esse final.

Ao Prof. Dr. Wilson Jacob Filho um querido professor, para o qual não há palavras para descrever o quão importante é em toda essa história. A oportunidade de ser uma "mosqueteira" da sua segunda geração GEROLAB, como já declarou em alguns momentos, isto é para mim motivo de orgulho e honra.

Ao Prof. Dr. Ricardo Nitrini, obrigada pelas sugestões e opiniões, foram, com certeza, muito importantes para o amadurecimento deste trabalho.

Á Prof. Dra. Renata Ferretti- Rebustini pela coordenação e treinamento da equipe de triagem, além de toda a estruturação e participação inicial na implantação da entrevista dos casos psiquiátricos. Além disso, pela amizade e pelas palavras de apoio.

Á Profª Dra. Cláudia Suemoto, pela contribuição tão importante na minha formação como orientadora do meu primeiro projeto de pesquisa. E agora, neste trabalho, apoiou com sugestões no exame de qualificação e atuou na melhora das representações gráficas. Agradeço pela oportunidade de aprendizado e pela amizade.

Á Dra. Renata Leite, pela dedicação e disponibilidade ao laboratório, pela coordenação da equipe. Por ouvir e entender nossas necessidades e ser amiga nos momentos de descontração.

Ao Prof. Dr. José Marcelo Farfel por ter tido o primeiro interesse em entender a depressão nos idosos e dar início á inclusão desses pacientes em nosso banco de encéfalos. Agradeço pelas contribuições dadas na banca de qualificação.

Ao Prof. Dr. Alexandre Valotta, agradeço por me ajudar em um momento importante desse trabalho, ampliando meus conhecimentos de estereologia. Um colaborador com novas ideias e conceitos.

Dra. Ana Tereza Di Lorenzo Alho pelo trabalho colaborativo desenvolvido no grupo, nas situações do dia-a-dia. Pela amizade desde 2005. Pelas dicas sobre Würzburg, e por discutirmos nossos resultados e em estereologia. E por fim, por me ajudar nas conclusões deste trabalho.

Á Livia Polichiso, Gláucia Bento pelo apoio desde o início do projeto no processamento dos casos. Á Edilaine Tampellini, pela disponibilidade e pelo jeito carinhoso de atender á todos. Á Mariana Molina pelas palavras positivas. Á Camila Nascimento, pela amizade, pela troca de experiências e pelo auxílio com a organização das referências. Á Roberta Rodriguez, pela disponibilidade analisar neuropatologicamente alguns dos casos e nos transmitir um pouco dos seus conhecimentos em neuropatologia, além das histórias engraçadas que conta ao fim da tarde. Ao Rafael Emídio, por pacientemente me ajudar a usar me ajudar e solucionar problemas com o programa de resconstrução 3D. Além da amizade e da convivência em Würzburg

Ás alunas de capacitação técnica nível TT III, que muito contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho. Luzia Lima Carreira, que cuidou da coleta de casos na minha ausência, se aperfeiçoou nas técnicas e hoje continua uma carreira acadêmica. Mais recentemente á Ariane Moretto, nossa segunda TT III.

Ás alunas de Iniciação Científica do Projeto nível TT I: Lumena Ruiz, Camila Batella e Marcela Usmari. À equipe de entrevista, e principalmente ao Ricardo Caires pelas triagens á tarde e organização das entrevistas. Á Daniela Souza pelo cuidado especial que presta ás entrevistas de casos psiquiátricos.

Á todos os alunos que já passaram pelo laboratório: Maria do Carmo, Camila Ávila, Stephanie. E outros que estão conosco: Cintia, Juliana, Tiago. Á Monique e Thamiris pelos auxílios nos processamentos mesmo após os seus expedientes, á equipe de histologia Kátylla, Tárcio, Marcus. Cristina, os quais oriento diariamente sobre a rotina do laboratório e que muito torceram por esse trabalho.

Ao Dr. Eduardo Alho, agradeço pelos seus auxílios, pela aula de neuroanatomia tridimensional, que me permitiu fazer o protocolo de dissecção das regiões. E depois pela disponibilidade em me ensinar um pouco de todos os programas que usamos. Agradeço, também, pela sua cordialidade em me ajudar no período de adaptação em Würzburg, por sempre me acompanhar no departamento de estrangeiros, realmente, tive muita sorte em tê-lo por lá.

Á Sra. Marta Crocci, agradeço por sempre estar disposta a ajudar nas questões administrativas dos projetos, além de promover momentos de integração do grupo com as festinhas de datas comemorativas. Uma amiga, conselheira e fiel. Considero-te o coração do laboratório.

Aos técnicos do laboratório: Keila, pelo apoio e manuseio delicado com todos os nossos materiais, ao Gustavo por ter abraçado a nossa causa na rotina e nos desafios de conseguir cortar os blocos de parafina dos casos deste trabalho, para darmos início ás análises neuropatológicas.

Ás técnicas da Universidade de Würzburg : Frau Angelika Bahrke e Frau Eva Broschk. Sem dúvidas foram mais que colegas de trabalho, foram amigas, mães, madrinhas, professoras... me receberam de braços abertos no laboratório e me adotaram por um ano. Só tenho a agradecer por em aturarem esse tempo, fazendo milhões de

perguntas, usando parte da bancada, gastando reagentes e ainda tomando o cafezinho alheio à tarde... *Viele Danke*!

Ao Prof. Dr. Schmitz da Universidade de Munique, por me receber em seu laboratório e estar disponível para meu treinamento no Stereoinvestigator, algo que será muito importante para continuidade deste estudo.

Á todos os colegas do PROMAN, muito obrigada pelos conselhos científicos, sobretudo, pelos ensinamentos de clínica do TAB, com a qual pude ter contato. Agradeço especialmente: Ao Prof. Dr. Fabiano Nery, Prof. á Dra. Karla Almeida e ao colega Dr. Alexandre Gigante, que realizaram as entrevistas psiquiátricas com o informante ao longo desse período. Á aluna Ana Cláudia Becker, pela participação ativa nas triagens e agendamento de retornos dos familiares nos anos de 2011 e 2012. Ao estatístico Tiago Mendonça, pelo cuidado tomado com os dados, por realizar as análises descritivas da melhor maneira possível e estar sempre disposto a ajudar. Á todos que torceram por mim e me apoiaram em momentos importantes como qualificação, prestações de contas e discussão de resultados.

Ao Prof. Eurípedes Miguel, grata por acreditar no projeto e estar disponível, juntamente com o seu grupo de pesquisa, fim de sanar todas as nossas dúvidas ou necessidades nesse período. Além disso, o seu entusiasmo com as pesquisas é, certamente, motivante!

Á Profª Helena Brentani, muito obrigada pelas contribuições na formação do banco, para a criopreservação do material e pela parceria sempre. Acredito que dela muitos frutos virão.

Á Prof. Dra. Roseli Gedanke Shavitt, por me receber no ambulatório para que pudesse observar os pacientes de TOC e enriquecer meu conhecimento quanto a clínica desse transtorno. E aos demais médicos que me acolheram e aceitaram minha presença nas consultas, além de me explicarem os quadros de pacientes em especial.

Á querida Carolina Cappi, que me ajudou no início dessa empreitada com conceitos sobre TOC e conservação de material para estudos moleculares. Além da amizade, palavras de apoio e motivação e pelo exemplo de dedicação ás pesquisas. Á Ariane Machado, que participou da primeira fase do projeto para formação da coleção de casos psiquiátricos. Ao Dr. Marcelo Hoexter por participar do "melhor diagnóstico estimado" e por revisar as entrevistas dos casos de TOC. Atualmente, por atuar ativamente para aplicação da segunda entrevista nos casos triados como TOC.

Aos Funcionários do Departamento de Patologia: Reginaldo, Ana Luiza, Sr. Luís, Sra. Pérola, Sra. Cecília, Sr. Sérgio e Thiago Rezende. Pela disponibilidade em poder nos ajudar sempre.

Aos técnicos e recepcionistas e médicos e todos os demais funcionários do SVOC-USP, pela contribuição contínua e por nos receber como equipe, sempre com boa vontade. E por nos auxiliar a conseguirmos coletar os casos.

Á Ana, ao Euvânio, ao Marcos, á Silvinha, ao Sebastião, ás cunhadas Solemar e Angélica, sobrinhos Samuel, João, Sara e Luís; e vovós Chica e Tereza, que me adotaram. Família que me recebeu de braços abertos e torceu pela minha trajetória com palavras e orações, além de cuidarem do Hugo na minha ausência.

Ao cunhado Davi e cunhada: Sheila pelos encontros felizes e momentos de união. E á cunhada Carla, por ter me dado meu primeiro sobrinho, Pietro, feliz, sincero e com brilho nos olhos.

Á minha amiga Kelly por entender minha empreitada e me apoiar com palavras, mesmo na distância.

Esta é uma das partes mais difíceis de se escrever neste trabalho, porque a emoção vinha á tona... Me emocionei todas as vezes que escrevia um trecho dos agradecimentos, pois era como assistir á um "filme", que me faria lembrar o quão essas pessoas foram importantes e o quanto necessitamos um do outro. Portanto, agradeço a Deus por ter me dado essa riqueza.

APOIO FINANCEIRO

Fundação de Amparo á Pesquisa (Fapesp)- Processo nº 2009/51482-0

CNPq Universal Processo nº 476647/2010-0

CAPES- Bolsa de estudo para doutorado direto no país

Bolsa da CAPES- PDEE- Bolsa para doutorado sanduíche na Universidade de Würzburg na Alemanha.

Programa de Pós-Graduação do Departamento de Patologia- Passagem aérea para New Orleans para apresentação do pôster no Congresso SOBP.

"As pessoas devem saber que o cérebro é a única origem de prazeres e alegrias, risos e brincadeiras, tristeza e preocupação, bem como disforia e choros. Através do cérebro podemos pensar, ver, ouvir e diferenciar entre sentir-se envergonhado, bom, ruim, feliz...Através do cérebro que nos tornamos insanos, enfurecidos, desenvolvemos ansiedades e medos, que podem vir no meio da noite ou durante o dia. Sofremos de insônia, cometemos erros e temos preocupações infundadas. Perdemos a capacidade de reconhecer a realidade, nos tornamos apáticos e não podemos participar da vida social.... Sofremos todos os mencionados acima através do cérebro quando este está doente..."

Hippocrates, " Da doença sagrada" (Traduzido do original em Grego e Alemão para o inglês por Andreas Marneros, e "tradução nossa" para esta Tese

NORMALIZAÇÃO BASEADA

Esta dissertação ou tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

LISTA DE SIGLAS

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE QUADROS

RESUMO

ABSTRACT

1.INTRODUÇÃO.....**1**

1.1 História dos transtornos de humor e dos transtornos de ansiedade *3*

1.2 Epidemiologia dos transtornos de humor e ansiedade: TOC, TAB e TDM *6*

1.3 A prevalência de transtornos psiquiátricos em idosos *7*

1.4 O quadro clínico do TAB *8*

1.5 O quadro clínico do TDM.....*9*

1.6 O quadro clínico do TOC *10*

1.7 TOC e TAB: transtornos heterogênios *11*

1.8 Bases neurobiológicas para o diagnóstico de transtornos psiquiátricos através de técnicas de neuroimagem..... *12*

1.9 Estudos postmortem em TAB e TDM *18*

1.10 O desafio de se formar novas coleções..... *21*

1.11 A escolha das regiões de interesse para criopreservação..... *24*

1.12 O córtex orbitofrontal: justificativa para escolha da região de interesse..... *27*

1.13 Os neurônios: como identificá-los histologicamente..... *34*

1.14 A técnica de estereologia *35*

2. OBJETIVOS.....**39**

2.1 Objetivos Gerais *41*

2.2 Objetivos específicos.....*41*

3. MATERIAIS E MÉTODOS..... **43**

3.1 Comitê de Ética..... *45*

3.2 Estrutura e recrutamento dos casos *45*

3.2.1 A triagem clínica inicial *48*

3.2.2 Entrevista psiquiátrica realizada com o informante *49*

3.3 Procedimentos anatomopatológicos *51*

3.3.1 Etapa 1- Coleta das amostras *52*

3.3.2 Etapa 2- Processamento dos encéfalos *52*

3.3.3 Preparo do paraformaldeído não tamponado 8% (Protocolo do BEHGEEC-FMUSP) *53*

3.3.4 Protocolo de dissecção das áreas *55*

3.4 - Processamento do hemisfério fixado para estudos estereológicos *61*

3.4.1 Documentação fotográfica dos casos *61*

3.4.2 Volumetria *62*

3.4.3 Desidratação em álcool *63*

3.3.4 Retirada de meninges *64*

3.3.5 Etapa 3- parte A -Emblocamento em celoidina (nitrocelulose) *65*

3.4.7 Corte seriado *67*

3.4.7 Coloração de Galocianina (coloração de Nissl) *68*

3.5 Etapa 3- parte B - Reconstrução tridimensional: estratégia para delineamento da região de interesse *69*

3.6 Critérios citoarquitetônicos *71*

3.7 Etapa 3- parte C- Análise estereológica *72*

3.7.1 Protocolo de contagem de neurônios *72*

3.7.2 Cálculo de volume e número total de neurônios das sub-regiões e do COF *74*

4.ANÁLISE ESTATÍSTICA **77**

5.RESULTADOS **81**

5.1 Casos coletados *83*

5.1.1 Dados demográficos *85*

5.2 Citoarquitetura *88*

5.2.1 Delineamento do córtex orbitofrontal para cálculo de volume *91*

5.4 Densidade neuronal, número total de neurônios e volume em todos os pacientes e controles *97*

5.5 Densidade neuronal, número total de neurônios e volume dividindo os grupos em TAB, TOC e controles *104*

5.6 Homogeneidade das sub-regiões *111*

5.7. Densidade neuronal nas camadas corticais *112*

6.DISCUSSÃO **115**

6.1. Os métodos aplicados *117*

6.2 Número de neurônios e densidade neuronal *120*

6.3. Volume *125*

6.4. Limitações do estudo 127

6.5. Novas estratégias e perspectivas futuras *129*

7. CONCLUSÃO 133

8. ANEXOS **137**

Anexo A - Aprovação do comitê de ética local *139*

Anexo B - Aprovação do comitê de ética nacional *140*

Anexo C - Entrevista de triagem *146*

Anexo D - Entrevista postmortem *161*

Anexo E- Procedimento operacional padrão para envio de amostras à Würzburg *178*

Anexo F- Guias rápidos dos programas computacionais aplicados *187*

9. REFERÊNCIAS *189*

LISTA DE SIGLAS

APA- *American Psychiatry Association*

BA - áreas de Broadman

BEHGEEC-FMUSP - Banco de Encéfalos Humanos do Grupo de Estudos em Envelhecimento Cerebral da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

CDR - Clinical Dementia Rating (Escore Clínico de Demência)

CID-10 - Classificação Internacional das Doenças 10ª edição

CONEP - Comissão Nacional de Ética em Pesquisa

DSM-IV - Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders

D-YBOCS - Escala dimensional Yale Brown de sintomas obsessio-compulsivos

ECA- Epidemiological Catchment Area Study

GEEC - Grupo de Estudos em Envelhecimento Cerebral

GEROLAB- Laboratório de Fisiopatologia no Envelhecimento

IPQ-HCFMUSP - Instituto de Psiquiatria do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

IQCODE- Informant questionarie cognitive decline in the erlderly

MDQ - Mood Disorder Questionnaire

NCS-R - National Comorbidity Survey Replication

NPI- Inventário Neuropsiquiátrico

OMS - Organização Mundial da Saúde

PROMAN - Programa de Transtorno Bipolar

PROTOC - Programa de Transtorno Obsessivo-Compulsivo

Psi-BEHGEEC-FMUSP- casos psiquiátricos do Banco de Encéfalos Humanos do Grupo de Estudos em Envelhecimento Cerebral da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

RNM - Ressonância nuclear magnética

RNMf - Ressonância nuclear magnética funcional

SVOC-USP- Serviço de Verificação de Óbitos da Capital da Universidade de São Paulo

Y-BOCS - Escala Yale Brown de sintomas obsessivo-compulsivos

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

µm- micrômetro
2D - bi - dimensional
3D - tri - dimensional
a.C. - Antes de Cristo
AL - antero-lateral
AM - antero-medial
BA - Área de Broadman
CEPTC-córtico-estriado-pálido-talâmico-corticais
cm- centímetro
COF - Córtex orbitofrontal
d.C. - Depois de Cristo
DP: Desvio Padrão
Esq. - Esquizofrenia
FP- região frontopolar,
g - gramas
IAM- Infarto agudo do miocárdio
IPM- Intervalo *postmortem*
L- litro
LCR- líquor cefalorraquidiano
mbar- milibar
mL: mililitro
mm^3- milímetro cúbico
mm- milímetro
MO- médio - orbitofrontal
Ne- número de neurônios
Nv- densidade
ºC- graus Celsius
Olf- tubérculo olfatório,
pH - potencial hidrogeniônico
PL- poterior lateral,
RDI- Região de interesse
ref. - referência
rpm - rotação por minuto
SO- sulco rostral inferior
SOC - sintoma obsessivo-compulsivo
TAB- Transtorno Afetivo Bipolar
TDM- Transtorno de Depressão Maior
TOC- Transtorno Obsessivo-Compulsivo
TUS Transtorno por Uso de Substâncias
V- volume
∑ - somatória

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Proposta esquemática das conexões pré-frontais envolvidas no controle emocional humano e na fisiopatologia 15

Figura 2 - Representação dos circuitos córtico-estriado-pálido-talâmico-corticais envolvidos no TOC..... 16

Figura 3 - Camadas corticais 30

Figura 4 - Conexões somatossensórias do COF 31

Figura 5 - As sub-regiões do COF..... 32

Figura 6 - Identificação de neurônios e glias..... 35

Figura 7 - Fluxograma das etapas do processo de coleta de encéfalos e dados dos indivíduos. 51

Figura 8 - Procedimentos iniciais para o processamento dos encéfalos..... 53

Figura 9 - Mapa das 46 áreas dissecadas (Molde de áreas)..... 55

Figura 10 - Protocolo detalhado da dissecção das regiões de interesse..... 56

Figura 11 - Documentação dos hemisférios fixados 62

Figura 12 - Volumetria através do Princípio de Arquimedes..... 63

Figura 13 - Documentação do hemisfério após desidratação. 64

Figura 14 - Emblocamento do hemisfério em celoidina..... 66

Figura 15 - Corte seriado do bloco de celoidina..... 67

Figura 16 - Processo de coloração em galocianina..... 69

Figura 17 - Fatias seriadas que foram armazenadas em ordem..... 70

Figura 18 - Fatia em celoidina enumerada e fatia corada. 70

Figura 19 - Identificação arquitetônica das regiões de interesse. 71

Figura 20 - A contagem de células pelo Image J 1.45I ®. 73

Figura 21 - Fluxograma de casos triados e coletados..... 84

Figura 22 - Representação gráfica da incidência de tabagismo e etilismo no grupo de pacientes 87

Figura 23 - Representação gráfica da incidência de tabagismo e etilismo no grupo controle 87

Figura 24 - Citoarquitetura do córtex orbitofrontal de um caso controle. 89

Figura 25 - Delimitação de bordas entre fronto-polar (FP) e antero-medial (AM) e posterior medial (PM)..... 94

Figura 26 - Delimitação de bordas entre fronto-polar (FP), médio-orbitofrntal (MO) e posterior-lateral (PL). 95

Figura 27 - Delimitação de bordas entre posterior-medial (PM) e posterior-lateral (PL).....97

Figura 28 - Representação gráfica da densidade neuronal nas sub-regiões e no COF em todos os pacientes e controles 99

Figura 29 - Representação gráfica da média dos volumes das sub-regiões e COF em todos os pacientes e controles..... 101

Figura 30 - Representação gráfica do número total de neurônios em todos os pacientes e controles. 103

Figura 31 - Representação gráfica da densidade neuronal nas sub-regiões e no COF em pacientes de TAB, TOC e controles. 106

Figura 32 - Representação gráfica dos volumes das sub-regiões e COF nos pacientes de TAB, TOC e controles..... 108

Figura 33- Representação gráfica do número total de neurônios das sub-regiões e do COF nos pacientes de TAB e TOC e controles. 110

Figura 34 - Representação gráfica da comparação de densidade neuronal entre AM, MO e AL no grupo de pacientes e no grupo controle. 111

Figura 35 - Comparação da citoarquitetura das camadas corticais. 112

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Alguns estudos realizados com técnicas de imagens para investigação de áreas cerebrais em doenças psiquiátricas..... 25

Tabela 2 - Alguns estudos *postmortem* para investigação de áreas cerebrais em doenças psiquiátricas 26

Tabela 3 - Instrumentos utilizados na triagem 48

Tabela 4 - Escalas ou Instrumentos para avaliação clínico-funcional de TAB e TOC . 50

Tabela 5 Áreas representadas e crio preservadas á -80 C 54

Tabela 6 - Características dos pacientes e controles 86

Tabela 7 - Mediana de densidade neuronal (Nv/mm^3) de cada sub-região de COF e total 98

Tabela 8 - Volume (mm^3) das sub-regiões e do COF nos pacientes e nos controles .. 100

Tabela 9 - Número total de neurônios nos psiquiátricos e controles 102

Tabela 10 - Densidade neuronal (Nv/mm^3) de COF e sub-regiões nos subgrupos 104

Tabela 11- Densidade neuronal (Nv/mm^3) do COF e sub-regiões nos pacientes de TOC e controle 105

Tabela 12- Volume (mm^3) das sub-regiões e de COF nos subgrupos 107

Tabela 13- Volume (mm^3) das sub-regiões e do COF de pacientes com TOC e controles 107

Tabela 14- Número total de neurônios nos subgrupos 109

Tabela 15- Número total de neurônios no grupo TOC e no grupo controle 109

Tabela 16 - Análise da densidade neuronal nas das camadas corticais: comparação entre pacientes e controles 114

LISTA DE QUADROS

Quadro 1- Critérios de Inclusão e Exclusão do Psi-BEHGEEC 46

Quadro 2 - Critérios de Inclusão de controles saudáveis 47

Quadro 3 - Descrição de análise para delineamento das sub-regiões do COF 90

Quadro 4 - Descrição da transição citoarquitetônica entre FM e AM 92

Quadro 5 - Descrição da transição citoarquitetônica entre AM e PM 93

Quadro 6 - Descrição da transição citoarquitetônica entre FP e MO 94

Quadro 7 - Descrição da transição citoarquitetônica entre AL e MO 96

Quadro 8 - Descrição da transição citoarquitetônica entre PM e PL 96

RESUMO

Oliveira KC. *Análise estereológica postmortem do córtex orbitofrontal de indivíduos acometidos por transtorno obsessivo-compulsivo ou por transtorno afetivo bipolar* [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2013.

INTRODUÇÃO: O transtorno afetivo bipolar (TAB) e o transtorno obsessivo-compulsivo (TOC) estão entre as dez condições médicas mais incapacitantes. No entanto, suas bases neurobiológicas são ainda desconhecidas. Os estudos *postmortem* podem dar uma boa contribuição para o entendimento da fisiopatologia desses transtornos, pois permitem a comparação das alterações celulares, citoarquitetônicas e moleculares com as manifestações clínicas, além de auxiliarem numa melhor compreensão dos achados dos estudos de neuroimagem. OBJETIVOS: Comparar a densidade neuronal, volume e número total de neurônios do córtex orbitofrontal (COF) e suas sub-regiões: antero-medial (AM), médio-orbitofrontal (MO) e antero-lateral (AL) entre casos psiquiátricos e controles; Verificar se há diferenças de densidade neuronal, volume e número total de neurônios do COF entre os casos de TAB e casos de TOC e controles. MÉTODOS E CASUÍSTICA: 17 encéfalos de indivíduos acima de 50 anos foram coletados, diagnosticados e submetidos a análises estereológicas, sendo três indivíduos acometidos por TAB, sete indivíduos acometidos por TOC e sete controles saudáveis pareados por idade, gênero e hemisfério cerebral analisado. Um hemisfério foi fixado por perfusão com formalina 20% e processado para estudos neuroestereológicos, enquanto o outro teve as 45 regiões de interesse dissecadas e congeladas a -80ºC para futuros estudos moleculares. RESULTADOS: O COF e suas sub-regiões apresentaram menor densidade neuronal no grupo total de casos *vs*. controles ($p<0,05$). No entanto, não houve diferença em relação ao volume. A sub-região MO apresentou um número menor de neurônios nos casos que em controles ($p<0,05$). Curiosamente, na análise de densidade neuronal das camadas corticais, apenas a camada IV não apresentou diferença estatisticamente significante entre casos e controles. CONCLUSÕES: Nossos achados mostram que alterações no COF podem estar envolvidas com a fisiopatologia do TOC ou TAB, e indicam que podem haver interações entre elas e, além disso, concordam com estudos de imagem funcional e de atividades cerebrais na região MO que nos faz refletir que além de uma perda neuronal, há também uma hipoativação e uma redução funcional. Estudos com um número maior de amostras e com diferenciação celular poderão trazer novas contribuições para o entendimento da fisiopatologia desses transtornos neuropsiquiátricos.

Descritores: Encéfalo; Córtex cerebral; Contagem de células; Pesquisa biomédica; Transtorno obsessivo-compulsivo/fisiopatologia; Transtorno bipolar/fisiopatologia.

ABSTRACT

Oliveira KC. *Postmortem stereological analysis of orbitofrontal cortex of the subjects with obsessive-compulsive disorder or. bipolar disorder* [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2013.

INTRODUCTION: Bipolar disorder (BD) and obsessive compulsive disorder (OCD) are within the ten medical condition promoving incapacity worldwide. To date, their neuropathological substrates are yet to be disclosed. Postmortem studies designed to estimate cytoarchitectonic and molecular changes for clinical and imaging correlation, have the potencial to undercover pathophysiological aspects of these conditions. OBJECTIVE: Objective: To compare neuronal density, volume and total neuron number of orbitofrontal cortex (OFC) as a whole and divided by sub-regions: antero-medial (AM), medio-orbitofrontal (MO) and antero-lateral (AL) among BD, OCD and matched controls. METHODS: We used 17 postmortem brains sourced from the Psy-BBBABSG. All the subject were older than 50 years and were classified based on clinical evaluation in BD, OCD and healthy control. Subjects were matched by age, gender and brain hemisphere. One hemisphere were perfusion fixed with 20% formalin and used for neuroestereological studies. The second hemisphere had ROIs dissected and snap frozen for future molecular studies. OUTCOMES: Neuron density in OFC and the sub-regions were decreased in cases vs. controls ($p<0,05$). This result was observed in cortical layers analyses with exception of layer IV. We did not observed significant changes in volume. The MO sub-region had reduced total neuron number in cases than in controls ($p<0,05$). CONCLUSION: Ours results suggest that OFC changes may be part of BD and OCD pathogenesis. These results go in line with functional imaging findings. Further studies with a higher number of cases and adressing specific neuron types are needed.

Descriptors: Brain; Cerebral cortex; Cell count; Biomedical research; Obsessive-compulsive disorder/physiopathology; Bipolar disorder/physiopathology.

INTRODUÇÃO

1. Introdução

1.1 História dos transtornos de humor e dos transtornos de ansiedade

Os transtornos de humor e de ansiedade são entidades antigas identificadas pelos gregos do período clássico. Entretanto, as definições antigas eram bem diferentes das atuais (Marneros & Angst, 2002). Antes de se chegar ao conceito clínico de transtorno afetivo bipolar (TAB) e depressão maior (TDM) outras entidades como loucura, melancolia, mania, fúria divina, tristeza, demência, psicose e depressão nomearam o transtorno (Alcântara *et al.*, 2003). E ainda, muito antes disso, sociedades primitivas acreditavam que essas entidades fossem efeito de magia e forças sobrenaturais.

As discussões a esse respeito sempre existiram e muitos anos foram necessários para que a definição dos transtornos psiquiátricos fosse implantada. Hipócrates inovou com seus escritos naturalistas ao modificar os conceitos médicos que sofriam muita influência da magia (Angst & Marneros, 2001). No século IV e V a.C., Hipócrates descreveu a melancolia e a associou a um conjunto de sintomas tais como: aversão ao alimento, desalento, abatimento, insônia, irritabilidade e inquietude e afirmava que o medo e a depressão eram prolongados. Para o estudioso, todas as doenças e, inclusive, as doenças mentais se originavam do desequilíbrio de quatro humores: sangue, bile amarela, bile negra e fleuma. Considerava-se que o excesso de bile negra, era a causa da melancolia, ao contrário da mania que seria mediada pela bile amarela. Tal teoria permaneceu até o Renascimento (Angst & Marneros, 2001; Cordás, 2002).

Embora o conceito de transtorno de humor tenha sido modificado ao longo dos séculos, descrições de mania e melancolia estão presentes, no mínimo, desde os escritos datados entre 300 e 400 anos a.C (Roccatagliata & Barclay-Temperini, 1986; Angst & Marneros, 2001). No início dos anos 150 d.C., Areteu da Capadócia descreveu que os elementos de ambas as síndromes foram reconhecidas em diferentes períodos em um mesmo indivíduo. Mais tarde, em 1567, um médico bizantino chamado Alexander de Tralles observou que em casos de melancolia crônica, o quadro de mania poderia

aparecer em crises periódicas ou recorrentes de forma cíclica, e as características de mania e melancolia geralmente aconteciam em um mesmo período (Trede *et al.*, 2005).

No século XIX, a possibilidade de diferenciação de transtornos psiquiátricos, apesar da sobreposição das características clínicas, foi encorajada. Ocorreu um crescimento do reconhecimento dos transtornos mentais relacionados a distúrbios orgânicos, principalmente, associado à insanidade (Bayle, 1822; apud Trede *et al*.,2005), estado confusional ou delírio (Delasiauve, 1851; apud Trede *et al*.,2005).

Dentre as teorias divulgadas, está a de Rufus Wyman, em Boston, no ano de 1830, de que mania e melancolia estão intimamente relacionadas podendo o indivíduo alternar rapidamente de uma a outra. Três anos mais tarde, na Bélgica, Joseph Guislain verificou que mania e melancolia estão intimamente relacionadas e são geralmente alternadas (Angst & Sellaro, 2000). Entretanto, somente alguns anos depois as bases modernas do transtorno bipolar foram introduzidas por Falret e Baillarger na França, nos anos de 1851 e 1854 respectivamente (Marneros, 2001).

Historicamente, há um exemplo importante de tensão entre condições específicas múltiplas versus conceitos diagnósticos que podem ser encontrados na evolução da abordagem do conceito de depressão maníaco-depressiva por Emil Kraepelin (1856-1926). E é a partir desses conceitos discutidos por Kraepelin nas oito edições de seu famoso livro texto: Psychiatrie: Ein Lehrbuch für Studierende und Ärzte 5- ou Psychiatry: *A Textbook for Students and Physicians*, na tradução para o português "Psiquiatria: um livro-texto para estudantes e médicos", que as doenças psiquiátricas tiveram seus conceitos refinados e categorizados e se definiu principalmente o TAB (Angst & Sellaro, 2000).

Foi nesta edição que se descreveu dois grupos dentro da complexidade da até então conhecida como depressão maníaco-depressiva (insanidade) dando origem ao TAB e depressão unipolar. A partir de 1950, consolidou-se a distinção entre transtorno bipolar, caracteristicamente marcado por episódios de mania e depressão ou estados mistos, e depressão maior com ausência de episódios maníacos ou de excitação (Trede *et al.*, 2005; Zivanovic & Nedic, 2012).

A definição clínica de TAB é algo muito recente. Até 1966, mesmo com algumas evidências e textos publicados, os conceitos de depressão bipolar e unipolar eram muito

confundidos. Os conceitos distintos dos dois transtornos foram implantados nas obras de Jules Angst, que publicou a sua monografia, no mesmo ano de 1966, intitulada*: "On the Aetiology and Nosology of Depressive Disorders"* em português: "A Etilogia e a Nosologia dos Transtornos Psiquiátricos" e, em seguida, alguns meses depois, Carlo Perris publicou na Europa, *"A study of bipolar (maniac-depressive) and unipolar recurrent depressive disorder"* em português: " Estudo do transtorno bipolar (maníaco-depressivo) e da depressão unipolar recorrente". Em 1967, nos Estados Unidos, Winokur e Clayton confirmaram essa hipótese, publicando seus resultados (Marneros, 2001).

Por fim, o TAB refere-se a um grupo de transtornos afetivos que juntamente caracterizam episódios de depressão, mania ou hipomania (Phillips & Kupfer, 2013).

O transtorno obsessivo-compulsivo (TOC) é um tipo de transtorno de ansiedade e também possui uma história de séculos para ser definido. No entanto, a história do TOC possui relatos mais recentes. Embora a síndrome relacionada ao TOC esteja sendo investigada e reconhecida há mais de 300 anos (Insel, 1990), as primeiras considerações sobre uma causa orgânica para o transtorno foram feitas a partir de 1860. Até uma década antes, o TOC era considerado parte das entidades de insanidade ou até mesmo de senilidade.

No entanto, sua definição e seu conceito não foram instituídos logo de início; em um primeiro momento foi chamada de neurose, depois quase próximo à psicose e somente nos anos de 1880 foi considerada uma neurose propriamente (Berrios, 1989).

Os sintomas foram descritos parcialmente por diferentes pesquisadores e em diferentes países: os egípcios descreviam os sintomas relacionados à religiosidade e impulsos sexuais, a perda de desejos foi descrita pelos franceses, e os alemães deram ênfase na natureza irracional dos pensamentos (Okasha *et al.*, 1994).

1.2 Epidemiologia dos transtornos de humor e ansiedade: TOC, TAB e TDM

Após a Segunda Guerra Mundial, foram realizados diversos estudos populacionais para se avaliar a prevalência de doenças psiquiátricas. No entanto, não havia muitas ferramentas objetivas para se avaliar um paciente e definir o diagnóstico. Apenas por volta dos anos 80 é que os estudos passaram a ser baseados em questionários semi-estruturados dando um enriquecimento ao método quantitativo (Angst & Marneros, 2001).

No estudo americano, *Epidemiological Catchment Area Study (ECA)* realizado com mais de nove mil indivíduos, observou-se que a prevalência dos transtornos de ansiedade, ao longo da vida, é em torno de 28% e dos transtornos de humor 20% (Kessler *et al.*, 2005).

Outros estudos do *ECA* e do *National Comorbidity Survey Replication (NCS-R)* mostraram uma prevalência de transtornos graves ou incapacitantes, incluindo transtorno bipolar, esquizofrenia, psicose não-afetiva, dependência de substâncias, tentativas de suicídio, em torno de 5% a 6% da população norte-americana (Andrade *et al.*, 2008).

A prevalência de TAB, ao longo da vida, é de aproximadamente 2,1% na população brasileira (Merikangas *et al.*, 2011), em concordância com a prevalência da população americana (Regier *et al.*, 1993; Merikangas *et al.*, 2007). No entanto, tem um estudo brasileiro que relata até 8,3% de prevalência (Moreno & Andrade, 2005).

O TDM afeta quase 15% da população mundial (Bremner *et al.*, 2002) e 16,2 % da população de adultos americanos segundo o *NCSR*. Entretanto, um recente estudo epidemiológico nacional, em corte transversal, avaliou quase 3 000 adultos e verificou uma prevalência de 20,4% em nossa população (Munhoz *et al.*, 2013).

O TOC é um transtorno psiquiátrico crônico, com prevalência em corte transversal de 1,0 a 2,0% (Ruscio *et al.*, 2010). A prevalência, em estudos longitudinais, é estimada em aproximadamente 2,5% (Torres & Lima, 2005). O transtorno está entre as dez condições médicas que causam maior incapacitação no mundo (Murray & Lopez, 1996) e estima-se que o TOC venha a se tornar o sexto transtorno psiquiátrico em 2020 em

relação ao número de anos de vida perdidos por incapacitação, segundo a Organização Mundial da Saúde (World Health Organization, 2006).

Um estudo epidemiológico de 1994 observou que as obsessões são mais prevalentes que as compulsões e que ao longo da vida o TOC está associado com o aumento de probabilidade de desenvolvimento de outras comorbidades (Kolada *et al.*, 1994), como depressão maior, em cerca de 67% dos casos (Aouizerate *et al.*, 2004).

1.3 A prevalência de transtornos psiquiátricos em idosos

Os transtornos afetam também os idosos, mesmo excluindo-se os que foram acometidos na fase jovem. Na atualidade, com o aumento da expectativa de vida, há elevação do número de transtornos que ocorrem tardiamente. Um estudo de prevalência avaliou a incidência de transtornos de humor em indivíduos a partir dos 55 anos de idade. Foi observado que tanto os transtornos de ansiedade quanto os de humor apresentam altas taxas de prevalência. Além disso, as taxas são maiores para o gênero feminino (Byers *et al.*, 2010).

Há um destaque para o desenvolvimento tardio de transtornos de humor na população idosa: um estudo transversal analisou 100 idosos bipolares e 100 controles pareados pela idade e observou que o transtorno bipolar foi um importante modificador no impacto da idade no funcionamento do indivíduo, o que caracteriza o transtorno como uma doença crônica e incapacitante (Cacilhas *et al.*, 2009). Embora existam tratamentos modernos, os resultados obtidos no tratamento contra a bipolaridade são mais escassos em idosos (Angst & Sellaro, 2000).

A literatura tem evidenciado que os transtornos de ansiedade, como o TOC, são comorbidades presentes também em indivíduos com transtorno de depressão maior tardia. Além disso, esses pacientes apresentam pior prognóstico do que os indivíduos acometidos apenas por depressão (Lenze, 2003). Estudos indicam que a taxa de

prevalência do TOC entre pessoas acima de 65 anos é de 1,5% e que entre os institucionalizados essa taxa é substancialmente maior (Teachman, 2007).

Esses dados são preocupantes quando analisamos os dados apresentados pela Organização Mundial da Saúde (OMS), a qual relata que haverá 2 bilhões de pessoas acima de 60 anos no mundo até o ano de 2050 (World Health Organization, 2013). Estes dados pedem atenção para a melhora da vida global e de sua qualidade o que inclui promover a prevenção e gerenciamento de doenças crônicas.

No Brasil, o aumento do número de idosos vem crescendo progressivamente o que indica que até 2025 poderá ser o sexto país do mundo em número de idosos (Organização Mundial Da Saúde, 2005). Com isso, a atenção para os cuidados com os idosos e o desenvolvimento de doenças crônicas nesta população é uma questão social e de saúde pública para a qual precisamos estar preparados. Certamente, o envelhecimento é um fenômeno que ocorre em outros países principalmente em países desenvolvidos (Kalache *et al.*, 1987). A grande diferença entre os países desenvolvidos e os países em desenvolvimento, em relação ao envelhecimento, é que os primeiros acompanham o ritmo desse crescimento do ponto de vista socioeconomico (Organização Mundial Da Saúde, 2005), enquanto os países em desenvolvimento ainda não estão estruturados para tal fenômeno, o que faz com que a qualidade de vida desses indivíduos sofra as consequências inclusive devido à atenção quase nula ás doenças neuropsiquiátricas.

1.4 O quadro clínico do TAB

O TAB tipo I é um transtorno psiquiátrico crônico cuja característica é a presença de episódios de alteração patológica de humor. Ao longo da evolução da doença o indivíduo sofre uma alternância entre episódios de depressão maior e de mania (Goodwin & Jamison, 2007). Estes episódios são recorrentes e os intervalos para alternância são variáveis podendo até mesmo haver um período de eutimia, que é a

normalidade de humor. Para ser considerado TAB I o indivíduo precisa ter sofrido pelo menos um episódio maníaco.

O TAB pode ter início em qualquer fase da vida, no entanto, é mais comumente manifesto na 3ª década (Lafer *et al.*, 2011). A partir da década de 90, evidenciou-se que o TAB é um transtorno heterogêneo, com ampla variação de sintomas e curso (Kapczinski *et al.*, 2004). O TAB de início tardio, após os 50 anos de idade, pode estar associado a alguma outra condição médica (Lafer *et al.*, 2012), como demência frontotemporal.

É considerada uma doença psiquiátrica grave e devastadora, devido a grande frequência de hospitalização e tentativas de suicídio, prejuízo ocupacional, desestabilização familiar e pessoal. Apresenta impacto social, por estar associado ao prejuízo substancial do desempenho no trabalho e ao risco de suicídio ao longo da vida que é em torno de 15% (Nery *et al.*, 2010). Há indícios que as tentativas de suicídio nesses pacientes estejam associadas á baixa qualidade de vida (De Abreu *et al.*, 2012).

Além disso, a presença de sintomas psicóticos, abuso frequente de álcool e drogas e déficits cognitivos são fatores adicionais de aumento de morbidade nos portadores de TAB (Goodwin & Jamison, 2007), fazendo com que o TAB seja considerado um dos problemas de saúde pública que geram maior incapacitação em todo o mundo (Regier *et al.*, 1993; Murray & Lopez, 1996; Andrade *et al.*, 2002; Pini *et al.*, 2005).

1.5 O quadro clínico do TDM

Embora não tenhamos analisado casos específicos de TDM, o transtorno apareceu como comorbidade de alguns casos avaliados. Desta forma, algumas considerações sobre o TDM são feitas a seguir.

É uma desordem caracterizada pela recorrência de episódios depressivos discretos geralmente com sintomas como: desordem de humor, anedonia, baixa motivação, alteração de atividade psicomotora, redução do sono, apetite, energia e libido (Kessler *et*

al., 2005; Fitzgerald *et al.*, 2008). É frequentemente associada com incapacidade, significativa, morbidade e mortalidade. Está também listada pela OMS como uma das 10 condições médicas mais incapacitantes.

No geral, há uma grande dificuldade em diagnosticar e tratar os transtornos psiquiátricos. O TAB, muitas vezes é confundido e/ou tratado como TDM e o paciente sofre principalmente com a polifarmácia, pois dificilmente um paciente bipolar é livre de medicações e não tenham sido submetidos á diagnósticos prévios de TDM.

Um estudo recente mostra que existem estudos que procuram refinar os marcadores de diferenciação entre os dois transtornos e aponta que existe uma característica psicomotora discriminatória entre depressão unipolar e bipolar. Esse fator de ativação psicomotora associado à instabilidade mista, tentativa de suicídio e euforia pode ser usado para se fazer o diagnóstico diferencial (Cassano *et al.*, 2012).

1.6 O quadro clínico do TOC

O TOC é um tipo de transtorno de ansiedade e é caracterizado clinicamente por pensamentos persistentes, intrusivos, insensatos (obsessões) que causam desconforto e comportamentos repetitivos e compulsões normalmente realizadas para aliviar as obsessões.

Indivíduos portadores de TOC reconhecem que os seus pensamentos e comportamentos são excessivos e irracionais e frequentemente fazem grandes esforços para suprimir e resistir a eles. Ainda que medicamentos e terapia comportamental possam controlar os sintomas de TOC parcialmente, o curso habitual é crônico e a remissão completa é rara.

1.7 TOC e TAB: transtornos heterogêneos

O TOC, assim como outros transtornos mentais, possui um quadro heterogêneo (Miguel *et al.*, 2005) com inúmeros fatores contribuindo para sua expressão fenotípica, o que dificulta o seu diagnóstico.

É um transtorno permeado por uma variabilidade de sintomas e um dos tipos de obsessão mais frequente é o da contaminação (Kalache *et al.*, 1987) seguida de dúvida patológica (42%), somática (36%), necessidade de simetria e ordem (31%), agressividade (28%), sexual (26%) e outras (13%). Enquanto que as formas clássicas de compulsão incluem checagem (63%), lavagem e limpeza (50%), contagem (36%) necessidade de pedir ou confessar (31%), simetria e precisão (28%) e colecionismo (14,3%) (Rasmussen & Eisen, 1992; Sasson *et al.*, 1997; De Mathis *et al.*, 2006).

Atualmente o diagnóstico é realizado a partir da avaliação clínica do paciente e da observação dos sintomas e critérios definidos pelo DSM-IV (American Psychiatry Association, 2000). Para esse diagnóstico, geralmente são utilizados instrumentos e escalas de entrevista clínica estruturada como o SCID IV (Kim *et al.*, 2001) ou a escala Yale Brown de sintomas obsessivo-compulsivos (Y-BOCS).

Atualmente, para o diagnóstico clínico de TOC, a abordagem de dimensão dos sintomas tem sido empregada. Na tentativa de definir subtipos homogêneos do transtorno e reduzir a heterogeneidade do transtorno (De Mathis *et al.*, 2006; Kichuk *et al.*, 2013). Nessa abordagem, os pacientes são classificados segundo os sintomas obsessivo-compulsivos (SOC), a idade de início dos sintomas e a presença de tiques (Miguel *et al.*, 2005). Por fim, as diferenças clínicas encontradas entre os pacientes são precisamente caracterizadas formando-se grupos de pacientes em diferentes dimensões de sintomas (Rosario-Campos *et al.*, 2006).

Outro desafio para os pacientes de TOC é quanto ao tratamento, que pode ser medicamentoso ou por terapia comportamental. No entanto, o seu curso, a dosagem e a combinação de medicamentos são variados, principalmente por influência da heterogeneidade do transtorno (Kawaguchi *et al.*, 2013). No entanto, sabe-se que uma

parte dos pacientes (cerca de 40 a 60%) não respondem ao tratamento farmacológico (Arumugham & Reddy, 2013).

O TAB, por sua vez, também tem sido considerado uma doença heterogênea principalmente pela dificuldade em se estabelecer o diagnóstico. Os registros indicam que entre o início da doença e seu diagnóstico há um atraso que pode variar entre 5 e 10 anos, isso porque os pacientes bipolares que sofrem de um primeiro episódio depressivo, muitas vezes são diagnosticados como tal, nos primeiros anos de tratamento (Hirschfeld *et al.*, 2003).

Um estudo multicêntrico avaliou mais de 5.000 pacientes e observou que 31% dos pacientes diagnosticados como caso de TDM, foram reavaliados como TAB segundo o DSM-IV (Angst *et al.*, 2011).

1.8 Bases neurobiológicas para o diagnóstico de transtornos psiquiátricos através de técnicas de neuroimagem

As doenças neuropsiquiátricas sempre foram caracterizadas como psicoses funcionais com possíveis alterações de neurotransmissores, mas sem base neuropatológica consistente.

Nas últimas décadas os estudos que empregaram técnicas de neuroimagem *in vivo* apontam para alterações estruturais, neuroquímicas e funcionais em áreas cerebrais e em redes neurais específicas, sugerindo haver uma base neurobiológica para os transtornos mentais.

Os primeiros registros começaram a aparecer no final da década de 1970, com a disponibilidade da tomografia computadorizada, quando foi possível observar o alargamento dos ventrículos cerebrais em pacientes com esquizofrenia (Johnstone *et al.*, 1976).

Desde então, os estudos publicados sugerem alterações em determinadas regiões cerebrais tais como: córtex pré-frontal, córtex orbitofrontal (COF), corpo estriado, tálamo, cerebelo e estruturas límbicas como a amígdala e o hipocampo. Isto porque tais regiões compõem dois circuitos cerebrais importantes: o circuito límbico-talâmico-cortical (Marchand *et al.*, 2005) e o circuito límbico-estriado-globo pálido-talâmico.

Supõe-se que alterações funcionais em regiões cerebrais desses circuitos resultem no aparecimento de sintomas afetivos, cognitivos e comportamentais em transtornos psiquiátricos (Gigante *et al.*, 2011a). Estudos por neuroimagem funcional e estrutural evidenciaram que manifestações sintomáticas do TAB podem apresentar alterações nestas circuitarias (Nery *et al.*, 2009).

O circuito límbico-estriado-globo-pálido-talâmico possui características básicas: a princípio os impulsos cortico-estriatais são progressivamente integrados à região de passagem subsequente como: globo pálido ou substância negra e, em seguida, para uma porção restrita do tálamo. Deste, o impulso retornará a uma região cortical comum, já que se observa que os circuitos são parcialmente fechados através da projeção da porção talamocortical (Alexander *et al.*, 1986).

O COF, a região de interesse (RDI) neste estudo, faz parte de um dos cinco circuitos cerebrais: motor, oculomotor, dorsolateral pré-frontal, giro do cíngulo anterior e o próprio circuito orbitofrontal. Todos estão envolvidos nas primeiras redes organizacionais do cérebro (Cummings, 1993; Heimer, 2003).

No TAB, acredita-se que as informações originadas do córtex são transmitidas primeiramente para os núcleos da base e posteriormente para o tálamo (Angst & Marneros, 2001). Isto porque um modelo de circuitaria chamado de frontal-subcortical supõe-se ser como o de maior relevância no TAB e explicaria os sintomas do transtorno baseados em duas cadeias: excitatória e inibitória. A cadeia excitatória faz com que a informação que flui pela via direta do circuito frontal-subcortical aumenta o fluxo excitatório do córtex. Por sua vez, a cadeia inibitória, a via indireta do circuito, inibe o tálamo e com isso inibe a condução excitatória para o córtex (Marchand *et al.*, 2005). Em função deste modelo de circuito, acredita-se que a redução da função excitatória no córtex orbitofrontal possui um importante papel no TAB (Strakowski *et al.*, 2000).

Estudos por neuroimagem foram realizados baseados nestes modelos de circuitaria, considerando principalmente os núcleos da base e o córtex frontal como regiões alvo. Em consequência, já mostraram que alterações volumétricas e de densidade nestas regiões podem ter uma associação com o TAB.

Por sua vez, estudos de neuroimagem funcional apontam algumas disfunções (hiperativação ou hiperfunção) de áreas límbicas e subcorticais e redução de modulação (hipoativação ou hipofunção) das áreas pré-frontais associadas com desequilíbrio das emoções e da cognição (Strakowski *et al.*, 2005).

Um estudo clássico, utilizando ressonância nuclear magnética (RNM), mostrou uma redução de volume da região subgenual do giro do cíngulo anterior em pacientes bipolares (Sharma *et al.*, 2003). Outros estudos encontraram redução de densidade nessa mesma região (Doris *et al.*, 2004). No entanto, outros estudos não reproduziram esses achados (Brambilla *et al.*, 2002; Lochhead *et al.*, 2004; Lyoo *et al.*, 2004).

Para Fornito *et al.* (2007), em seus estudos com RNM, a redução do giro do cíngulo anterior está relacionado ao neurodesenvolvimento, pressupondo um desenvolvimento aberrante pré ou peri-natal desses pacientes.

Não se sabe o quanto tais anormalidades são decorrentes do processo fisiopatológico em si, ou se decorrem de fatores extrínsecos aos transtornos mais associados a ela, como a exposição à medicação psicotrópica ou uso de álcool e drogas. Por exemplo, um estudo realizado a partir da análise com RNM, mostrou que o volume de substância cinzenta no COF de pacientes bipolares deprimidos é menor do que em pacientes bipolares em remissão da doença (Nery *et al.*, 2009). Essa redução de volume da substância cinzenta pode estar associada á níveis menores de glutamato e glutamina, que foram mensurados em pacientes bipolares com história prévia de alcoolismo, por espectroscopia de próton no córtex pré-frontal dorsolateral esquerdo. Os pacientes bipolares que nunca desenvolveram alcoolismo não apresentaram alteração (Nery *et al.*, 2011). Esses estudos suportam a hipótese que as manifestações de humor intrínsecas à doença ou a exposição á fatores externos podem acompanhar anormalidades na estrutura cerebral.

Recentemente, foi publicado um relatório sobre o consenso da neuroanatomia funcional do TAB. Concluiu-se, que o TAB possivelmente origina-se de uma disfunção

nas duas conexões cerebrais que modulam o comportamento emocional (Figura 1). E o COF está envolvido em uma dessas conexões, tendo sua função associada á modulação dos estímulos emocionais internos, tais como os paradígmas que envolvem a indução de uma resposta emocional (Strakowski *et al.*, 2012).

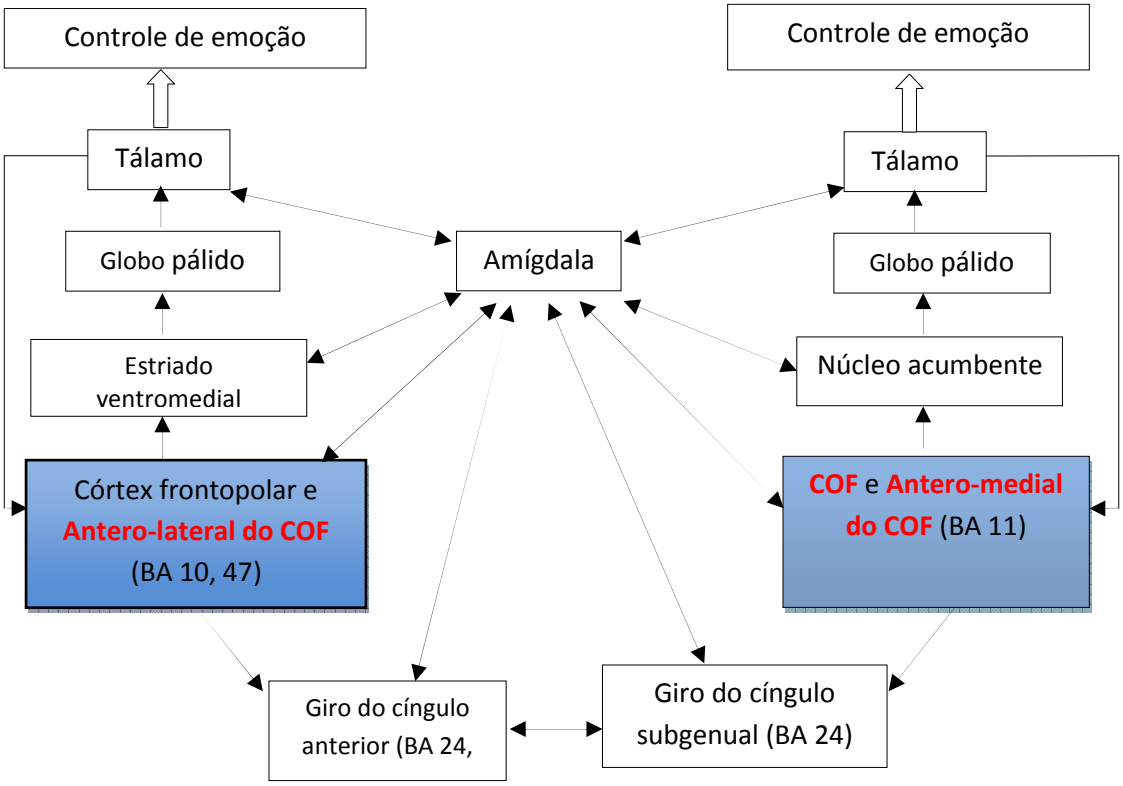


Figura 1 - Proposta esquemática das conexões pré-frontais envolvidas no controle emocional humano e na fisiopatologia do TAB. BA = áreas de Brodmann (Adaptado de: (Strakowski *et al.*, 2012).

Evidências de uma base biológica para o TOC são fornecidas por diversos estudos de neuroimagem estrutural e funcional, a partir dos quais, também, é possível prever um modelo fisiopatológico do TOC (Hoexter *et al.*, 2009). Esses estudos sugerem um modelo neurobiológico do TOC que envolvem os circuitos córtico-estriado-pálido-talâmico-corticais (CEPTC) (Figura 2).

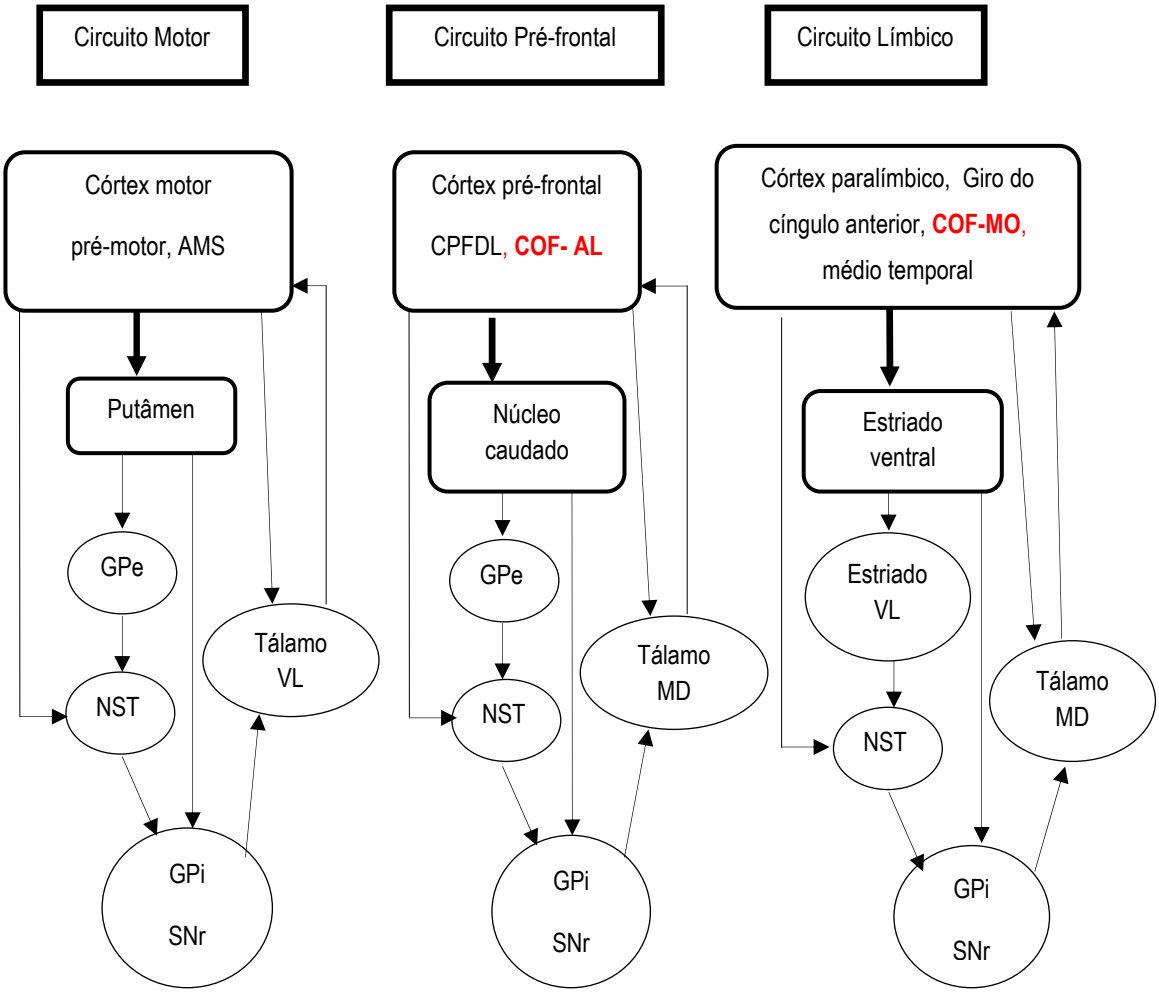


Figura 2 - Representação dos circuitos córtico-estriado-pálido-talâmico-corticais envolvidos no TOC. AMS: área motora suplementar; GPe : globo pálido externo; GPi: globo pálido interno; NST: núcleo subtalâmico; SNr: substância negra reticulata; Tálamo VL: tálamo ventral; Tálamo MD: tálamo mediosorsal. FONTE: Adaptado de (Alexander et al., 1986).

Segundo esse modelo, a manifestação dos sintomas do TOC estaria ligada à hiperatividade de certas regiões do cérebro (Rauch *et al.*, 1994).

Os primeiros estudos de neuroimagem funcional no TOC utilizaram tomografia por emissão de pósitrons e mostraram as áreas envolvidas no TOC relacionadas ao circuito CEPTC, sendo: o córtex pré-frontal (em especial o COF); os núcleos da base (principalmente a região do estriado, formada por putâmen e núcleo caudado); tálamo e giro do cíngulo anterior (Baxter *et al.*, 1987; Swedo *et al.*, 1989; Rauch *et al.*, 1994).

O uso de ressonância nuclear magnética funcional (RNMf) confirma os achados dos estudos que fizeram uso de tomografia, evidenciando uma maior ativação no córtex medio-orbitofrontal, córtex lateral frontal e giro do cíngulo anterior, e das regiões subcorticais: a amígdala e o núcleo caudado (Breiter *et al.*, 1996; Adler *et al.*, 2000; Nakao *et al.*, 2005).

Estudos interessados em investigar alteração volumétrica de regiões envolvidas nesses circuitos, mostraram que pacientes acometidos por TOC apresentam maior volume de substância cinzenta no COF e também na região parahipocampal. No mesmo estudo ao se investigar a porção subcortical, foi encontrada uma relação inversamente proporcional da gravidade dos sintomas do TOC com o volume do tálamo (Valente *et al.*, 2005).

Um estudo de meta-regressão coletou os dados de volume de 12 estudos que compararam pacientes com TOC e controles saudáveis. A partir desse estudo foi possível mostrar que não há alteração volumétrica global de substância cinzenta nos pacientes. No entanto, alterações volumétricas em regiões específicas foram apontadas sendo elas: de aumento de volume em regiões subcorticais como o núcleo caudado e putâmen e redução de volume do giro do cíngulo anterior, no córtex frontal médio e na área pré-motora, conhecida como área de Brodmann 6 (Radua & Mataix-Cols, 2009).

Entretanto, alguns estudos descrevem importantes circuitos que podem estar envolvidos nessas doenças. É previamente proposto que a disfunção do mesmo circuito límbico-talâmico-cortical, envolvido no TAB, esteja envolvido em depressão (Drevets *et al.*, 2008a), sendo confirmado por alguns estudos de imagem funcional que fazem uso de estímulos emocionais (Mayberg, 1997; Mayberg, 2003) .

Adicionalmente, as regiões subcorticais e o giro do cíngulo anterior apresentam um aumento funcional nos pacientes, ao contrário do córtex pré-frontal dorsalateral (Seminowicz *et al.*, 2004). Em contrapartida, um estudo anterior relatou que a atividade do córtex pré-frontal apresenta-se aumentada nos pacientes de TDM tratados com medicamentos antidepressivos (Mayberg *et al.*, 2000).

Quanto ás bases neurobiológicas da TDM, há vários estudos de neuroimagem tentando entender a fisiopatologia desse transtorno. No entanto, não há conclusões definitivas. Quanto á volumetria, um estudo estrutural, mostrou que o volume do giro

do cíngulo anterior e posterior de pacientes de TDM é menor do que em controles saudáveis (Caetano *et al.*, 2006). Um estudo de RNM avaliou o COF em pacientes e controles, estabelecendo uma delimitação própria das bordas e encontrou redução de volume da região nos pacientes (Lai *et al.*, 2000).

A aplicação de técnicas variadas não nos permite muitas comparações e conclusões (Fitzgerald *et al.*, 2008).

Em relação á densidade, em outro estudo, aplicando-se a mesma técnica, constatou-se que a concentração de substância cinzenta em pacientes de TDM é reduzida em diferentes áreas límbicas envolvidas com a regulação emocional como amígdala, hipocampo, tálamo, giro do cíngulo anterior e ainda o córtex temporal superior e médio, o lobo central do cerebelo e os núcleos da rafe (Lee *et al.*, 2011).

Há poucos estudos focados no COF, no entanto, um estudo recente mensurou a espessura do MO do COF e verificou que o mesmo é mais fino nos pacientes de TDM (Van Eijndhoven *et al.*, 2013).

No geral, em transtornos neuropsiquiátricos é suposto que reduções do volume de substância cinzenta nas regiões alvo podem corresponder a reduções no número de neurônios e células da glia ou da arborização dendrítica. E ainda, tais alterações morfológicas podem ser decorrentes de processos fisiopatológicos ligados a diminuição dos níveis de neurotrofinas e/ou a um funcionamento anormal de cascatas de sinalização intracelular que controlam a plasticidade sináptica e a resiliência celular (Schloesser *et al.*, 2008).

1.9 Estudos *postmortem* em TAB e TDM

Embora os estudos de neuroimagem tenham evidenciado diversos achados, proporcionando novos substratos para o entendimento neurobiológico do TAB e do TOC, etiologia e a fisiopatologia desses transtornos continuam sendo um enigma. A validação de tais achados a nível molecular e celular ainda são contraditórios (Bielau *et*

al., 2005), pois tais técnicas de pesquisa, embora sejam ferramentas de diagnóstico para muitas doenças, ainda são limitadas para elucidar mudanças neuropatológicas sutis ou alterações no número de neurônios (Ne) ou nível molecular associado a um transtorno psiquiátrico (Schmitt *et al.*, 2007; Schmitt *et al.*, 2008).

A falta de conhecimento sobre a fisiopatologia, a dificuldade de acesso ao tecido cerebral humano e a incerteza das associações entre as medidas normais e biológicas testadas e a patogênese impedem o desenvolvimento de biomarcadores para os transtornos psiquiátricos (American Psychiatry Association, 2012).

Embora diversos estudos estejam pautados na descoberta e investigação de marcadores histológicos e imunoistoquímicos, essa realidade ainda não é verídica para as doenças neuropsiquiátricas (Schnieder & Dwork, 2011). Poucos estudos realizados com amostras provindas de pacientes de esquizofrenia testaram uma reação imunoistoquímica com ubiquitina, no entanto, nenhum achado foi encontrado (Dwork *et al.*, 1998).

Desta forma, estudos *postmortem* são fundamentais para auxiliar no entendimento da etiologia e da fisiopatologia dos transtornos psiquiátricos (Schmitt *et al.*, 2007). Através desses estudos, pode-se fazer a análise direta das alterações celulares, morfológicas e moleculares presentes no tecido cerebral, podendo ser elucidados os possíveis mecanismos envolvidos.

Dentre os métodos neuropatológicos, a neuroestereologia é considerada padrão-ouro para análise morfológica de volume, densidade celular, número de células, área e tamanho celular. Tais análises fornecem informações sobre o desenvolvimento, reparo, envelhecimento, e alterações patológicas presentes no tecido cerebral humano (Schmitz & Hof, 2005).

Uma recente revisão de estudos *postmortem* mostrou que algumas regiões cerebrais de indivíduos portadores de TAB apresentam uma série de alterações em tamanho, número e densidade celular comparados às mesmas regiões cerebrais de indivíduos saudáveis. No entanto, as regiões de interesse e os métodos adotados são diferentes, criando diversos achados que dificilmente se inter-relacionam (Gigante *et al.*, 2011b).

Outras regiões cerebrais foram estudadas mostrando alterações como redução de densidade neuronal em pacientes psiquiátricos, sobretudo bipolares e obsessivos-

compulsivos. As regiões com esses achados foram: o giro do cíngulo anterior, o cíngulo dorsal (Benes *et al.*, 2001; Cotter *et al.*, 2002), com uma atenção especial dada ao giro do cíngulo anterior subgenual (Ongur *et al.*, 1998; Schmitt *et al.*, 2008), o hipocampo (Jeste & Lohr, 1989; Benes *et al.*, 2008), o córtex entorrinal (Falkai *et al.*, 1988; Schmidt *et al.*, 2008), o núcleo mediodorsal do tálamo (Pakkenberg, 1990) e a amígdala (Bielau *et al.*, 2005).

O córtex pré-frontal é outra importante região de interesse, no entanto verifica-se uma variabilidade de sua delimitação nos estudos, devido a sua grande extensão. A partir do mapa de Brodmann, esta região pode ser considerada como área 9, 46 (dorsolaterais), 10 (frontopolar), e ainda como área 47, sendo identificada tanto como

antero-lateral do COF, quanto, pré-frontal inferior. Entretanto, mesmo considerando a diversidade de denominações usadas, são poucos os estudos que mostram alterações importantes nessas regiões.

No córtex pré-frontal dorsolateral são descritas reduções na densidade em camadas corticais (Rajkowska *et al.*, 2001) ou ainda, uma redução no tamanho dos neurônios (Cotter *et al.*, 2002; Law & Harrison, 2003; Vostrikov *et al.*, 2007).

Acredita-se que essas alterações no córtex pré-frontal possam estar associadas á déficits de funções cognitivas, comumente apresentadas em pacientes com TAB.

Porém achados semelhantes foram encontrados na mesma região cerebral em pacientes de TDM, apresentando redução de densidade neuronal e de tamanho de neurônios (Stockmeier *et al.*, 2004).

Poucos estudos foram realizados avaliando o COF. Um desses estudos investigou a porção caudal do COF e encontrou redução do tamanho neuronal (Cotter *et al.*, 2005).

Embora o TOC seja considerado um dos mais robustos e confiáveis modelos de alterações neurobiológicas entre os transtornos psiquiátricos baseados nos estudos de neuroimagem (Hoexter *et al.*, 2009), até o momento não há nenhum estudo *postmortem* publicado para confirmar esses achados.

Diversos mecanismos são propostos para explicar a presença dessas alterações, incluindo a excitotoxicidade por excesso de glutamato, neuroinflamação e disfunção de vias de sinalização (Gigante *et al.*, 2011b).

Acredita-se, também, que exista uma etiologia complexa e heterogênea a nível genético e ambiental, podendo ter variações até mesmo de indivíduo para indivíduo (Smoller & Finn, 2003).

A associação dos métodos estereológicos e testes estatísticos apropriados pode identificar alterações cerebrais estruturais distinguíveis entre encéfalos acometidos e não-acometidos.

Novas técnicas de pesquisa neuropatológica e celular tornaram os estudos *postmortem* a nova fronteira da pesquisa dos transtornos psiquiátricos em neurobiologia (Schmitt *et al.*, 2008) e as informações obtidas não são possíveis por nenhuma outra técnica de pesquisa em psiquiatria, até o momento.

Porém, a neuroestereologia requer um tecido *postmortem* de boa qualidade, levando em conta o controle de diversos parâmetros e, por isso, este tipo de pesquisa possui dificuldades inerentes como: as dificuldades em coletar encéfalos, em caracterizar clinicamente os casos, em conservar e processar o material cerebral. O tecido *postmortem* pode ser utilizado na investigação de alterações patológicas moleculares, como a expressão de RNA e proteínas, com a finalidade de avaliar, por exemplo: variações de *splicing*, nível de receptores específicos e atividade enzimática os quais também requerem cuidados especiais.

Assim, criação de bancos de encéfalos de portadores de transtornos psiquiátricos é uma iniciativa rara e altamente dependente de envolvimento multidisciplinar.

1.10 O desafio de se formar novas coleções

Coleções de encéfalos de pacientes portadores de TAB são raras, embora existentes. Estudos de revisão apontam que 80% das publicações de estudos *postmortem* no TAB, nos últimos 30 anos, usaram materiais originados das mesmas séries de casos

(Torrey *et al.*, 2000; Deep-Soboslay *et al.*, 2008). Com isso ficou demonstrado que há uma necessidade imperiosa de novas coleções para avançar o entendimento da neurobiologia deste transtorno grave e incapacitante (De Oliveira *et al.*, 2012).

Além disso, houve uma redução do número de autópsias no mundo, o que faz com que coleções de amostras de controles saudáveis sejam escassas, dificultando o controle de parâmetros importantes de qualidade como o intervalo *postmortem* (Waldvogel *et al.*, 2006).

Com respeito ao TOC, não se conhece nenhum banco de encéfalos que se dedique a coletar casos deste transtorno o que reforça como é difícil coletar encéfalos bem caracterizados de pacientes que foram portadores de TAB ou TOC.

A investigação neuropatológica é um componente essencial dos esforços atuais para revelar a complexa neurobiologia desses dois transtornos psiquiátricos. E a partir desse ponto, a primeira fase de nossa pesquisa se dedicou em expandir a coleção *postmortem* de casos bem caracterizados psiquiatricamente para o uso da comunidade científica, havendo então a parceria de um grupo de pesquisadores multidisciplinares.

No Brasil, o maior banco de encéfalos humanos existente foi criado em 2004 pelos Departamentos de: Patologia, Neurologia e pela Disciplina de Geriatria da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo pelo grupo de integrantes do Grupo de Estudos em Envelhecimento Cerebral (GEEC) e recebeu o nome de Banco de Encéfalos Humanos do Grupo de Estudos em Envelhecimento Cerebral (BEHGEEC). Seu principal objetivo é coletar material de grande qualidade para pesquisas multidisciplinares sobre o envelhecimento cerebral e doenças neurodegenerativas (Grinberg *et al.*, 2007) e para isso conta com a participação de diferentes especialistas.

Diferente de iniciativas semelhantes ao redor do mundo, que obtêm os espécimes cerebrais a partir de doações individuais espalhadas pela rede de abrangência da pesquisa, o BEHGEEC dispõe da vantagem única de contar com uma fonte de doações de tecido cerebral, que é o Serviço de Verificação de Óbitos da Capital da Universidade de São Paulo (SVOC-USP), o qual realiza em média 13.000 autópsias por ano. O SVOC foi criado em 1931 e em 1939 passou a ser vinculado á USP (Leite, 2009).

Sempre cuidadoso com questões éticas e metodológicas, e moldado em parâmetros internacionais, o BEHGEEC coletou mais de 1.600 encéfalos desde que foi criado, e disponibiliza esse material para grupos de pesquisa interessados no estudo de envelhecimento e quadros demenciais (Grinberg *et al.*, 2007).

A necessidade de caracterizar e excluir doenças psiquiátricas, como os transtornos de humor e de ansiedade, nos casos coletados estimulou a primeira etapa de uma parceria entre o BEHGEEC e o Departamento de Psiquiatria da Faculdade de Medicina da USP. Dois grupos de pesquisa (Programa de Transtorno Bipolar, PROMAN; e Programa de Transtornos do Espectro Obsessivo-Compulsivo, PROTOC), respectivamente especializados no estudo da clínica e neurobiologia do TAB e do TOC, se uniram ao BEHGEEC para iniciar a primeira coleção brasileira de encéfalos de pacientes portadores de TAB e de TOC. Ainda nesta parceria contamos com a estrutura do Laboratório de Pesquisa em Morfologia Cerebral do Departamento de Psiquiatria Clínica da Julius-Maximilian Universidade de Würzburg na Alemanha, para adaptação de protocolos neuroestereológicos adequados para a coleção.

Desta forma, o Psi-BEHGEEC-FMUSP foi estabelecido em 2008 baseado na experiência local e bem sucedida do BEHGEEC-FMUSP e em outros bancos de encéfalos focados em transtornos psiquiátricos (Deep-Soboslay *et al.*, 2005; Ferrer *et al.*, 2008; Schmitt *et al.*, 2008).

O Psi-BEHGEEC-FMUSP, a princípio, foi focado na coleta de casos de TAB e TOC, mas devido á possibilidade de rastreio de outros transtornos, eventualmente são armazenados também, casos de TDM, esquizofrenia e transtorno por uso de substâncias (TUS). Isto ocorre, pois alguns casos são identificados após a avaliação final das informações sobre os pacientes previamente rastreados como possíveis casos TAB ou TOC.

O primeiro ano de estabelecimento do projeto foi dedicado ao desenvolvimento de protocolos para a triagem, recepção, coleção e armazenamento de casos. A coleção foi iniciada efetivamente em 2009. Todos os protocolos foram aprovados pelo comitê de ética local e nacional. Desta forma a primeira parte deste trabalho objetivou descrever os procedimentos usados para formação da coleção de casos psiquiátricos, além de justificar os protocolos escolhidos para essa pesquisa e discutir as diferenças entre o

nosso protocolo e os adotados por outras coleções similares no mundo (De Oliveira *et al.*, 2012).

O Psi-BEHGEEC-FMUSP possui dois núcleos: (1) clínico: responsável pela triagem e avaliação clínica e (2) patológico: responsável pelo processamento do tecido, manuseio e criopreservação. O núcleo clínico é composto por uma equipe na qual atuam enfermeiros gerontólogos e psiquiatras extensivamente treinados em pesquisa psiquiátrica e supervisionados por especialistas em transtornos de humor e ansiedade. O núcleo patológico é composto por uma equipe multidisciplinar de profissionais da saúde graduados e alunos de graduação supervisionados por neuropatologistas experientes.

1.11 A escolha das regiões de interesse para criopreservação

Considerando que a primeira etapa do projeto contemplou a formação da coleção, um protocolo foi planejado e melhorado para dar início às investigações realizadas neste trabalho. Sobretudo a seleção de áreas cerebrais para criopreservação escolhidas até o presente momento, foram baseadas em revisões constantes sobre as evidências mais atuais apontadas nos estudos de imagem *in vivo*, e estereológicos em *postmortem*. Toda a amostra armazenada está disponível para estudos futuros. Segue abaixo as tabelas de revisões (Tabelas1 e 2):

Tabela 1 - Alguns estudos realizados com técnicas de imagens para investigação de áreas cerebrais em doenças psiquiátricas

Região Cerebral	***Transtorno Estudado***	***Autores***
Amígdala	TAB / TOC	(Altshuler *et al.*, 1998; Blumberg *et al.*, 2003; Brambilla *et al.*, 2003; Strakowski *et al.*, 2005; Rosso *et al.*, 2007; Doty *et al.*, 2008) ;
Córtex frontal	TAB	(Doris *et al.*, 2004)
Córtex frontopolar	TAB	(Drapier *et al.*, 2008)
Córtex orbitofrontal	TOC/TAB	(Choi *et al.*, 2004; Pujol *et al.*, 2004; Nery *et al.*, 2009)
Giro do cíngulo anterior	TAB/TOC	(Doris *et al.*, 2004; Kang *et al.*, 2004; Lochhead *et al.*, 2004; Lyoo *et al.*, 2004; Mcdonald *et al.*, 2004)
Globo pálido	TOC/TAB	(Delbello *et al.*, 2004)
Hipocampo	TAB / TOC	(Atmaca *et al.*, 2008; Bearden *et al.*, 2008) ;
Lobo parietal	TAB	(Mcdonald *et al.*, 2004)
Lobo temporal	TAB/TOC	(Kwon *et al.*, 2003; Lochhead *et al.*, 2004; Mcdonald *et al.*, 2004)
Córtex entorrinal	TOC	(Valente *et al.*, 2005)
Núcleo caudado	TAB	(Beyer *et al.*, 2004; Delbello *et al.*, 2004)
Putâmen	TAB/TOC	(O'sullivan *et al.*, 1997; Delbello *et al.*, 2004; Pujol *et al.*, 2004)
Sustância branca	TAB	(Mcdonald *et al.*, 2004)
Tálamo	TAB	(Caetano *et al.*, 2001; Monkul *et al.*, 2006)

Tabela 2 - Alguns estudos *postmortem* para investigação de áreas cerebrais em doenças psiquiátricas

Região Cerebral	***Transtorno Estudado***	***Autores***
Amígdala	TAB/ TDM / Esquizofrenia	(Bezchlibnyk *et al.*, 2007)
Córtex entorrinal	TAB	(Schmitt *et al.*, 2008)
Córtex orbitofrontal	TAB	(Cotter *et al.*, 2005)
Córtex pré-frontal dorsolateral	TAB	(Rajkowska, 2000; Rajkowska *et al.*, 2001; Law & Harrison, 2003; Vostrikov *et al.*, 2007; Sakai *et al.*, 2008)
Giro do cíngulo	TAB	(Ongur *et al.*, 1998; Benes *et al.*, 2001; Bouras *et al.*, 2001; Chana *et al.*, 2003; Todtenkopf *et al.*, 2005; Drevets *et al.*, 2008b)
Hipocampo	TAB / TDM	(Muller *et al.*, 2001; Benes *et al.*, 2008)
Tálamo	TAB	(Young *et al.*, 2004; Byne *et al.*, 2009)
Córtex temporal	TAB	(Beasley *et al.*, 2005)

1.12 O córtex orbitofrontal: justificativa para escolha da região de interesse

O COF faz parte do lobo frontal e mais precisamente forma a base da parte rostral desse lobo, sobrepondo-se á uma fina camada óssea da órbita. Na superfície óssea da órbita é possível identificar impressões da superfície cortical que é conhecida como juga cerebrália. Classicamente, o COF tem sua extensão sagital compreendida entre a substância perfurada anterior (polo caudal) e o polo rostral (borda rostral) e na extensão coronal: do opérculo frontal (borda lateral) á margem ventral-medial do respectivo hemisfério (borda medial). É uma região composta por quatro sulcos e por quatro giros: o sulco olfatório ocupa uma porção medial do hemisfério, que forma a borda lateral do giro reto. Em posição lateral a este sulco, outros dois: o sulco medial lateral e o orbitofrontal transverso formam um conjunto de sulcos semelhantes ás letras "H", "X" e "K". Estes sulcos são responsáveis por originar, no COF, quatro giros maiores: o medial, o lateral, o anterior e o giro orbitofrontal posterior (Chiavaras & Petrides, 2000). Importante salientar que a formação de sulcos e giros tem sido associada á delimitação de estruturas (Xu *et al.*, 2010) e de conectividade neuronal (Herculano-Houzel *et al.*, 2010) e ainda, que a variação anatômica de giros e sulcos no COF pode estar associada com o desenvolvimento de transtornos neuropsiquiátricos (Bartholomeusz *et al.*, 2013).

Segundo os principais registros citoarquitetônicos, o COF compreende a associação de áreas isocorticais: agranular paralímbica e granular (Von Economo & Koskinas, 1925; Vogt *et al.*, 1995). Segundo estes autores, ficou sendo compreendida como uma grande área, citoarquitetonicamente e arquitetonicamente, heterogênea e pode ser subdividida adotando outras sub-regiões (Ongur *et al.*, 2003). Essas evidências são confirmadas também pelos estudos de neuroimagem estrutural, funcional e com os estudos com lesão nesta região. Desta forma, denominou-se a área 47, sendo a parte caudal medial e considerou-se que a área 13 possui as mesmas características arquitetônicas da área 47. A área 12 foi então definida na porção medial e a área 11 em uma porção rostral inferior.

O córtex cerebral humano pode ser subdividido, pela anatomia microscópica, em duas partes, isocórtex ou neocórtex e alocórtex, que por sua vez, é subdividido em paleocórtex e arquicórtex (Filimonoff, 1947).

O isocórtex compõe a maior parte do córtex de um adulto humano e se caracteriza por possuir seis camadas corticais, visivelmente estruturadas a partir da coloração de Nissl (Zilles *et al.*, 2004).

Sabe-se que somente duas regiões isocorticais no cérebro adulto possuem uma redução ou aumento do número de camadas corticais, sendo elas: o córtex frontal agranular, cuja lâmina cortical IV não é claramente visível e possui uma correlação com o córtex motor e pré-motor e o córtex visual primário, que mostra uma subdivisão das camadas IV em IVa, IVb e IVc (Zilles *et al.*, 2004).

O córtex é classificado em homogenético e heterogenético. O córtex homogenético se assemelha muito ao isocórtex, em que suas seis camadas corticais são desenvolvidas ainda durante o estágio fetal e preservadas, na idade adulta, com exceção das duas regiões já mencionadas acima. O córtex heterogenético, por sua vez, se assemelha ao alocórtex e nunca passou pelo estágio de desenvolvimento com seis camadas corticais e nem indica tal arquitetura em adultos. Devido á área escolhida para o estudo serão focalizadas, a seguir, as características arquitetônicas e citoarquitetônicas do lobo frontal. Esta região cerebral compreende o isocórtex e pode ser subdividido citoarquitetonicamente em regiões granular (camada IV visível), não-granular (camada IV pouco desenvolvida), e agranular (ausência de camada IV). O COF faz parte da região ventral-orbital designada por Brodmann como áreas 11, 12, 47 e compõem também a região granular pré-frontal (Zilles *et al.*, 2004).

As seis camadas corticais, recebem os nomes: camada molecular (I), camada externa granular (II), camada piramidal externa (III), camada granular interna (IV), camada ganglionar ou camada piramidal externa (V) e camada multiforme ou também chamada de camada de células fusiformes ou polimórficas (VI) (Von Economo & Koskinas, 1925).

Segue uma breve descrição das camadas corticais do COF segundo von Economo e Koskinas

- Camada molecular ou camada I: possui espessura normal na região granular e um pouco mais espessa na parte agranular do córtex. Pode ter pequenas células piramidais ou fusiformes;

- Camada granular externa ou camada II: é extremamente estreita se comparada com a camada I e também possui pouca celularidade, as células geralmente são pequenas e piramidais;

- Camada piramidal externa ou camada III: é subdividida em IIIa, IIIb e IIIc. IIIa possui células relativamente maiores do que as da camada IV. As células da camada IIIb não são maiores que as das camadas IIIa e IIIc . Em porções caudais se tornam menos povoadas;

- Camada granular interna o camada IV: estreita e mais pobre em células, possui células pequenas e granulares. Observa-se um estreitamento da camada no COF;

- Camada ganglionar ou camada piramidal externa V: possui um grupo irregular de células, com presença de células piramidais e triangulares. A camada Va mostra células de tamanhos variados e mais distribuídas do que em Vb, que contém células médias;

- Camada multiforme ou camada VI: é espessa e caracterizada pela presença de células piramidais. Normalmente, a densidade celular é diminuída de VIa para VIb.

Todas as camadas são identificadas por algarismos romanos conforme a figura 3.

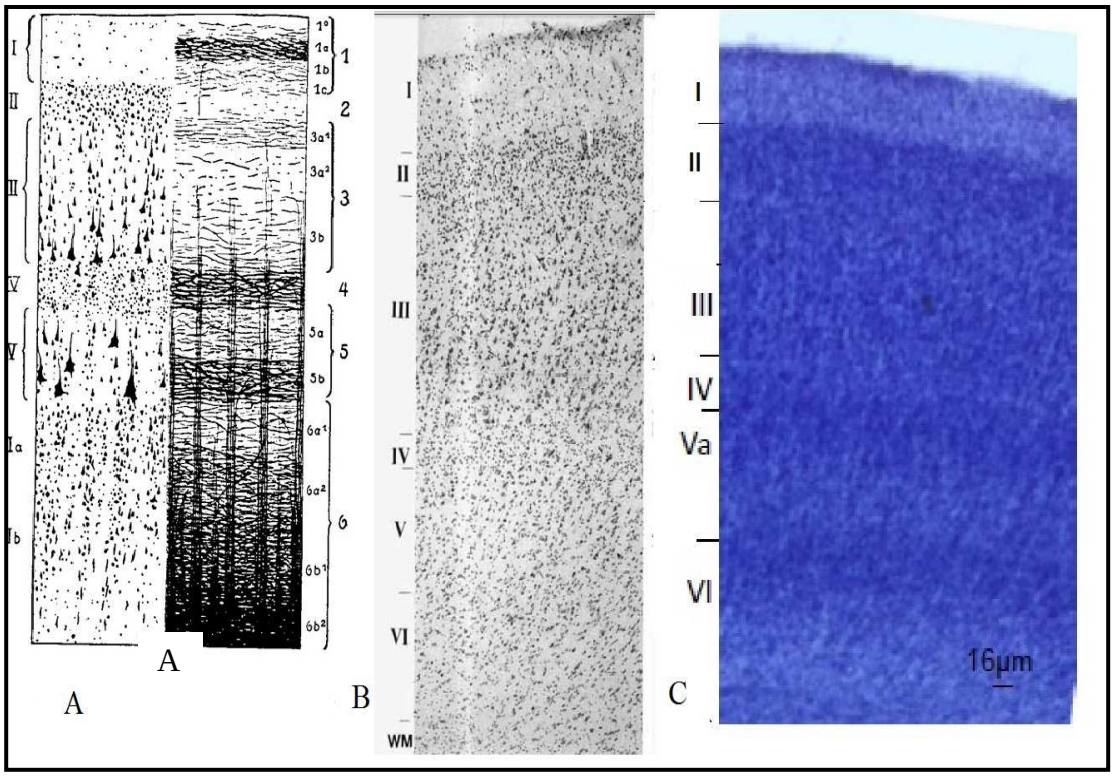


Figura 3 - Camadas corticais. A) Esquema adaptado da distribuição das camadas; B) Esquema adaptado da coloração de Nissl C) Identificação em nossos casos.
FONTE: Adaptado de von Economo & Koskinas (1925) e Hof, *et al.*(1995)

Sabe-se que a partir do COF originam-se aferentes do córtex piriforme. Este está localizado entre o trato olfatório lateral e o córtex temporal, a partir da conexão insular, fazendo uma integração entre a região cortical e límbica (Nieuwenhuys, 2012). Esta região possui extensa conexão com outras regiões cerebrais incluindo o núcleo mediodorsal talâmico, diversas áreas sensoriais, áreas límbicas como a região ventral-medial do estriado, hipotálamo e amígdala (Ongur & Price, 2000; Hornboll *et al.*, 2013).

A região ventral-orbital recebe impulsos ou informações do núcleo mediodorsal do tálamo (Divac *et al.*, 1978; Alexander *et al.*, 1986).

Estas conexões confirmam que o COF é uma região importante para a qual diversas conexões sensoriais e somatosensórias convergem (Bechara *et al.*, 2000; Barbas, 2007), nas quais são transmitidas informações viscerais, relacionadas á gustação e olfação (Stevenson & Miller, 2013).

A figura 4 esboça esquematicamente o COF e as diversas conexões funcionais que a ela convergem.

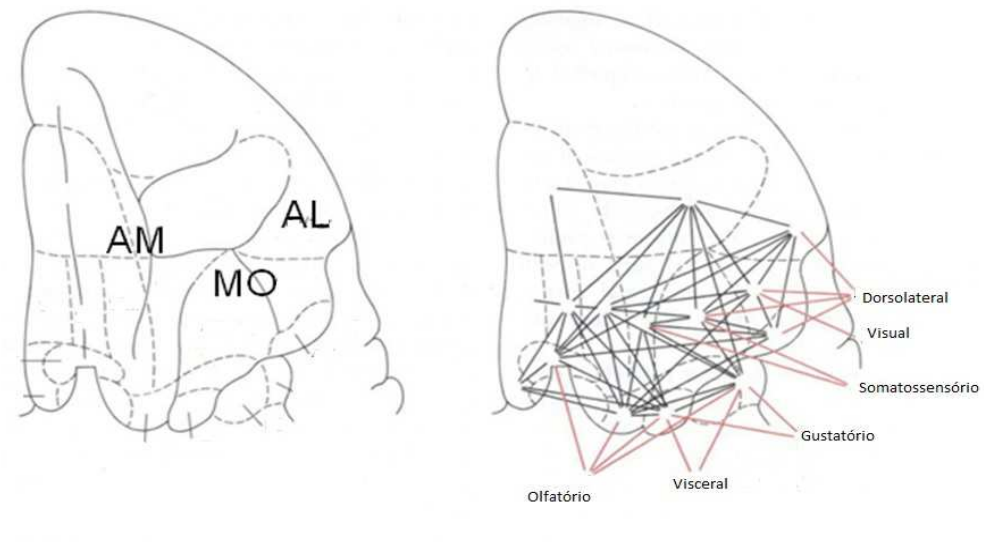


Figura 4 - Conexões somatossensórias do COF
FONTE: Adaptado de Nieuwenhuys (2008)

No entanto, o delineamento dessa região ainda não é bem definido. Alguns estudos sobre morfologia tentaram definir exatamente a região, utilizando métodos e técnicas diferentes, o que tornaram as definições contraditórias (Von Economo & Koskinas, 1925; Beck, 1949; Petrides, 2001; Ongur *et al.*, 2003; Uylings *et al.*, 2010).

A partir de evidências imunoistoquímicas e citoarquitetônicas, Hof *et al.* (1995) baseados nos estudos anteriores, dividiram a superfície basal do lobo frontal em oito áreas distintas dentre elas a região antero-medial (AM) do COF, médio-orbitofrontal (MO) e antero-lateral (AL) do COF. Com base no estudo de Hof e nas observações realizadas com as amostras da coleção do Laboratório de Pesquisa em Morfologia Cerebral da Universidade de Würzburg, demos início á nossa estratégia de análise.

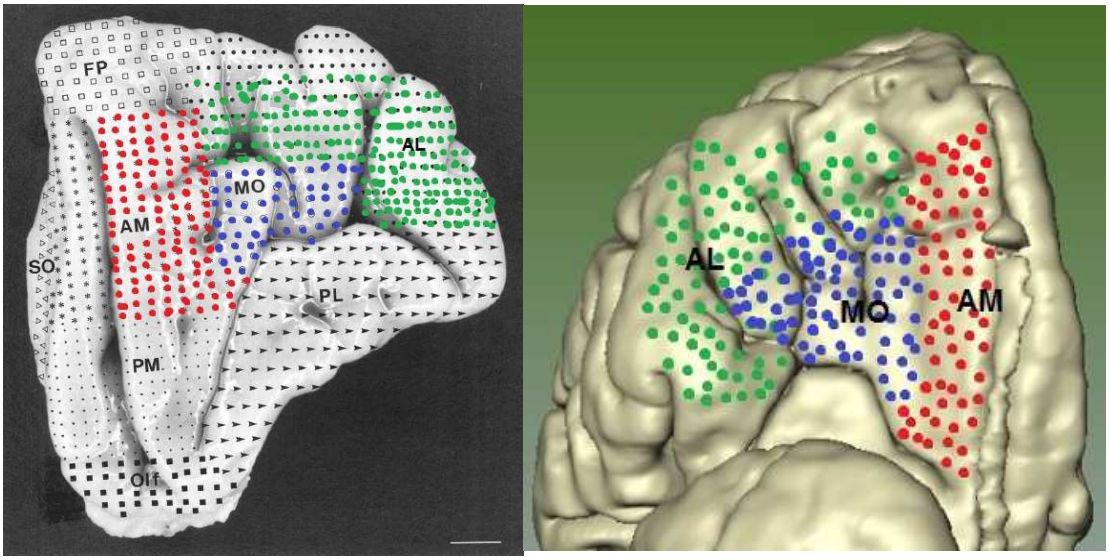


Figura 5 - As sub-regiões do COF. Figura A: Esquema modificado da delimitação do COF proposto por Hof. FP= região frontopolar, MO= região medio-orbitofrontal, Olf: tubérculo olfatório, PL= região poterior lateral, SO= sulco rostral inferior, AL= região antero-lateral, AM= região antero-medial . Escala de 1,5 cm. Figura B: Reconstrução 3D de um caso da nossa amostra e indicação das sub-regiões.
FONTE: Adaptado de (Hof *et al.*, 1995).

Acredita-se que manifestações comportamentais, cognitivas e emocionais estejam relacionadas à disfunção de conexões cerebrais relacionadas ao córtex pré-frontal e sistema límbico e particularmente aos circuitos inter-relacionados: o circuito límbico-talamo-cortical e límbico-estriato-pálido-talâmico, nos quais o COF está envolvido (Carmichael & Price, 1994; Saxena *et al.*, 2003; Nery *et al.*, 2009; Gigante *et al.*, 2011b).

Estudos mostram que o COF é uma região funcionalmente heterogênea e as primeiras observações foram realizadas em pacientes que sofreram lesões, principalmente nas porções centrais do COF. Estes sujeitos apresentaram déficits sensoriais e mnésicos, confabulação e distúrbios de personalidade graves incluindo a falta de consciência social. Os primeiros registros, segundo relatos, apareceram no final da década de 1930 (Tranel *et al.*, 1988; Damasio *et al.*, 1990; Malloy *et al.*, 1993). Desde então, estudos comportamentais tem sido desenvolvidos para tentar explicar diversas teorias. Uma delas é que quando há mudança de comportamento e essa mudança está relacionada a afeitos negativos e inapropriados como: desinibição e pobre tomada de decisão (Damasio *et al.*, 1994). Aventa-se então, a hipótese de o COF estar envolvido com a moralidade (Funayama & Mimura, 2012).

Além disso, outros estudos também mostram o COF está relacionada á perda da habilidade humana e animal de adaptação a mudanças ou resultados inesperados, ou seja, á habilidade que o humano tem de se adaptar às novas circunstâncias (Schoenbaum *et al.*, 2003). Desse modo, portanto, insatisfação diante de mudanças pode desencadear um transtorno de humor ou ansiedade. Uma das teorias apontadas para explicar esse fenômeno é de que essa região é um codificador rapidamente flexível de informação associativa.

A partir desses indícios, justifica-se a investigação da correlação dessa região de interesse (RDI) com as doenças de transtorno de ansiedade e de humor. Desta forma, o COF tem ganho destaque nas investigações de diversas doenças neuropsiquiátricas, principalmente nos estudos por imagem (Bremner *et al.*, 2002; Kringelbach & Rolls, 2004; Altshuler *et al.*, 2005; Kuhn *et al.*, 2011).

Ainda, estudos de ressonância funcional revelam que o córtex orbitofrontal e ocórtex pré-frontal estão ativados durante o processamento de comportamento social e julgamento de ações de consequência social, sobretudo na sub-região MO do COF (Moll *et al.*, 2002).

No TAB foi verificada uma possível hipoatividade das sub-regiões rostral e lateral quando o indivíduo está em episódio maníaco, associadas à redução de volume do COF em adultos (Cotter *et al.*, 2005). No entanto, esses achados ainda não foram confirmados.

No TOC, a relação do COF com os sintomas da doença está mais robusta. Medições metabólicas com aplicação da técnica de PET foram realizadas, a fim de encontrar relação com o metabolismo de glicose e TOC, nos quais a elevação das taxas nos pacientes foram significantes no COF (Baxter *et al.*, 1989). Porém, outro estudo verificou redução de glicose em pacientes com sintomas específicos como o colecionismo (Saxena *et al.*, 2004).

Em estudos clínicos, o tratamento medicamentoso e terapêutico de pacientes com TOC já mostrou associação entre a remissão de sintomas e a hiperativação do córtex orbitofrontal no estado basal (Etain & Bonnet-Perrin, 2001).

Em resumo, o COF apresenta um papel central no comportamento humano e é associado com diferentes áreas sensoriais, com estruturas límbicas e com o córtex pré-frontal que media funções executivas, refletindo controle e inibição de comportamento inapropriado e de resposta emocional. Além disso, está relacionado á tomada de decisão, flexibilidade comportamental diante de novas situações e solução de problemas (Jackowski *et al.*, 2012).

1.13 Os neurônios: como identificá-los histologicamente

Os neurônios possuem forma e tamanho variados, e são formados por um corpo celular ou pericário, contendo um núcleo e um nucléolo. Do corpo, partem prolongamentos chamados de axônios.

Para a sua identificação celular, a melhor coloração conhecida até o momento, é a coloração de galocianina, também conhecida como Nissl com a qual, o neurônio apresenta-se grande, com nucléolo e citoplasma geralmente bem corados, sendo característico, a proeminência da substância de Nissl no citoplasma (Schnieder & Dwork, 2011).

O citoplasma do neurônio possui retículo endoplasmático rugoso que é responsável pela formação de agregados de cisternas que originam polirribossomos livres. A boa coloração de galocianina é decorrente da impregnação do corante ás cisternas e ribossomos que são visualizados no microscópio óptico como manchas basofílicas (Junqueira e Carneiro, 1999).

As células gliais por sua vez, também são visualizadas usando-se a coloração de galocianina, sendo que oligodendrócitos, astrócitos e micróglias são mais compactos e menores. Diferentemente das demais glias, os oligodendrócitos possuem núcleo mais basofílico (Hamidi et al., 2004).

No geral, a coloração de galocianina permite identificar neurônios e diferenciá-los de células gliais (Figura 6).

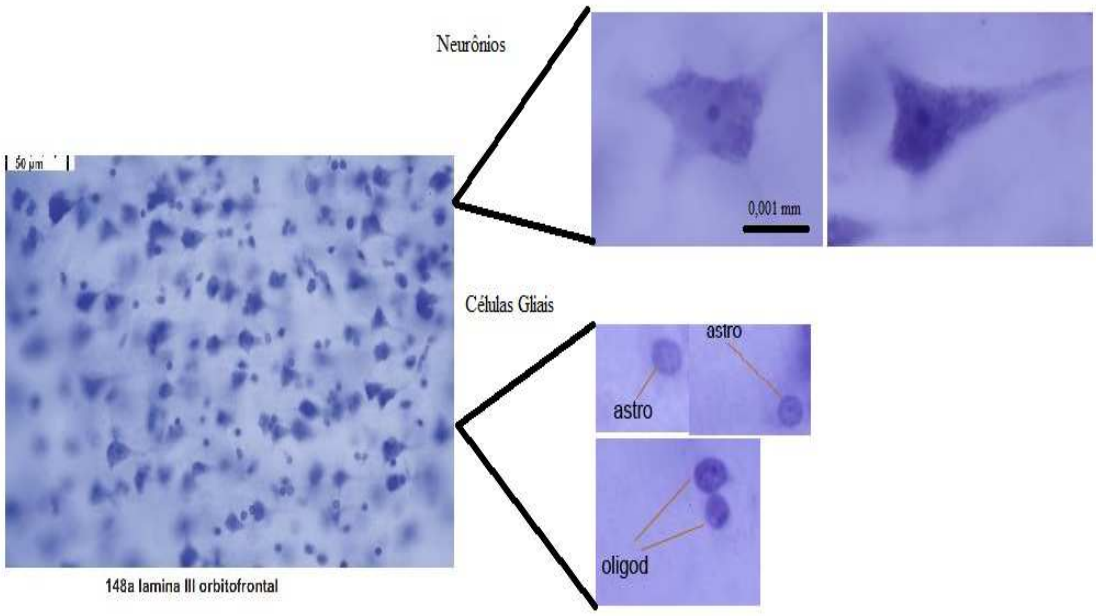


Figura 6 - Identificação de neurônios e glias. Foto microscópica de lâmina cortical corada com galocianina. Foco em um ponto da camada cortical III do COF com aumento de 200x. Em um aumento maior (2000x) é possível visualizar e diferenciar neurônios, astrócitos (astro) e oligodendrócitos (oligd.). Escala da imagem da fatia 50 µm e da imagem das células com escala de 1 µm

1.14 A técnica de estereologia

"A estereologia é a parte dos métodos matemáticos relacionados á medidas tri-dimensionais obtidas das secções de uma estrutura" (Weibel, 1979)

O objetivo principal da estereologia é a obtenção de informações quantitativas, a partir de imagens microscópicas. A técnica de contagem de partículas, através da microscopia, é uma das mais importantes descobertas da pesquisa desde o início da era moderna científica (Geuna, 2005).

As principais vantagens da estereologia são: a eficiência, simplicidade, validade e a aplicabilidade ampla. As técnicas esterológicas oferecem maneiras altamente eficientes de se estimar alguns parâmetros numéricos com poucos viéses como: áreas, tamanhos,

volumes, densidades e número de populações de um material sólido em amostras como secções planas.

Em estudos neuropatológicos é permitida tanto a análise em regiões inteiras do encéfalo, quanto de uma região específica ou ainda de uma única célula ou núcleo.

Pode-se considerar o estado de arte, quando a estereologia está associada á morfologia e permite o mapeamento morfológico da região de interesse em três dimensões.

A busca da melhoria das técnicas estereológicas é alvo de pesquisa já há mais de 20 anos, no entanto, a mais recente técnica que tem eliminado os vieses é o "*Design-based-stereology*", cuja definição indica que as amostras e as grades que serão usadas podem ser definidas previamente (West, 2002). O método é ideal para detectar efeitos pequenos em estruturas heterogêneas e desta forma, melhorar a interpretação dos dados (Dorph-Petersen & Lewis, 2011).

Considerada padrão-ouro desde o final dos anos 1980, o disetor óptico é uma técnica utilizada para se mensurar densidade de populações. Tem como base a contagem tri-dimensional (3D) e por isso foi chamada de "caixa de contagem", no inglês, *counting box*, que se trata da contagem de células em um volume óptico de tecido definido, podendo ser determinada a quantidade de células por unidade de volume em mm^3, reconhecida pelo símbolo Nv (Williams & Rakic, 1988; Cordás, 2002).

Um dos diferenciais da técnica é poder ser aplicada em cortes espessos de tecido e permitir a contagem em apenas uma fatia. A vantagem está em reduzir os vieses, pois trata-se da contagem de células que são visualizadas em mais do que dois níveis da profundidade do tecido. Desta forma, evita-se a contagem duplicada de células, ao contrário do que ocorre na técnica de contagem de bidimensionais (Geuna, 2005).

Além disso, a técnica minimiza os erros que eram ocasionados devido ao formato irregular da célula, a variabilidade de tamanho ou ainda a artefatos ao cortar o tecido, levando-se em conta, que e o disetor óptico permite a contagem tanto de células que estão por completo dentro da "caixa de contagem" ou que estão cruzando pelo topo ou direita ou traseira da caixa.

O volume é estimado pelo princípio de Cavalieri (1635), definido como a técnica de contagem de pontos Esta técnica consiste em estimar o volume global de uma região, considerando que o material analisado pode estar seccionado, desde que, os intervalos das fatias sejam iguais. Desta forma, estima-se o volume em fatias seriadas. Além disso, deve-se garantir uma análise sistemática-randomizada- amostral, ou seja, que todas as fatias possuam igual probabilidade de serem contadas. Em seguida, somam-se todos os pontos contados em cada área e multiplica-se pela distância entre as fatias (Gundersen & Jensen, 1987). O valor obtido é o volume, também chamado de volume referência V(*ref)*.

A proposta de se verificar o número de neurônios é antiga e o interesse por esta quantificação tornou-se crescente desde que postulou-se que a quantidade de neurônios é fundamental para a função cerebral por muitos pesquisadores (Williams & Herrup, 1988).

Na estereologia a estimativa do número total de neurônios pode ser obtida através do produto do V (ref) e densidade em um volume (Nv) (West, 1999).

2. OBJETIVOS

2. Objetivos

2.1 Objetivos Gerais:

- Comparar a densidade neuronal, volume e número total de neurônios do COF entre pacientes psiquiátricos e controles;
- Verificar se há diferenças de densidade neuronal, volume e número total de neurônios do COF entre pacientes de TAB e pacientes de TOC e controles.

2.2 Objetivos específicos:

- Verificar se há diferenças de densidade neuronal, volume e número total de neurônios estimado nas sub-regiões de COF: AM, MO, AL em pacientes e controles;
- Verificar se há diferença de densidade neuronal entre as sub-regiões AM, MO e AL no grupo de pacientes e no grupo de controles;
- Verificar se há diferença de densidade neuronal entre as camadas corticais IIIa, IIIb, IIIc, IV, Va, VIa, VIb.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3. Materiais e Métodos

3.1 Comitê de Ética

O estudo foi aprovado pelo comitê de ética local CAPPesq sob nº 740/09 (Anexo A) e pelo comitê de ética nacional CONEP 10/573 (Anexo B). A identidade de todos os indivíduos foi mantida em sigilo.

3.2 Estrutura e recrutamento dos casos

As amostras foram originadas do Serviço de Verificação de Óbitos da Capital da Universidade de São Paulo (SVOC-USP). O SVOC-USP é responsável pelas autópsias de indivíduos que faleceram de morte natural dentro da região metropolitana da cidade de São Paulo, e avaliam em torno de 13.000 autópsias por ano. Todas as autópsias são realizadas por um grupo de médicos patologistas.

Os encéfalos foram coletados dos indivíduos portadores de TAB ou TOC durante a vida e faleceram com idade igual ou maior que 50 anos de idade. Os casos foram selecionados de acordo com os critérios do BEHGEEC-FMUSP (Grinberg et al., 2007a) com algumas modificações conforme o quadro 1:

Quadro 1- Critérios de Inclusão e Exclusão do Psi-BEHGEEC

Critérios de Inclusão e Exclusão dos pacientes Psi-BEHGEEC	
Critérios de Inclusão	I. Idade maior que 50 anos; II. Ter um parente que convivia próximo ao sujeito e que possa providenciar informações relevantes; III. Diagnóstico de TAB tipo I de acordo com o *Diagnostic and Statistical Manual (DSM-IV)* IV. Diagnóstico de TOC de acordo com DSM-IV V. Intervalo *postmortem* (IPM) até 24 horas VI. pH do líquido cefalorraquidiano maior que 6.0
Critérios de Exclusão	I. Indivíduos que morreram de causas cerebrais primárias (por exemplo, acidente vascular encefálico agudo, traumatismo craniano, meningite, tumores, etc.); II. Indivíduos que passaram por situações com potencial de causar lesões cerebrais isquêmicas; III. Indivíduos portadores de comorbidades que possam prejudicar a função cognitiva, tais como demências ou o mental;

FONTE: Adaptado de (Grinberg *et al.*, 2007; Ferreti *et al.*, 2010).

A coleta dos controles saudáveis precisava estar pareada com as amostras coletadas dos sujeitos psiquiátricos, quanto a idade, gênero e hemisfério Para a coleta, alguns critérios foram estabelecidos, o que tornou essa coleção relevante e rara, conforme quadro (2) a seguir:

Quadro 2 - Critérios de Inclusão de controles saudáveis

Critérios de Inclusão e Exclusão dos controles	
Critérios de Inclusão	I. Idade maior que 50 anos; II. Ter um parente que convivia próximo ao sujeito e que possa providenciar informações relevantes; III. Ausência de diagnóstico de TAB tipo I de acordo com o *Diagnostic and Statistical Manual (DSM-IV)* IV. Ausência de diagnóstico de TOC de acordo com DSM IV VI. pH do líquido cefalorraquidiano maior que 6.0
Critérios de Exclusão	I. Indivíduos que morreram de causas cerebrais primárias (por exemplo, acidente vascular encefálico agudo, traumatismo craniano, meningite, tumores, etc.); II. Indivíduos que passaram por situações com potencial de causar lesões cerebrais isquêmicas; III. Indivíduos portadores de comorbidades que possam prejudicar a função cognitiva, tais como demências ou retardo mental; IV. Possuir diagnóstico clínico para demências, Parkinson, depressão maior ou preencher critérios dos instrumentos de avaliação de mania e depressão e de TOC V. Presença de abuso de álcool ou outras substâncias, tais como medicamentos ansiolíticos ou antidepressivos

3.2.1 A triagem clínica inicial

Seguindo os critérios de inclusão, todos os indivíduos com idade a partir de 50 anos que chegassem ao SVOC-USP eram candidatos a participar do Psi-BEHGEEC. A equipe de enfermeiros e gerontologistas de plantão, explicavam a pesquisa ao familiar próximo, antes do procedimento de autópsia e o convidavam para participar. Uma vez assinado o termo de consentimento livre e esclarecido pelo familiar, o então conhecido como informante era submetido a responder às escalas clínicas semi-estruturadas para avaliação funcional e psiquiátrica. Esta avaliação incluía informações médicas e demográficas, história familiar, e diversos questionários e escalas que cobrem múltiplos domínios cognitivos e atividades de vida diária (Tabela 3). Adicionalmente, sintomas psiquiátricos podiam ser triados a partir de questões do SCID (Ferreti *et al.*, 2010).

Tabela 3 - Instrumentos utilizados na triagem

Domínio	***Instrumento de avaliação***
TOC	Triagem adaptada da entrevista clínica estruturada para o DSM-IV: transtornos do eixo I - SCID-I/P 2.0 (First *et al.*, 1996) e da Yale-Brown obsessive-compulsive scale - Y-BOCS (Goodman *et al.*, 1989), D-YBOCS (Rosario-Campos *et al.*, 2006)
TAB	Mood Disorder Questionnaire- MDQ (Miller *et al.*, 2004) DSM IV – Structured Clinical Interview (SCID) para transtorno de depressão e mania (Spitzer *et al.*, 1992; Del-Ben *et al.*, 1996)
Cognição	Escore Clínico de Demência (CDR, Clinical Dementia Ratio) (Burke *et al.*, 1988; Morris, 1993), Informant quest. cognitive decline in the elderly – IQCODE- versão retrospectiva (Jorm *et al.*, 1996)
Sintomas psiquiátricos	Inventário Neuropsiquiátrico - NPI (Cummings *et al.*, 1994)
Avaliação Funcional	The Katz Index (Katz *et al.*, 1963) Atividades instrumentais da vida diária (Lawton & Brody, 1969)
Doenças parkinsonianas	Um breve questionário de triagem para parkinsonismo (Tanner *et al.*, 1990)
Informação social	ABIPEME – escala brasileira de investigação de análise socioeconômica (Almeida & Wickerhauser, 1991)

3.2.2 Entrevista psiquiátrica realizada com o informante

Nos casos em que a triagem foi positiva para transtornos psiquiátricos foi solicitada a autorização para se fazer contato com o familiar ou informante, com a finalidade de agendar uma segunda entrevista confirmatória, chamada de entrevista psiquiátrica *postmortem*. Para isso foi necessário aguardar o tempo de luto (em média entre um e três meses após o falecimento do ente). Nesta fase, a entrevista foi realizada por um médico psiquiatra especialista vinculado ao Instituto de Psiquiatria do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (IPQ-HCFMUSP).

A entrevista de confirmação possuía duas partes: (1) a avaliação da história psiquiátrica individual durante o tempo de vida, e (2) um instrumento estruturado composto por escalas de avaliação psiquiátrica. Esta entrevista tinha duração em média de duas horas, e aplicava-se por completo o SCID seção A, que aborda os episódios de humor depressivo-maníaco e a versão curta DY-BOCS. A tabela 4 descreve os instrumentos usados na confirmação da entrevista.

O SCID foi aplicado em forma de fluxograma, ou seja, a sequência das perguntas dependeu das respostas anteriores do informante. Assim, para aplicação da mesma, é essencial ser um especialista ou ter recebido um treinamento adequado.

O diagnóstico final foi alcançado após o consenso a partir do princípio de "melhor diagnóstico estimado", que é considerado o padrão ouro em estudos *postmortem*. (Deep-Soboslay *et al.*, 2005) Para isso, o médico psiquiatra que aplicou a entrevista fez um resumo da história clínica e das informações obtidas. Tais informações foram encaminhadas e avaliadas por outros seis psiquiatras especializados em TAB ou TOC do IPQ-HCFMUSP, sendo geralmente três do PROMAN para os possíveis diagnósticos de TAB e três do PROTOC, para os possíveis diagnósticos de TOC.

Tabela 4 - Escalas ou Instrumentos para avaliação clínico-funcional de TAB e TOC

Transtorno	***Escalas ou Instrumentos***
TAB	SCID -I, MDQ (Spitzer *et al.*, 1992; Miller *et al.*, 2004)
TOC	Versão curta do DY-BOCS, SCID I (Goodman *et al.*, 1989; Spitzer *et al.*, 1992; Rosario-Campos *et al.*, 2006)
Outros	SCID -I (Para transtornos do eixo I)

TAB: transtorno afetivo bipolar; TOC: Transtorno obsessivo-compulsivo
FONTE: adaptado de de Oliveira *et al.*,2012

Nesta entrevista para o diagnóstico de TAB I foi considerado o critério do "Manual estatístico e diagnóstico de transtornos mentais - 4ª edição (DSM- IV)" e da "Classificação Internacional das Doenças - 10ª edição (CID-10)". Segundo o DSM- IV deve ser considerado ao menos um episódio de mania ou episódio misto (composto por sintomas maníacos e depressivos); e geralmente tem ao menos um episódio depressivo. No CID-10, não há discriminação entre TAB I e TAB II; e é requerido dois episódios discretos de transtorno de humor, no qual ao menos um deles deve ser maníaco ou hipomaníaco somado á um episódio depressivo (World Health Organization, 1992)

A escala Y-BOCS é uma entrevista semi-estruturada com a finalidade de avaliar a gravidade dos sintomas de TOC (Goodman *et al.*, 1989).

A escala "Dimensional Yale-Brown Obsessivo-Compulsivo" (DY-BOCS) é uma escala que mede a presença e a gravidade dos sintomas obsessivos-compulsivos dentro de seis dimensões que relacionam tematicamente obsessões e compulsões As seis dimensões são relativas: (1) agressão, violência e injúria; (2) sexual, moral e religioso; (3) simetria, ordem e contagem; (4) contaminação e limpeza; (5) somática e superstição e (6) colecionismo (Rosario-Campos *et al.*, 2006; Torresan *et al.*, 2013).

Alguns dos casos de TOC de nossa amostra foram classificados como sintomas obsessivos compulsivos (SOC), devido à limitação de se obter informações sobre pensamentos intrusivos através do informante.

3.3 Procedimentos anatomopatológicos

Para melhor entendimento de todos os procedimentos que foram aplicados, é apresentado, a seguir, um fluxograma que descreve resumidamente todas as etapas (Figura 7):

TRIAGEM, AVALIAÇÃO E CLÍNICA PATOLÓGICA

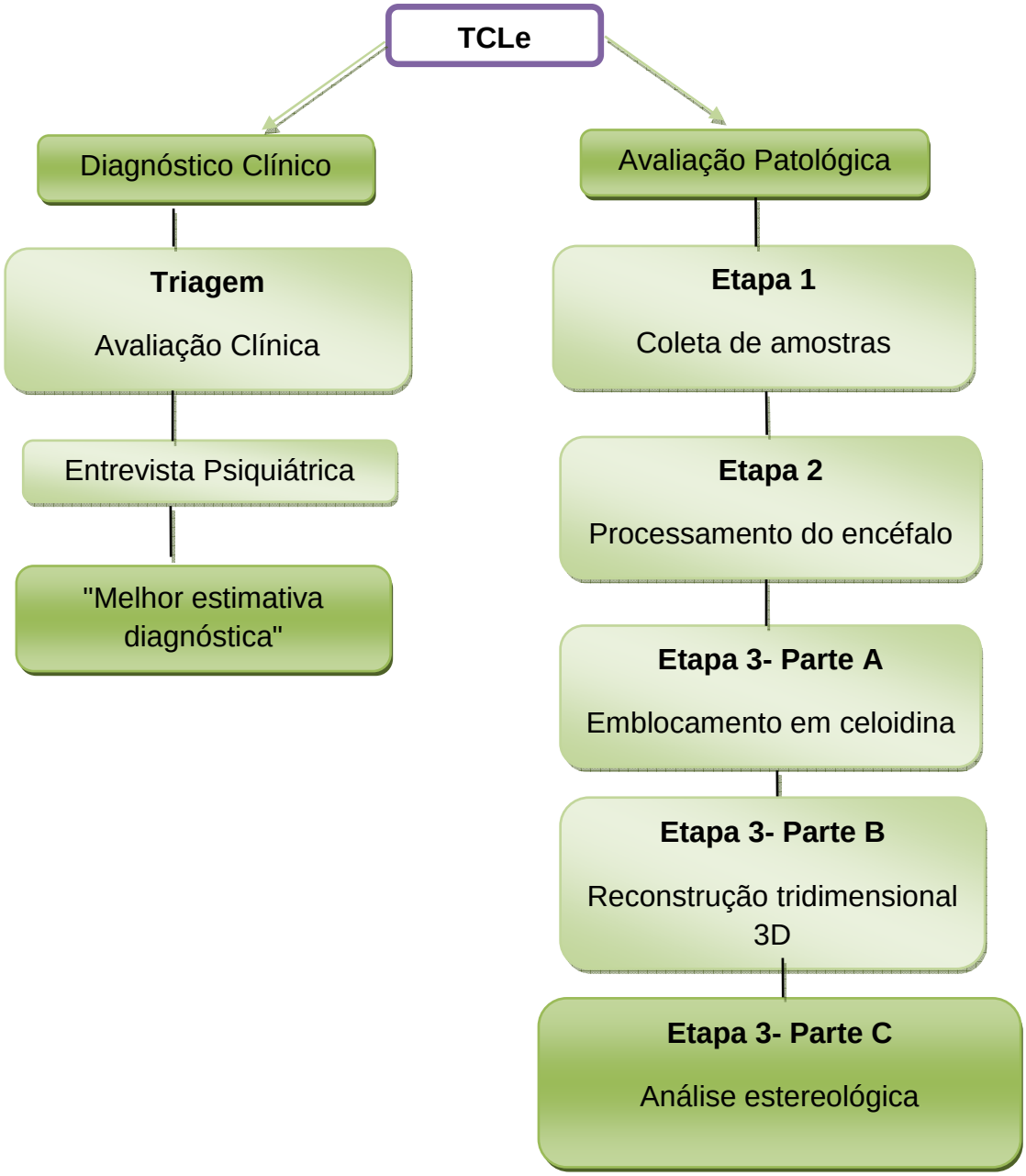


Figura 7 - Fluxograma das etapas do processo de coleta de encéfalos e dados dos indivíduos. FONTE: Adaptado de de Oliveira *et al.*, 2012

3.3.1 Etapa 1- Coleta das amostras

Durante a autópsia, antes da remoção do encéfalo, o líquor cefalorraquidiano (LCR) era coletado dos ventrículos e seu pH era mensurado para avaliar a qualidade do tecido. Em grande parte, devido ao curto intervalo *postmortem* (IPM), o pH geralmente estava dentro dos padrões de qualidade, ou seja, maior que 6,0. Assim que o encéfalo era removido, acondicionado em uma caixa térmica com gelo e transportado para o laboratório do BEHGEEC no andar acima, era imediatamente processado.

A amostra de LCR era centrifugada e armazenada em alíquotas de 1,5 mL á 80ºC para estudos futuros. Da mesma forma, amostra de sangue era coletada para extração de DNA, para a mesma finalidade.

3.3.2 Etapa 2- Processamento dos encéfalos

A massa e volume do encéfalo eram mensurados ainda na sala de autópsia. No laboratório, os hemisférios eram hemisseccionados sagitalmente (Figura 8a). Foi necessário ter cuidado nesta fase, principalmente com os controles que eram pareados com os casos. Colocava-se o encéfalo sobre uma superfície reta com a parte inferior voltada para cima e fazia-se um corte único, separando os dois hemisférios pelo corpo caloso, cuidando para não danificar as áreas mediais e o tronco encefálico. Quando era um caso psiquiátrico, era necessário alternar o hemisfério de acordo com o caso anterior. Esta atitude era tomada porque não é claro se há dominância hemisférica em TAB e TOC. Se fosse um controle saudável, a fim de se ter uma amostra balanceada, ele devia estar de acordo com o caso psiquiátrico, previamente coletado, quanto ao hemisfério a ser fixado. Para todos os encéfalos coletados, alternadamente, um hemisfério era fixado e o outro congelado.

Para a fixação por perfusão (Figura 8b), o Polígono de Willis era mantido intacto e, em seguida, todo o sistema vascular era lavado com uma solução composta por 250 mL

de manitol e 10 mL de heparina (Grinberg *et al.*, 2008) e, a seguir, adicionava-se o fixador formalina 20%. O material ficou fixando em formalina 20% por mais três semanas no mínimo. Devido à retirada de um hemisfério para criopreservação, as artérias do hemisfério a ser dissecado foram bloqueadas com um barbante para prevenir o vazamento das soluções.

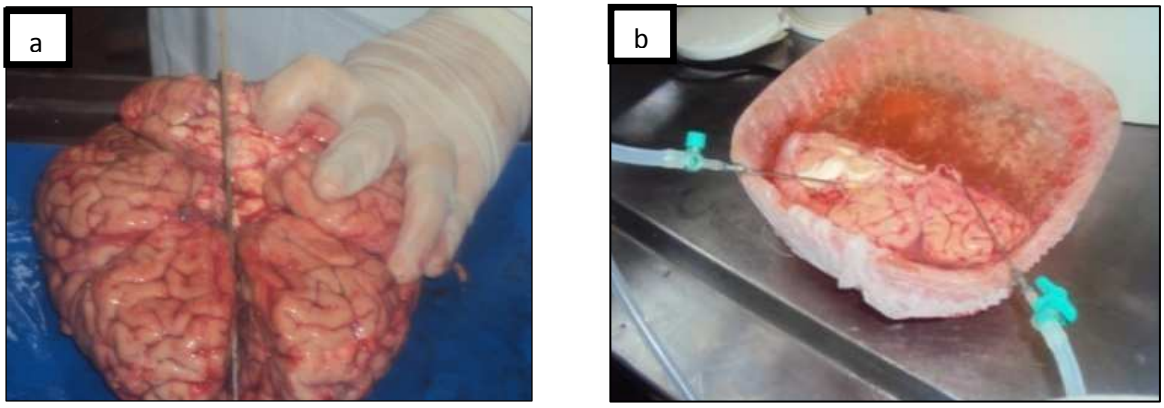


Figura 8: Procedimentos iniciais para o processamento dos encéfalos. a) Hemidissecção; b) Fixação por perfusão. Separação dos hemisférios de um caso da nossa coleção. Fixação de um hemisfério encefálico por perfusão. Imagem adaptada de de Oliveira et al., 2012

3.3.3 Preparo do paraformaldeído não tamponado 8% (Protocolo do BEHGEEC-FMUSP)

Todo o preparo dos fixadores foi realizado no Laboratório de Fisiopatologia em Envelhecimento (GEROLAB). Para o preparo do fixador formalina 20% foi seguido os seguintes procedimentos:

O paraformaldeído não tamponado 8% equivalente á formalina 20% era preparado da seguinte forma: necessário colocava-se 5L de água num balão de fundo chato de 12.000 mL e levava-se ao fogão para aquecer. A seguir, adicionava-se 1.600 g de paraformol em pó e mexia-se sempre, até que houvesse a diluição completa do

paraformol. Finalmente acrescentava-se água até que se obtivesse uma solução final de 20 litros. Esperava-se a solução esfriar para medir o pH que devia ficar entre 6,0 e 7,0.

As regiões de interesse foram escolhidas a partir dos estudos de neuroimagem em TAB e TOC e estudos *postmortem* prévios em TAB (Tabela 5). As 46 áreas dissecadas eram armazenadas em criotubos identificados.

Tabela 5 - Áreas representadas e criopreservadas á -80 C

Cortical	**Subcortical**
Córtex cíngulo dorsal (32)	Amígdala (subnúcleos lateral, medial)
Córtex frontal dorsolateral (9,46)	Núcleo caudado (cabeça, corpo, cauda)
Córtex entorrinal (28)	Globo pálido (interno e externo)
Córtex frontopolar (10)	Hipotálamo
Giro frontal inferior (45)	Hipocampo (anterior e posterior)
Córtex orbitofrontal (11,47)	Cápsula interna
Córtex médio pré-frontal (25)	Corpúsculo mamilar
Área pré-motora (6)	Núcleo basal de Meynert
Córtex visual primário (17)	Putâmen
Subgenual do cíngulo anterior (24)	Tálamo (pulvinar, ventral, anterior e mediodorsal)
	Núcleo acumbente
Supragenual do cíngulo anterior (24)	**Tronco encefálico**
Córtex parietal superior e inferior (7,49)	Hemisfério cerebelar
Córtex temporal superior e inferior (22,21)	Vermis cerebelar
	Núcleo denteado
	Mesencéfalo
	Ponte

Regiões encefálicas dissecadas descritas no protocolo de dissecção do Psi-BEHGEEC. As áreas de Brodmann estão em parênteses. FONTE: de Oliveira *et al*., 2012

3.3.4 Protocolo de dissecção das áreas

Para se dissecar todas as áreas foi necessário ter um cuidado e atenção para que nenhuma fosse esquecida e que todas fossem manuseadas e armazenadas com a mesma qualidade. Para isso foi feito um mapa que foi chamado de "molde de áreas" (Figura 9), que consistia em uma placa na qual eram identificadas todas as áreas que deviam ser retiradas. O mapa funcionou como um guia para o executante durante a dissecção, além de orientar quantas e quais regiões já tinham sido dissecadas durante o procedimento. Isso manteve-se a rotina e a conferência de que todas as áreas importantes tinham sido armazenadas.

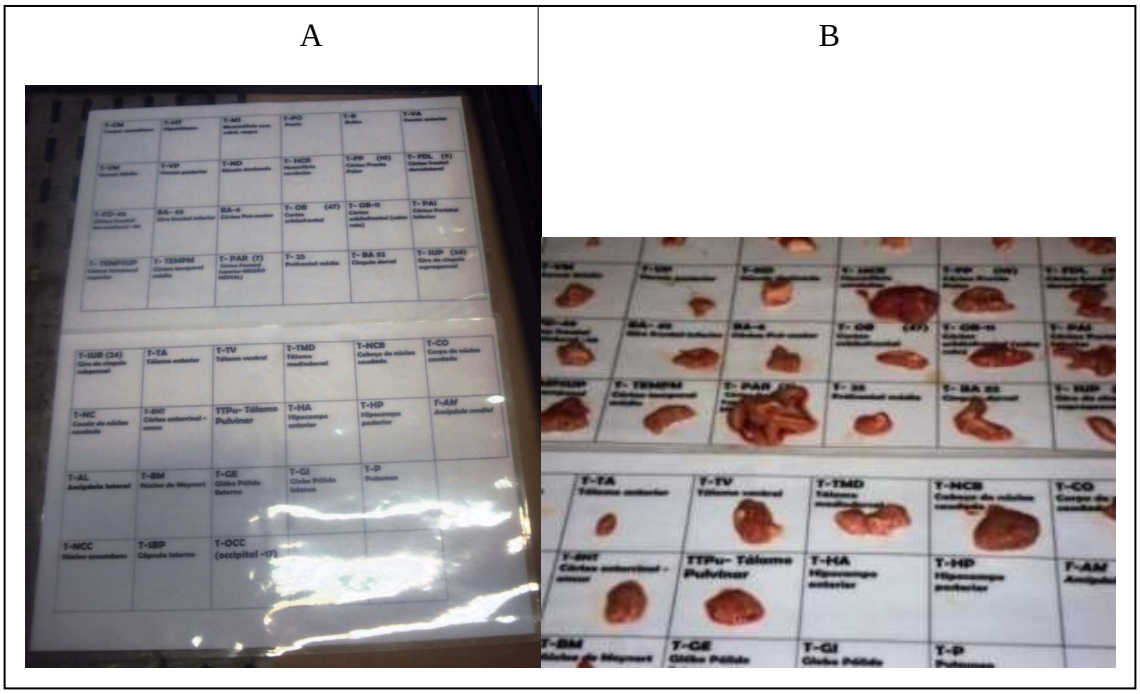


Figura 9 - Mapa das 46 áreas dissecadas (Molde de áreas). A) Mapa de estruturas a serem retiradas do hemisfério que será dissecado; B) Todos os fragmentos são codificados e mantidos em placa resfriada com gelo.
FONTE: Adaptada de (De Oliveira *et al.*, 2012)

Um protocolo com imagens da dissecção foi construído com intuito de ensino teórico e treinamento dos alunos do BEHGEEC-FMUSP. Abaixo seguem as fotos das regiões (Figura 10):

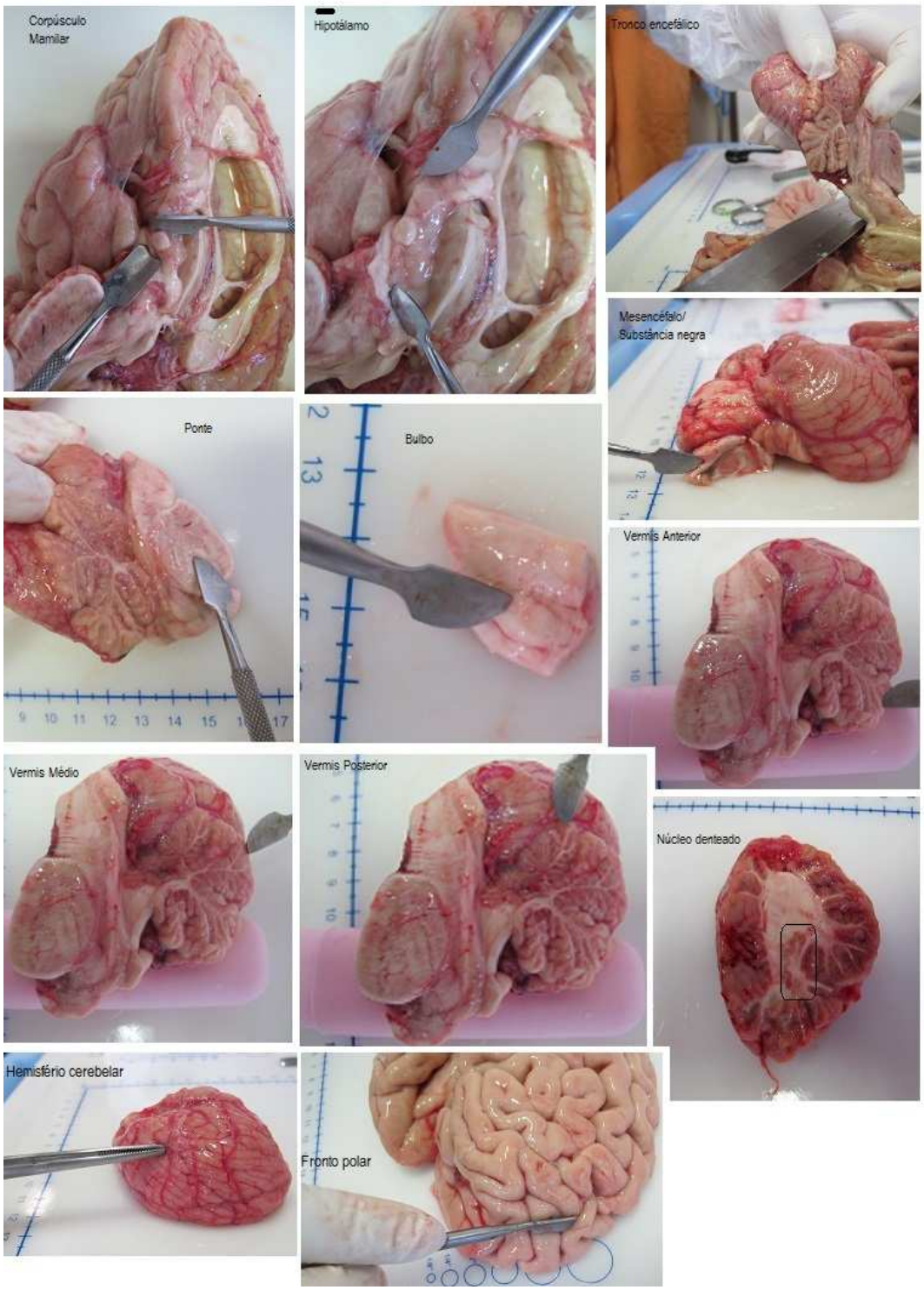
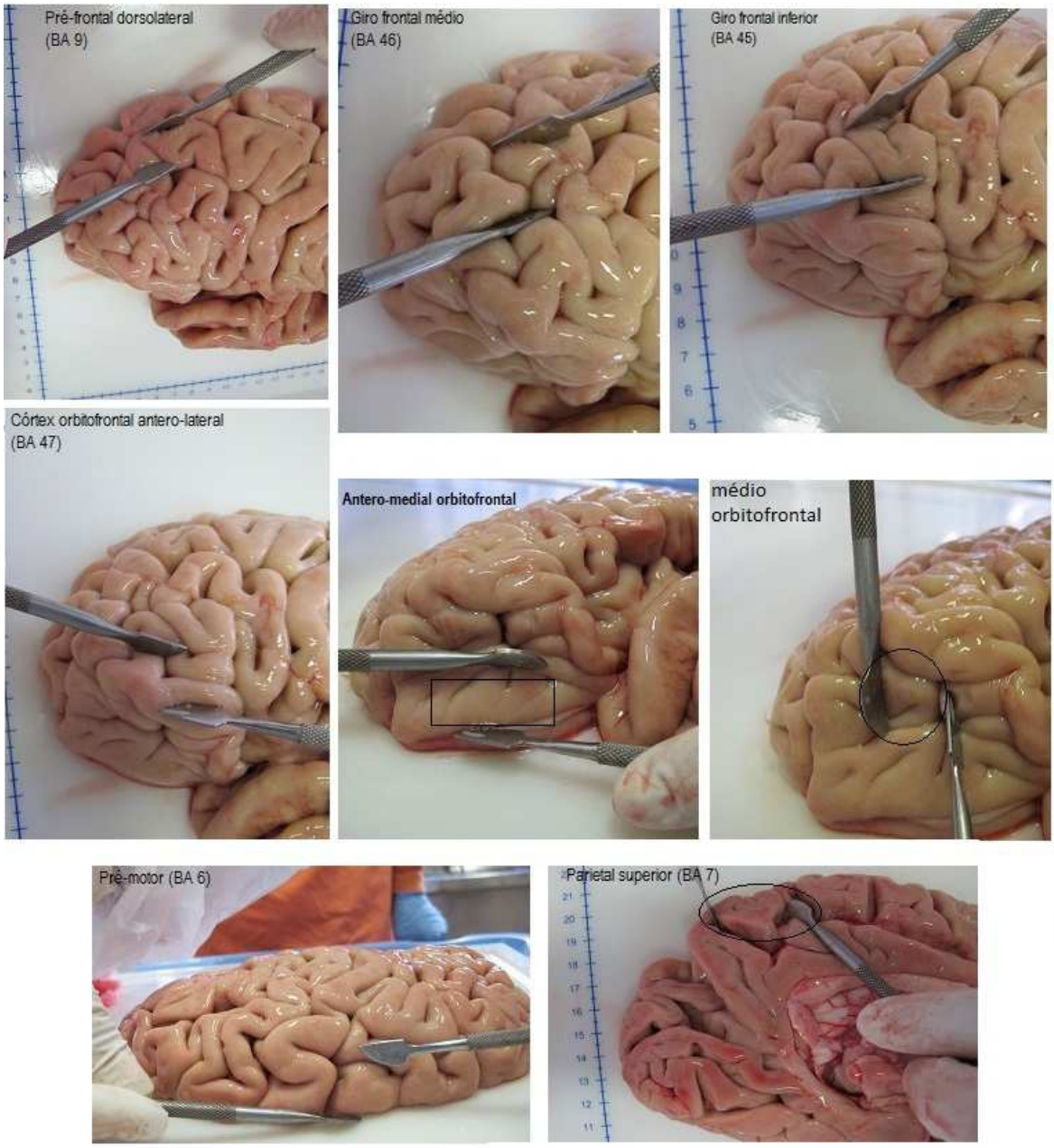
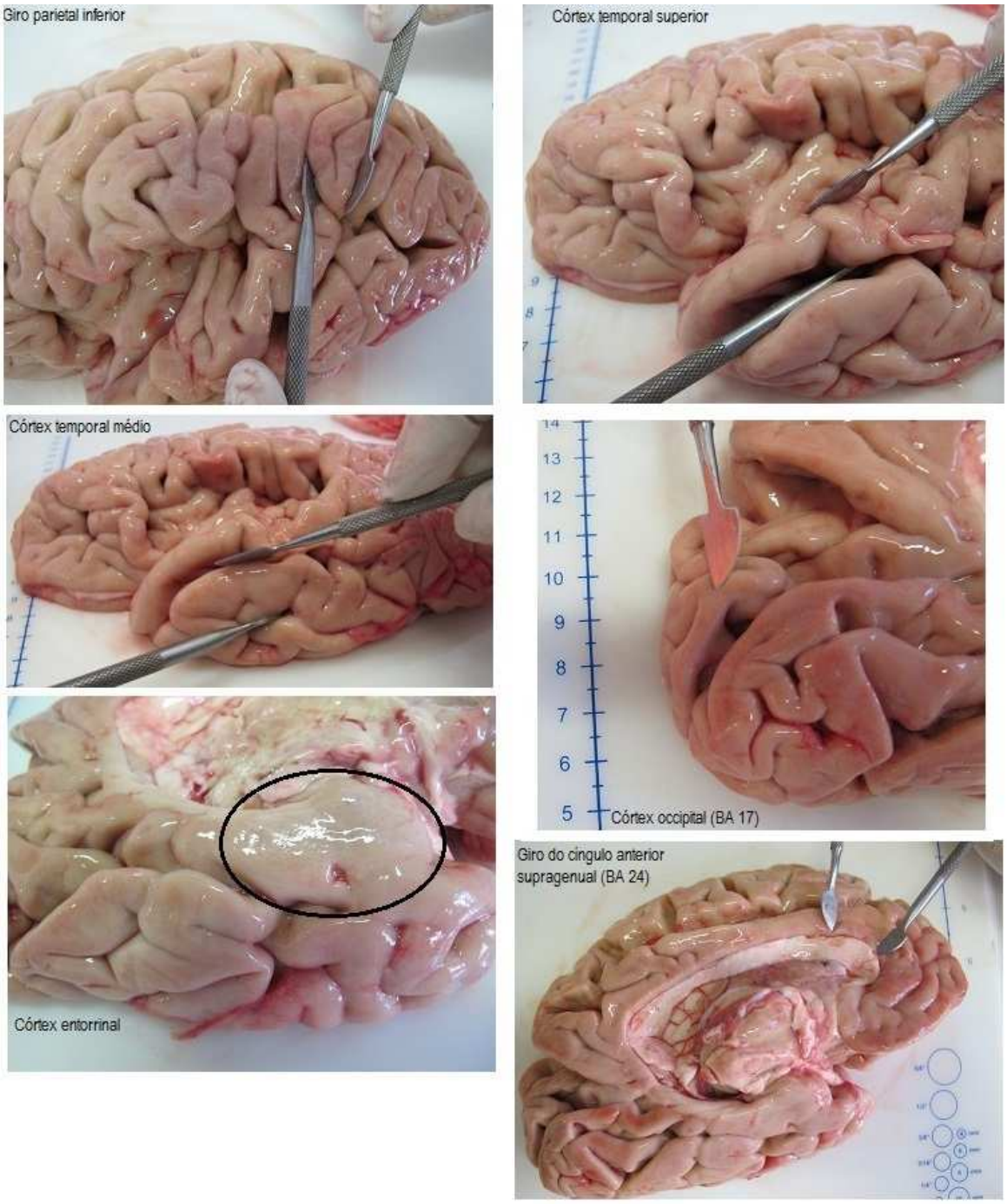


Figura 10 - Protocolo detalhado da dissecção das regiões de interesse "continua"

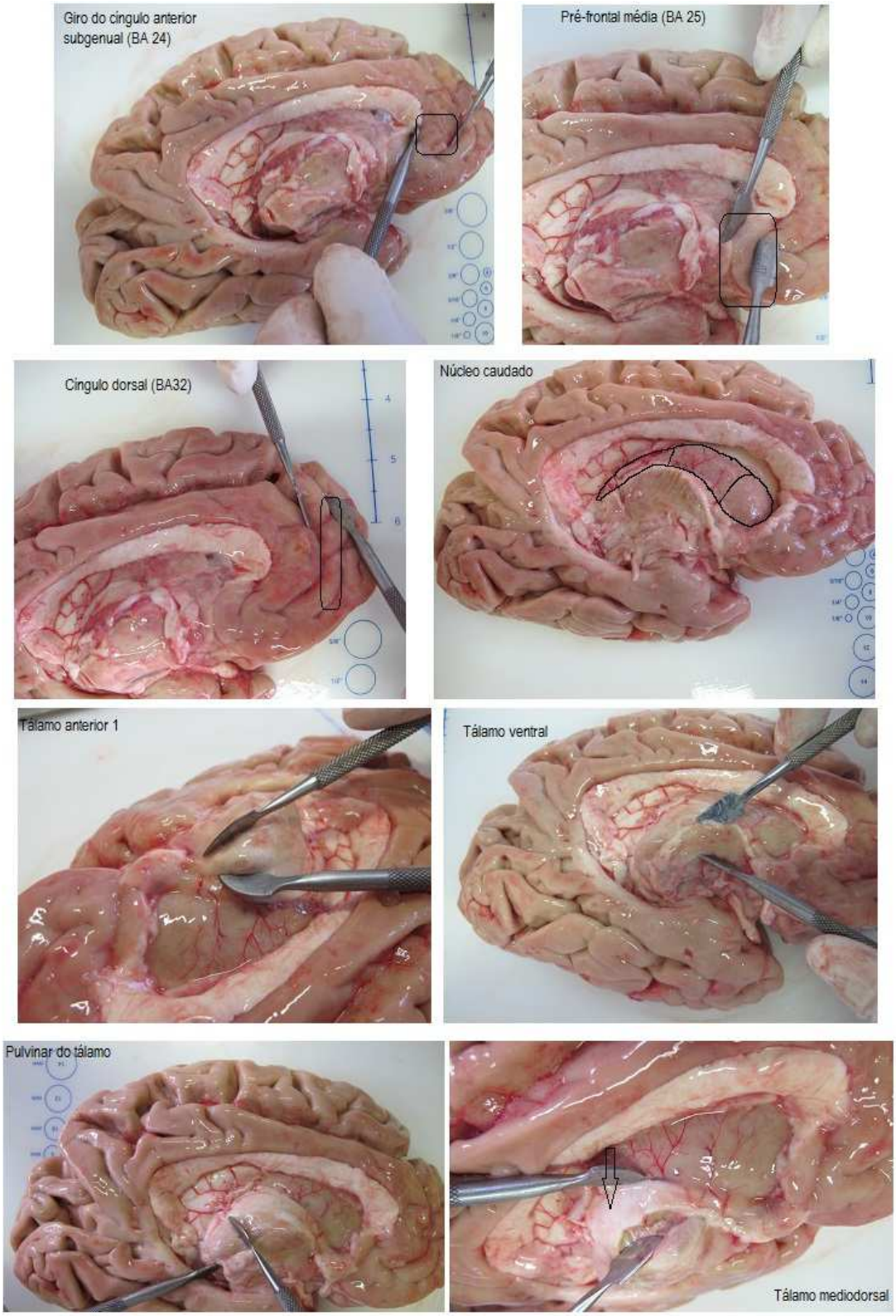


Continuação - Figura 10- Protocolo detalhado da dissecção das regiões de interesse

"continua"

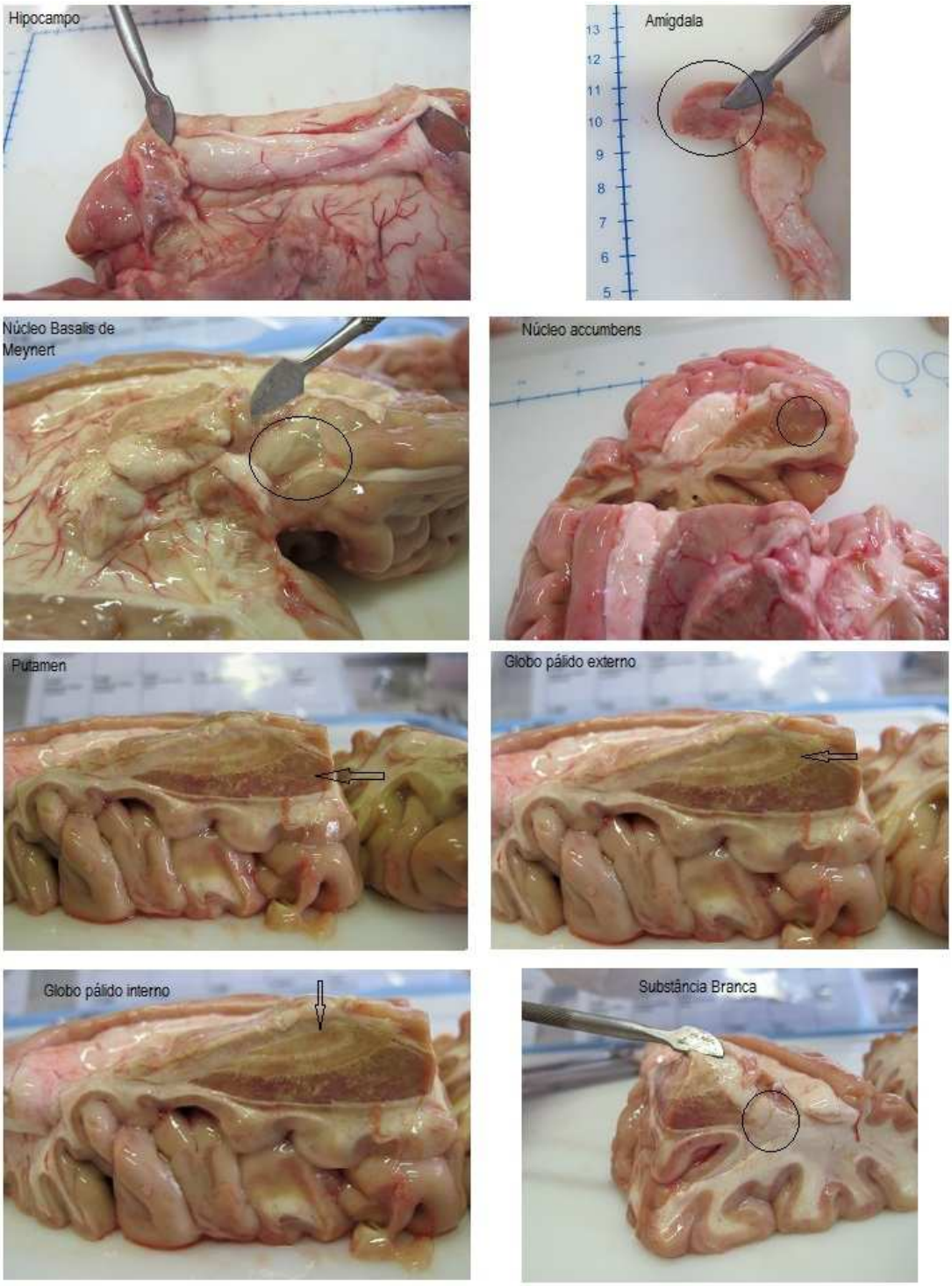


Continuação - Figura 10 - Protocolo detalhado da dissecção das regiões de interesse "continua"



Continuação - Figura 10- Protocolo detalhado da dissecção das regiões de interesse

"continua"



Continuação - Figura 10- Protocolo detalhado da dissecção das regiões de interesse "conclusão"

3.4 Processamento do hemisfério fixado para estudos estereológicos

O hemisfério fixado foi enviado para o Laboratório de Pesquisa em Morfologia Cerebral do Departamento de Psiquiatria Clínica da Julius-Maximilian Universidade de Würzburg de acordo com todos os procedimentos éticos e legais requeridos (UN 3373) e com as regras do CONEP. (Toda a documentação envolvida está no Anexo E).

Na Universidade de Würzburg, os hemisférios foram submetidos a um rápido processo de emblocamento em celoidina adequado para estudos neuroestereológicos e citoarquitetônicos (Heinsen *et al.*, 2000; Grinberg *et al.*, 2008). Este mesmo método foi previamente usado em diversos estudos em psiquiatria (Teipel *et al.*, 2005; Kreczmanski *et al.*, 2007; Casanova *et al.*, 2008; Van Kooten *et al.*, 2008).

3.4.1 Documentação fotográfica dos casos

Todos os hemisférios fixados foram fotografados para a documentação de sua conformação inicial. Esta documentação fotográfica foi realizada com câmera FinepixS2 Pro FujiFilm-Nikon® (Tóquio, Japão) e lente macro (SIGMA® 50mm 1:2.8 D) com baixa magnificação óptica. Foram contempladas as vistas: superior, inferior, dorsal e medial de todos os casos conforme figura 11 a seguir:

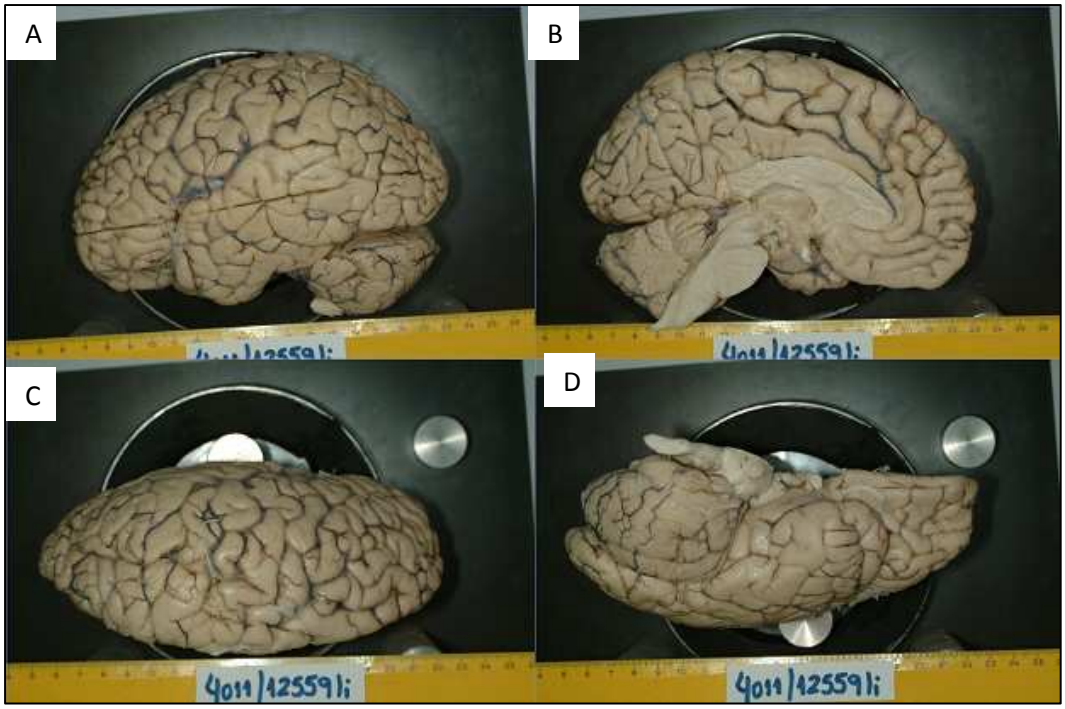


Figura 11 - Documentação dos hemisférios fixados. Documentação por fotos científicas dos casos fixados; A) vista dorsal; B) vista medial; C) vista superior; D) vista posterior.

3.4.2 Volumetria

A técnica aplicada foi baseada no princípio de Arquimedes, através do qual se obtém o volume a partir da massa de água deslocada. Para este experimento foi usado um balde com água, uma balança de precisão, um suporte no qual apoiava-se uma peneira que devia estar ligada a este por fios de nylon.

Colocava-se o balde com água na balança, tarava-se o composto balde, água e peneira imersa na água. Retirava-se a peneira para fora do balde. Em seguida, apoiava-se o hemisfério na peneira e emergia no balde com água (Figura 12). A massa resultante, era o volume em mm^3 do hemisfério. Esse dado foi obtido para análises futuras de volume total do hemisfério.

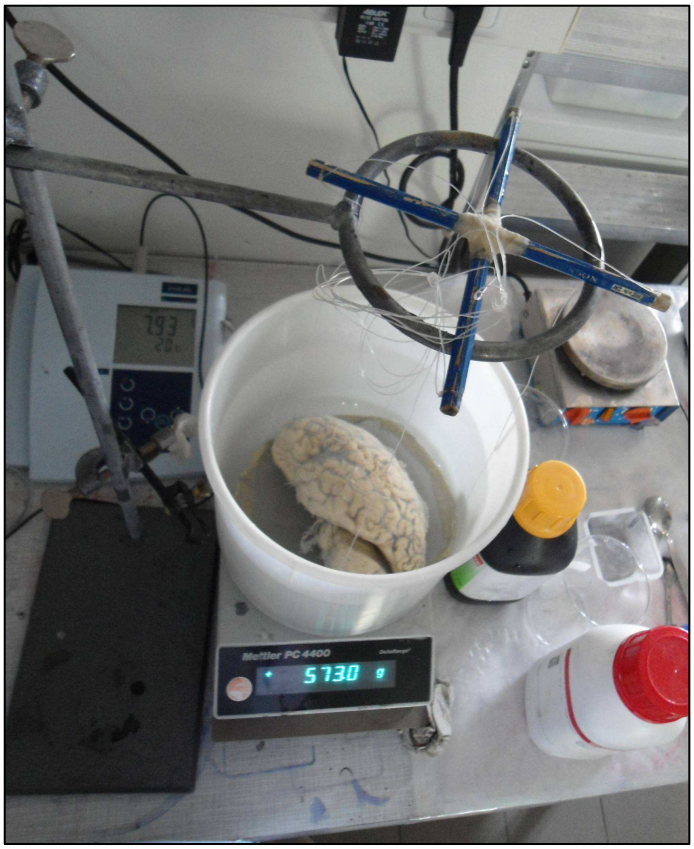


Figura 12 - Volumetria através do Princípio de Arquimedes. Foto ilustrativa da técnica utilizada pelo Laboratório da Unidade de Pesquisa em Morfologia Cerebral do Departamento de Psiquiatria da Julius Maximilian Universidade de Würzburg

3.4.3 Desidratação em álcool

Os hemisférios foram desidratados por gradientes crescentes alcoólicos. O processo ocorria em quatro semanas, quando a amostra ficava uma semana na mesma concentração alcoólica, com exceção, do primeiro álcool de 70%, no qual a amostra ficava por duas semanas, havendo troca de álcool após a primeira semana, isto porque a primeira solução de álcool era "contaminada" pela água que saía da amostra neste período. A segunda semana de álcool 70% era a semana de desidratação pura neste

gradiente. Após esse período fazia-se a troca para o álcool 80%, e por fim na semana seguinte troca-se pelo álcool 96%.

3.3.4 Retirada de meninges

A retirada de meninges permite uma melhor visualização dos sulcos e giros cerebrais além de facilitar o corte das fatias no micrótomo horizontal.

Após a desidratação, as meninges e os vasos eram removidos cuidadosamente para não haver deformação da amostra. Além disso, era importante manter o tecido sempre umedecido com álcool 96% durante esse processo.

O tronco cerebral era seccionado e arquivado em álcool para estudos futuros. Após isso as fotos para documentação eram feitas novamente conforme o protocolo de documentação já descrito (Figura 13). As mesmas vistas eram contempladas, no entanto, nesta etapa, obtinha-se a imagem dos troncos cerebrais em separado.

Figura 13 - Documentação do hemisfério após desidratação. Fotos científicas de uma amostra após desidratação e retirada de meninges com o tronco separado

3.3.5 Etapa 3- parte A -Emblocamento em celoidina (nitrocelulose)

Cada hemisfério era embebido em celoidina a 8% para isso os procedimentos descritos a seguir foram realizados:

Primeiramente a solução de celoidina deve era preparada. A solução era feita na fração 1/4, sendo 1 parte de álcool-éter e 4 partes de celoidina a 8%. Para isso, era necessário misturar 200mL de álcool 70% a 200 mL de dietiléter.

A solução de celoidina e o hemisfério desidratado, então, eram acomodados em uma caixa-molde, que devia ter buracos e tampões conforme figura a seguir (Figura 14a). Essa caixa podia ser adaptada (um pote com furos e tampões de plástico envoltos com gaze cirúrgica), como é observado na figura 14c.

Ao imergir o hemisfério na solução, o mesmo devia ser totalmente coberto pela celoidina. A caixa devia, então, ser tampada e repousar em média por 24 horas. No dia seguinte, colocava-se a caixa no dessecador acoplado a uma bomba à vácuo que era regulada entre 100 e 200 mbar, como mostra a figura 14b. O bloco ficava sob pressão da bomba por 2 dias, dentro da capela ou em estufa com temperatura entre 30 e 35º C .

Após esse processo, o bloco de celoidina já estava com consistência razoável e, então, os tampões deviam ser tirados aos poucos. Nesta etapa, a caixa devia ser colocada dentro de uma cuba ou caixa de vidro, juntamente com uma placa de Petri contendo clorofórmio. Este reagente ajuda na desidratação do bloco. Geralmente o bloco demorava mais duas semanas para ficar com a consistência desejada. Após esse período, o bloco era desenformado conforme figura 14d.

Possíveis buracos e espaços eram completados com celoidina 8% para evitar que o hemisfério tivesse contato com o ar. O bloco de celoidina retornava á caixa de vidro com clorofórmio (Figura 14 e), onde ficava por mais 18 dias. A caixa devia ser mantida fechada e o excesso de água devia ser retirado diariamente da caixa.

Após isso, o bloco podia ser colocado em outra caixa, contendo álcool 70%, por no mínimo 2 e no máximo 4 dias.

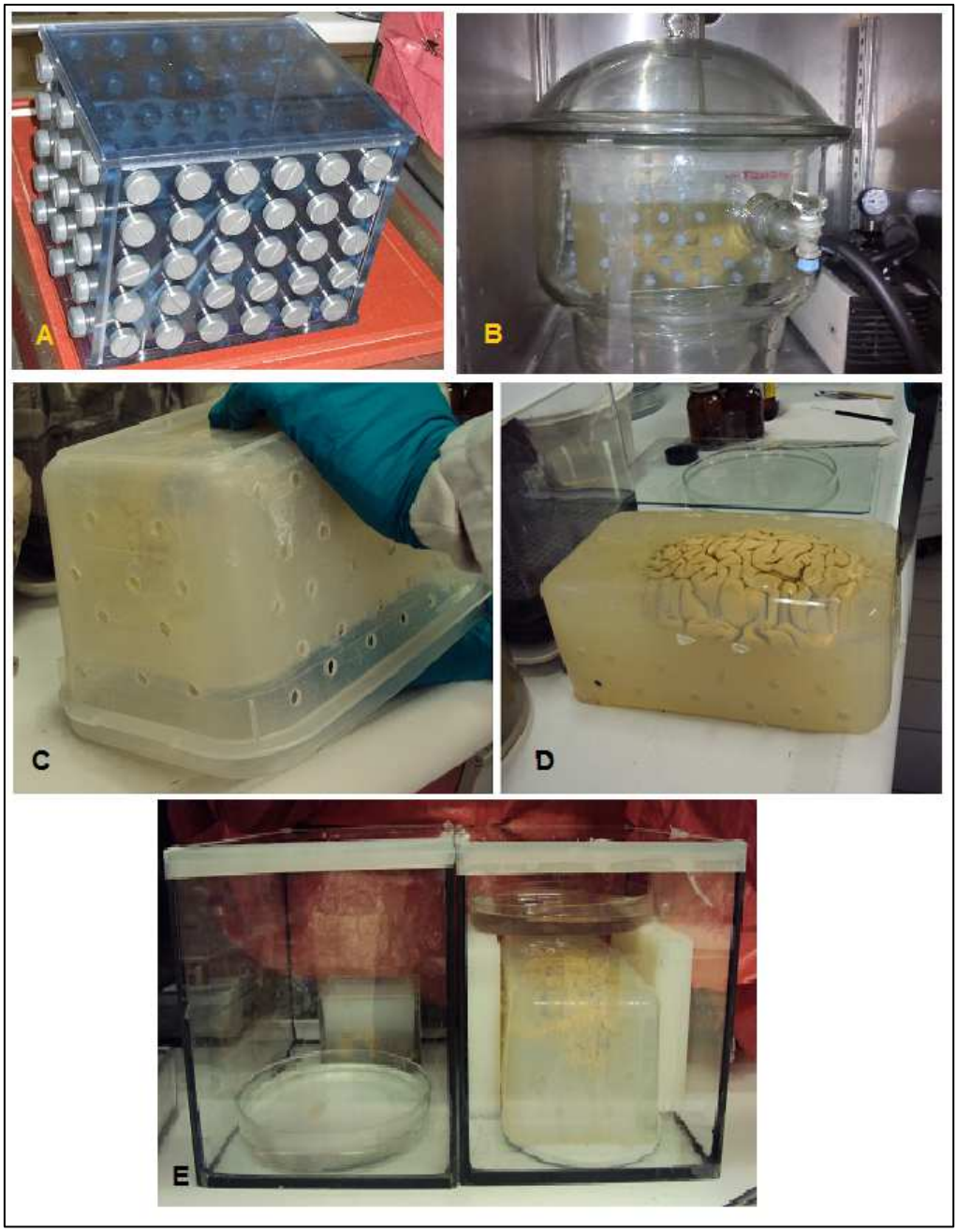


Figura 14 - Emblocamento do hemisfério em celoidina. a) Modelo de caixa-molde b) Caixa-molde com amostra e celoidina no dessecador; c) Desenformando o bloco de celoidina d) O bloco de celoidina; e) Desidratação do bloco de celoidina

3.4.6 Corte seriado

O bloco de celoidina foi desbastado e colocado sobre o micrótomo horizontal para que fosse seccionado coronalmente com espessura de 440 µm (Figura 15). Foi utilizado um micrótomo horizontal de grande porte (Cambridge Instruments, UK) (Heinsen *et al.*, 2000; Grinberg *et al.*, 2008).

Durante a secção do bloco todas as fatias foram escaneadas e as mesmas foram usadas para fazer a reconstrução 3D do hemisfério inteiro ou da região de interesse (Heinsen *et al.*, 2004).

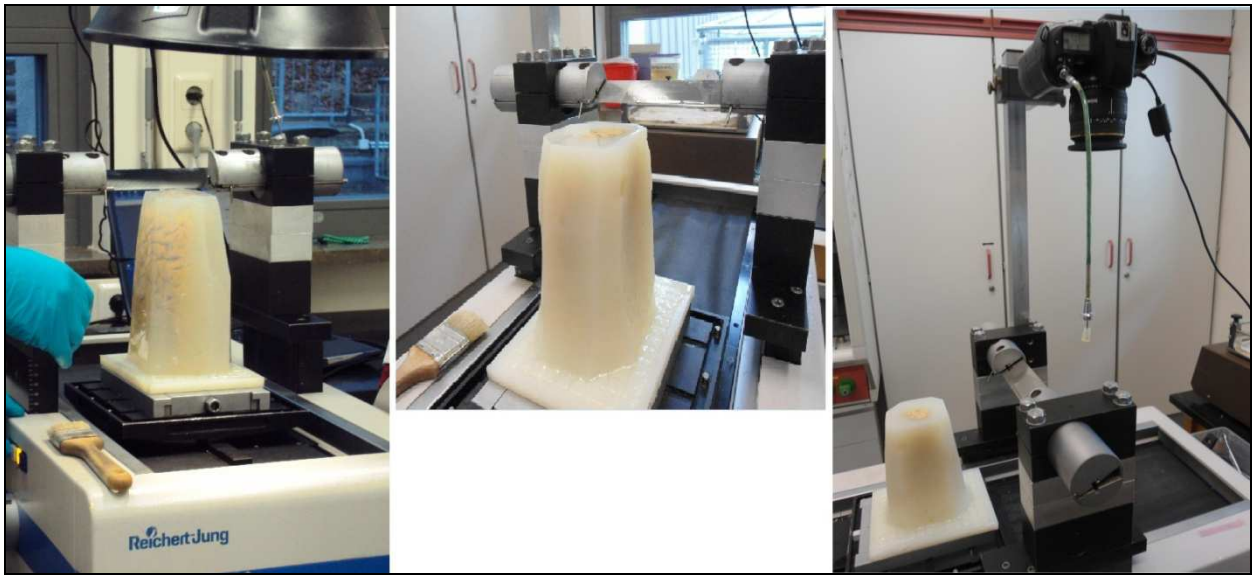


Figura 15 - Corte seriado do bloco de celoidina. Preparo do bloco de celoidina com material encefálico para os cortes. Máquina fotográfica acoplada para obtenção da imagem de todas as fatias.

Após o corte todas as fatias foram armazenadas em álcool a 70 % e entre as fatias foram colocados papel filtro para permitir que as fatias não grudassem durante o armazenamento.

3.4.7 Coloração de Galocianina (coloração de Nissl)

O texto a seguir refere-se ao protocolo de coloração em galocianina da Unidade de Pesquisa em Morfologia Cerebral da Julius MaximilianUniversidade de Würzburg.

Este protocolo é utilizado para coloração em galocianina de fatias embebidas em celoidina e cortadas com espessura de aproximadamente 440µm.

No primeiro dia foram separadas as fatias embebidas em celoidina, que estavam armazenadas em álcool 70%. Foram submetidas a uma lavagem por, no mínimo, 1 hora em água corrente. A remoção do excesso de celoidina, também foi feita com o uso de uma tesoura (cortou-se ao redor do tecido). Colocou-se as fatias em solução de Tween 2% por 2 horas em agitador a 35 rpm.

Por fim, foram colocadas em solução de ácido fórmico, e repousaram por uma noite. Nesta etapa, cada fatia foi acomodada (separadamente) em papel filtro e transferida para placas de Petri.

No segundo dia, fez-se a lavagem em água corrente por, no mínimo, 1 hora para retirada do ácido fórmico. Em seguida, as fatias foram colocadas em banho-maria de galocianina por 2 horas, em agitador a 50 rpm, e após esta etapa, seguiram para a lavagem em água corrente por 30 min.

Nesta fase, foi necessário ordenar as fatias sequencialmente conforme a figura 16. As fatias, já organizadas, foram submetidas à desidratação em álcool 50% por 30 min.. Após, em álcool 80% por, no mínimo, 1 hora, e finalmente, em álcool absoluto por, no mínimo, 1 hora e, então, foi feita a última troca de álcool absoluto ficando em repouso por mais uma noite.

No terceiro dia, as fatias foram submetidas à solução de xilol-propanolol na proporção 1:2 por, no mínimo, 1 hora e 30 min.. Nesta etapa, fez-se a troca de papel filtro. Seguiu-se o próximo banho em xilol por 1 hora e 30 min. E em seguida, trocou-se o xilol, onde as lâminas ficaram por uma noite.

Após essa etapa, as lâminas foram montadas com resina sintética (Permount®) em uma lâmina com 10x15 cm de tamanho. O período mínimo de secagem destas lâminas,

após montada, variou entre 3 a 4 semanas. Depois desse período foi possível manuseá-las.

Esta técnica nos permite observar as camadas corticais e células neuronais (Kreczmanski *et al.*, 2005; Casanova *et al.*, 2006; Van Kooten *et al.*, 2008).

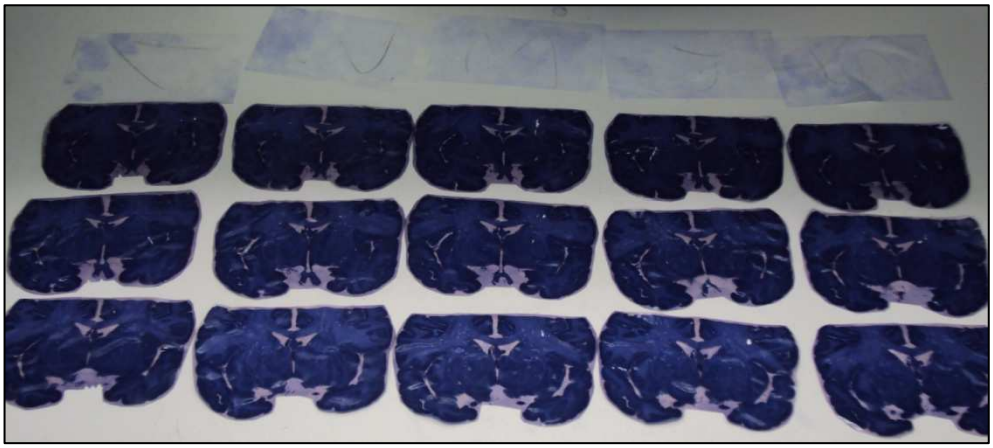


Figura 16 - Processo de coloração em galocianina. Uma das etapas do protocolo de coloração, organização das fatias de 440 µm já coradas em galocianina que foram, em seguida, desidratadas.

3.5 Etapa 3- parte B - Reconstrução tridimensional: estratégia para delineamento da região de interesse

Todas as fatias seriadas cortadas em 440 µm em celoidina foram fotografadas com câmera digital (FinePix S2 Pro- Fujifilm Nikon® -Tóquio, Japão) e lente macro (SIGMA® 50mm 1:2.8 D) com baixa magnificação óptica (Figura 17).

Figura 17 - Fatias seriadas que foram armazenadas em ordem.

Todas as fatias foram enumeradas para possibilitar a correlação da fatia em celoidina, a fatia corada e a reconstrução 3D. Para isso foi usado o programa Irfanview® (anexo F) que nos permitiu imprimir o número da fatia na própria imagem (Figura18).

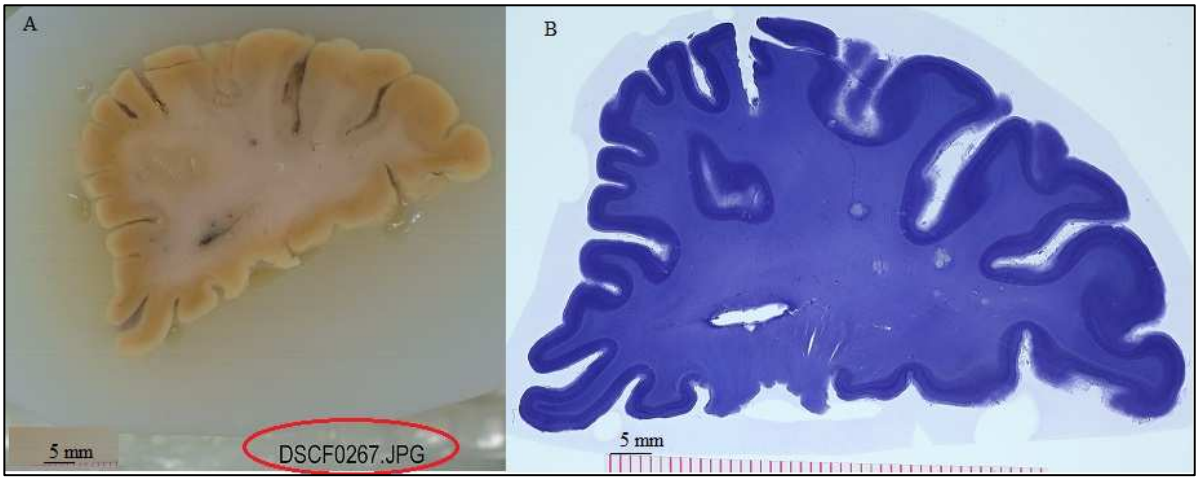


Figura 18 - Fatia em celoidina enumerada e fatia corada. Lâmina de um caso sendo a mesma fatia em celoidina (A) e depois em galocianina (B).

A partir desse recurso foi feita a reconstrução 3D de todos os lobos frontais dos casos coletados para esse banco com uso do software Amira (Amira 3D data visualization 5.4.1®) (Anexo F). A reconstrução nos permitiu visualizar arquitetonicamente as sub-regiões da região de interesse: região antero-medial (AM), medio-orbitofrontal (MO) e antero-lateral (AL) (Figura 19).

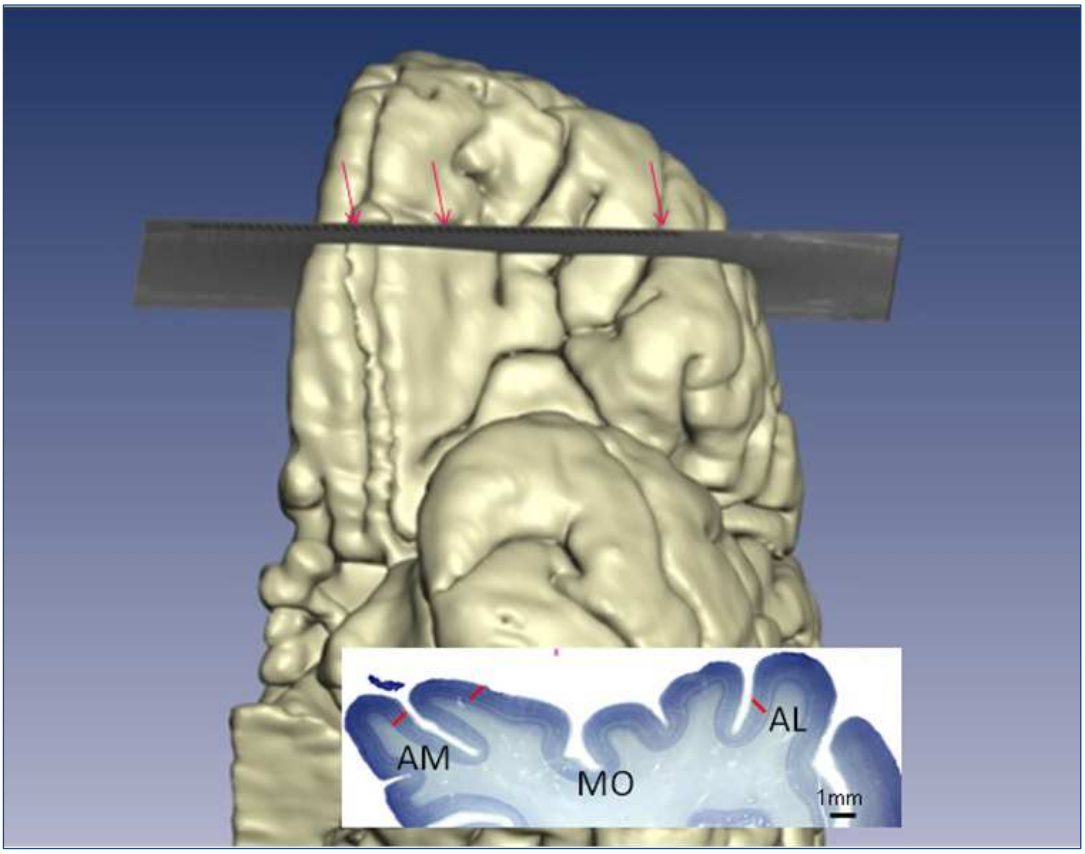


Figura 19 - Identificação arquitetônica das regiões de interesse. Reconstrução 3D de um caso controle do banco, destacando as bordas delimitadas citoarquitetonicamente. AM: antero-medial, MO: médio-orbitofrontal, AL: antero-lateral.

3.6 Critérios citoarquitetônicos

A foto macroscópica das lâminas coradas, em baixo poder de magnificação óptica, utilizando câmera digital com lente simples de reflexo digital Canon EOS 5D Mark II 21.1 Megapixel® (Tóquio, Japão) e lentes Vivitar ® auto-macro 90mm 1:2.8 (Tóquio, Japão), mostrou claramente o arranjo laminar dos neurônios e a real alteração de espessura das lâminas, possibilitando analisar as propriedades de coloração das lâminas e densidade celular. Como auxiliar, foi usado o estereomicroscópio (Olympus) com uma magnificação de 7,5mm, cuja profundidade do foco possibilitou a impressão visual em 3D do arranjo nuclear nos cortes espessos. A junção de ambas as técnicas para visualização das camadas corticais facilitou o delineamento das áreas citoarquitetônicas.

Considerando a heterogeneidade histológica das camadas corticais foram eleitos campos de conformação diferenciada (parede cortical, curva e depressões) do córtex cerebral, sendo que os pontos contados eram perpendiculares á pia-máter em uma disposição que garantiu a visualização de todas as camadas. Desta forma, evitou-se as regiões que configuravam cortes tangenciais.

Com esse rigor de documentação fotográfica e critérios estabelecidos, foi possível obter dados das camadas corticais IIIa, IIIb, IIIc, IV, Va, Vb, VIa, VIb do córtex cerebral de cada campo (vide figura 3). Identificados os pontos para análise foram obtidas imagens digitais com uso da interface de um computador e um microscópio (Olympus BH-2®) em campo claro com objetiva 400x (40:1.0x10) e lente fotográfica 5x (Olympus 125 FK 5x®), que resultou num aumento de 2000x, acoplados a uma câmera digital Canon EOS 5D Mark II 21.1 Megapixel ®(Tóquio, Japão). Nesta etapa, para cada caso foram feitas 88 imagens por campo, sendo analisados três campos por sub-região, havendo um total de 792 imagens por caso.

Com esse material foi possível estimar densidade celular, volume além do número de neurônios do COF como um todo e de cada uma de suas sub-regiões (Schmitz & Hof, 2005).

3.7 Etapa 3- parte C- Análise estereológica

3.7.1 Protocolo de contagem de neurônios

O presente estudo foi baseado nas técnicas de disetor óptico para análise de densidade neuronal e contagem de neurônios e no princípio de Cavalieri para cálculo do volume.

Como as fatias seriadas eram espessas, foi possível produzir imagens de secções ópticas virtuais que se distanciavam em 2,7 µm uma da outra no microscópio Olympus.

Rotineiramente, foi utilizado um conjunto de 11 imagens e este conjunto virtual de imagens foi importado para o software Image J 1.45I ®(National Institutes of Mental Health , EUA), sendo aprofundado no total 29,7 µm na lâmina, ou seja, todo o nucléolo de neurônio novo que aparecia no campo de visão entre 20µm e 49,7µm foram contados (Heinsen *et al.*, 1999).

No Image J 1.45I ® aplicou-se uma nova grade, cuja área foi de 10 μm^2 ou 0,01 mm^2. As linhas proibidas marcadas em vermelho (Figura 20) foram determinadas, sendo que os nucléolos encontrados sobre tais linhas e que apareceram na primeira imagem não foram contados a fim de evitar vieses. Com o uso da função "contador de células" do programa Image J, foram contados os nucléolos da região de interesse que se tornou visível na tela do computador ao mover a sequência de imagens. No final, o programa disponibiliza o número total de nucléolos de cada sequência de imagens. Foram contados para cada individuo no mínimo 746 neurônios e no máximo 2230 neurônios.

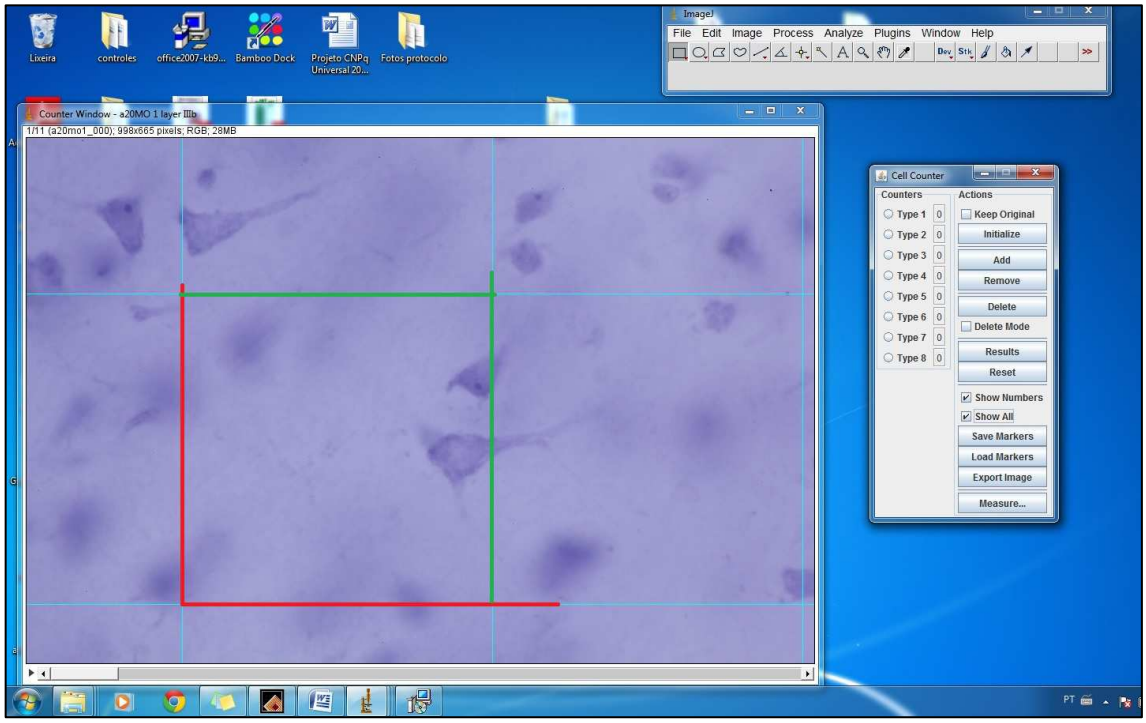


Figura 20 - A contagem de células pelo Image J 1.45I ®. Linha vermelha: limite, onde as células que tocam essas linhas não podem ser contadas; Linha verde, caso a célula as toque a contagem é permitida.

Todas as imagens foram codificadas o que propiciou a análise ás cegas, de maneira que o pesquisador executante não teve conhecimento a que grupo a amostra analisada fazia parte. Todos os delineamentos e contagens foram monitorados por um profissional especializado no assunto. As identificações, quanto ao grupo, apenas foram reveladas após a finalização das contagens neuronais e tabulação das mesmas.

Os dados coletados dessa contagem foram aplicados a uma fórmula estereológica para cálculo de densidade celular.

Considerando a calibração do campo óptico visualizado no computador compreendendo uma área da grade de 0,01 mm^2 e a espessura óptica da secção de 0,0297 mm, foi conseguido facilmente calcular a densidade de neurônios (Nv) em um volume aplicando a fórmula (1):

$$\mathbf{Nv = N / A.\ t = N_A / t \qquad (1)}$$

Sabendo se-que:

N= Número de nucléolos visualizados e contados

A= área da grade

t= espessura da secção óptica

$Nv = N / 0{,}01 \times 0{,}0297 = Nv/mm^3$

d. Cálculo da Grade

Foi necessário ajustar a imagem no Image J 1.45I ® para calibração da área da grade, onde os nucléolos foram visualizados e contados. Desta forma, em imagens cujas dimensões eram de 998 x 665, calibrou-se 100 µm equivalente a 556 pixels, ou seja, 1 mm são 5560 pixels.

3.7.2 Cálculo de volume e número total de neurônios das sub-regiões e do COF

Para o cálculo de volume foi aplicado o princípio de Cavalieri e estimado em mm^3 (West *et al.*, 1978; Gundersen & Jensen, 1987; Heinsen *et al.*, 1994). Para isso, foi considerada a delineação de cada subárea AM, MO e AL em cada caso, e todas as lâminas ímpares foram contadas de maneira que cada caso apresentou no mínimo 10 fatias. Com o uso do Image J 1.45I ®, uma grade em forma de cruzes foram sobrepostas ás imagens da área em baixa magnificação óptica e todas as cruzes que estavam dentro da área delimitada foram contadas. Em seguida, os pontos contabilizados em cada fatia foram inseridos na fórmula de volume, conhecido pelo símbolo de V ou (V *(ref)*) e do coeficiente de erro (CE).

A fórmula (2) do princípio de Cavalieri é:

$$\mathbf{V\ (ref) = t\ .\ (a/p)\ .\ \sum_{i=1}^{n} Pi} \qquad \mathbf{(2)}$$

Sabendo-se que:

t = média da distância entre as fatias

a/p = área de um ponto da grade

Pi = número de pontos em cada fatia

n = número de secções usadas.

Desta forma, os valores assumidos em nossas amostras foram:

t = 0,88 mm; a/p = 0,7 mm^2; n > 10.

Devido à variabilidade arquitetônica de um indivíduo para o outro, alguns casos tiveram mais que 10 fatias analisadas para que a delimitação citoarquitetônica fosse respeitada.

Mais simplificadamente e para a fácil aplicação no Excel, usamos a fórmula 3:

V= ∑P . (a/p) .t (3)

Ao calcular o erro do valor estimado foi obtido o coeficiente de erro (CE). O mesmo foi aplicado de acordo com o método de Gundersen-Jensen (1987) e é calculado no mesmo momento em que calcula-se o volume. A fórmula usada é 4 ou 5:

$$CE\,(\sum P) = \frac{\sqrt{\textbf{Variância total}}}{\sum P} \qquad \textbf{(4)}$$

ou

$$CE(est_1 V) = \left(\sum_{i=1}^{n} A_i\right)^{-1} \times \left[\frac{1}{12}\left(3\sum_{i=1}^{n} A_i^2 + \sum_{i=1}^{n-2} A_i A_{i+2} - 4\sum_{i=1}^{n-1} A_i A_{i+1}\right)\right]^{1/2} \qquad \textbf{(5)}$$

O número total de neurônios foi calculado a partir da densidade neuronal (Nv) e do volume (V *(ref)*) em mm^3, aplicando a fórmula 6:

Ne = Nv (Ne/ mm^3) x V *(ref)*mm^3 (6)

Para a estimativa de Ne utilizamos duas estratégias:

- Somatória dos números de neurônios estimados para cada sub-região, ou seja,

  Ne AM + Ne MO + Ne AL (7)

- O produto da média da densidade neuronal total (Nv COF) e a somatória dos volumes

  Nv . COF . ∑ Vref COF (8)

4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

4. Análise estatística

Foi realizada uma análise descritiva dos dados demográficos para caracterizar os grupos de sujeitos s e controles como idade, pH, IPM. A análise inicial compreendeu: média, mediana, desvio padrão, percentil, mínimo e máximo.

Para a comparação de todas as variáveis que pudessem influenciar no pareamento do grupo de sujeitos s com o grupo controle como: hemisfério, idade e gênero, foram aplicados os testes Qui- Quadrado e o teste de Fisher.

Como a normalidade não pôde ser assumida, aplicamos um teste não paramétrico Mann-Whitney U-test, para comparar as médias entre os grupos. Desta forma, investigamos a hipótese nula considerando um nível de significância de 0,05.

As análises realizadas entre as variáveis das sub-regiões do COF foi usado o Test-t de Student. Para todas as análises utilizamos o software SPSS 14.0.

5.RESULTADOS

5. Resultados

5.1 Casos coletados

Durante o período de fevereiro de 2009 a dezembro de 2011 foram coletados 1423 casos, sendo 97 triados como possíveis casos psiquiátricos. Destes, 64 foram excluídos por terem tido acidente vascular encefálico (AVE), demência, trauma, baixo pH, IPM maior que 24 horas e por falta de informações. Há 12 casos que aguardam o agendamento da entrevista psiquiátrica e para realizar o melhor diagnóstico estimado. Outros 10 casos foram triados como controles pareados. Os 21 casos restantes foram inclusos seguindo o diagnóstico seguinte: 5 TAB, 2 com sintomas obsessivos-compulsivos (SOC), 6 TOC, 5 TDM, 1 transtorno de humor (SOE), 1 transtorno por uso de substâncias (TUS), 1 Esquizofrênico conforme fluxograma mostrado na figura 21.

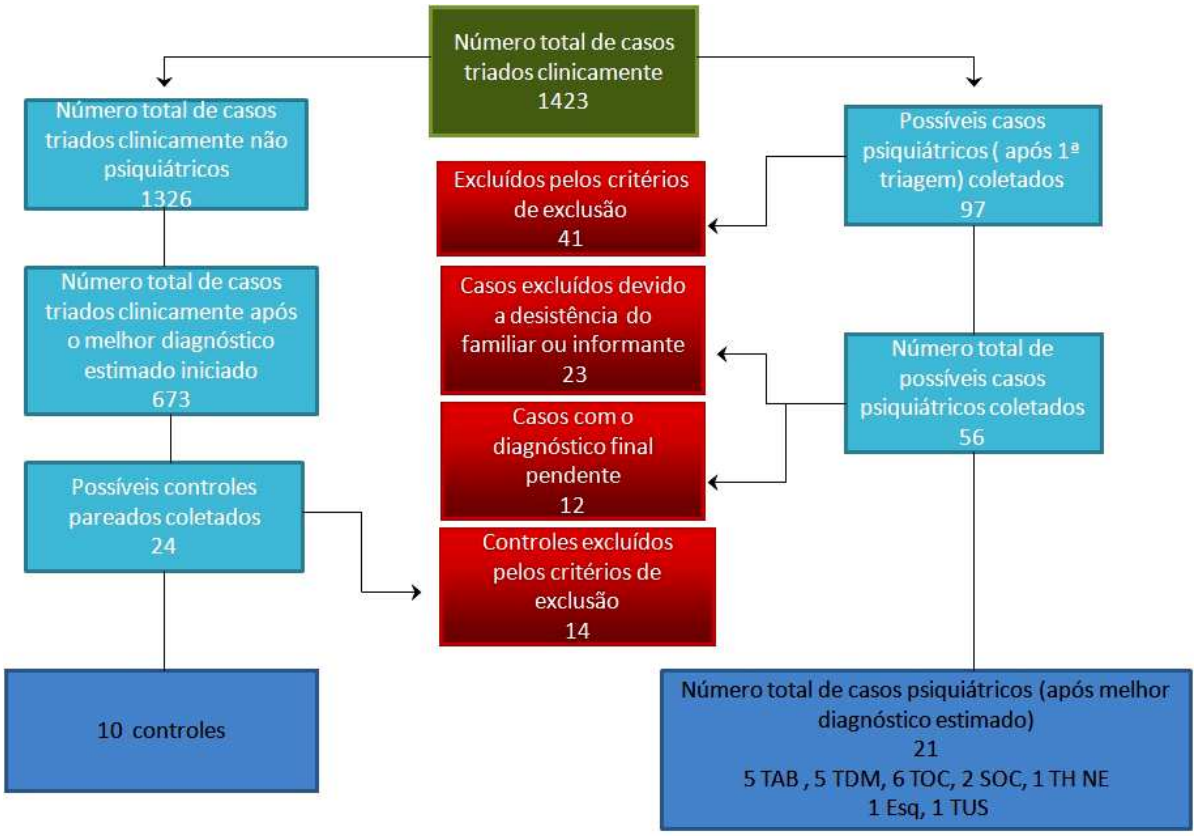


Figura 21 - Fluxograma de casos triados e coletados. THNE: transtorno de humor não especificado, Esq: esquizofrenia, TUS: transtorno por uso de substâncias.

No período de processamento dos casos na Alemanha, não havíamos finalizado o consenso de todos os casos de TAB e de TOC. Desta maneira, dois sujeitos com TAB e um de TOC não foram inclusos nas análises apresentadas neste estudo.

Neste trabalho, uma parte da população apresentada no fluxograma foi analisada estereologicamente, portanto, os dados que serão apresentados adiante são referentes a: 7 controles, 5 TOC, 2 SOC e 3 TAB. Para as análises os sujeitos com TOC e SOC foram agrupados no grupo TOC.

5.1.1 Dados demográficos

O grupo controle é composto por 57,1% de sujeitos do sexo masculino e no grupo de sujeitos psiquiátricos 60% são, também, do sexo masculino (X^2 = 0,14, g.l.=1, p= 1,0).

Quanto à lateralidade do hemisfério verificamos que no grupo controle em 57,1% dos casos foi analisado o hemisfério esquerdo e no grupo de psiquiátricos em 60% dos casos foi, também, analisado o hemisfério esquerdo (X^2 = 0,14, g.l.=1, p = 1,0). Por outro lado, os grupos TAB e TOC estão pareados quanto ao hemisfério direito (28,6%) (X^2=1,27, g.l.=2, p = 0,5).

A média de idade do grupo de sujeitos psiquiáricos foi de 70 anos com desvio padrão de 6 anos e do grupo controle foi de 74 anos (± 12 anos). Esses dados mostram que a amostra está balanceada quanto gênero, lateralidade e idade. A tabela 6 mostra as características importantes dos sujeitos analisados:

Tabela 6 - Características dos sujeitos psiquiátricos e controles

Caso/ Gênero/Idade	*Diag. Psiq.*	*Causa da morte*	*IPM (horas)*	*pH*	*mL/ (g)*
1/M/77	TOC	Carcinoma de pâncreas	17:00	6,5	1100/1258
2/F/66	TAB	DPOC	12:45	7,0	1100/1046
3/F/66	TOC	Edema Pulmonar	13:05	6,9	1100/1108
4/M/66	TOC	IAM	8:50	8,0	1200/1194
5/F/61	SOC	Peritonite Aguda Purulenta	21:10	7,0	1250/1312
6/F/65	TAB	IAM	6:28	9,0	1100/1042
7/M/73	TOC	Edema Pulmonar	23:00	6,5	1100/1203
8/M/81	TOC	Broncopneumonia	13:55	7,0	1100/1162
9/M/74	SOC	Edema Pulmonar	19:07	8,0	1200/1298
10/M/74	TAB	Broncopneumonia	22:40	7,0	1000/1226
Média (DP)			**Média (DP)**	**Média (DP)**	**Média (DP)**
70 (± 6)			**17:00 (± 6)**	**7,2 (± 0,7)**	**1125 (±71)/ 1184 (± 90)**
11/M/72	Controle	Tromboembolismo Pulmonar	8:55	8,0	1000/1226
12/F/66	Controle	Dissecção e Rotura de Aorta	15:29	7,0	1300/1328
13/F/63	Controle	Tromboembolismo Pulmonar	7:20	6,9	1250/1314
14/M/66	Controle	Pneumonia	14:10	6,8	1100/1252
15/M/82	Controle	Hematoma intra-abdominal	16:10	6,4	1300/1332
16/M/71	Controle	IAM	13:37	6,6	1100/1136
17/F/98	Controle	Edema Pulmonar	16:31	6,5	1200/1240
Média (DP)			**Média (DP)**	**Média (DP)**	**Média (DP)**
74 (± 12)			**13:00 (±3)**	**6,8 (±0,5)**	**1157 (±159) 1216 (±150)**

Diag. Psiq: diagnóstico psiquiátrico; IPM: intervalo *postmortem*; DP: Desvio Padrão; mL: volume em mililitro; g: massa em gramas; DPOC= doença pulmonar obstrutiva crônica; IAM= infarto agudo do miocárdio

Dos sujeitos psiquiátricos, 60% foram declarados como brancos, 30% negros e 10% pardos. Apenas 20% eram etilistas, no entanto, outros 30% já tiveram contato com álcool durante a vida. Desse grupo 60% eram tabagistas (Figura 22).

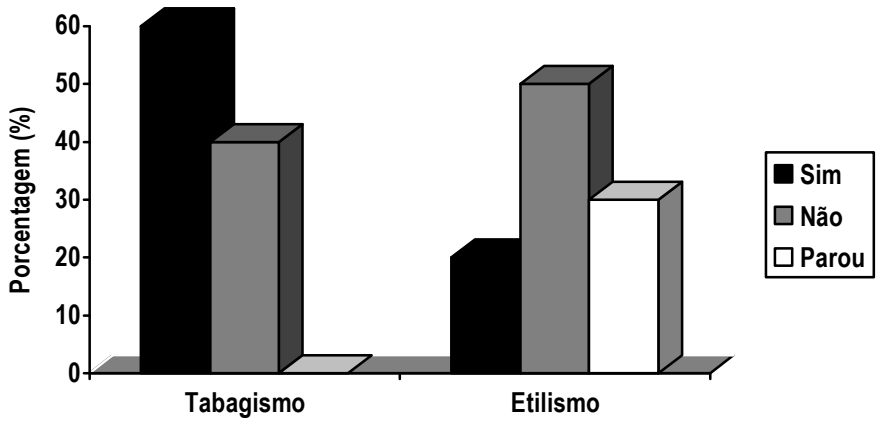


Figura 22 - Representação gráfica da incidência de tabagismo e etilismo no grupo de sujeitos psiquiátricos

Do grupo controles, 57% foram declarados como brancos, 14% como negros e 29% como pardos. Cerca de 14% eram etilistas e 57% tiveram contato com álcool em algum momento da vida. Em relação ao tabagismo, cerca de 57% havia parado com o vício, e 42% eram tabagistas (Figura 23).

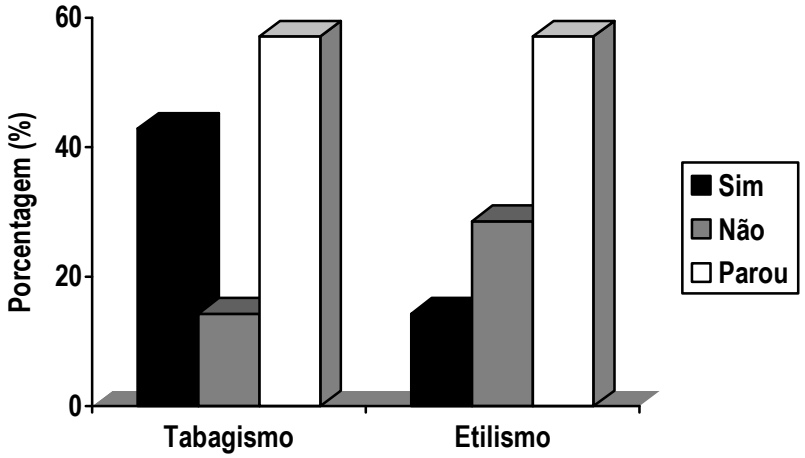


Figura 23 - Representação gráfica da incidência de tabagismo e etilismo no grupo controle

Verificamos que dos sujeitos psiquiátricos, poucos tinham diagnóstico em vida (30%) ou tinham feito uso de medicamentos psiquiátricos (20%). Foi possível constatar segundo o "melhor diagnóstico estimado" que dos casos de TOC ou SOC estudados, 4

possuíam comorbidade de transtorno de depressão maior e um caso de transtorno psicótico breve, sendo que um dos casos que apresentou transtorno de depressão maior, tratava-se de episódio único.

A análise descritiva também foi realizada dividindo os grupos de transtornos psiquiátricos TAB e TOC. Nesta análise, observou-se que no grupo TAB a idade média foi de 68 anos (± 5 anos) e do grupo TOC foi de 71 (± 7 anos). O grupo de TOC está mais balanceado do que o grupo de TAB quanto ao gênero sendo 40% feminino nos controles e 50% no grupo de TOC, em contrapartida, o gênero masculino está balanceado entre os grupos TAB e TOC (28,6%) (X^2=1,27, g.l=2, p.=0,5).

5.2 Citoarquitetura

A reconstrução 3D prévia foi indispensável para a orientação e delineamento citoarquitetônico das sub-regiões do COF: AM, MO, AL. A razão entre as diferenças das camadas e as propriedades de coloração são estudadas em baixa magnificação (Figura 24 c-e). Essa estratégia nos permitiu aplicar essa análise para os sujeitos psiquiátricos e controles.

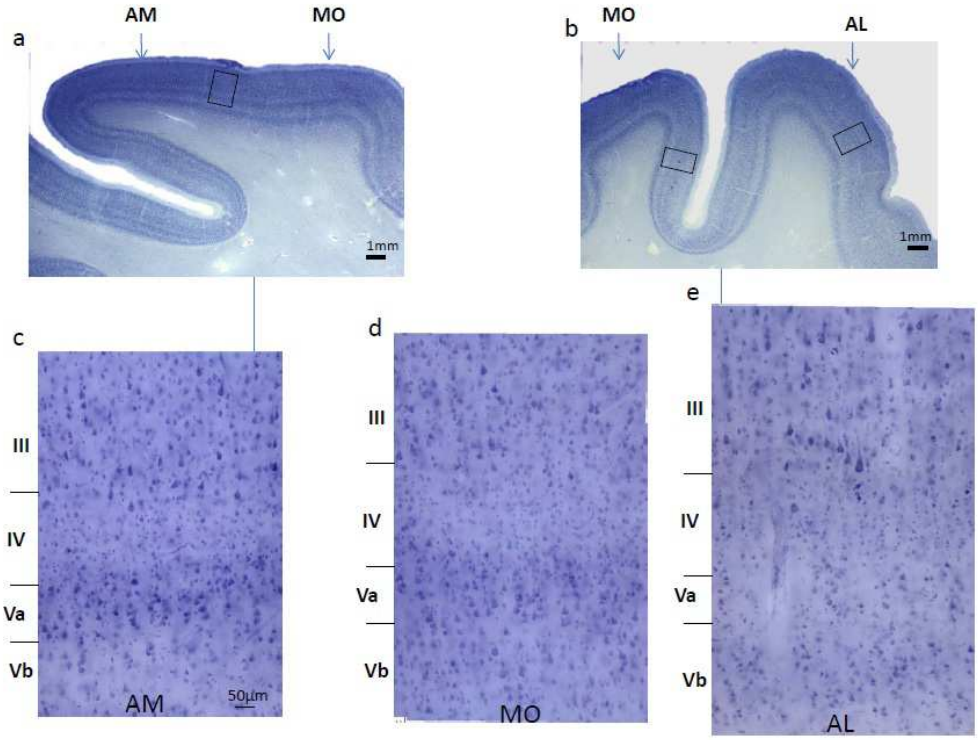


Figura 24 - Citoarquitetura do córtex orbitofrontal de um caso controle. Figuras a e b: visão macroscópica do córtex orbitofrontal; figuras c,d: visão microscópica das bordas (retângulos) indicados em a (borda entre AM e MO) e b (borda entre MO e AL). Escala de 1mm para a e b; de 50 µm para c, d, e.

O Quadro 3 mostra os critérios analisados para o delineamento das sub-regiões do COF realizados a partir da observação da citoarquitetonia das camadas corticais de casos controles.

Quadro 3 - Descrição de análise para delineamento das sub-regiões do COF

AM	***MO***	***AL***
Va: com alta cromofilia	Va: diminuição de cromofilia, aumento global do número de células piramidais	Va: mais estreita que em MO, células dispersas, arranjo em colunas
IV: estreita e com baixa densidade celular	IV: aumento de espessura e densidade celular em relação AM	IV: aumento em espessura e densidade celular em relação AM e MO
III: menor densidade celular que em MO e AL, apresenta células piramidais grandes e isoladas com alta cromofilia	III: aumento do número de células, aumento do tamanho celular, menos cromofílica do que em AM	III: espessa e bem corada
IIIc- presença de células piramidais		IIIc: número de células piramidais, tamanho celular e intensidade de coloração aumentada.

AM: antero-medial; MO: médio-orbitofronal; AL: antero-lateral

Após o delineamento do COF realizado neste estudo, adicionamos MO no protocolo de dissecção de áreas para criopreservação para futuros estudos.

5.2.1 Delineamento do córtex orbitofrontal para cálculo de volume

Utilizando amostras do nosso banco de encéfalos em cortes coronais e sagitais conseguimos delimitar o COF citoarquitetonicamente. É possível verificar que a disposição das camadas corticais não segue a mesma disposição dos giros e sulcos, o que torna a citoarquitetura necessária. Esta ferramenta também poderá ser utilizada em estudos futuros.

Delineamos as características das bordas entre a região frontopolar (FP) e a sub-região anterior medial (AM). Verificamos, nos cortes coronais, que toda a região rostral do COF é altamente granular e a quantidade de células granulares aumenta na transição de AM para FP, ou seja, do sentido caudal para o rostral. Desta forma, observamos que FP é mais granular que AM e, sobretudo, há um grande número de células granulares na camada IIIc em FP, quando visualizado em cortes sagitais.

Também em cortes sagitais, visualizando da região rostral para a caudal é possível verificar uma diminuição da espessura da camada cortical IV. Além disso, AM apresenta células piramidais grandes e mais cromofílicas, e tem o número dessas células diminuídas quando se observa em direção á borda de posterior medial (PM). Contrariamente a FP, AM possui poucas células granulares e as células piramidais de FP, por sua vez, são basofílicas e menores quando comparadas as de AM. Conforme o quadro 4:

Quadro 4 - Descrição da transição citoarquitetônica entre FM e AM

FP	***AM***
Camada V compacta e bem marcada. É perfurada por inúmeras fibras finas	Fibras espessas passam pela camada VI.
Muitas células granulares na camada IIIc e é menos espessa	Camada IIIc apresenta células menores, mas é uma camada mais espessa, inclusive na extensão de AM
Camada IV menos espessa do que em AM	Camada IV mais espessas ao longo de AM
Células piramidais menores que em AM	Apresenta menor número de fibras
Córtex mais fino que em AM	

FP: Frontopolar; AM: anterior-medial

Na porção caudal, ou seja, quase em limite a PM é possível verificar a redução de células granulares na camada IV de AM, podendo até mesmo estar ausentes em PM.

Quanto á delimitação de bordas entre AM e PM em cortes sagitais, as características estão no quadro 5:

Quadro 5 - Descrição da transição citoarquitetônica entre AM e PM

AM	***PM***
Camada V torna-se difusa ou ausente, com maior celularidade em Vb	Camada V é fortemente marcada, quase alinhada (próximo á Ínsula), portanto, é bem evidente e cromofílica
Camada IV granulosa, com mais células granulares	Camada IV ausente
Camada IIIc proeminente, com clusters de células	Camada IIIc não é clara, possui poucas células
Grandes células piramidais e mais cromofílicas em direção a PM (caudal)	Poucas células granulares
Os sulcos delimitam AM e PM	Fibras radiais são menos numerosas e espessas, são vistas melhores fibras em tamanho e arranjos
As estrias estão mais evidentes	

AM: antero-medial; PM: postero-medial

Na reconstrução 3D, é possível identificar a fatia analisada, conforme descrito anteriormente e identificar a localização arquitetônica correspondente á delimitação realizada citoarquitetonicamente (Figura 25).

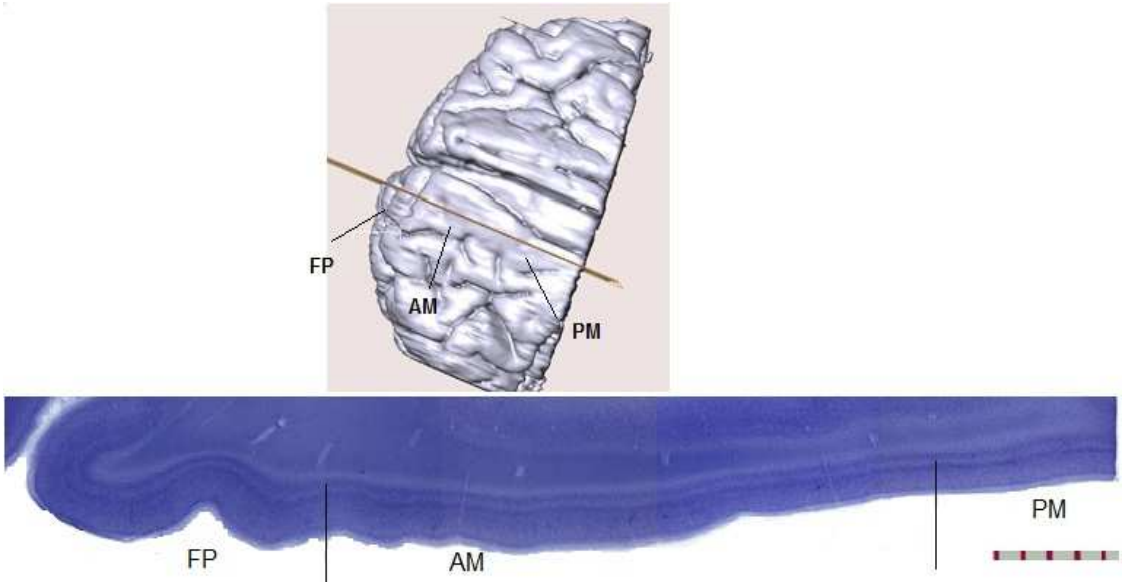


Figura 25 - Delimitação de bordas entre frontopolar (FP) e antero-medial (AM) e posterior medial (PM). Reconstrução 3D de cortes seriados sagitais do lobo frontal com indicação da lâmina escolhida. Na lâmina histológica, corada em galocianina, são mostradas as bordas entre FP e AM e PM.

A borda entre FP e MO é caracterizada pela presença da camada IIIc bem marcada em FP, ou seja, mais basofílica que em MO. No entanto, a camada Va é menor em FP que em MO. Demais características estão no quadro a seguir (6):

Quadro 6 - Descrição da transição citoarquitetônica entre FP e MO

FP	***MO***
Camada Va é menor em espessura	Camada Vb é espessa, tem células mais distribuídas
Camada IIIc bem corada e marcada	Camada Va é mais espessa que em FP e AL
Características continuam próximas aos sulco	Camada IIIc não é bem marcada
	Camadas IIIa e IIIb é menos visível

FP: frontopolar; MO: médio-orbitofrontal

Verificamos, em cortes sagitais, que a borda entre MO e postero-lateral (PL) está em um sulco, no qual a camada IIIc torna-se mais espessa na direção de PL a MO ou seja, se visualizado da região caudal para a rostral. No entanto, a camada IIIc de PL é menos basófílica que a camada IIIc de AL. Assim, pode-se identificar a borda entre essas duas regiões na extremidade lateral do COF. As diferenças citoarquitetônicas podem ser visualizadas em lâminas e reconstruções como na figura 26:

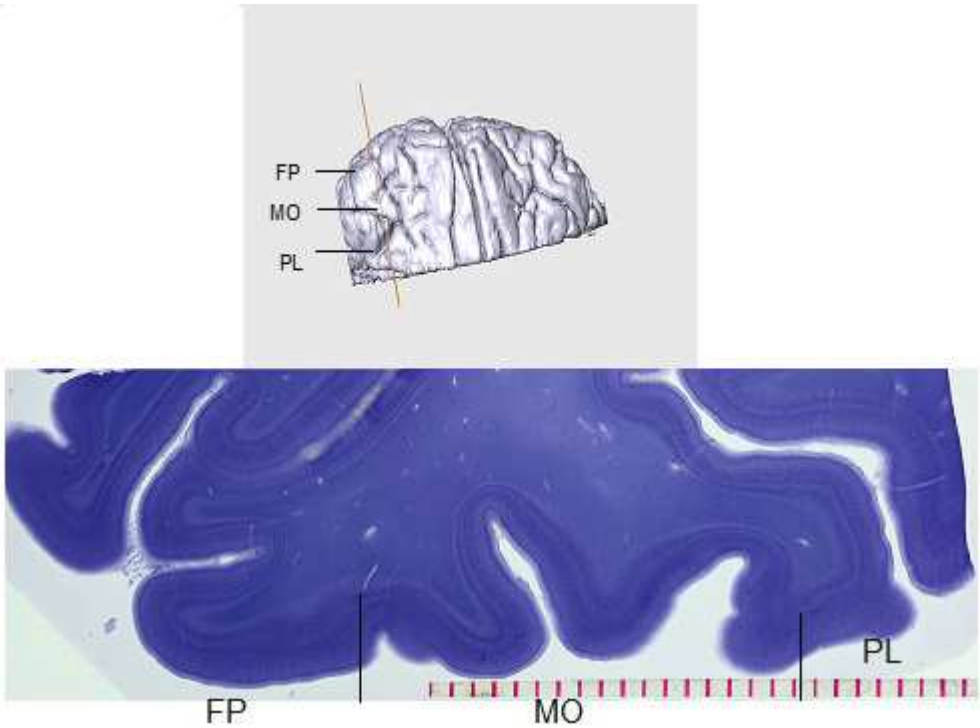


Figura 26 - Delimitação de bordas entre frontopolar (FP), médio-orbitofrontal (MO) e posterior-lateral (PL). Reconstrução em 3D de cortes seriados sagitais do lobo frontal, com indicação da a lâmina escolhida. A lâmina histológica, corada em galocianina, mostra a delimitação de bordas entre FP, MO e PL.

A borda entre AL e MO parece ser facilmente visualizada, principalmente porque AL apresenta uma camada IIIc mais desenvolvida. Seguem as características no quadro a seguir (7):

Quadro 7 - Descrição da transição citoarquitetônica entre AL e MO

AL	***MO***
Camada IIIc rica em células e mais espessa	Camada IVmenor que em AL
Presença de células piramidais	Células pequenas e em menos número nas depressões corticais
Células menores e homogêneas	Maioria das células mais basófilas
Mais células, no entanto, menos basófilas	

Embora algumas áreas não sejam alvo do nosso presente estudo, fizemos a análise das bordas de PM e PL. Uma diferença relevante é a ausência de camada IIIc, IV e VI em PM , enquanto PL apresenta uma camada IIIc rica em células granulares. A descrição é apresentada no quadro 8 e observada na figura 27.

Quadro 8 - Descrição da transição citoarquitetônica entre PM e PL

PM	***PL***
Camada VI possui distribuição dispersa	Camada V menos corada que em PM
Camada V compacta, bem marcada e corada	Camada IIIc com células granulares
Ausência de camadas IV e IIIc Possui camada II	O córtex do PL é espesso como o da Ínsula
Ausência de células granulares	As camadas são menos desenvolvidas

PM: posterior-medial; PL: posterior-lateral

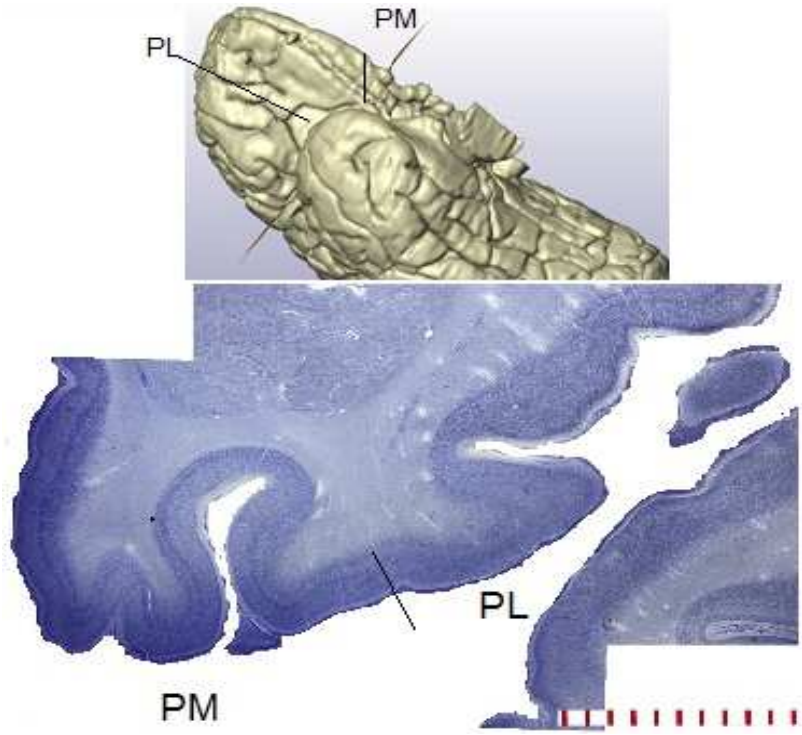


Figura 27 - Delimitação de bordas entre posterior-medial (PM) e posterior-lateral (PL). Reconstrução em 3D de cortes seriados coronais do lobo frontal, com indicação da a lâmina escolhida. A lâmina histológica, corada em galocianina, mostra a delimitação de bordas entre PM e PL.

5.4 Densidade neuronal, número total de neurônios e volume em todos os sujeitos psiquiátricos e controles

Na análise descritiva verificamos a média da densidade neuronal de cada sub-região e a estimativa para COF, comparando os grupos de sujeitos (TAB e TOC juntos) e controles.

A densidade neuronal estimada de COF nos controles variou entre 34.901 neurônios/mm^3 e 16.990 neurônios/ mm^3, cuja média foi de 22.662 neurônios/ mm^3. A densidade neuronal observada nos sujeitos foi menor variando entre 20.373 neurônios/

mm^3 e 10.459 neurônios/ mm^3, cuja média foi de 16.141 neurônios / mm^3. As medianas estão representadas na tabela 7.

Tabela 7 - Mediana de densidade neuronal (Nv/mm^3) de cada sub-região de COF e total

Região	***Controle (N=7)*** *Med. (IQ)*	***Paciente (N=10)*** *Med. (IQ)*	***p***
AM	21.230,83 (4.489)	15.128,13 (6.546)	0,019
MO	21.604,94 (6.593)	17.092,92 (3.787)	0,014
AL	20.485,60 (8.511)	15.946,50 (5.471)	0,014
COF	21.106,12 (6.094)	15.860,77 (5.221)	0,007

Teste Mann-Whitney U test com nível de significância de 0,05. AM: antero-medial; MO: médio-orbitofrontal; AL: antero-lateral; COF: córtex orbitofrontal

Ao calcular a razão das médias foi possível verificar que o grupo de sujeitos psiquiátricos apresentou uma diferença na média amostral observada 28% menor que a média observada no grupo controle.

Verificamos que houve diferença significante de densidade neuronal para todas as sub-regiões e para o COF ao comparar todos os sujeitos psiquiátricos com os controles (Figura 28).

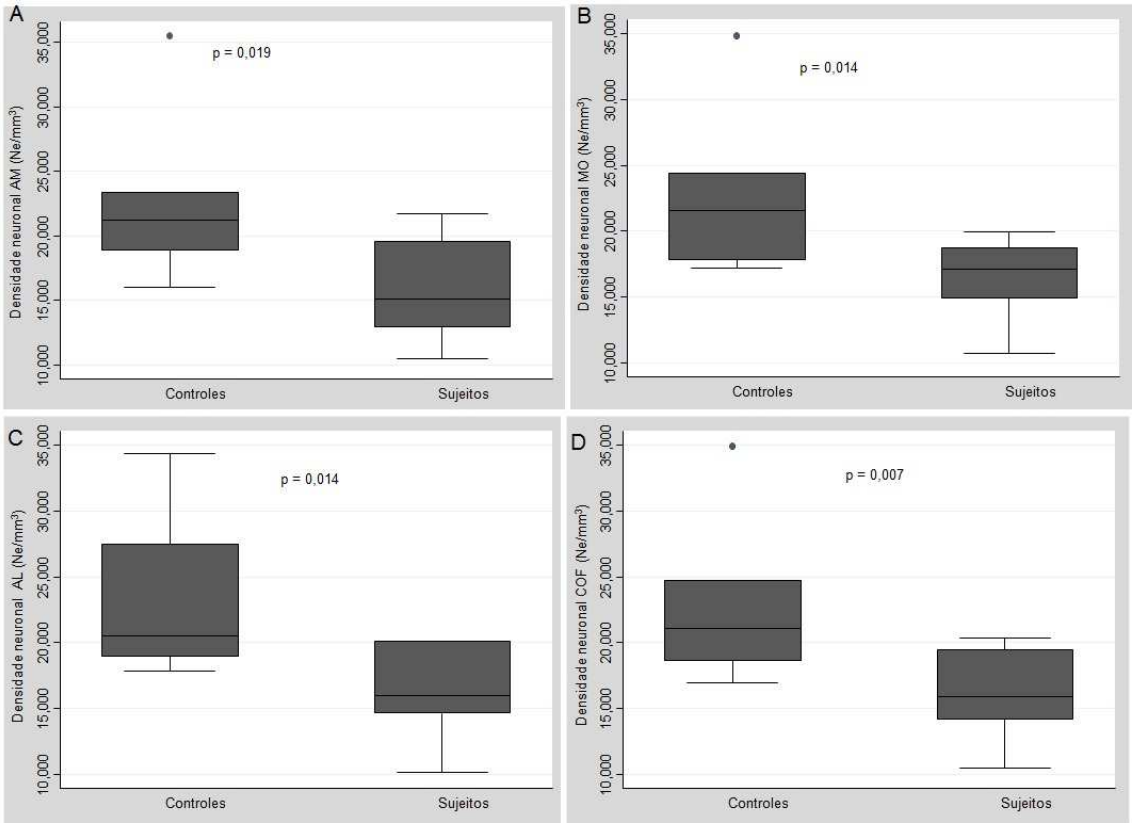


Figura 28 - Representação gráfica das medianas das densidades neuronais (Nv) nas sub-regiões e no COF em todos os sujeitos e controles ($p<0,05$). A) Nv de AM (antero-medial); B) Nv de MO (médio-orbitofrontal); C) Nv de AL (antero-lateral); D) Nv de COF (córtex orbitofrontal). Nv/mm^3: número de neurônios por volume em mm^3

Na análise descritiva de volume, obtivemos que o volume máximo dos controles para COF foi de 1.900 mm^3 e o mínimo de 900 mm^3, enquanto que para os sujeitos o volume máximo foi de 1.668 mm^3 e o mínimo de 992 mm^3. A tabela 8 mostra as médias e desvios padrão:

Tabela 8 - Volume (mm^3) das sub-regiões e do COF nos sujeitos acometidos e nos controles

Região	***Sujeito (N=10)***	***Controle (N=7)***	***p***
AM	378 ± 75	364 ± 139	0,9
MO	513 ± 114	595 ± 150	0,4
AL	428 ± 97	489 ± 133	0,5
COF	1.320 ± 200	1.449 ± 357	0,3

Teste não paramétrico Mann Whitney com $p<0,05$. AM: antero-medial; MO: médio-orbitofrontal; AL: antero-lateral; COF: córtex orbitofrontal; N=número de casos

Ao comparar as médias do volume de cada sub-região e o volume de COF entre todos os sujeitos e os controles, observamos que não há diferença estatística (Figura 29).

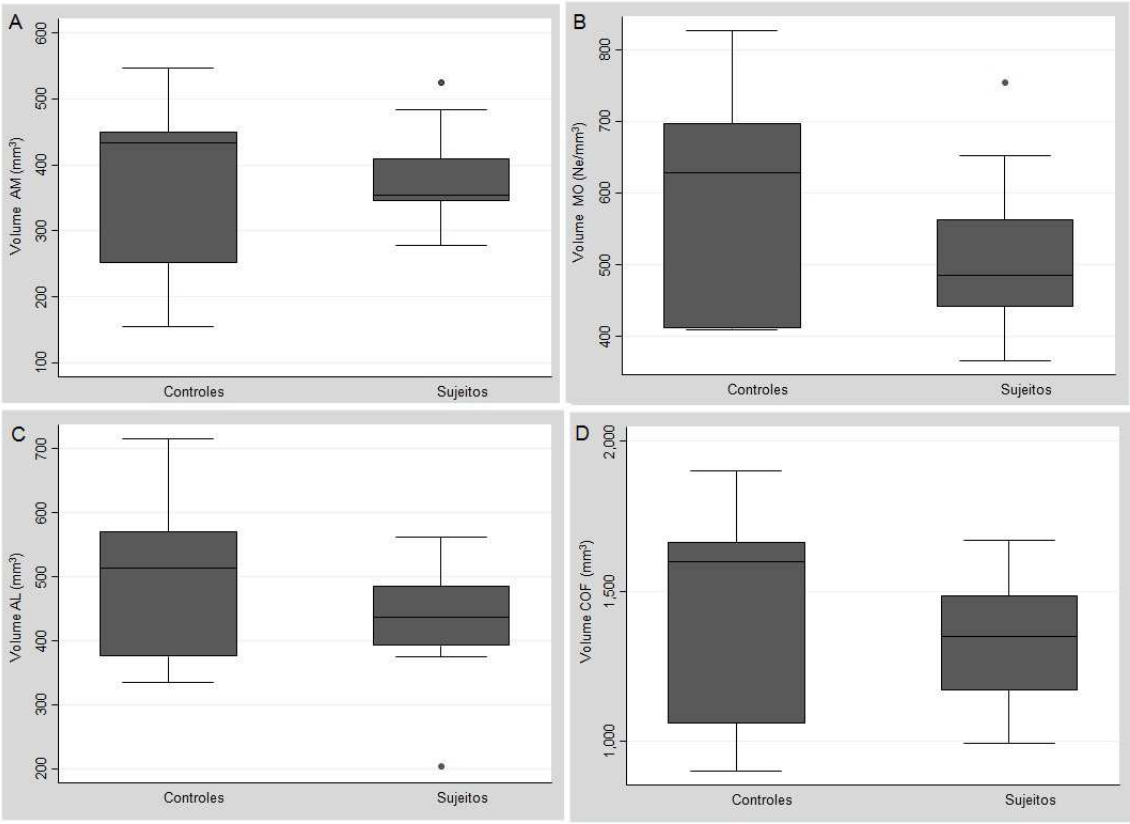


Figura 29 - Representação gráfica das medianas dos volumes (V) das sub-regiões e COF em todos os sujeitos psiquiátricos e controles (P<0,05). A) V de AM (antero-medial); B) V de MO (medio-orbitofrontal); C) V de AL(antero-lateral); D) V de COF(córtex orbitofrontal)

Na análise descritiva, a média de número total de neurônios dos sujeitos é menor do que dos controles. Fizemos duas estimativas de número total de neurônios para COF, considerando duas fórmulas esterológicas, obtendo valores para COF e COF 2. Desta forma, confirmamos os resultados e, inclusive, obtivemos a mesma significância estatística para ambas. O número total de neurônios de COF máximo nos controles foi de 48.158.464 e no mínimo de 18.965.890 neurônios, enquanto que nos sujeitos o número total de neurônios máximo foi de 33.986.156 e no mínimo foi de 13.323.621 neurônios. As médias estão representadas na tabela 9.

Tabela 9 - Número total de neurônios nos sujeitos e controles

Região	***Sujeitos (N=10)***	***Controles (N=7)***	***p***
AM	6.053.123 ± 2.032.634	7.720.152 ± 2.487.461	0,19
MO	8.444.553 ± 2.828.522	13.424.366 ± 4.059.972	**0,019**
AL	7.047.588 ± 2.652.015	11.459.416 ± 4.939.202	0,05
COF	21.538.512 ± 6.704.337	32.647.960 ± 10.693.828	**0,04**
COF 2	21.545.263 ± 6.612.283	32.603.934 ± 10.700.223	**0,04**

Média e desvio-padrão. Teste não- paramétrico Mann- Whitney U-test com $p < 0,05$. AM: antero-medial; MO: medio-orbitofrontal; AL: antero-lateral; COF: córtex orbitofrontal; COF 2: análise alternativa de número total de neurônios em COF. N = número de casos

Houve significância estatística na diferença entre sujeitos e controles em relação ao número total de neurônios de COF e o numero total de neurônios de MO. Ainda podemos observar uma tendência á diferença em AL (Figura 30).

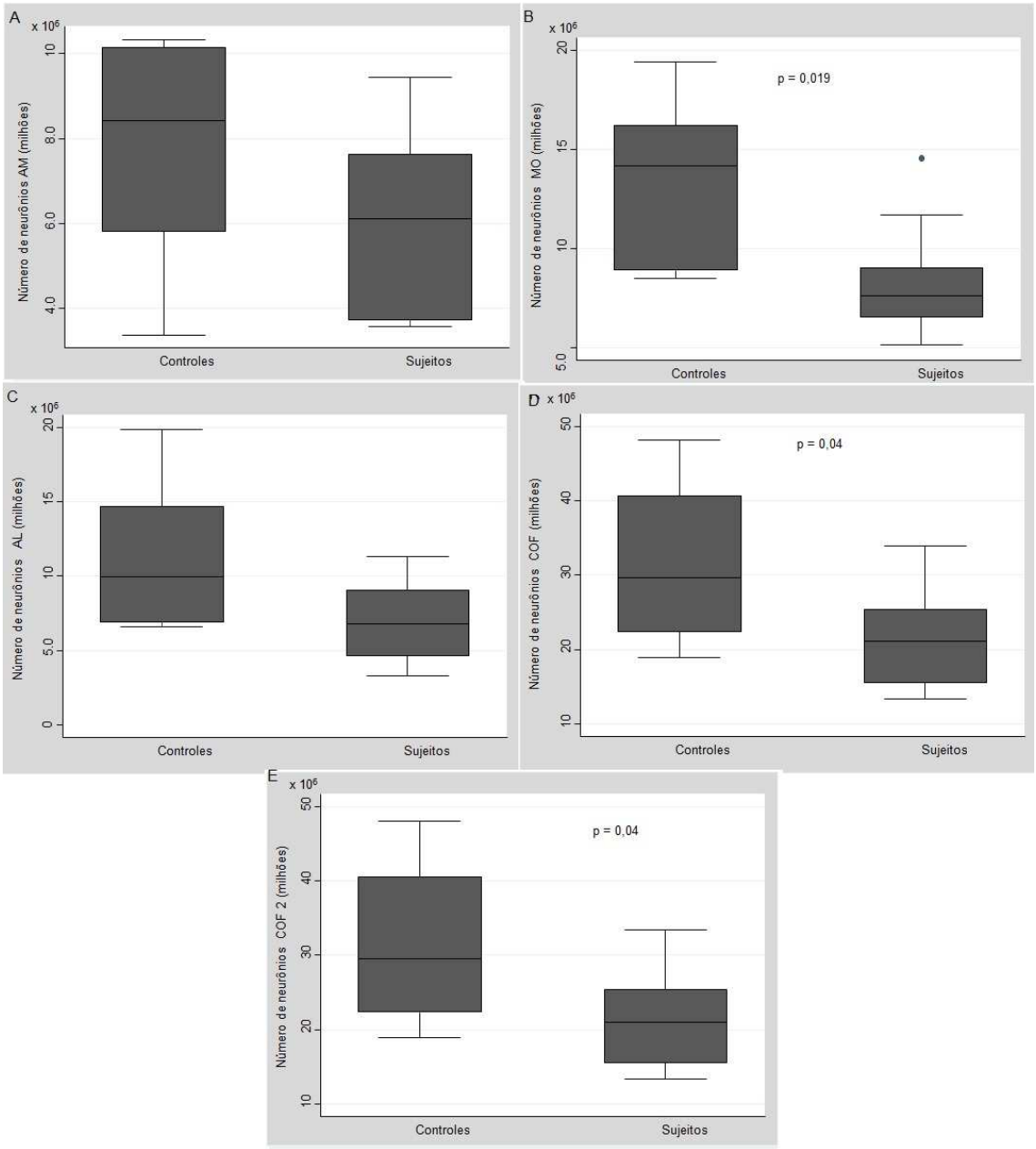


Figura 30 - Representação gráfica das medianas do número total de neurônios (Ne) em todos os sujeitos e controles. A) Ne de AM (antero-medial); B) Ne de MO (médio-orbitofrontal); C) Ne de AL (antero-lateral); D) Ne de COF (córtex orbitofrontal); E) COF 2 (análise alternativa de número total de neurônios em COF)

5.5 Densidade neuronal, número total de neurônios e volume dividindo os grupos em TAB, TOC e controles

Para as análises, separamos o grupo de sujeitos em dois subgrupos: grupo de TAB e grupo de TOC. Devido ao pequeno número de amostras no grupo de sujeitos acometidos por TAB, não foi possível aplicar testes não paramétricos para todas as variáveis analisadas. Desta forma, as análises deste grupo são apenas descritivas. Já o grupo dos sujeitos com TOC teve um maior número de observações o que permitiu compará-los com os controles.

Ao avaliar o grupo de TAB, observamos que a densidade neuronal do COF máxima foi de 19.703 neurônios/ mm^3 e o mínimo de 10.459 neurônios/ mm^3, sendo a média da densidade neuronal de 13.930 neurônios/ mm^3. Enquanto que nos sujeitos com TOC observou-se a densidade neuronal máxima em torno de 20.373 neurônios/ mm^3 e a mínima de 14.231 neurônios/ mm^3, obtendo uma densidade neuronal com média de 17.088 neurônios/ mm^3. A tabela 10 mostra a mediana do COF e de suas sub-regiões:

Tabela 10 - Densidade neuronal (Nv/mm^3) de COF e sub-regiões nos subgrupos

Região	***TAB (N=3)***	***TOC (N=7)***
	Med. (IQ)	*Med. (IQ)*
AM	11.737,74 (9.820)	15.525,62 (6.126)
MO	11.503,92 (9.259)	17.957, 35 (2.525)
AL	11.644,22 (8.651)	16.086,79 (5.331)
COF	11.628,63 (9.243)	16.040 (4.317)

Med: mediana; IQ= interquartil em parênteses; Nv/mm^3: unidade de densidade neuronal. AM: antero-medial; MO: medio-orbitofrontal; AL: antero-lateral; COF: córtex orbitofrontal

Ao observar as médias da densidade neuronal dos sujeitos com TAB e comparar com as médias observadas dos controles, há uma diferença de aproximadamente 28% menor que as médias dos controles. Desta forma, estes dados mostram uma tendência à diferença de densidade neuronal entre os grupos.

Ao analisar as médias das densidades neuronais entre TOC e controles obtivemos uma diferença de densidade neuronal significante O número de amostras do grupo TOC

permitiu aplicar o teste não paramétrico Mann-Whitney entre sujeitos e controles. O resultado foi significante em AM, MO e COF, mas não para AL (Tabela 11).

Tabela 11- Densidade neuronal (Nv/mm^3) do COF e sub-regiões nos sujeitos com TOC e controles

Região	***TOC (N=7)*** *Med (IQ)*	***Controles (N=7)*** *Med (IQ)*	***p***
AM	16.547 (3.268)	22.259 (6.307)	0,038
MO	17.342 (1.589)	22.827 (5.917)	0,038
AL	17.376 (2.607)	22.900 (5.941)	0,053
COF	17.088 (2.382)	22.662 (5.909)	0,017

Mediana (Med) e interquartil (IQ). Teste não paramétrico Mann-Whitney U-test com $p<0,05$. Med: mediana; IQ= interquartil em parênteses; Nv/mm^3: unidade de densidade neuronal. AM: antero-medial; MO: medio-orbitofrontal; AL: antero-lateral; COF: córtex orbitofrontal

Para observar a diferença entre TAB e TOC, analisamos as diferenças de médias da densidade neuronal do COF observadas entre os mesmos, e obtivemos que a densidade neuronal dos casos de TAB são em média 15% menores do que os casos de TOC, mas não há significância estatística (Figura 31).

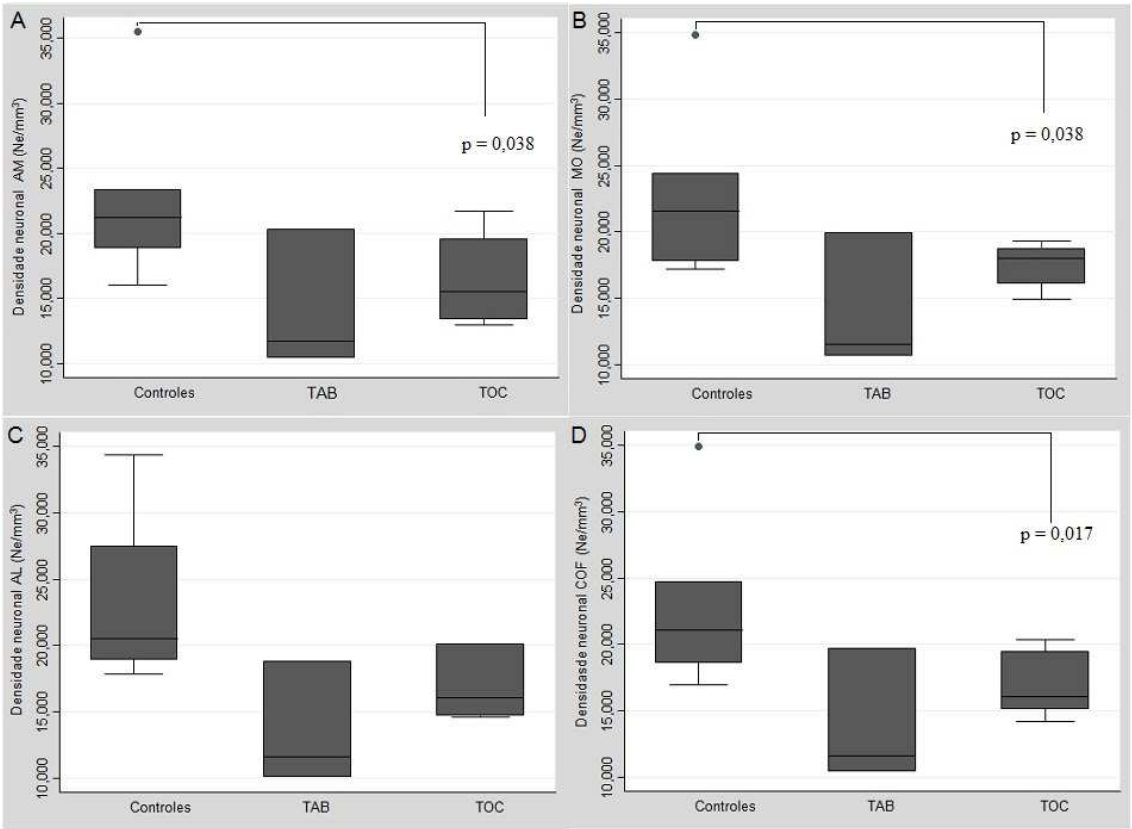


Figura 31 - Representação gráfica das medianas das densidades neuronais (Nv) nas sub-regiões e no COF em sujeitos com TAB, TOC e controles ($p<0,05$). A) Nv de AM (antero-medial); B) Nv de MO (médio-orbitofrontal); C) Nv de AL (antero-lateral); D) Nv de COF (córtex orbitofrontal). Nv/mm^3: número de neurônios por volume em mm^3

Para os sujeitos com TAB, o volume máximo foi de 1.379 mm^3 e o mínimo de 1.145 mm^3. Por sua vez, no grupo dos sujeitos com TOC, o volume máximo de COF foi de 1.668 mm^3 e o mínimo foi de 992 mm^3. Médias dos volumes de cada sub-região e do COF estão na tabela 12:

Tabela 12- Volume (mm^3) das sub-regiões e de COF nos subgrupos

Região	***TAB (N= 3)***	***TOC (N= 7)***
AM	347 ± 39	391 ± 86
MO	459 ± 98	536 ± 119
AL	425 ± 33	429 ± 118
COF	1.232 ± 28	1.357±221

Méias e desvio-padãro. AM: antero-medial; MO: médio-orbitofrontal; AL: antero-lateral; COF: córtex orbitofronta. N = número de casos

Ao comparar o grupo TOC *versus* grupo controle não houve diferença estatística (p>0,5) (Tabela 13).

Tabela 13- Volume (mm^3) das sub-regiões e do COF de sujeitos com TOC e controles

Região	***TOC (N= 7)***	***Controle (N=7)***	***p***
AM	391 ± 86	364 ± 139	0,8
MO	536 ± 119	595 ± 150	0,7
AL	429 ± 118	489 ± 133	0,5
COF	1.357 ±221	1.449 ± 357	0,5

Médias e desviopadrão. Teste não paramétrico Mann-Whitney U-test com p<0,05. AM: antero-medial; MO: médio-orbitofrontal; AL: antero-lateral; COF: córtex orbitofronta. N = número de casos

Quanto às médias dos volumes, não foi observado diferença entre os grupos de TAB, TOC e controle (Figura 32)

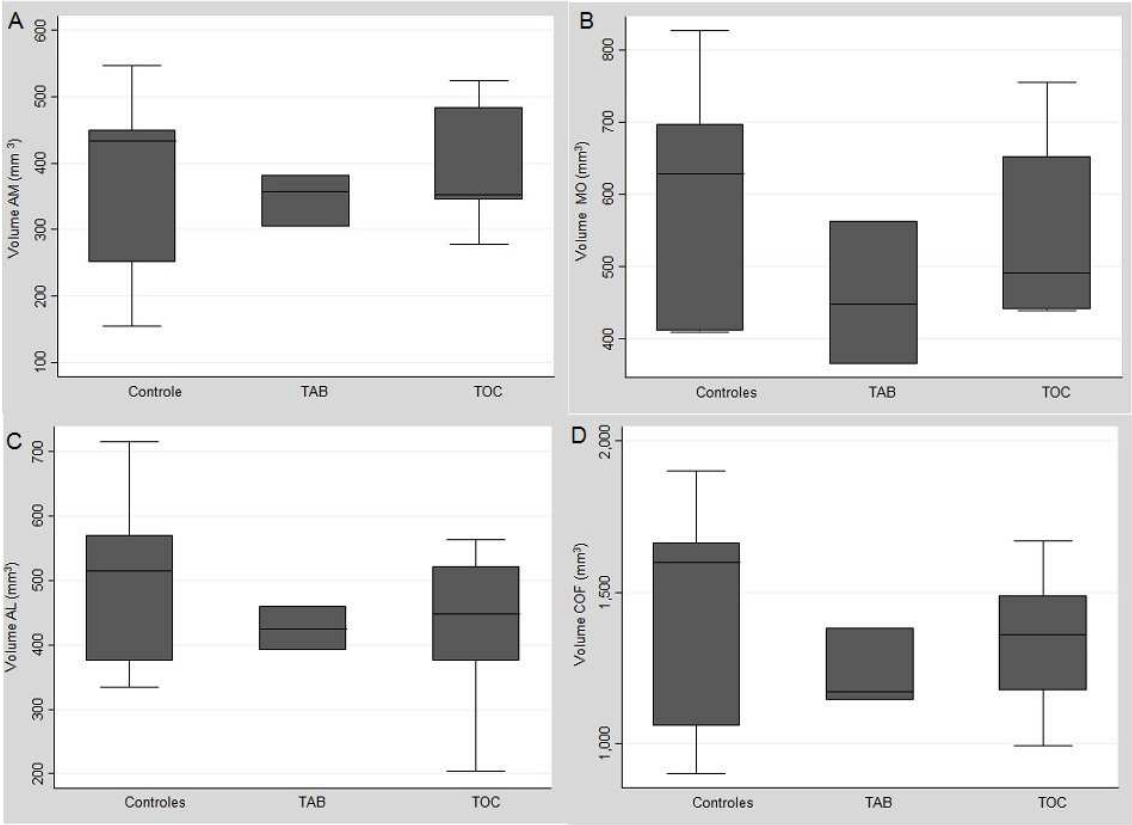


Figura 32 - Representação gráfica das medianas dos volumes (V) das sub-regiões e COF nos sujeitos com TAB, TOC e controles p<0,05. A) V de AM (antero-medial); B) V de MO (médio-orbitofrontal); C) V de AL (antero-lateral); D) V de COF (córtex orbitofrontal)

Em relação ao número total de neurônios, o grupo dos sujeitos com TAB apresentou o número máximo de 23.093.732 e o mínimo de 13.323.621 neurônios, enquanto o grupo de TOC apresentou o número máximo de 33.986.156 e o mínimo de 15.561.951 neurônios. A tabela 14 mostra as médias e os desvios padrão nos grupos TAB e TOC.

Tabela 14- Número total de neurônios nos subgrupos

Região	***TAB (N= 3)***	***TOC (N= 7)***
AM	5.020.511 ± 2.356.486	6.495.670 ± 1.893.346
MO	6.167.152 ± 1.083.707	9.420.581 ± 2.811.521
AL	5.751.183 ± 1.948.125	7.603.189 ± 2.843.279
COF	16.949.945 ± 5.349.484	23.505.40 ± 5.077.422
COF 2	16.938.847 ± 5.325.910	23.519.442 ± 5.089.730

Média e desvio padrão do número total de neurônios. AM: antero-medial; MO: médio-orbitofrontal; AL: antero-lateral; COF: córtex orbitofrontal; COF 2: análise alternativa do número total de neurônios em COF. N = número de casos

Um teste paramétrico foi aplicado para comparar número total de neurônios do grupo TOC *versus* controle, no entanto, não houve diferença estatística (Tabela 15).

Tabela 15- Número total de neurônios no grupo TOC e no grupo controle

Região	***TOC (N=7)***	***Controles (N=7)***	***p***
AM	6.495.670 ± 1.893.346	7.720.152 ± 2.487.461	0,3
MO	9.420 581 ± 2.811.521	13.424.366 ± 4.059.972	0,09
AL	7.603.189 ± 2.843.279	11.459.416 ± 4.939.202	0,1
COF	23.505.040 ± 6.545.530	32.647.960 ± 10.693.828	0,1
COF 2	23.519.442 ± 6.400.925	32.603.934 ± 10.700.223	0,1

Média e desvio padrão do número total de neurônios. Teste não paramétrico Mann-Whitney U-test com $p<0,05$. AM: antero-medial; MO: médio-orbitofrontal; AL: antero-lateral; COF: córtex orbitofrontal; COF 2: análise alternativa do número total de neurônios em COF. N = número de casos

Embora as diferenças não tenham sido encontradas, o gráfico mostra que há uma tendência á diferenciação das médias entre os grupos TAB, TOC e controles (Figura 33).

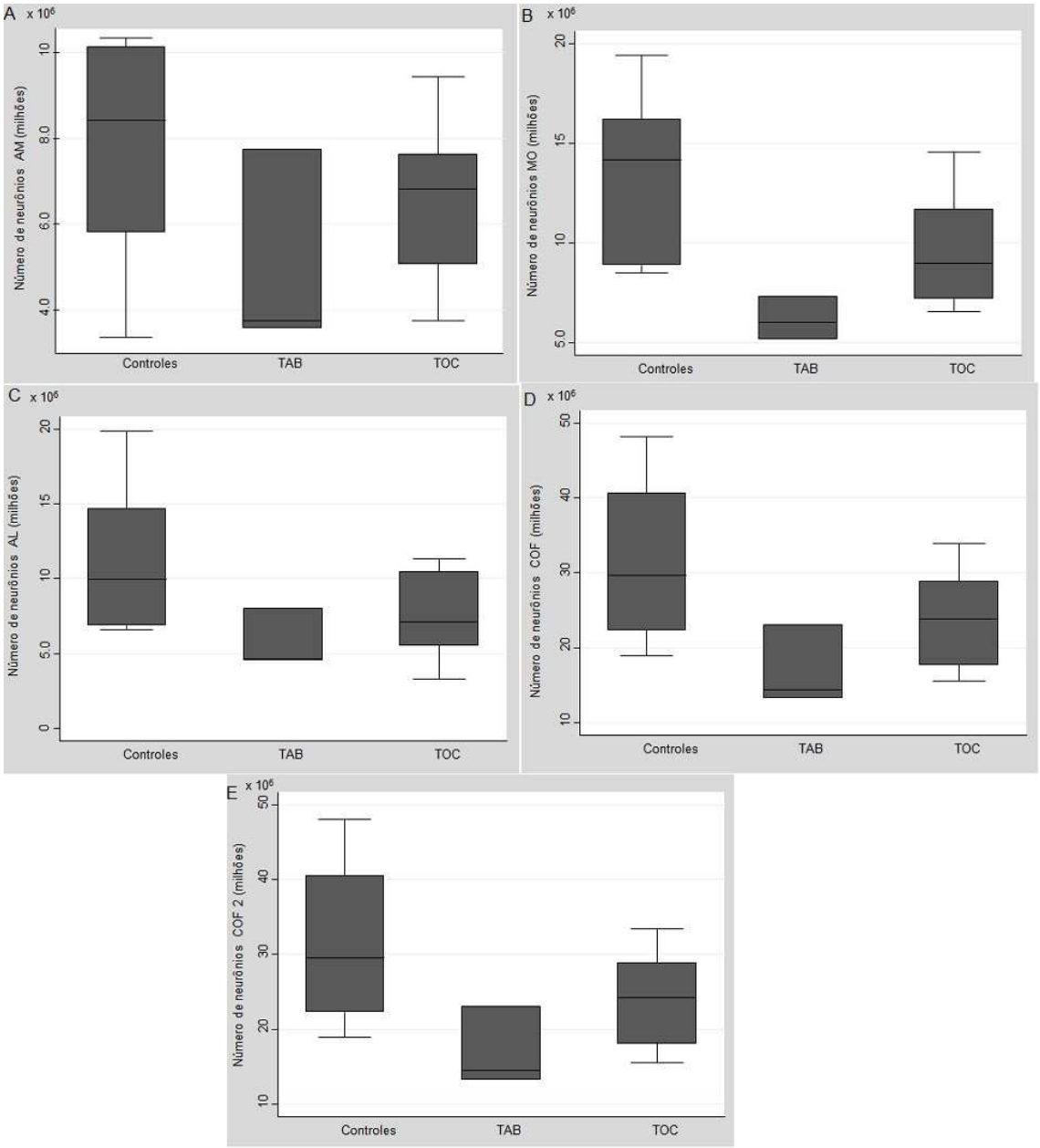


Figura 33- Representação gráfica das medianas do número total de neurônios (Ne) das sub-regiões e do COF nos sujeitos com TAB e TOC e controles. A) Ne de AM (antero-medial); B) Ne de MO (médio-orbitofrontal); C) Ne de AL (antero-lateral); D) Ne de COF (córtex orbitofrontal); E) Ne de COF 2 (análise alternativa do número total de neurônios em COF)

Para a análise de volume total e número total de neurônios o coeficiente de erro (CE) foi calculado, e analisamos as médias para cada grupo, obtendo os valores de: 0,06 nos controles, 0,05 no grupo TAB e 0,04 no grupo TOC. Também foi sido calculado o CE para cada uma das sub-regiões AM, MO e AL nos 17 casos, obtendo os valores de: 0,04 para AM, 0,04 para MO e 0,06 para AL.

5.6 Homogeneidade das sub-regiões

Aplicando o teste estatístico (teste t de- Student), verificamos que não há diferença na estimativa de densidade neuronal entre as sub-regiões avaliadas. As análises foram realizadas com os 10 sujeitos psiquiátricos e os 7 controles, sendo realizada a comparação em duas etapas: entre AM e MO, e MO e AL conforme mostra a figura 34:

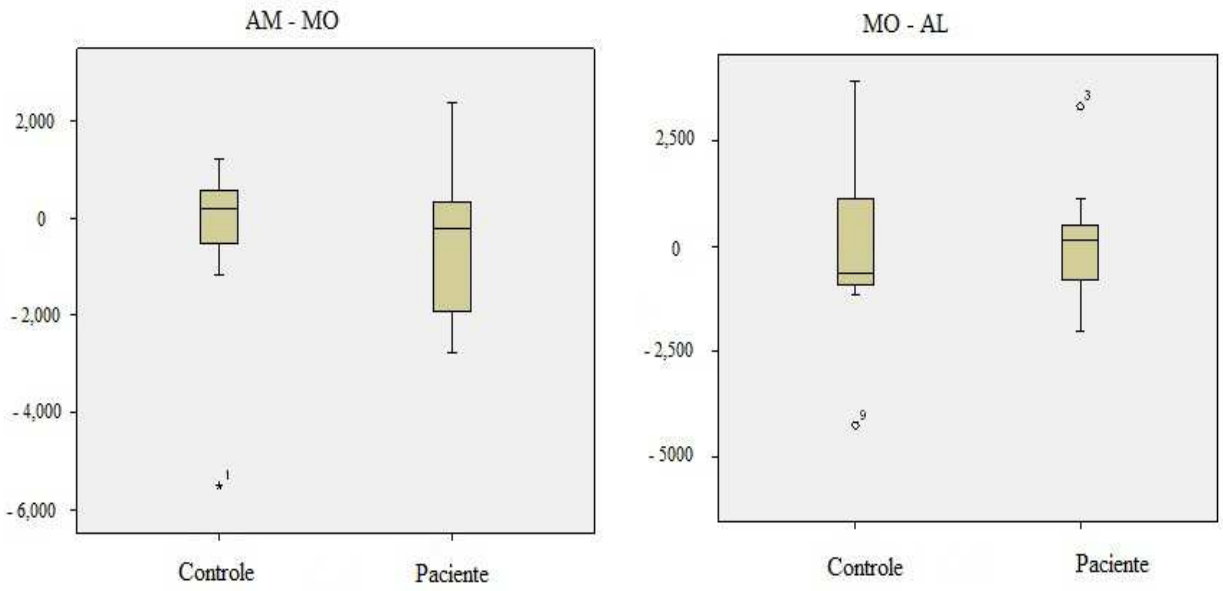


Figura 34 - Representação gráfica da comparação da diferença entre as densidades neuronais das sub-regiões AM, MO e AL no grupo de sujeitos psiquiátricos e no grupo controle. AM: antero-medial; MO: médio-orbitofrontal; AL: antero-lateral.

É possível observar que os desvios-padrão são equivalentes entre as sub-regiões tanto nos sujeitos quanto nos controles. O teste de médias de AM e MO apresenta t =-1,2, g.l.= 16, p=0,2, e de MO e AL t= 0,09, g.l.= 16, p=0,9. O intervalo de confiança foi de 95% sendo: para AM-MO: -1496;412, e MO-AL: -940;1028. Desta forma, rejeitamos a hipótese de que a densidade neuronal das sub-regiões de um mesmo grupo sejam diferentes.

5.7. Densidade neuronal nas camadas corticais

A análise das camadas corticais aplicada á técnica descrita anteriormente confirmam as análises de densidades neuronais em sujeitos psiquiátricos e controles (Figura 35)

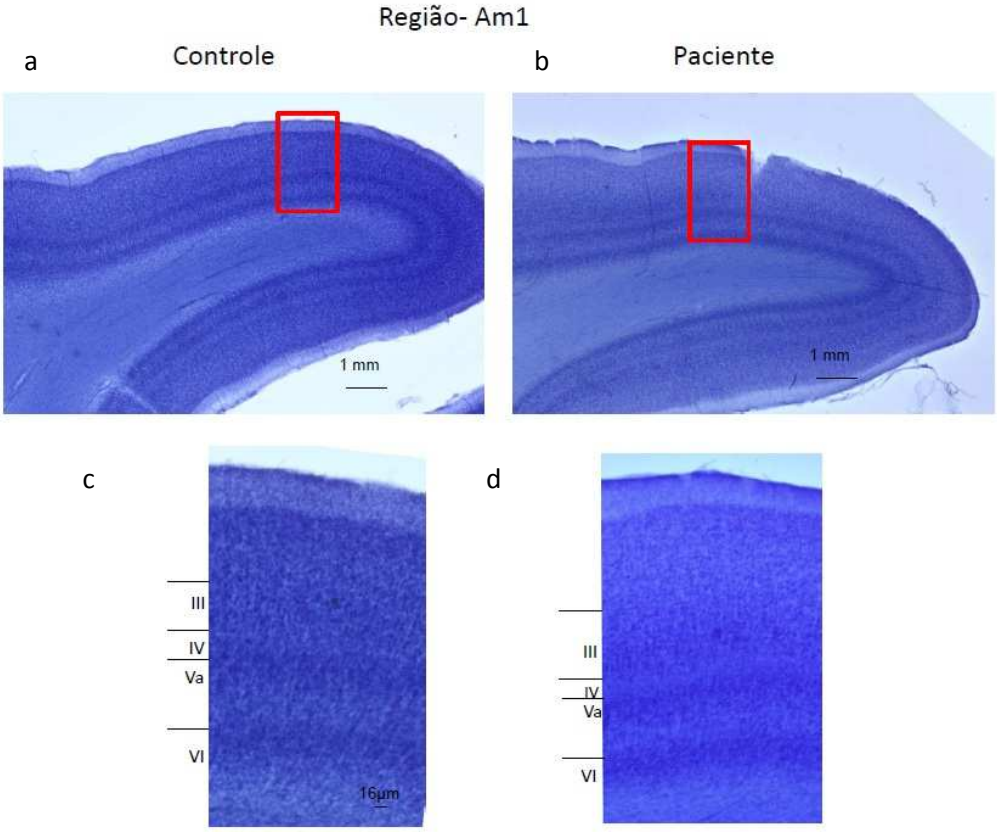


Figura 35 -. Comparação da citoarquitetura das camadas corticais. Caso e controle pareados no presente estudo. A figura mostra a diferença de densidade celular entre sujeitos e controles. As figuras a e b indicam a região analisada, em baixo poder de magnificação óptica (escala de 1mm). As figuras c e d mostram as camadas corticais das regiões indicadas com um poder de magnificação maior (escala de 16µm).

Analisando macroscopicamente, verificamos que: os casos controle apresentam camadas corticais bem coradas quando comparados com os casos psiquiátricos que apresentam palidez das camadas corticais. É possível verificar que a IIIb dos casos psiquiátricos é visivelmente pálida e a lâmina IIIc apresenta um considerável

espessamento. Além disso, nos casos psiquiátricos é possível observar células piramidais grandes nesta lâmina cortical IIIc. Ao analisar microscopicamente no controle, essas células estão presentes, no entanto, estão cobertas por neurônios menores.

Em geral, as lâminas Va e VIa tornam-se estreitas nos casos psiquiátricos. A lâmina Va do controle apresenta, em sua camada superior, células menores e na sua camada inferior; células grandes. Em contrapartida, a lâmina Va do sujeito psiquiátrico é diminuída assim como suas células em número e tamanho. Outra análise importante é que o controle possui estrias verticais em sua formação que podem ser visualizadas nas camadas corticais. No sujeito psiquiátrico são mais visíveis estrias horizontais. Isto ocorre devido ás células que sustentam as fibras serem menores e em menor número. Desta forma, a análise microscópica confirma que ocorre a perda de células neuronais nos casos psiquiátricos fazendo com que o rearranjo em colunas verificado nos controles seja perdido. Esse conjunto de análises confirma a perda de densidade celular, quando comparados casos psiquiátricos e controles.

Analisamos a densidade neuronal em cada camada cortical e foi encontrado a diferença entre sujeitos psiquiátricos e controles com significância estatística importantes em algumas camadas (Tabela 16).

Tabela 16 - Análise da densidade neuronal nas das camadas corticais: comparação entre casos psiquiátricos e controles

Camadas		*Densidade neuronal nas camadas corticais*		
		Sujeito (N= 10)	**Controle (N=7)**	**p**
AM				
	IIIa	52.076 ± 12.972	72.470 ± 17.955	0,025
	IIIb	39.169 ± 10.467	62.209 ± 19.470	0,001
	IIIc	43.322 ± 8.599	61.888 ± 14.909	0,003
	IV	60.942 ± 18.862	84.846 ± 23.674	**0,055**
	Va	55.218 ± 12.143	74.875 ± 20.115	0,014
	Vb	45.230 ± 11995	60.125 ± 19.567	0,10
	VIa	48.933 ± 7.797	63.652 ± 14.600	0,007
	VIb	37.373 ± 11.925	54.834 ± 22.600	0,025
MO				
	IIIa	53.647 ±20.304	74.394 ± 20.344	0,07
	IIIb	42.760 ± 9.628	63.011 ± 15.105	0,003
	IIIc	45.342 ± 9.628	63.011 ± 17.075	0,010
	IV	64.085 ± 19.406	80.968 ± 22.300	**0,08**
	Va	58.585 ± 15.468	77.120 ± 24.164	0,193
	Vb	47 586 ± 8 872	67 821 ± 16 390	0,001
	VIa	48.597 ± 9.103	68.943 ± 17.732	0,002
	VIb	39.618 ± 10.515	56.758 ± 17.637	0,01
AL				
	IIIa	56.116 ± 18.847	73.753 ±17.930	0,01
	IIIb	41.414 ± 12.299	63.331 ± 18.083	0,01
	IIIc	42.648 ± 10.367	62.369 ± 14.873	0,003
	IV	65.656 ± 18.496	74.875 ± 20.883	**0,36**
	Va	52.300 ± 15.390	82.411 ± 27.067	0.01
	Vb	47.025 ± 9.032	67.179 ± 22.830	0,01
	VIa	49.382 ± 8.432	70.065 ± 14.194	0,001
	VIb	36.475± 11.050	57.880 ± 19.556	0,002

Teste não paramétrico Mann-Withney U-test com $p<0,05$. Média e desvio padrão da densidade neuronal. AM: antero-medial; MO: médio-orbitofrontal; AL: antero-lateral

Em geral, as camadas corticais IIIb, IIIc VIa e VIb apresentaram-se mais alteradas quanto à densidade neuronal estimada, nas diferentes sub-regiões quando se comparou sujeitos com controles. Enquanto a camada IV não apresentou diferença em nenhuma sub-região do COF.

6. DISCUSSÃO

6. Discussão

6.1. Os métodos aplicados

Estudos clinicopatológicos bem conduzidos estão contribuindo para o entendimento da patogênese das doenças e os bancos de encéfalos, por sua vez, tem se empenhado em criar uma estrutura que possibilite a obtenção de materiais de alta qualidade com um histórico clínico confiável.

Este trabalho é um estudo pioneiro, pois trata de uma coleção de encéfalos provenientes de uma população brasileira heterogênea e ainda não avaliada quanto aos aspectos neuropatológicos das doenças psiquiátricas.

Esta não é a primeira coleção de amostras de TAB, mas é o primeiro estudo realizado com TAB usando o método que é apresentado neste trabalho e o primeiro estudo, até o momento, com tecido *postmortem* em TOC ou SOC.

Isso pode ser justificado por haver diversos fatores que tem limitado a criação desses bancos especializados em transtornos psiquiátricos dentre eles um dos mais importantes é o baixo número de autópsias ao redor do mundo. A literatura sobre estudos de alterações celulares em sujeitos com TAB é quase que inteiramente baseada nas mesmas coleções com poucas amostras (Benes *et al.*, 2001; Cotter *et al.*, 2002; Uylings *et al.*, 2005). Isso limita a representatividade, reprodutibilidade e generalização dos achados. Portanto, obervamos que existia uma necessidade muito grande em colecionar novos casos de TAB para estudos *postmortem*, e era preciso diversificar as amostras atualmente existentes.

Nossa amostra possui características dificilmente encontradas em outras coleções como: sujeitos com idade avançada que faleceram por outras causas naturais; casos menos graves e alguns não tratados. As amostras com essas características podem complementar outras coleções. Na maioria dos casos, os demais bancos de encéfalos apresentam amostras de sujeitos portadores de TAB, que cometeram suicídio, portanto,

suspeita-se que estavam em um estágio avançado do transtorno. Geralmente, são compostos por indivíduos de idade mais jovem ou ainda que foram polimedicados para o tratamento psiquiátrico.

Aplicamos um protocolo que pudesse minimizar os vieses dentro das nossas condições tanto na avaliação clínica, quanto nos procedimentos anatomopatológicos. Na avaliação clínica, o maior cuidado foi no emprego de uma entrevista diagnóstica complexa e na aplicacão de um consenso diagnóstico estabelecido por três especialistas (De Oliveira *et al.*, 2012). Foi assegurado de que o modelo de entrevista retrospectiva com familiares possibilitava realizar diagnósticos de transtornos mentais com alta confiabilidade (Torrey *et al.*, 2000; Bielau *et al.*, 2005).

As escalas e instrumentos aplicados são amplamente aceitos e validados para avaliação com o informante. Um estudo do nosso grupo verificou a sensibilidade e especificidade das escalas e instrumentos utilizados na triagem para o diagnóstico *postmortem*, aplicando os mesmos questionários à familiares de pacientes vivos e constatou que a entrevista aplicada na triagem tem 86,65% de sensibilidade e 84,4% de especificidade para o diagnóstico de demência e 65,3% de sensibilidade e 93,7% de especificidade para o diagnóstico de cognição normal (Ferretti *et al.*, 2010).

Dentre os critérios de exclusão, um dos mais importantes era o diagnóstico clínico negativo para demência. Portanto, a escala de escore clínico de demência (CDR), foi muito importante, mesmo porque tem sido considerada padrão-ouro para a realização da avaliação global de pacientes portadores de demência tipo Alzheimer. Contudo, também é indicada para avaliação de demais demências, por avaliar seis domínios importantes: memória, orientação, julgamento e resolução de problemas: assuntos comunitários, domésticos, hobbies e autocuidado. Desta forma, a escala abrange tanto funcionalidade quanto os aspectos cognitivos.

A coleção de casos psiquiátricos bem estruturada nos garante a qualidade do nosso estudo. Desta forma, consideramos os pontos fortes da nossa coleção para permitir o mínimo viés em análise estereológica: um adequado pH, verificado através do líquor, e o curto intervalo *postmortem* que é uma das mais importantes restrições para validação dos estudos neuroestereológicos (Waldvogel *et al.*, 2006). Diferentemente de outros estudos que fizeram uso de material emblocado em parafina (Rajkowska *et al.*, 1999;

Cotter *et al.*, 2005) o presente estudo fez uso de celoidina que permite uma melhor preservação do tecido, evitando a deformação do mesmo e permitindo a secção do hemisfério cerebral em fatias espessas, a qual tem a vantagem de causar menos distorção que outros métodos tradicionais.

Além disso, o presente estudo utilizou a reconstrução 3D de cada encéfalo com o objetivo de selecionar a melhor fatia para a análise de densidade neuronal, compreendendo as 3 sub-regiões alvo do COF e também para uma checagem arquitetônica da delimitação das regiões como um todo.

Em nosso estudo citoarquitetônico, quanto ao delineamento do COF, não conseguimos repetir, em nossas amostras coradas em galocianina (Nissl), nos 17 casos, o delineamento descrito num artigo publicado recentemente por Uylings *et al*. (2010). Nesse artigo o COF possui mais subdivisões de maneira que AM é identificado como 11 e $47m^1$, MO é chamado de $47m^2$ ou $47m^3$ e o AL de $47l^1$ e $47l^2$. No entanto, as bordas observadas em nossas 17 amostras se aproximam do modelo apresentado por Hof *et al* em 1995. Estudos com um maior número de casos, e até mesmo com associação de estudos de imagem, devem ser realizados para melhorar esses achados.

Sabe-se que as investigações neuroestereológicas são padrão-ouro para as análises morfológicas de área, volume, número de células, densidade e volume nuclear em áreas de interesse em transtornos neuropsiquiátricos. Com a técnica de *desgin-based* acredita-se ter um erro sistemático mínimo (Schmitz & Hof, 2005).

Os estudos de refinamento de citoarquitetura podem auxiliar no entendimento dos achados nos estudos por RNM, que apesar do aprimoramento contínuo desta técnica, alguns desses achados ainda apresentam uma identificação duvidosa de alterações patológicas representadas, por exemplo, por inclusões proteicas ou fosforilação de proteínas.

Dessa forma, os estudos *postmortem* juntamente com aqueles realizados através da análise por imagem estrutural e funcional apresentam grande potencial de revelar alterações morfológicas e metabólicas nesses transtornos no COF. A junção das alterações de neuroimagem com os de nível microscópico nos aproximam da translação da pesquisa e aplicação.

6.2 Número de neurônios e densidade neuronal

Na análise do número total de neurônios, observamos que há uma diferença significativa no COF inteiro e principalmente no MO: há uma diferença na média amostral observada em MO, com um número de neurônios 37% menor nos sujeitos do que nos controles, enquanto no COF inteiro essa diferença é de 34%.

Essa redução do número total de neurônios na sub-região MO dos sujeitos pode ter relação com a alteração observada nesta região específica, no estudo funcional de Wang *et al.* (2012) que mensurou a atividade cerebral através da amplitude da flutuação de baixa frequência no COF de pacientes com TDM. Como resultado, detectou-se que a sub-região MO teve uma redução deste marcador nos dois hemisférios. Esse marcador possui uma importante relação com o nível de oxigenação sanguínea e consequentemente está relacionado á função neuronal.

Na literatura existem poucos trabalhos que fizeram contagem de células no encéfalo e nenhum estudo que fez contagem neuronal no COF em sujeitos com TAB ou TOC. O nosso estudo avaliou tanto o número, quanto a densidade de neurônios.

No TAB, um estudo de Ongur *et al.* (1998), avaliou o giro do cíngulo subgenual (área 24 de Brodmann), uma região subcortical, de 28 sujeitos bipolares. Nessa análise nenhuma redução de número de neurônios foi encontrada, em contrapartida, verificou-se uma redução de células gliais. Embora o estudo tenha apresentado um bom número amostral, alguns critérios de seleção dos casos não foram considerados como: o alto intervalo *postmortem* que variou de 26 a 40 horas, ausência de informação quanto ao pH do tecido. Outra observação importante é que a coleção trata-se de sujeitos bipolares mais graves, pois todos haviam cometido suicídio.

Em relação à análise da densidade neuronal, nossos resultados mostram uma considerável redução de densidade de neurônios do COF e em suas sub-regiões: AM, MO e AL, de indivíduos que foram acometidos por TOC ou TAB, quando comparados com os controles, com uma diferença na média amostral 28% menor do que a média do grupo controle, apresentando um $p<0,05$ na análise não paramétrica.

Na análise de comparação da densidade neuronal somente dos casos de TOC ou SOC com controles, as densidades de COF e das sub-regiões AM e MO foram menores nos sujeitos acometidos do que nos controles com $p<0,05$. No entanto, a densidade de AL não apresentou diferença significante.

Os resultados do nosso estudo corroboram com outros estudos *postmortem* que avaliaram densidade neuronal no TAB. O estudo de Rajkowska *et* al. (2001) avaliou o córtex pré-frontal dorsolateral, área (9) de Brodmann (BA 9) em 10 sujeitos bipolares e descreveu reduções na densidade neuronal nas camadas IIIa, IIIb e IIIc em torno de 16% a 22%. Ao diferenciar as células, verificou uma redução de células piramidais na camada IIIa e Va em torno de 17 e 30%. Entretanto, este estudo apresenta algumas características da casuística que pode influenciar nos estudos morfométricos como: amostras com um alto IPM, sendo este acima de 24 horas; e cerca de metade da casuística avaliada foram pacientes graves de TAB que cometeram suicídio. Em relação ás técnicas estereológicas aplicadas, observa-se que os critérios para delimitação citoarquitetônica da área BA 9 não foram previamente estabelecidos, devido á ausência das bordas corticais no material. Isto impediu que uma amostragem sistemática randomizada fosse feita, sendo distribuídos, aleatoriamente, cinco pontos sobre o giro frontal superior e médio. Isto impediu a estimativa de volume e número de neurônios considerando toda a região de interesse.

Anteriormente, Rajkowska *et al.* (1999) já haviam realizado estudos estereológicos em amostras cerebrais de indivíduos acometidos por TDM. Nesse estudo, esses autores avaliaram a porção rostral e a porção caudal do COF, abrangendo também o córtex pré-frontal dorsolateral em 12 sujeitos. O estudo aprofundou a análise quanto ao tipo celular e verificou redução de densidade de neurônios grandes nas camadas III e IV em torno de 20% e 60%, acompanhado do aumento de densidade de neurônios pequenos em torno de 30% a 70% na camada III na região rostral do COF. Adicionalmente, observou-se uma redução de tamanho de neurônios nas camadas II e IIIc em torno de 9%. Nenhuma alteração neuronal foi observada na porção caudal do COF. Levando-se em conta toda a região do COF, foi apresentada uma redução de 22 a 37%, na densidade de neurônios grandes. Porém, as técnicas de processamento das amostras e as técnicas estereológicas utilizadas possuem características que podem enviesar os resultados. Embora esse material cerebral tenha sido emblocado em celoidina, os blocos tinham

tamanho pequeno, conforme descrito, ou seja, eram do tamanho de 3x3 cm. Desta forma, sabemos que a delimitação citoarquitetônica das sub-regiões analisadas não foi realizada, devido á ausência de bordas. Além disso, foram contadas as células neuronais e gliais que apareceram em apenas um ponto (disetor) de cada sub-região como representativo de todo o córtex. Uma média de valores obtidos em mais pontos na mesma sub-região é aconselhável, já que a conformação do córtex não é uniforme e o coeficiente de erro não foi calculado nesta contagem.

Um estudo, realizado posteriormente por Cotter *et al.* (2002), analisou o córtex pré-frontal dorsolateral (área 9 de Brodmann) em 15 sujeitos com TAB; 15 com TDM e 15 com esquizofrenia e não encontrou alteração de densidade, mas verificou cerca de 16% de redução do tamanho dos neurônios na camada V e 18% na camada VI dos sujeitos com TAB.

Essa análise foi repetida em outros estudos que utilizaram as amostras do mesmo banco de encéfalos, que o estudo de Cotter *et al*., (2000b) e confirmaram essa redução de tamanho neuronal (Law & Harrison, 2003; Vostrikov *et al.*, 2007), no entanto, em camadas diferentes. Porém esses estudos, usaram cortes muito finos com 10 µm de espessura, que não é ideal para uma boa contagem neuronal em 3D, através do disetor óptico, que é padrão-ouro. Esta limitação pode ter ocorrido, devido ao material ter sido embebido em parafina, o que além de impedir cortes mais espessos, resulta em deformação do tecido.

Cotter *et al*. (2005) fizeram uma investigação anterior semelhante à nossa que avaliou o COF em sujeitos com TAB. Nesse estudo, foi mensurada a densidade neuronal e glial e tamanho neuronal, no entanto, não encontraram redução ou perda neuronal e sim, observaram redução de tamanho celular, apenas nas camadas corticais I, em torno de 21% e na camada V, com redução de 20%. Embora este estudo tenha abordado a sub-região AL do COF, a área contemplada foi a sua porção caudal, o que diferencia da área analisada em nossa amostra, que contemplou uma porção mais rostral para densidade neuronal e contabilizou todas as secções ímpares que compreendesse a delimitação citoarquitetônica da sub-região. Além disso, no estudo desses autores, não há relato de se ter considerado a heterogeneidade das camadas corticais em diferentes pontos do COF. Tais observações podem explicar os resultados contraditórios encontrados. Porém, esses estudos em TAB são únicos e precisam ser reproduzidos.

No nosso estudo, estimamos a densidade neuronal de cada camada cortical. Curiosamente, ao contrário de todas as outras camadas corticais, apenas a camada IV não apresentou diferença estatística ao comparar sujeitos e controles. Porém, ao contrário do nosso estudo, Sakai *et al*. (2008) deram ênfase na alteração encontrada nessa camada cortical. Esse estudo analisou o córtex pré-frontal, mais precisamente a área 9 de Brodmann, na qual se observou uma redução de densidade neuronal em torno de 28% nesta camada cortical IV em amostras cerebrais de sujeitos com TAB. Apesar das regiões cerebrais abordadas, tanto no nosso estudo, como no de Sakai *et al.* (2008), serem próximas anatomicamente, elas possuem conexões diferentes, além de terem sido submetidas à diferentes técnicas histológicas. Nesse estudo, de Sakai *et al.* não foi analisado o volume da região em mm^3, mas as áreas em mm^2 o que explicaria tais diferenças.

Contrariando todos os estudos que encontraram redução de densidade celular no COF, Khundakar et al. (2011) realizaram um estudo com 13 sujeitos com depressão maior com idade acima ou igual à 60 anos, mas não encontraram significância nos resultados, concluindo que não há alteração no COF. No entanto, a região analisada não está claramente identificada na descrição, além de terem sido submetidos á diferentes técnicas histológicas. A análise estereológica, com atenção às camadas corticais, consideraram apenas as camadas III e V. O delineamento randômico sistematizado dos pontos para contagem não levou em conta a diferenciação das camadas corticais. Desta forma, não se sabe se uma camada foi mais contemplada que a outra. Como vimos em nossos resultados, a camada IV não apresentou o mesmo comportamento das demais.

Uma revisão de estudos com uso de RNM em TOC realizada em 2009 (Radua & Mataix-Cols, 2009) indicou que Yoo *et al.* (2008) realizaram um dos poucos estudos que mostraram alteração no COF. Eles observaram que a densidade de substância cinzenta no giro frontal inferior, que seria referente à região AL do COF, apresentou redução nos pacientes de TOC.

Considerando apenas os casos de TAB, ao analisar as médias da densidade neuronal, nossos dados mostraram que há uma tendência das médias de sujeitos acometidos e controles serem diferentes, embora não tenha sido possível aplicar testes não paramétricos, devido ao baixo número de observações. Desta forma, podemos considerar a possibilidade desses achados serem refinados no futuro, se aumentarmos o

número de casos da nossa amostra ou o número de pontos analisadas (disetores) em cada região de interesse através da análise estereológica.

Os estudos citados que mostraram alterações morfológicas, inclusive, no nível celular, podem ser decorrentes de processos fisiopatológicos diversos, ainda não muito bem explicados. Porém, essa redução de densidade neuronal pode ter sido originada de morte celular nessas sub-regiões e no COF inteiro. Este fenômeno estaria de acordo com estudos que encontraram redução de tamanho neuronal, que pode ser explicado por uma fase inicial de apoptose (Gigante *et al.*, 2011a).

Suspeita-se que indivíduos expostos à depressão e estresse possuam neurônios vulneráveis que sofrem atrofia ou danos devido ao aumento do nível de glicocorticoides e, dessa forma, podem alterar as características citoarquitetônicas de regiões cerebrais específicas (Duman *et al.*, 1999; López *et al.*, 1999). Especula-se ainda, a relação do fator neurotrófico derivado do cérebro (*Brain-derived neurotrophic factor, BDNF*) com essa morte ou atrofia neuronal. Pois, acredita-se que o BDNF esteja associado ao desenvolvimento da região pré-frontal do cérebro até a vida adulta (Friedman *et al.*, 1991) e que, portanto, a falta de BDNF poderia desencandear a morte neuronal.

As análises em pacientes bipolares, com foco em regiões cerebrais específicas como o COF, sustentam cada vez mais a hipótese de que possa haver um dano celular nas áreas que envolvem o circuito córtex-frontal-límbico. (Konradi *et al.*, 2004; Kato, 2006; 2008; Rao *et al.*, 2010; Rao *et al.*, 2012).

Adicionalmente, acredita-se que processos fisiopatológicos envolvidos, no TAB, estariam ligados a diminuição dos níveis de neurotrofinas ou a um funcionamento anormal de cascatas de sinalização intracelular que controlam a plasticidade sináptica e a resiliência celular (Schloesser *et al.*, 2008), ou ainda, que um processo oxidativo possa estar envolvido causando apoptose (Ranjekar *et al.*, 2003; Andreazza *et al.*, 2008).

Por sua vez, o trabalho publicado pelo *Cross-Disorder Group of the Psychiatric Genomics Consortium* (2013) de meta-análise quanto à associação genômica, no qual correlacionou cinco transtornos psiquiátricos diferentes, incluindo o TAB, e 14 polimorfismos de nucleotídeo simples (*Single Nucleotide Polymosphism, SNP*) mais relevantes, concluiu não haver especificidade entre os transtornos e polimorfismos. Da mesma forma, Rao *et al.* (2012), ao dosarem proteínas de tecido cerebral do lobo frontal

em sujeitos com TAB e esquizofrênicos, observaram um aumento significante de proteínas e níveis de RNA mensageiro em ambos os transtornos, indicando também, a falta de especificidade entre os parâmetros estudados e os transtornos psiquiátricos.

Tais evidências justificariam os nossos achados de redução de densidade neuronal nos sujeitos psiquiátricos agrupados *versus* os controles, podendo ser um substrato morfológico comum para TAB e TOC, ou ainda, que o processo fisiopatológico dessas doenças, poderia ser, até certo ponto, semelhante, embora a forma de manifestação clínica desses transtornos ser diferente.

6.3. Volume

Verificamos que os volumes do COF e das sub-regiões observados nos sujeitos acometidos e controles são semelhantes, visto que, no teste para médias não houve nenhum valor estatisticamente diferente. Desta forma, confirmamos que a densidade neuronal reduzida nos sujeitos tende a não ter influência no volume da região estudada, conforme verificado por Oorschot em 1994, ou seja, tais resultados sobre a análise de densidade neuronal, contribuem para que essa redução de densidade não seja associada a outros fatores confundidores como artefatos ocorrido durante o processamento do tecido.

Os estudos de RNM funcional tem contribuído para mostrar que o COF possui um papel importante na evolução dos aspectos cognitivos e integração com o estado emocional (Hornboll *et al.*, 2013). Nesse sentido, para discutirmos as alterações encontradas, faremos, a seguir, comparações com os estudos de imagem.

Estudos de RNM com emprego de paradigmas cognitivos de transtornos psiquiátricos, tem encontrado alteração das atividades do COF, e tais achados já foram relatados, não apenas no TAB como em transtornos de ansiedade (Jackowski *et al.*, 2012). Alguns foram realizados em pacientes de TAB, como o estudo de Nery *et al.* (2009) realizado com 28 indivíduos e que não encontrou diferença de volume do COF

inteiro ou de suas sub-regiões entre pacientes e controles, no entanto, mostrou que os volumes de substância cinzenta no COF de pacientes bipolares deprimidos são menores do que em pacientes bipolares em remissão da doença, com uma diferença de quase 15%. Esses resultados sugerem que a redução de volume no COF, pode estar associada à características clínicas específicas do TAB.

Os registros de redução volumétrica no COF também existem nos pacientes de TOC tratados e não tratados. Hoexter *et al.* (2012) realizaram um estudo com RNM em 29 pacientes de TOC, com a finalidade de mensurar o volume de substância cinzenta no COF. Como resultado importante, verificou-se que a sub-região MO apresentou um menor volume de substância cinzenta nos pacientes livres de medicamentos nos dois hemisférios e ainda constataram que essa redução desaparecia após o tratamento. Entretanto, no nosso estudo, não constatamos alteração do volume do MO. Essa discordância pode ser devido ás diferenças de idade dos pacientes, número amostral e informação relacionada ao uso de medicamentos.

No entanto um estudo anterior de Pujol *et al.* (2004) avaliou o MO do COF, estruturalmente por RNM, em uma amostra de 72 pacientes. Nesse estudo verificou-se uma redução do volume da substância cinzenta nos pacientes comparados com controles.

Registros de alterações em AL também são encontrados. Szeszko *et al.* (2008) submeteram 37 pacientes pediátricos de TOC, não medicados, ao exame de RNM. Encontraram aumento de substância cinzenta no AL do COF em crianças. A discrepância existente entre resultados obtidos através da análise estereológica e o exame de RNM no estudo do volume do COF pode ocorrer devido à variabilidade entre as duas técnicas em relação à delimitação dessa região, além da diferença de faixa etária abordada nos dois estudos. Deve-se ressaltar que a estereologia é considerada padrão-ouro para essa finalidade.

Em geral, os achados contraditórios de aumento de volume ou redução de volume, são em parte associados á hipoativação ou hiperativação das regiões cerebrais pelos estudos funcionais. Um exemplo disso é o estudo que avaliou 11 pacientes bipolares e 17 controles diante da variação de expressão facial emocional. Observou-se uma

atenuação de atividades na área 47 reconhecida como sub-região AL do COF em pacientes bipolares (Altshuler *et al.*, 2005).

6.4 Limitações do estudo

O desenho deste estudo é retrospectivo transversal, as informações clínicas são baseadas no informante, ao contrário dos estudos longitudinais que são prospectivos e baseados na avaliação direta do indivíduo. Um dos pontos limitantes relacionados à isso, é que uma análise considerando os medicamentos, não é possível, já que na maioria dos casos não há relato de diagnóstico em vida, e os que o possuem, muitas vezes o familiar não sabe informar com precisão o tipo de medicamento usado. Assim, não temos uma informação segura para estudar esse fator confundidor nas amostras de maneira mais aprofundada.

O número pequeno de casos é outra limitação importante e acreditamos que possa existir uma falha em nossa triagem. No período de desenvolvimento deste estudo um projeto piloto foi realizado e apresentado no XVIII Congresso Brasileiro de Geriatria e Gerontologia. Este estudo objetivou avaliar e melhorar a triagem dos casos para tentarmos aumentar o número amostral da coleção. Este piloto ocorreu durante cinco semanas, no período matutino, utilizando uma triagem psiquiátrica de auto-preenchimento. No entanto, nesta tentativa não tivemos muito êxito. Dos 115 familiares que preencheram a triagem, apenas 24,3% informaram que o familiar falecido tinha alguma doença mental com diagnóstico médico prévio e 1,7% não sabia responder. Destes positivos, a maioria tinha diagnóstico de uso de substâncias como álcool e drogas. Além disso, entre os casos potencialmente positivos houve alta incidência de sujeitos muito idosos com comorbidades, tais como, doença de Alzheimer, Parkinson e demais demências (Becker *et al.*, 2012).

Uma das desvantagens importantes em relação ao baixo número amostral, é o fato de não termos conseguido avaliar os sujeitos com TAB *versus* os controles, além disso, não pudemos ainda tentar verificar se há alguma diferença entre os sujeitos com TAB e

TOC. Por outro lado, são poucos os casos que conseguimos manter no banco dentro dos critérios necessários, o que explicaria o nosso baixo número de amostras. Isto porque, para a garantia de uma boa coleção precisamos considerar importantes etapas como: as avaliações clínicas, anatomopatológicas e consentimento do familiar ou cuidador, nas quais alguns casos são excluídos por não preencherem esses critérios.

As técnicas de coleta, preservação e criopreservação merecem cuidado, atualização e otimização constantes, visto que encontramos algumas limitações na etapa inicial do estudo que não nos permitiu até o presente momento analisar as regiões subcorticais devido à perda das bordas da região em algumas lâminas histológicas, que só pôde ser visto na etapa histológica de coloração. Em função disso estudamos o córtex. O método está em processo de reavaliação e inclusive, outras formas de fixação serão testadas, a fim de possibilitar no futuro, o estudo das regiões subcorticais.

Ao comparar estudos aplicando os métodos de neuroimagem e os poucos estudos estereológicos verifica-se que ambos possuem suas vantagens e desvantagens. Em geral, os estudos de neuroimagem não possuem problemas de artefatos no tecido como, por exemplo, o encolhimento, o qual é inevitável durante o processamento histológico, além de que pode ser aplicado *in vivo*, ao contrário da histologia. Porém, as técnicas de neuroimagem, não nos permitem fazer uma delimitação citoarquitetônica das camadas corticais e possui uma grande dificuldade técnica para delimitar áreas subcorticais.

Em relação á análise estereológica, o estudo apresenta algumas limitações específicas. Infelizmente, não existe um consenso sobre as definições citoarquitetônicas do COF. Para esse estudo, escolhemos as sub-regiões mais importantes, de acordo com número de conexões somatosenssórias. Porém, por falta de consenso, nossos resultados não são comparáveis com outros estudos.

As densidades neuronais foram calculadas a partir da contagem de pontos (disetores) em apenas uma fatia de cada caso, devidamente identificada contendo as três sub-regiões de interesse. Desta forma, essa técnica nos permitiu estimar a densidade para o COF e suas sub-regiões, além de estimar o número de neurônios. No entanto, parâmetros de qualidade de análise estereológica bem fundamentados foram considerados: como a randomização dos pontos em todas as camadas corticais, já citado anteriormente e a contagem de, no mínimo, 750 a 1300 células por indivíduo (Schmitz,

1998). Esse procedimento foi necessário por termos trabalhado com um sistema semi-automatizado de análise que requer tempo e muita mão-de-obra.

A princípio, planejou-se usar um sistema computadorizado, com um software específico para essas análises tanto na Universidade de Munique como no Instituto de Pesquisa do Hospital Albert Einstein. Porém, o tamanho das nossas lâminas, que contem o hemisfério cerebral inteiro, não nos permitiu o uso desses dois equipamentos, que estão adaptados á plataforma para lâminas menores. Esse sistema, possui os mesmos princípios adotados no semi-automatizado, mas reduz o tempo de análise e a mão-de-obra em cada caso, o que proporcionaria a contagem de neurônios em mais fatias.

No entanto, para os cálculos de volume todas as fatias ímpares foram contempladas e o coeficiente de erro foi calculado.

6.5. Novas estratégias e perspectivas futuras

Constatamos que a coleção de encéfalos de portadores de transtornos psiquiátricos é um processo lento e de longo prazo, especialmente se desejarmos ter um banco de encéfalos de qualidade comparável ou mesmo superior aos nossos pares internacionais.

Portanto, para formar uma coleção bem caracterizada e com um número relevante de casos analisados, todos os procedimentos de coleta, caracterização clínica e análise terão continuidade, dentro da rotina do BEHGEEC-FMUSP e considerando o potencial do SVOC-USP na captação dos casos. Esta estratégia nos permitirá, principalmente, confirmar os dados iniciais resultantes deste projeto e permitir a aplicação de outros. A média de casos bipolares coletados por ano por três dos mais importantes bancos de encéfalos com doação em vida é cerca de 3 a 4 casos por ano, o que confirma a dificuldade em se ter essas amostras (Deep-Soboslay *et al.*, 2011).

Atualmente, os pesquisadores envolvidos se reúnem constantemente para discutir novas possibilidades de triagem dos casos. E a partir disso, temos desenvolvido uma

nova estratégia de triagem de auto-preenchimento pelo familiar, com uma abordagem diferenciada e maior envolvimento dos funcionários do SVOC-USP. Nesse sentido, temos desenvolvido palestras, para orientação e motivação desses profissionais, que abordam desde o que são transtornos psiquiátricos, até a aplicabilidade e os objetivos de nossas pesquisas, afim de orientá-los e inserí-los neste contexto para podermos contar com esse apoio que é fundamental.

Além disso, temos aumentado os nossos períodos de plantão de quatro para sete períodos semanais no sentido de aumentar nossa casuística. Dessa forma, essas iniciativas são tarefas difíceis por serem dependentes de uma série de adaptações não somente na nossa rotina em pesquisa, mas por envolver outros profissionais e um sistema de serviço já bem estruturado. Assim, precisamos contar com a colaboração de técnicos de autópsia, médicos patologistas e todos os demais. Embora, temos conseguido avançar nestas dificuldades, todas as adaptações requerem tempo e acreditamos que, a longo prazo, poderemos obter um bom resultado.

Após diversas tentativas, com a colaboração de outros pesquisadores do BEHGEEC, foi conseguida a liberação do uso de celoidina na Faculdade de Medicina da USP (FMUSP) para fins científicos. Portanto, estamos na fase inicial de testes do emblocamento de celoidina em nosso laboratório. Com essa iniciativa, não haverá mais necessidade do emblocamento de encéfalos ser realizado na Alemanha. Além disso, um sistema computadorizado está em fase de implantação na FMUSP, que permitirá refinar essas análise e avaliar novos casos.

Por outro lado, o COF na doença de Alzheimer apresenta neurodegeneração nas suas porções posterior-medial (PM) agranular e, no entanto, não apresenta lesões ou apresenta poucas lesões, nas regiões que estudamos neste trabalho, anterior-medial e anterior-lateral granular. Portanto, esse fato diminui a possibilidade de fator confundidor nos casos analisados (Hof *et al.*, 1995). Além disso, todos os sujeitos analisados foram submetidos à uma avaliação clínica para excluir a possibilidade de doenças neurodegenerativas e à uma avaliação macroscópica para respeitar os critérios de inclusão. No entanto, deve-se levar em conta que pacientes sem sinais clínicos podem apresentar marcadores patológicos no tecido cerebral protegidos por uma reserva cognitiva (Farfel *et al.*, 2013). Motivados em sanar essa questão que envolve a comorbidade de alterações neurodegenerativas demos início a uma análise

anatomopatológica com testes imunoistoquímicos, ainda no período deste estudo. Portanto, uma avaliação neuropatológica refinada com intuito de avaliar marcadores de emência, em todas as amostras da coleção, será aprofundada e melhor discutida no futuro.

Finalmente, a continuidade dos protocolos estereológicos ocorrerão em novas amostras, e poderemos verificar os mesmos parâmetros em regiões subcorticais tais como amígdala e tálamo. Além disso, estratégias de refinamento das análises poderão ser feitas, dentre elas: diferenciação das células neuronais e gliais e a estimativa de densidade celular usando-se mais fatias seriadas de cada caso, o que melhoraria o desenho do presente estudo.

7. CONCLUSÃO

7. Conclusão

- As alterações no número e densidade neuronal do córtex orbitofrontal podem estar relacionadas à fisiopatologia dos transtornos obsessivo-compulsivo e bipolar agrupados.

- Foi demonstrado que as sub-regiões antero-medial, médio-orbitofrontal e antero-lateral do córtex orbitofrontal são homogêneas em relação à densidade neuronal tanto no grupo de sujeitos psiquiátricos quanto no grupo controle.

- Enquanto a densidade neuronal diminuiu nas três sub-regiões do córtex orbitofrontal, o número de neurônios só diminuiu na sub-região médio-orbitofrontal dos sujeitos psiquiátricos.

- As alterações do número e densidade neuronal dos transtornos psiquiátricos estudados não provocaram modificação do volume do córtex orbitofrontal como um todo e nem de suas sub-regiões analisadas separadamente.

- A análise da densidade neuronal nas quatro camadas corticais estudadas que integram o córtex orbitofrontal demonstrou diminuição em todas com exceção da camada IV, possivelmente, por ser uma camada que, em condições normais, já apresenta um pequeno número de neurônios.

- O possível papel das alterações do córtex orbitofrontal nos transtornos obsessivo-compulsivo e bipolar agrupados pode significar a associação desses transtornos psiquiátricos com alterações nos circuitos córtico-estriado-pálido-talâmico e límbico-talâmico-cortical.

8. ANEXOS

Anexo A - Aprovação do comitê de ética local

HOSPITAL DAS CLÍNICAS
DA FACULDADE DE MEDICINA
DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

APROVAÇÃO

O Presidente da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em 12/08/2009, **APROVOU** ***ad-referendum*** o Protocolo de Pesquisa nº **0740/09**, intitulado: "**ANÁLISE ESTEREOLÓGICA POST MORTEM DE REGIÕES CEREBRAIS DE PORTADORES DE TRANSTORNO AFETIVO BIPOLAR** " apresentado pelo Departamento de **PATOLOGIA**.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10/10/1996, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador Responsável: **PROF. DR. CARLOS AUGUSTO PASQUALUCCI**
Pesquisadora Executante: **KATIA CRISTINA DE OLIVEIRA**

CAPPesq, 12 de agosto de 2009

PROF. DR. EDUARDO MASSAD
Presidente da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP e da FMUSP Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo Rua Ovídio Pires de Campos, 225, 5º andar - CEP 05403 010 - São Paulo – SP Fone: 011 3069 6442 Fax: 011 3069 6492 e-mail: cappesq@hcnet.usp.br / secretariacappesq2@hcnet.usp.br

hf

Anexo B - Aprovação do comitê de ética nacional

HOSPITAL DAS CLÍNICAS
DA FACULDADE DE MEDICINA
DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Memo.CAPPesq – 414/10

São Paulo, 14 de outubro de 2010.

Ilmo. Sr.
Prof. Dr. Carlos Augusto Gonçalves Pasqualucci
DD Pesquisador
Departamento de Patologia

Segue anexo para conhecimento cópia do parecer nº **673/10 datado de 01.10.10** da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP/MS referente à **APROVAÇÃO** do Protocolo de Pesquisa nº **0740/09** – intitulado **"ANÁLISE ESTEREOLÓGICA POST MORTEM DE REGIÕES CEREBRAIS DE PORTADORES DE TRANSTORNO AFETIVO BIPOLAR."**

Atenciosamente,

PROF. DR. EDUARDO MASSAD
Presidente da Comissão Ética para Análise de Projetos de Pesquisa

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
Rua Ovídio Pires de Campos, 225, 5º andar - CEP 05403 010 - São Paulo - SP
Fone: 011 - 30696442 fax : 011 - 3069 6492 - e-mail : cappesq@hcnet.usp.br

SIPAR - Ministério da Saúde
Registro Número:
25880. 1750691/2010-52
08/10/2010

MINISTÉRIO DA SAÚDE
Conselho Nacional de Saúde

OFÍCIO Nº. 3071/10/CONEP/CNS/MS

Brasília-DF, 06 de outubro de 2010.

Assunto: *"Encaminhamento de Parecer"*.

PP. 0740/09

Senhor (a) Coordenador (a),

1. Encaminhamos, em anexo, o (s) Parecer (es) nº **0573/2010, referente ao Protocolo de Pesquisa Registro CONEP nº 15.682** da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP, referente(s) a (os) projeto(s) de pesquisa acompanhada(s) por esse Comitê.

Atenciosamente,

ROZÂNGELA FERNANDES CAMAPUM
SECRETÁRIA-EXECUTIVA DO
CONSELHO NACIONAL DE SAÚDE

Ao Senhor(a) Eduardo Massad
Coordenador(a) do Comitê de Ética em Pesquisas
Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP - HCFMUSP
R. Ovídio Pires de Campos, Nº 225, 5º andar
Cerqueira Cesar São Paulo SP
Cep : 05.403-010

RECEBIDO
DATA 19/10/10
Comitê de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
CAPPesq - HCFMUSP

Slds

CONSELHO NACIONAL DE SAÚDE
COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA

PARECER Nº 573/2010

Registro CONEP 15682 (Este nº deve ser citado nas correspondências referentes a este projeto)

CAAE – 0656.0.015.000-09 **Processo nº 25000.631902/2009-60**
Projeto de Pesquisa: *"Análise estereológica post mortem de regiões cerebrais de portadores de transtorno afetivo bipolar"*.
Pesquisador Responsável: Dr. Carlos Augusto Gonçalves Pasqualucci
Instituição: HCFMUSP – Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo **(CENTRO ÚNICO)**
CEP de origem: HCFMUSP
Área Temática Especial: Pesquisa com cooperação estrangeira, Biossegurança
Patrocinador: FAPESP

Sumário geral do protocolo

Inicialmente as doenças neuropsiquiátricas eram caracterizadas como psicoses funcionais com possíveis alterações de neurotransmissores, mas sem base neuropatológica consistente. No final da década de 1970, com a disponibilidade da tomografia computadorizada, foi possível observar o alargamento dos ventrículos cerebrais em pacientes com esquizofrenia e desde então, não somente os estudos por diagnóstico por imagem, mas os estudos *post mortem* evidenciaram que essas doenças têm base neuropatológica.

O transtorno afetivo bipolar (TAB) tipo I é um distúrbio psiquiátrico grave e devastador, cuja prevalência ao longo da vida na população geral é de aproximadamente 1,6%. A grande freqüência de hospitalização e tentativas de suicídio, prejuízo ocupacional, desestabilização familiar e pessoal, fazem com que o TAB seja considerado um dos problemas de saúde pública que geram maior incapacitação em todo o mundo. Alguns estudos apontam a prevalência de TAB tipo I, TAB tipo II e TAB subclínico em torno de 4 a 5% da população. A despeito da alta prevalência e do custo social e econômico do TAB, a etiologia e a fisiopatologia desse transtorno são em grande parte desconhecidos. O curso clínico do TAB é caracterizado pela ocorrência cíclica de episódios de depressão maior e de mania. A presença de sintomas psicóticos, comorbidade com abuso de álcool e drogas, transtornos de ansiedade, déficits cognitivos, e níveis maiores de impulsividade são fatores adicionais de aumento de morbidade nos portadores de TAB.

Estudos baseados em técnicas de imagem e em análise anatomopatológica têm demonstrado perda celular ou redução de densidade celular em várias regiões importantes do encéfalo em pacientes com bipolaridade. Esses estudos concentraram-se, principalmente, em regiões cerebrais constituintes de dois circuitos inter-relacionados: o circuito límbico-talâmico-cortical e o circuito límbico-estriado-globo pálido-talâmico. Desta forma, conjectura-se que distúrbios das áreas supostamente regulatórias do humor são responsáveis pelas manifestações sintomáticas do TAB.

Estudos baseados em ressonância nuclear magnética (RNM) estrutural registraram redução de densidade da substância cinzenta no giro do cíngulo anterior, e redução de volume. No entanto, outros estudos de imagem não reproduziram esses achados. Ainda, três estudos relataram redução de volume do córtex pré-frontal subgenual em pacientes bipolares com forma familiar da doença.

paramétricos (Mann-Whitney, por exemplo) serão aplicados. Dependendo da distribuição dos dados serão ajustados modelos lineares generalizados para identificar variáveis entre paciente, gênero, hemisfério, intervalo post mortem, peso e volume encefálico que possam influenciar no diagnóstico. Testes-F serão utilizados para comparar as variâncias de todas as variáveis investigadas entre controles e pacientes. Caso não haja diferença de variância, testes estatísticos paramétricos multivariados, utilizando modelo linear generalizado serão utilizados.

Local de realização

Trata-se de um projeto nacional e unicêntrico, com cooperação estrangeira. Alem do Brasil, participará também a Alemanha.

Ao todo, no mundo, 40 sujeitos de pesquisa participarão do estudo, todos no centro em tela. Os encéfalos serão coletados no Serviço de Verificação de Óbitos da Capital da Universidade de São Paulo (SVOC-USP). O processamento histológico dos encéfalos em celoidina será realizado no laboratório da Unidade de pesquisa em morfologia cerebral do Departamento de Psiquiatria da Universidade de Würzburg, sob responsabilidade do Prof. Dr. Helmut Heinsen. Coleta, processamento inicial, técnicas imunoistoquímicas, exame neuropatológico e análise estereológica serão feitos no Laboratório de Fisiopatologia do Envelhecimento, sede do Banco de Encéfalos Humanos do Grupo de Estudos em Envelhecimento Cerebral da Universidade de São Paulo (BEHGEEC), cuja pesquisadora responsável é a Profª. Dra. Lea Tenenholz Grinberg. A análise clínica será feita pelo Departamento de Psiquiatria da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (USP), e os pesquisador responsável é o Profº. Dr. Beny Lafer.

O Banco de Encéfalos Humanos do Grupo de Estudos em Envelhecimento Cerebral (BEHGEEC) foi criado em 2004 pelos Departamentos de Patologia, Neurologia e Disciplina de Geriatria da Faculdade de Medicina da USP. A criação do BEHGEEC teve como objetivo coletar material de grande qualidade para pesquisas multidisciplinares sobre o envelhecimento cerebral e doenças neurodegenerativas. Desta forma, o banco disponibiliza este material aos grupos de pesquisa que apresentam interesse e competência para interação científica. É moldado em parâmetros de qualidade internacional, havendo um constante cuidado com questões éticas e metodológicas. O banco de encéfalos conta com o suporte do SVOC-USP, localizado no prédio da Faculdade de Medicina da USP, o qual realiza em média 13.000 autópsias por ano.

Apresentação do protocolo

A Folha de Rosto se encontra preenchida e assinada.

O orçamento financeiro do estudo (páginas 45, numeração do CEP) informa que o valor total do estudo é de R$ 115.930,80 e que os recursos foram obtidos pelo Auxílio à Pesquisa FAPESP cedida integralmente em Setembro/2009, sob o protocolo: 09/51482-0.

O currículo do pesquisador responsável demonstra que o mesmo se encontra qualificado para condução do estudo em tela.

O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) foi apresentado nas páginas 30-32 (numeração do CEP).

Considerações sobre a análise das respostas ao Parecer CONEP Nº 17/2010, relativo ao projeto de pesquisa em questão:

1. O cronograma do estudo (página 20, numeração do CEP) não informa qual é a data prevista para início do estudo, informa apenas quais serão os procedimentos previstos para os 06 quadrimestres de duração do estudo. Solicita-se que novo cronograma seja apresentado em que conste a previsão de data de início do estudo no Brasil após a aprovação do Sistema CEP/CONEP.

Resposta: O pesquisador informou o mês de início do projeto e o cronograma.
Análise: Pendência **atendida**.

2. Na página 15 (numeração do CEP) é informado que "Na hipótese de a equipe de enfermagem selecionar algum caso em condições de ser incluído no estudo, um psiquiatra será chamado para realizar uma entrevista complementar, ainda durante o aguardo da liberação do cadáver pelo Serviço de Verificação de Óbitos. Se o informante não esteja disposto a fornecer a entrevista complementar naquela ocasião, a mesma poderá ser remarcada para um segundo momento. Essa segunda entrevista será realizada no Instituto de Psiquiatria do HCFMUSP e será oferecida uma ajuda de custo de R$50,00 (cinquenta reais) para o informante. Informações complementares também poderão ser coletadas por telefone ou em último caso, na residência do informante" (grifo nosso). Ressalta-se que a ajuda de custo não é eticamente aceitável, pois poderá ser considerada uma indução ao aceite em participar do estudo, ferindo sua autonomia. A Resolução CNS 196/96, item VI.3."h", determina que a importância referente a ressarcimento de gastos aos sujeitos de pesquisa "não poderá ser de tal monta que possa interferir na autonomia da decisão do indivíduo ou responsável de participar ou não da pesquisa". Assim o que se oferece ao sujeito/ ao responsável pelo sujeito deve ser sempre a título de ressarcir gastos e não incentivar a participação.

Resposta: O pesquisador apresenta um cálculo justificando o valor de 50 reais atribuindo valores baseados no salário mínimo a tempo perdido (1 dia de trabalho R$22,00), lanche + almoço (R$18,00), transporte (R$10,00).

Análise: Pendência **atendida**.

3. Na página 16 (numeração do CEP) é informado que "Após a craniotomia, o pH do líquor cefalorraquidiano (LCR) será medido; em seguida, o encéfalo será retirado com o polígono de Willis íntegro, pesado e o volume aferido pelo método de Arquimedes. Amostra de LCR será centrifugada e acondicionada em freezer -80° C para estudos posteriores. Amostras de sangue serão coletadas para extração de DNA" (grifo nosso). Os objetivos do estudo não incluem a realização de análises genéticas e o projeto de pesquisa não foi classificado na área temática especial Genética Humana. Solicita-se, portanto, esclarecimentos sobre o trecho destacado acima, assim como qual a justificativa para retirada/processamento ou armazenamento de tal material e, caso pertinente, adequação do protocolo às requisições da Resolução CNS 340/2004 que regulamenta estudos em Genética Humana.

Resposta: O pesquisador informa que o projeto de coleta de material está amparada por projeto específico de constituição de banco de encéfalos conforme Resolução 357/2005.

Análise: Pendência **atendida**.

4. Com relação ao TCLE apresentado:
   a. O TCLE precisa ser reescrito em linguagem adequada ao entendimento do sujeito de pesquisa. Entendendo-se que há um banco de encéfalos e que o responsável pelo sujeito da pesquisa doou os órgãos para pesquisa, o TCLE deve informar que o material coletado será utilizado para a realização de pesquisa específica sobre TAB. Solicita-se adequação.
   b. É necessário que a Resolução CNS 347/2005 seja seguida, perguntando se os responsáveis querem saber em termos de resultados individuais dos exames que serão realizados e o significado de cada exame. Solicita-se adequação.
   c. O TCLE na página 2/4 (página 30, numeração do CEP) se refere a Alzheimer e a Parkinson, porém não há referências a essas doenças no protocolo. Solicitam-se esclarecimento e, caso necessário, adequação.
   d. Caso seja realizada, de fato, extração e análise do material genético, é necessário que tais informações constem no TCLE e que o TCLE seja adequado às requisições da Resolução 340/2004. Solicitam-se adequações.
   e. O TCLE informa em sua página 2/4 (página 30, numeração do CEP) que "o corpo de seu parente não será mutilado". Solicita-se que o trecho supracitado seja alterado para "a aparência externa do corpo não será alterada".

Resposta: "Desta forma, iremos readequar o TCLE do banco de Encéfalos conforme as orientações. Entretanto, como o presente projeto apresenta características peculiares,

gostariamos de pedir a permissão de utilizarmos o TCLE (TCLEI) do banco de encéfalos para fazer a triagem inicial e no caso de positividade para transtorno afetivo bipolar, apresentaremos o TCLE específico do projeto aqui proposto (TCLE II) (Anexos II e III)".
Análise: Pendência **atendida**.

5. Solicita-se apresentar a regulamentação do Banco de Materiais Biológicos de onde serão utilizadas amostras, assim como autorização do CEP para sua constituição.

Resposta: "Em relação ao regulamento para o armazenamento de materiais o código de conduta do Banco de Encéfalos Humanos do Grupo de estudos em Envelhecimento cerebral da Faculdade de Medicina da USP encontra-se em anexo. O mesmo foi aprovado pelo comitê gestor do BEHGEEC-USP e publicado em revista internacional indexada e revisada por pares. Reforçamos que todo material é codificado e de-identificado".
Análise: Pendência **atendida**.

6. Com relação à Resolução CNS 347/2005, no que se refere à participação estrangeira, a resolução afirma "4. No caso de pesquisa envolvendo mais de uma instituição, deve haver acordo entre as instituições participantes, contemplando formas de operacionalização e de utilização do material armazenado. 5. No caso de armazenamento e/ou formação do banco de material biológico no Exterior, deve ser obedecida à legislação vigente para remessa de material para o Exterior e ser apresentado o regulamento para análise do CEP quanto ao atendimento dos requisitos do item II. 5.1. O pesquisador e instituição brasileiros deverão ser considerados como cotistas do banco, com direito de acesso ao mesmo para futuras pesquisas. Dessa forma, o material armazenado não poderá ser considerado como propriedade exclusiva de país ou instituição depositária". Assim solicita-se informar se haverá constituição de banco na Alemanha, e o acordo de uso do material.

Resposta: "No presente estudo não há o envolvimento de outra instituição tão pouco a formação de banco de materiais biológicos no exterior".
Análise: Pendência **atendida**.

Diante do exposto, a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP, de acordo com as atribuições definidas na Res. CNS 196/96, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto.

Situação: **Protocolo aprovado.**

Brasília, 01 de outubro de 2010.

Gyselle Saddi Tannous
Coordenadora da CONEP/CNS/MS

Anexo C - Entrevista de triagem

ENTREVISTA CLÍNICA **NPROT** **NSVO**

Data da necropsia: ____/____/____

Nome:_____**Idade:** ____ **DN:** ____/____/____
Sexo: _____ **Raça:** □B □N □P □A **Natural**: ____ **Proced:** ____ **Estado Civil:** □S □C □V □A □D **Filhos:** _____
Escolaridade: _____ anos (□ A □ <4a □ <8a □ <12a □ >15a)
Profissão: □do lar □ doméstica □outros_____
Situação: □ Ainda trabalhava □ Aposentado _____a □ Ap por invalidez _____ a □ Outro_____

Informante

□ Parentesco: _____ Freq com o pcte: □D □S □M_____ Cuidador primário: □ sim □ não
Com quem residia: _____

Causa do Óbito: _____
Como correu o óbito: □ em casa □ no hospital: _____
_____
_____
_____

HPMA:
_____
_____
_____
_____

AP: □ Nega ou desconhece qualquer antecedente patológico
□ HAS □ DM □ DAC □ ICC (TF_____) □ Arritmia □ MP □ IVP/ OAC □ IRC □ DLP
□ AVCi // h prévio? Há___ a – □ sem seqüela □ com seqüela: □cognitiva □motora _____
□ AIDS □ Sífilis □ AO/ OP □ Dist Tireóide □ Bronquite/ Asma □ DPOC_____
□ Down □ Depressão □ Esquizofrenia □ Mania □ D Parkinson
□ TTOs anteriores: Clínicos:_____Cirúrgicos: _____
□ Não fazia tratamento ou acompanhamento médico atualmente_____

□ Sd demencial diagnosticada em vida: □não □sim Há_____a Etiologia: _____
□ História compatível com Síndrome demencial: □não □sim
Início dos sintomas: □ lento □súbito □memória □comportamento □outro_____
Curso: □ lento e progressivo □ rápido □ evolução em degraus □ curso flutuante

Função anterior à morte

□ Acuidades visual e auditiva preservadas □ ↓acuidade visual □óculos □hipoacusia □prótese
□ Dentição preservada □uso de prótese dentária □ disfagia □ SNG/SNE
□ Sedentário □ Atividade física: □ caminhada □ doméstica □ outra_____._por _____anos
□ Andava: □ sem auxílio □ com auxílio: □pessoas □parede/ móveis □equipamentos auxiliares
□ Amputações _____ □ Lesões cutâneas (úlceras) _____□ Acamado
□ Independente □ Dependente □ Tomava decisões sozinho □ Não tomava decisões
□ Em que situações relacionava-se com muita gente? _____freq _____/sem ou ____/anos

FR: □ Obesidade (P____ A_____ IMC_____) □ Reposição hormonal _____
□ Tabagismo: _____anos/maço □parou □ Etilismo: □social □alcoolismo □parou

Medicações que usava: □Não usa: □não foi prescrito □controle inadequado
Medicações: _____
_____
Psicotrópicos: _____
Automedicação: _____

AF: □ IAM_____ □ HAS □ DM _____ □ Depressão: _____ □Demência: _____
□ Epilepsia ou convulsões:_____ □ Retardo mental ou autismo: _____
□ Surdez: _____ □ Cegueira: _____ □ Desequilibrio: _____
□ Tremores:_____ □ Episodios de euforia/mania:_____ □ Câncer _____
□ Tentativa de Suicidio: _____ □ Diabetes: _____ □ Derrame:_____
□ Fraqueza muscular: _____ □Parou de andar sem acidente:_____ □ Outro: _____

Nome do Pai:
Data ou Ano de Nascimento:
Data ou Idade Falecimento:
Cidade Nascimento:

Nome da Mãe:
Data ou Ano de Nascimento:
Data ou Idade Falecimento:
Cidade Nascimento:

O pai e a mãe era parentes entre si? □ Não □ Sim _____

Irmãos/Irmãs: (sexo e idade)

1.
2.
3.
4.
5.
6.

Filhos/Filhas: (sexo e idade)

1.
2.
3.
4.
5.
6.

Outras Informações relevantes:

_____
_____
_____
_____
_____
_____
_____
_____
_____
_____
_____
_____
_____
_____
_____

Informant questionnaire on cognitive decline in the elderly

(IQCODE – Versão retrospectiva)

Gostaríamos que você se lembrasse de como era seu amigo ou familiar há 10 anos atrás e compare com o estado em que ele estava há 3 meses antes de sua morte.
Comparada com há 10 anos atrás, como estava a pessoa antes de sua morte:

	Muito melhor (1)	**Um pouco melhor (2)**	**Não muito alterado (3)**	**Um pouco pior (4)**	**Muito pior (5)**
1. Reconhecer a face das pessoas amigas e da família					
2. Lembrar do nome de parentes e amigos					
3. Lembrar de coisas sobre a família e amigos (aniversários, ocupações, endereços...)					
4. Lembrar de coisas que aconteceram recentemente					
5. Lembrar de conversas que teve nos últimos dias					
6. Esquecia o que queria dizer no meio de uma conversa					
7. lembrar-se de seu próprio endereço e telefone					
8. lembrar (saber) que dia e mês era					
9. Lembrar onde as coisas são usualmente guardadas					
10. Lembrar-se de onde encontrar as coisas que foram colocadas em lugares fora do comum					
11. Adaptar-se a qualquer mudança na sua rotina diária					
12. Saber como funcionam os eletrodomésticos					
13. Aprender a usar novos eletrodomésticos/ utensílios domésticos					
14. Aprender coisas novas em geral					
15. Lembrar-se de coisas que aconteceram em sua vida quando era jovem					
16. Lembrar-se de coisas que aprendeu quando era jovem					
17. Entender o significado de palavras não comuns					
18. Entender o significado do que está escrito em jornais e revistas					
19. Acompanhar uma estória em um livro ou pela TV					
20. Escrever uma carta para um amigo ou com fins de trabalho					
21. Saber sobre eventos históricos importantes do passado					
22. Tomar decisões com problemas do dia a dia					
23. Manusear dinheiro para compras					
24. Lidar com problemas financeiros (ex: pensão, conta bancária)					
25. Lidar com outros problemas matemáticos, por exemplo: saber quanto comprar de comida, saber quanto tempo se passou entre as visitas dos familiares/ amigos.					
26. Usar sua inteligência para entender o que está acontecendo e o motivo pelo qual está acontecendo.					

Total: _____

ESCORE CLÍNICO DE DEMÊNCIA – FOLHA DE REGISTRO

Esta é uma entrevista semi-estruturada. Por favor, faça todas estas perguntas. Faça quaisquer questões adicionais que sejam necessárias para determinar o CDR do sujeito. Por favor, tome nota das informações das perguntas adicionais.

QUESTÕES SOBRE MEMÓRIA PARA O INFORMANTE

1. Ele/ela tem algum problema com sua memória ou seu pensamento (raciocínio)? ☐ SIM ☐ NÃO

   1a - Se sim, é um problema constante? (em oposição a eventual, raro) ☐ SIM ☐ NÃO

2. Ele/ela pode se lembrar de eventos recentes? ☐ Freqüentemente ☐ Às vezes ☐ Raramente

3. Ele/ela pode se lembrar de uma lista curta de itens (compras)? ☐ Freqüentemente ☐ Às vezes ☐ Raramente

4. Houve algum declínio na memória durante o último ano? ☐ SIM ☐ NÃO

5. Sua memória está comprometida a tal ponto que teria interferido em suas atividades de vida diária de alguns anos atrás? (ou atividades pré-aposentadoria) (opinião de outros informantes) ☐ SIM ☐ NÃO

6. Ele/ela se esquece completamente de um evento importante (ex. viagem, festa, casamento em família) algumas semanas depois do evento? ☐ Freqüentemente ☐ Às vezes ☐ Raramente

7. Ele/ela se esquece de detalhes pertinentes de um evento importante? ☐ Freqüentemente ☐ Às vezes ☐ Raramente

8. Ele/ela se esquece completamente de informações importantes do passado distante (ex. data de nascimento, data de casamento, local do emprego)? ☐ Freqüentemente ☐ Às vezes ☐ Raramente

9. OBS - Questão removida por não ser aplicável.

QUESTÕES SOBRE ORIENTAÇÃO PARA O INFORMANTE

Com que freqüência ele/ela sabe o exato:

1. Dia do Mês?

   ☐ Freqüentemente ☐ Às vezes ☐ Raramente ☐ Não sabe

2. Mês?

   ☐ Freqüentemente ☐ Às vezes ☐ Raramente ☐ Não sabe

3. Ano?

   ☐ Freqüentemente ☐ Às vezes ☐ Raramente ☐ Não sabe

4. Dia da semana?

   ☐ Freqüentemente ☐ Às vezes ☐ Raramente ☐ Não sabe

5. Ele/ela tem dificuldades com relações temporais (quando os eventos ocorreram em relação uns com os outros)?

   ☐ Freqüentemente ☐ Às vezes ☐ Raramente ☐ Não sabe

6. Ele/ ela pode achar seu caminho em ruas conhecidas?

☐ Freqüentemente ☐ Às vezes ☐ Raramente ☐ Não sabe

7. Com que freqüência ele/ela sabe como ir de um lugar para o outro fora de sua vizinhança?

☐ Freqüentemente ☐ Às vezes ☐ Raramente ☐ Não sabe

8. Com que freqüência ele/ela pode encontrar seu caminho dentro de casa?

☐ Freqüentemente ☐ Às vezes ☐ Raramente ☐ Não sabe

QUESTÕES SOBRE JULGAMENTO E RESOLUÇÃO DE PROBLEMAS PARA O INFORMANTE

1. Em geral, se você tivesse que avaliar as habilidades dele/dela para resolver problemas atualmente, você consideraria que elas são:

☐ Tão boas quanto sempre foram. ☐ Boas, mas não tão boas quanto antes.

☐ Regulares. ☐ Ruins. ☐ Não há nenhuma habilidade.

2. Avalie sua habilidade em lidar com pequenas quantias de dinheiro (ex.: trocar dinheiro, dar gorjeta):

☐ Não há perda. ☐ Alguma perda. ☐ Perda grave

3. Avalie sua habilidade em lidar com transações financeiras complicadas (ex.: pagar contas, controle de conta bancária):

☐ Não há perda. ☐ Alguma perda. ☐ Perda grave.

4. Ele/ela pode lidar com uma emergência doméstica (ex. vazamento nos encanamentos, pequenos incêndios):

☐ Tão bem quanto antes.

☐ Pior do que antes por causa da dificuldade de pensamento (raciocínio).

☐ Pior do que antes, por outra razão. (qual)_____

5. Ele/ela pode entender situações ou explicações?

☐ Freqüentemente ☐ Às vezes ☐ Raramente ☐ Não sabe

6. Ele/ela se comporta de modo apropriado* [isto é, em sua maneira usual (pré-doença)]em situações sociais e em interação com outras pessoas?

☐ Freqüentemente ☐ Às vezes ☐ Raramente ☐ Não sabe

* Este item avalia comportamento, não aparência.

QUESTÕES SOBRE ASSUNTOS COMUNITÁRIOS PARA O INFORMANTE

Ocupacional

1. O sujeito ainda está trabalhando? ☐ SIM ☐ NÃO ☐ N/A

   Se não aplicável - vá para o item número 4
   Se sim - vá para o item número 3
   Se não - vá para o item número 2

2. Os problemas de memória ou de pensamento (raciocínio) contribuíram para a decisão do sujeito de se aposentar? (A questão 4 é a próxima) ☐ SIM ☐ NÃO ☐ N/A

3. O sujeito tem dificuldade significante em seu trabalho por causa de problemas com memória ou pensamento (raciocínio)?
   ☐ Raramente ou nunca ☐ Às vezes ☐ Freqüentemente ☐ Não sabe

Social

4. Ele/ela alguma vez dirigiu carro? ☐ SIM ☐ NÃO

5. Ele/ela dirige carros atualmente? ☐ SIM ☐ NÃO

6. Se não, é devido a problemas de memória ou pensamento (raciocínio)? ☐ SIM ☐ NÃO

7. Se ele/ela ainda está dirigindo, há problemas ou riscos devido ao pensamento (raciocínio) pobre? ☐ SIM ☐ NÃO

8. Ele/ela é capaz de fazer compras para suas próprias necessidades independentemente?
   ☐ Raramente ou nunca ☐ Às vezes ☐ Freqüentemente ☐ Não Sabe

   (precisa ser acompanhado em qualquer compra)

   (Pode comprar um número limitado de itens, compra itens duplicados ou esquece itens necessários)

9. Ele/ela é capaz de fazer atividades independentemente fora de sua casa?
   ☐ Raramente ou nunca ☐ Às vezes ☐ Freqüentemente ☐ Não sabe

   (Freqüentemente incapaz de realizar atividades sem ajuda)

   (Atividades limitadas ou de rotina, por exemplo,participação superficial na igreja ou reuniões,idas a salão de beleza).

   (Participação significativa em atividades,por exemplo, votar)

10. Ele/ela é levado a eventos sociais fora da casa de familiares? ☐ SIM ☐ NÃO
    Se não, por que não?_____

11. Um observador casual do comportamento do sujeito pensaria que ele está doente? ☐ SIM ☐ NÃO

12. Se institucionalizado, ele/ela participa bem de atividades sociais? ☐ SIM ☐ NÃO

IMPORTANTE:
As informações coletadas são suficientes para classificar o nível de comprometimento do sujeito em assuntos comunitários?

Se não, por favor, investique mais.
Atividades na comunidade: tais como ir à igreja, visitar amigos ou família, atividades políticas, organizações profissionais tais como associações, outros grupos profissionais, clubes sociais, organização de serviços, programas educacionais).

* Por favor, adicione notas se necessário para esclarecer o nível de funcionamento do sujeito nesta área.

QUESTÕES SOBRE O LAR E ATIVIDADES DE LAZER PARA O INFORMANTE

1a) Que mudanças ocorreram em suas habilidades de realizar tarefas domésticas? _____
_____

1b) O que ele/ela ainda pode fazer bem?_____
_____

2a) Que mudanças ocorreram em suas habilidades para realizar seus passatempos (hobbies)?_____
_____

2b) O que ele/ela ainda pode fazer bem?_____
_____

3) Se institucionalizado, o que ele/ela não pode mais fazer bem (Casa e Hobbies)_____
_____

Atividades da vida diária (Blessed):

	Nenhuma perda		Perda grave
4. Habilidade para realizar tarefas domésticas	0	0,5	1

Por favor, descreva_____
_____

5. Ele/ela é capaz de realizar tarefas domésticas até o nível de: (Escolha uma, o informante não precisa ser perguntado diretamente)

☐ Sem função significativa

(Realiza atividades simples, tais como fazer a cama, somente com muita supervisão)

☐ Funciona somente em atividades limitadas

(Com alguma supervisão, lava a louça com limpeza aceitável, coloca a mesa)

☐ Funciona independentemente em algumas atividades

(Opera equipamentos, tal como aspirador de pó, prepara refeições simples)

☐ Funciona em atividades usuais mas não no nível usual

☐ Funciona normalmente em atividades usuais

IMPORTANTE:

As informações coletadas são suficientes para classificar o nível de comprometimento do sujeito em CASA & HOBBIES?

Se não, por favor investique mais.

Tarefas Domésticas: Tais como cozinhar, lavar, limpar, fazer compras, levar o lixo para fora, limpar o quintal, manutenção de cuidados básicos e reparos básicos na casa

Hobbies: Costurar, pintar, artesanato, leitura, entretenimento, fotografia, jardinagem, ir ao teatro ou concerto, trabalho em madeira, participação em esportes.

QUESTÕES SOBRE O AUTOCUIDADO PARA O INFORMANTE

"Qual sua estimativa da habilidade mental dele (a) nas seguintes áreas:"

Vestir-se (Blessed)	Sem ajuda (0)	Às vezes não abotoa os botões corretamente,... (1)	Seqüência errada - esquece itens comumente. (2)	Incapaz de se vestir (3)
Lavar-se (Arrumar-se)	Sem ajuda (0)	Necessita de estímulo (1)	Algumas vezes precisa de ajuda (2)	Sempre – ou quase sempre – precisa de ajuda (3)
Hábitos À mesa	De modo limpo; utiliza os talheres adequados. (0)	De modo desorganizado; utiliza apenas colher. (1)	Apenas sólidos simples (2)	Tem que ser alimentado (3)
Controle de esfíncter	Controle completo normal (0)	Ocasionalmente molha a cama (1)	Freqüentemente molha a cama (2)	Duplamente incontinente (3)

*Escore 1 pode ser considerado se o auto-cuidado estiver comprometido quando comparado a um estado anterior, mesmo que não receba estímulo.

ESCORE CLÍNICO DE DEMÊNCIA (CDR)

Escore Clínico de Demência (CDR)	0	0,5	1	2	3

	Comprometimento				
	Normal 0	**Questionável 0,5**	**Leve 1**	**Moderada 2**	**Grave 3**
Memória	Sem perda de memória ou esquecimento leve e inconstante.	Esquecimento leve e constante (em oposição a eventual); recordação parcial de eventos; esquecimento "benigno".	Moderada perda de memória; mais marcada para eventos recentes; déficit interfere nas atividades cotidianas.	Perda de memória grave; somente retém material intensamente aprendido; material novo rapidamente perdido.	Perda de memória grave; restam apenas fragmentos.
Orientação	Plenamente orientado.	Plenamente orientado, exceto por leve dificuldade nas relações temporais.	Dificuldade moderada com relações temporais; orientado para lugar do exame; pode ter desorientação geográfica em outros lugares.	Dificuldade grave com relações temporais; usualmente desorientado para o tempo, freqüentemente para o espaço.	Orientado apenas para pessoa.
Julgamento e resolução de problemas	Resolve bem problemas diários e administra bem negócios e finanças; bom julgamento em relação ao desempenho prévio.	Leve dificuldade em resolver problemas, similaridades e diferenças.	Dificuldade moderada para administrar problemas, similaridades e diferenças; julgamento social usualmente mantido.	Grave dificuldade em administrar problemas, similaridades e diferenças; julgamento social usualmente comprometido.	Incapaz de fazer julgamentos ou de resolver problemas.
Assuntos Comunitários	Função independente no nível usual no trabalho, em compras, grupos sociais ou de voluntários.	Leve dificuldade nessas atividades	Incapaz de funcionar independentemente nessas atividades, embora ainda possa engajar-se em algumas; parece normal à inspeção casual.	Nenhuma referência a funcionamento independente fora de casa. Parece estar bem para ser levado a atividades fora de ambiente familiar.	Nenhuma referência a funcionamento independente fora de casa. Parece estar muito doente para ser levado a atividades fora de ambiente familiar
Tarefas do Lar e Atividades de Lazer	Vida no lar, passatempos e interesses intelectuais bem mantidos.	Vida no lar, passatempos e atividades intelectuais levemente comprometidos.	Dificuldade leve mas evidente nas funções do lar; tarefas mais difíceis abandonadas; passatempos e interesses mais complexos abandonados.	Somente tarefas simples preservadas, interesses muito restritos e mal sustentados.	Sem função significativa em casa.
Autocuidado	Plenamente capaz para o autocuidado.		Necessita estímulo.	Requer ajuda para vestir-se, higiene e cuidado com objetos pessoais.	Requer muita ajuda para o cuidado pessoal, incontinência freqüente.

Episódio Maior Depressivo no Passado – SCID

Critérios para classificar como depressão maior: Cinco (ou mais) dos seguintes critérios presentes durante período maior ou igual a duas semanas, sendo que um dos cinco deve ser ou (1) humor deprimido, ou (2) perda do interesse ou prazer.

1) Já houve, pelo menos uma vez na vida dele(a), algum momento em que se sentiu deprimido(a), ou na pior na maior parte do dia, quase todos os dias? (Como é que foi isso?)
SE SIM: Durou mais que duas semanas? SIM ( ) NÃO ( )

2) Naquele tempo ou em outro momento, ele(a) perdeu o interesse ou o prazer pelas coisas que costumava gostar? (Como é que foi isso?) Isso acontecia quase todos os dias?

SE SIM: Durou mais que duas semanas? **SIM ( ) NÃO ( )**

Critério: 1 2 3 ? Quando foi isso?_____

3) Naquele período ele(a) perdeu ou ganhou peso? Ele(a) estava tentando perder peso?
SE NÃO: Como estava o apetite dele(a)? (Tinha que forçar para comer? Comia menos/mais que o habitual? Isso acontecia quase todos os dias?)

Critério 1 2 3 ? Assinalar: Perda de peso ou redução do apetite_____ Ganho de peso ou aumento do apetite _____

4) Como estava o sono dele(a)? (Dificuldade para dormir, acordando freqüentemente, dificuldades em ficar acordado, acordando muito cedo, ou, dormindo demais? Quantas horas por noite comparado com o habitual? Isso acontecia quase todas as noites?)
Critério: 1 2 3 ? Assinalar: Insônia_____ Hipersônia_____

5) Ele(a) estava tão inquieto(a) ou agitado(a) que não era capaz de ficar parado(a)? (Isso acontecia todos os dias?)
SE NÃO: E o contrário: falando e se movendo mais devagar do que o normal dele(a)? (Isso acontecia todos os dias?)
Critério: 1 2 3 ? Assinalar: agitação psicomotora_____ retardo psicomotor_____

6) Como estava a energia dele(a)? (Cansado(a) o tempo inteiro? Quase todos os dias?)
Critério: 1 2 3 ?

7) Como ele se sentia em relação a si mesmo? (Inútil, sem valor?) Quase todos os dias?
SE NÃO: Ele se sentia culpado por coisas que fazia ou deixava de fazer? Quase todos os dias?
Critério: 1 2 3 ? Assinalar: Sentimento de inutilidade_____ Culpa inadequada_____

8) Ele(a) tinha dificuldade para se concentrar ou pensar? (Com que tipo de coisas isso interferia?) Quase todos os dias?
SE NÃO: Era difícil para ele(a) tomar decisões sobre coisas do dia a dia? Quase todos os dias?
Critério: 1 2 3 ? Assinalar: Capacidade de pensar diminuída_____ Indecisão_____

9) As coisas estavam tão ruins que ele(a) pensava muito em morte ou que estaria em melhor situação se estivesse morto(a)? E quanto a se ferir?

Critério: 1 2 3 ? Assinalar: Pensamentos de morte recorrentes____ Ideação suicida____Tentativa de suicídio

10) Durante aquele tempo ficou difícil para ele(a) trabalhar, cuidar das coisas em casa, ou se relacionar com as pessoas?

SIM ( ) NÃO ( )

11) Pouco antes de tudo isso começar ele estava bebendo em excesso ou usando drogas? SIM ( ) NÃO ( )

12) Pouco antes disso começar ele estava fisicamente doente? SIM ( ) NÃO ( )

13) Isso começou logo depois de alguém próximo a ele(a) morrer? SIM ( ) NÃO ( )

Durou mais que 2 meses? SIM ( ) NÃO ( )

OBS: Houve algum outro episódio de depressão na vida do paciente? ( ) SIM ( ) NÃO
Quando ocorreu (eram) ?_____

CONSIDERAR:			
1 – ausente ou falso	2 – subliminar (duvidoso)	3 – limiar ou verdadeiro	? – informação inadequada

CLASSIFICAÇÃO SÓCIO ECONÔMICA
Associação Brasileira dos Institutos de Pesquisa de Mercado
(ABIPEME)

A- Em sua casa tem?

	NÃO	SIM	QUANTIDADE					
			1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6 ou +**
Televisão			2	4	6	8	10	12
Empregada mensalista			6	12	18	24	24	24
Rádio			1	2	3	4	5	6
Banheiro			2	4	6	8	10	12
Aspirador de pó			5	5	5	5	5	5
Máquina de lavar			2	2	2	2	2	2
Automóvel de passeio			4	8	16	16	16	16

TOTAL:_____

B- Qual a instrução do chefe de família?

Sem Instrução/ primário incompleto	0
Primário completo/ ginásio incompleto	1
Ginásio completo/ colegial incompleto	3
Colegial completo/superior incompleto	5
Superior completo	10

TOTAL:_____

CLASSE ABIPEME	
CLASSE	**PONTOS**
A	35 OU +
B	21 a 34
C	10 a 20
D	05 a 09
E	00 a 04

Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
Caixa Postal 8090 – São Paulo, Brasil.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

I - DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME DO PACIENTE :..... .....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : ..... SEXO : .M F DATA NASCIMENTO: ...../...../.....
ENDEREÇO ..... Nº ..... APTO: .....
BAIRRO: ..... CIDADE .....
CEP:..... TELEFONE: DDD (.....) .....

2.RESPONSÁVEL LEGAL .....
NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.) .....
DOCUMENTO DE IDENTIDADE :.....SEXO: M F DATA NASCIMENTO.: ...../...../.....
ENDEREÇO: ..... Nº ..... APTO: .....
BAIRRO: ..... CIDADE: .....
CEP: ..... TELEFONE: DDD (.....).....

II - DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: CORRELAÇÃO ANÁTOMO - FUNCIONAL DAS ALTERAÇÕES CEREBRAIS NO ENVELHECIMENTO:*Um estudo quantitativo em material de necropsia*

2. PESQUISADOR: Lea Tenenholz Grinberg

CARGO/FUNÇÃO: Médica- pesquisadora INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 105290

UNIDADE DO HCFMUSP: Departamento de Patologia

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

SEM RISCO X RISCO MÍNIMO RISCO MÉDIO

RISCO BAIXO RISCO MAIOR

4.DURAÇÃO DA PESQUISA :3 anos

III - REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE OU SEU REPRESENTANTE LEGAL SOBRE A PESQUISA CONSIGNANDO:

Muito obrigada por sua atenção.

Estamos realizando um estudo para identificar como o envelhecimento ocorre no cérebro. Este estudo é muito importante porque ainda não sabemos direito porque as pessoas têm demência ou ficam mais esquecidas ou tremendo. Este trabalho também irá ajudar a descobrir a causa de morte de seu parente. Tratamentos novos para as doenças só são descorbertos fazendo estudos como este.

Este estudo irá funcionar da seguinte maneira:

O(a) Senhor(a) irá receber uma folha com perguntas a respeito de seu parente que faleceu. As perguntas são simples, porém é importante que o(a) senhor(a) pense por dois minutos antes de responder e que seja o mais exato possível. Caso não saiba a resposta, preencha o campo "não sei".

Durante a autópsia serão amostrados fragmentos de sistema nervoso central. Esses fragmentos serão estudados com bastante cuidado. Os resultados serão comparados com as respostas que o(a) preencheu. Não será feito nada a mais que o procedimento normal da autópsia e o corpo não será mutilado.

Assim, poderemos saber qual problema no cérebro de seu familiar que provocou doenças nele.

Não há nenhum risco neste estudo, por o(a) senhor(a) não precisará voltar aqui novamente e este estudo não atrasará a realização da autópsia.

Os resultados deste trabalho são muito importantes. Algumas das doenças passam de pai para filho e. Além disso, afetam a maioria da população. Então, os resultados que conseguiremos poderá ajudar muitas pessoas a não ficarem doentes.

IV - ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA CONSIGNANDO:

Qualquer dúvida que o(a) senhor(a) tenha será esclarecida pela própria médica responsável pelo trabalho, os resultados estarão disponíveis somente a(o) senhor(a). A qualquer momento, se for sua vontade, o seu familiar pode ser retirado da pesquisa e todas as informações obtidas serão sigilosas. Uma cópia deste documente será entregue a(o) senhor(a)

V. INFORMAÇÕES DE NOMES, ENDEREÇOS E TELEFONES DOS RESPONSÁVEIS PELO ACOMPANHAMENTO DA PESQUISA, PARA CONTATO

A responsável pela pesquisa em caso de dúvidas é,

Dra. Lea Tenemholz Grinberg CRM-SP: 105290 Telefone: (011) 30667322

VI - CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa

São Paulo, de de 200 .

assinatura do participante da pesquisa ou responsável legal

assinatura do pesquisador
(carimbo ou nome Legível)

HOSPITAL DAS CLÍNICAS

DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

CAIXA POSTAL, 8091 – SÃO PAULO - BRASIL

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

I - DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME DO PACIENTE :.....
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : ..... SEXO : M _ F _ DATA NASCIMENTO: ...../...../.....
ENDEREÇO ..... Nº ..... APTO: .....
BAIRRO: ..... CIDADE .....
CEP:..... TELEFONE: DDD (.....) .....

2.RESPONSÁVEL LEGAL .....
NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.) .....
DOCUMENTO DE IDENTIDADE :.....SEXO: M _ F _ DATA NASCIMENTO.: ...../...../.....
ENDEREÇO: ..... Nº ..... APTO: .....
BAIRRO: ..... CIDADE: .....
CEP: ..... TELEFONE: DDD (.....).....

II - DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: "Análise estereológica post mortem de regiões cerebrais de portadores de transtorno afetivo bipolar".

2. PESQUISADOR: Katia Cristina de Oliveira

CARGO/FUNÇÃO: Biomédica- pesquisadora INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL CRBM Nº 13861

UNIDADE DO HCFMUSP: Departamento de Patologia

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

SEM RISCO _ RISCO MÍNIMO X RISCO MÉDIO _

RISCO BAIXO _ RISCO MAIOR _

4.DURAÇÃO DA PESQUISA :3 anos

III - REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE OU SEU REPRESENTANTE LEGAL SOBRE A PESQUISA CONSIGNANDO:

Muito obrigada por sua atenção.

Essas informações estão sendo fornecidas para sua participação voluntária neste estudo, que visa identificar como as doençaspsiquiátricas e o envelhecimento ocorrem no cérebro. Este estudo é muito importante porque ainda não sabemos direitoporque as pessoas têm transtorno afetivo bipolar ou ficam mais depressivas, muito eufóricas repetindo movimentos e gestos. Tratamentos novos para as doenças só são descobertos fazendo estudos como este. Esta pesquisa determinará as condições cerebrais de seu familiar no momento de sua morte.

Este estudo irá funcionar da seguinte maneira:

O(a) Senhor(a) será entrevistado por um enfeirmeiro à respeito de seu parente que faleceu. As perguntas são simples,porém é importante que o(a) senhor(a) pense por dois minutos antes de responder e que seja o mais exato possível. Casonão saiba a resposta, diga "não sei".

Durante a autópsia serão amostrados fragmentos de sistema nervoso central. Esses fragmentos serão analisados com bastante cuidado para verificar alterações que possam prejudicar seu funcionamento. Os fragmentos serão armazenados para estudos futuros nas áreas de anatomia, biquímica, genética e imagem. Os resultados serão comparados com as respostas que o(a) senhor(a) respondeu. Não será feito nada a mais que o procedimento normal da autópsia e a aparência externa do corpo não será alterada.

O estudo não lhe causará nenhum transtorno. E este estudo não atrasará a realização da autópsia.
Caso sejam necessárias mais informações, o (a) senhor(a) aceita ser contatado por um pesquisador por telefone para agendar uma outra entrevista?
SIM( )_____NÃO( )_____

O senhor(a) nos autoriza a fazer a busca do prontuário médico do seu familiar para melhorarmos o diagnóstico clínico?
SIM ( ) NÃO ( )

Com sua colaboração, poderemos saber se existiam alterações no cérebro de seu familiar que pudessem ser responsáveis por provocar doenças. Desta forma, outras pessoas poderão ser beneficiadas porque os resultados que conseguiremos poderão ajudar muitas pessoas a não ficarem doentes.

IV - ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA CONSIGNANDO:

Qualquer dúvida que o(a) senhor(a) tenha será esclarecida pela própria pesquisadora responsável pelo trabalho, os resultados estarão disponíveis somente a(o) senhor(a). As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgado a identificação de nenhum paciente;
O pesquisador está comprometido em utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa
A qualquer momento, se for sua vontade, o seu familiar pode serretirado da pesquisa e todas as informações obtidas serão sigilosas. Uma cópia deste documente será entregue a(o)senhor(a)

V. INFORMAÇÕES DE NOMES, ENDEREÇOS E TELEFONES DOS RESPONSÁVEIS PELO ACOMPANHAMENTO DA PESQUISA, PARA CONTATO

A responsável pela pesquisa em caso de dúvidas é,

Dra. Katia Cristina de Oliveira CRBM 13861 Telefone: (011) 30618249

Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: 3069-6442 ramais 16, 17, 18 ou 20, FAX: 3069-6442 ramal 26 – E-mail: cappesq@hcnet.usp.br

VI - CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa

Anexo D - Entrevista *postmortem*

MEDICINA USP

ENTREVISTA CLÍNICA PARA DIAGNÓSTICO POST MORTEN DE TRANSTORNOS PSIQUIÁTRICOS

INSTITUTO DE PSIQUIATRIA

Nome:_____Idade: ____ DN: ____/____/____

Sexo: _____ Raça_____ Estado Civil: ☐S ☐C ☐V ☐A ☐D Filhos: _____ Natural: _____ Proced: _____

Escolaridade: _____ anos (_____)

☐ Destro ☐ Canhoto Mão que escrevia: ☐ D ☐ E Perna que usava para chutar a bola ☐ D ☐ E ☐ NA

Profissão: ☐do lar ☐ doméstica ☐outros_____

Situação: ☐ Ainda trabalhava ☐ Aposentado _____a ☐ Ap por invalidez _____ a ☐ Outro_____

Religião: ☐ Ateu/ Agnóstico ☐ Católico ☐ Protestante ☐ Judeu ☐ Espírita/ Umbandista ☐ praticante ☐ não praticante

ANTECEDENTES PESSOAIS

Histórico de nascimento: ☐ parto prolongado (duração do trabalho de parto _____) ☐ uso de fórceps

☐ prematuridade ☐ pós-data _____ ☐ relato de hipóxia ☐ infecções ☐ convulsões ☐ traumas

☐ exposição à substâncias perigosas ao longo da vida _____

☐ ECT: ☐ Não ☐ Sim (_____ vezes) motivo _____

		Idade de início
⇒ Asfixia perinatal	☐ Não ☐ Sim	_____
⇒ Traumatismo craniano	☐ Não ☐ Sim	_____
⇒ Encefalite	☐ Não ☐ Sim	_____
⇒ Tumor	☐ Não ☐ Sim	_____
⇒ Doença de Huntington	☐ Não ☐ Sim	_____
⇒ Neuroacantocitose – doença hereditária rara, cujos sintomas incluem perda muscular associada a movimentos musculares rápidos e involuntários e alteração de células vermelhas (hmg)	☐ Não ☐ Sim	_____
⇒ Doença genética com alteração de aparência física	☐ Não ☐ Sim	_____
⇒ Retardo mental	☐ Não ☐ Sim	_____
⇒ Distúrbio significante do desenvolvimento (com ou sem caracteristicas autistas)	☐ Não ☐ Sim	_____
⇒ Gagueira	☐ Não ☐ Sim	_____
⇒ Convulsões, Epilepsia e convulsões febris	☐ Não ☐ Sim	_____
⇒ Febre reumática (FR)*	☐ Não ☐ Sim	_____
⇒ Diabetes Mellitus	☐ Não ☐ Sim	_____
⇒ Meningite	☐ Não ☐ Sim	_____
⇒ Hipertensão arterial	☐ Não ☐ Sim	_____
⇒ Asma	☐ Não ☐ Sim	_____
⇒ Alergias: especificar _____	☐ Não ☐ Sim	_____
⇒ Enxaquecas (diagnosticada)	☐ Não ☐ Sim	_____
⇒ Hipertireoidismo	☐ Não ☐ Sim	_____
⇒ Hipotireoidismo	☐ Não ☐ Sim	_____
⇒ Bócio (aumento da tireóide)	☐ Não ☐ Sim	_____
⇒ Cardiopatia	☐ Não ☐ Sim	_____
⇒ Outro _____	☐ Não ☐ Sim	_____

* Idade em que teve FR (em que os sintomas apareceram) : _____ anos

Como foi feito o diagnóstico: _____Tratou: ☐ Não ☐ Sim _____

Sintomas apresentados: ☐ Pericardite ☐ Miocardite ☐ Endocardite ☐ Artrite ☐ Coréia de Sydenham

☐ Eritema marginado ☐ Nódulos subcutâneos

Exames realizados na fase aguda: ☐ Cultura orofaríngea para Streptococcus (☐ Positiva ☐ Negativa) Anticorpo DNAse B (valor mais alto _____) ☐ ASLO (valor mais alto_____)

Complicações da FR: ☐ Não ☐ Sim _____ ☐ Seqüela cardiaca _____

Algum outro membro da família teve FR? ☐ Não ☐ Sim _____

SINTOMAS PSIQUIÁTRICOS

Sintomas psiquiátricos: ☐ Não ☐ Sim Foi feito diagnóstico de Doença Psiquiátrica: ☐ Não ☐ Sim

Lista de possíveis comorbidades piquiátricas	Possible (2) Probable (3) Definite (4)	Idade de Início	Ao morrer?
01 – Transtorno Obsessivo Compulsivo			
02 – Transtorno Obsessivo Compulsivo Subclínico			
03 – Sintomas de Transtorno Obsessivo Compulsivo			
04 – Trasntorno da personalidade obsessivo compulsiva			
05 – Síndrome de Tourette			
06 – transtornos de tique motor ou vocal crônico			
07 – Trasntorno de tique transitório			
08 – Transtorno de tique sem outra especificação			
09 – THDA com ambos os sintomas			
10 – THDA com predominância de desatenção			
11 – THDA com predominância de hiperatividade/ impulsividade			
12 – Episódio depressivo maior atual			
13 – Episódio depressivo maior do passado			
14 – Episódio de Mania atual			
15 – Episódio de hipomania atual			
16 – Episódio de mania passado			
17 – Episódio de hipomania passado			
18 – Transtorno distímico			
19 –GMC/ Substância causando transtorno de humor			
20 – Substância induzindo transtorno de humor			
21 – Esquizofrenia			
22 – Esquizofreniforme			
23 – Transtorno esquizoafetivo			
24 – Transtorno delirante			
25–GMC/Subst. Causadoras de sintomas psicóticos			
26 – Transtorno psicótico sem outra especificação			
27 – Bipolar I			
28 – Bipolar II			
29 – Outros transtornos bipolares			
30 – Abuso de álcool			
31 – Dependência alccólica			
32 – Distúrbios por substâncias não alcoólicas			
33 – Trasntorno do Pânico			
34 – Transtorno do Pânico com agorafobia			
35 – Fobia social			
36 – Fobia específica			
37 – Transtorno do estresse pós - traumático			
38 – Transtorno de ansiedade generalizada			
39 – Transtorno somático			
40 – Transtorno doloroso			
41 – Transtorno somatoforme indiferenciado			
42 – Hipocondria			
43 – Distúrbio dismórfico corporal			
44 – Anorexia Nervosa			
45 – Bulimia Nervosa			
46 – Compulsão alimentar			
47 – Gagueira			
48 – Outros distúrbios da fala			
49 – Tricotilomania			
50 – Transtornos de conduta			
51 – Distúrbios específicos de aprendizagem			

MEDICAÇÕES EM USO

Medicações que usava: Não usa: não foi prescrito ☐controle inadequado ☐ NREF ☐ NMED_____
Medicações: _____

MEDICAÇÃO ATUAL	EM USO ATUAL?	IDADE DE INÍCIO (anos)	TEMPO DE USO (meses)	DOSE ATUAL
Carbonato de lítio (Carbolitium)	☐S ☐N			
ANTICONVULSIVANTES				
Ac. Valpróico / Valproato **(Depakene, Valpakene, Depakote)**	☐S ☐N			
Carbamazepina **(Tegretol, Tegretard)**	☐S ☐N			
Gabapentina **(Neurontin)**	☐S ☐N			
Lamotrigina **(Lamictal, Neural)**	☐S ☐N			
Oxcarbazepina **(Trileptal)**	☐S ☐N			
Topiramato **(Topamax)**	☐S ☐N			
OUTROS	☐S ☐N			
ANTIDEPRESSIVOS - ISRS / ISRSN				
Citalopram **(Cipramil, Procimax, Denyl, Alcytam)**	☐S ☐N			
Escitalopram **(Lexapro)**	☐S ☐N			
Fluoxetina **(Prozac, Verotina, Fluxene, Daforin, Eufor, Deprax)**	☐S ☐N			
Fluvoxamina **(Luvox)**	☐S ☐N			
Paroxetina **(Aropax, Cebrilin, Pondera, Roxetin)**	☐S ☐N			
Sertralina **(Zoloft, Tolrest, Serenata, Sercerin, Assert, Novativ)**	☐S ☐N			
Venlafaxina **(Efexor, Venlift)**	☐S ☐N			
Mirtazapina **(Remeron)**	☐S ☐N			
OUTROS	☐S ☐N			
ANTIDEPRESSIVOS - TRICÍCLICOS				
Amitriptilina **(Tryptanol, Amitril)**	☐S ☐N			
Clomipramina **(Anafranil)**	☐S ☐N			
Imipramina **(Tofranil)**	☐S ☐N			
Nortriptilina **(Pamelor)**	☐S ☐N			
OUTROS	☐S ☐N			
ANTIDEPRESSIVOS - OUTROS				
Bupropiona **(Welbutrin, Zyban, Zetron)**	☐S ☐N			
Minalciprano **(Ixel)**	☐S ☐N			
OUTROS	☐S ☐N			
BENZODIAZEPÍNICOS / ANSIOLÍTICOS / HIPNÓTICOS				
Alprazolam **(Frontal, Apraz, Altrox, Tranquinal)**	☐S ☐N			
Clonazepam **(Rivotril, Clonotril)**	☐S ☐N			
Diazepam **(Diempax, Valium)**	☐S ☐N			
OUTROS	☐S ☐N			
NEUROLÉPTICOS ATÍPICOS				
Aripiprazol **(Abilify)**	☐S ☐N			
Clozapina **(Leponex)**	☐S ☐N			
Olanzapina **(Zyprexa)**	☐S ☐N			
Quetiapina **(Seroquel)**	☐S ☐N			
Risperidona **(Risperdal, Zargus, Risperidon, Respidon)**	☐S ☐N			
Sulpirida **(Equilid, Sulpan, Dogmatil)**	☐S ☐N			
Ziprasidona **(Geodon)**	☐S ☐N			
OUTROS	☐S ☐N			

MEDICAÇÃO ATUAL	EM USO ATUAL?	IDADE DE INÍCIO (anos)	TEMPO DE USO (meses)	DOSE ATUAL
NEUROLÉPTICOS TÍPICOS				
Clorpromazina (**Amplictil, Longactil**)	☐S ☐N			
Haloperidol (**Haldol**)	☐S ☐N			
Pimozida (**Orap**)	☐S ☐N			
OUTROS	☐S ☐N			
ESTIMULANTES				
Metilfenidato (**Ritalina, Concerta**)	☐S ☐N			
OUTROS	☐S ☐N			
HORMÔNIOS				
T3 / Triiodotironina / Liotironina (**Cynomel**)	☐S ☐N			
T4 / Levotiroxina (**Euthyrox, Puran T4, Synthroid, Tetroid**)	☐S ☐N			
OUTROS	☐S ☐N			
OUTROS, Qual_____	☐S ☐N			

HISTÓRICO E ANTECEDENTES FAMILIARES

(refere-se apenas a parentes de primeiro e segundo grau – pais, irmãos, filhos, avós paternos e maternos, tios maternos e paternos)

Ele/ ela foi adotado? ☐ Não ☐ Sim
Irmãos do mesmo pai e mesma mãe que ele(a): _____ Irmãos ____ Irmãs Todos nascidos vivos: ☐ Sim ☐ Não
Irmãos ("meio – irmão") de pais diferentes: _____ Irmãos _____ Irmãs Todos nascidos vivos: ☐ Sim ☐ Não
Quem era o parente em comum? ☐ pai ☐ mãe

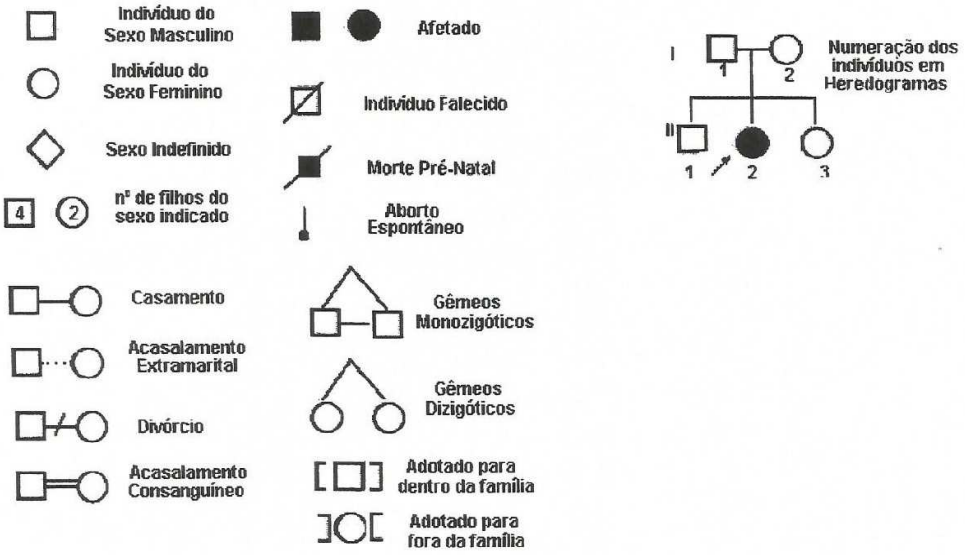
Filhos da última união: ____ homens ___ mulheres Filhos de outros casamentos/ fora dele: ___ homens ___ mulheres
Filhos adotados: _____ homens ____ mulheres

Alguma doença psiquiátrica ou neurológica na família? ☐ Não ☐ Sim _____
Tentativa/ Suicídio na família: ☐ Não ☐ Sim _____ ECT na família ☐ Não ☐ Sim _____

PAI	☐ Não	☐ Sim	☐ Não sei	☐ Bipolar ☐ Depressão	☐ Outro _____
MÃE	☐ Não	☐ Sim	☐ Não sei	☐ Bipolar ☐ Depressão	☐ Outro _____
IRMÃO*	☐ Não	☐ Sim	☐ Não sei	☐ Bipolar ☐ Depressão	☐ Outro _____
IRMÃO*	☐ Não	☐ Sim	☐ Não sei	☐ Bipolar ☐ Depressão	☐ Outro _____
IRMÃ*	☐ Não	☐ Sim	☐ Não sei	☐ Bipolar ☐ Depressão	☐ Outro _____
IRMÃ*	☐ Não	☐ Sim	☐ Não sei	☐ Bipolar ☐ Depressão	☐ Outro _____
FILHO	☐ Não	☐ Sim	☐ Não sei	☐ Bipolar ☐ Depressão	☐ Outro _____
FILHO	☐ Não	☐ Sim	☐ Não sei	☐ Bipolar ☐ Depressão	☐ Outro _____
FILHA	☐ Não	☐ Sim	☐ Não sei	☐ Bipolar ☐ Depressão	☐ Outro _____
FILHA	☐ Não	☐ Sim	☐ Não sei	☐ Bipolar ☐ Depressão	☐ Outro _____
OUTROS PARENTES					
	☐ Não	☐ Sim	☐ Não sei	☐ Bipolar ☐ Depressão	☐ Outro _____
	☐ Não	☐ Sim	☐ Não sei	☐ Bipolar ☐ Depressão	☐ Outro _____
	☐ Não	☐ Sim	☐ Não sei	☐ Bipolar ☐ Depressão	☐ Outro _____

* Irmã(o) do mesmo pai e mãe

HEREDOGRAMA



TRANSTORNO OBSESSIVO COMPULSIVO

Diagnóstico prévio de TOC: □ Não □ Sim: Por quem? _____ Quando_____ Onde_____
Tratamento prévio para TOC: □ Não □ Sim: Por quem? _____ Quando_____ Onde_____
Início dos sintomas e curso da doença:
Idade de início dos sintomas: _____ anos Primeiros Sintomas: _____
Idade de início dos piores sintomas: _____ anos _____
Início do uso da medicação: _____
Os sintomas de TOC foram precedidos de algum evento: doenças clínicas, neurológicas ou medicação

História evolutiva do TOC

VERSÃO ABREVIADA DA DYBOCS

Não é incomum que as pessoas possam ter pensamentos intrusivos, ansiosos, sobre algo ruim que possa vir a acontecer. Ocasionalmente, esses pensamentos podem resultar em um comportamento repetitivo, sem sentido, mas que pode reduzir os sentimentos de ansiedade por um tempo. Exemplos como, checar o bebê mesmo sabendo que todos estão bem, re-checar para ter certeza de que o forno está desligado ou que a porta está trancada, ou lavar e re-lavar as mãos para ter certeza de que estão limpas. Em outros momentos as pessoas evitarão alguns locais ou objetos para prevenir que esses pensamentos possam acontecer. Por exemplo, evitar banheiros públicos ou filmes assustadores. Raramente essas preocupações ou comportamentos repetitivos tomam grande parte do tempo de uma pessoa diariamente.

1. Pensamentos incômodos sobre algum acontecimento ruim que aconteceu com ele (a) ou com um familiar próximo (filho, cônjuge, pais). Imagens terríveis sobre o que poderia acontecer. Preocupação de que ele (a) possa ser responsável por algo ruim que venha a acontecer com eles.	Não Sim 0 1 2 3 4 5
2. Necessidade de checar e re-checar as coisas para ter certeza de que a pessoa por quem ele(a) estava preocupada estava bem ou necessidade de evitar certos lugares ou coisas para prevenir que pensamentos sobre algo ruim que possa acontecer com um familiar, aconteçam.	Não Sim 0 1 2 3 4 5
3. Pensamentos incômodos de sacrilégio ou blasfêmia. Preocupação de que ele(a) possa ser responsável por algo terrível aos olhos de Deus. Pensamentos sexuais incômodos.	Não Sim 0 1 2 3 4 5
4. Necessidade de evitar certos locais ou coisas para prevenir que pensamentos incômodos de sacrilégio ou sexuais aconteçam ou necessidade de checar e re-checar coisas que não aconteceram ou fazer coisas repetidamente, como rezar o tempo todo, para desfazer tais pensamentos.	Não Sim 0 1 2 3 4 5
5. Pensamentos incômodos sobre não ser justo, exato ou simétrico. Uma sensação incômoda de que as coisas não parecem ou soam corretas.	Não Sim 0 1 2 3 4 5
6. Necessidade de arrumar coisas ou refazê-las até que pareçam corretas. Necessidade de contar as coisas. Necessidade de evitar certos locais ou coisas para prevenir que pensamentos de não exatidão, de não ser justo ou de simetria, aconteçam.	Não Sim 0 1 2 3 4 5
7. Pensamentos incômodos de sujeita, germes, contaminantes, excretas ou produtos tóxicos de limpeza doméstica.	Não Sim 0 1 2 3 4 5
8. Necessidade de lavar e relavar suas mãos ou corpo ou necessidade de lavar ou relavar itens domésticos. Necessidade de evitar certos locais ou coisas para prevenir que pensamentos sobre estar sujo ou contaminado com germes, como não usar um garfo que outro tocou ou não usar um sanitário público.	Não Sim 0 1 2 3 4 5
9. Pensamentos incômodos sobre fugir de algo. Sensação de necessidade de guardar coisas sem importância, como jornal velho, pedaços de papel.	Não Sim 0 1 2 3 4 5
10. Guardar coisas que outras pessoas consideraraim lixo. Necessidade de evitar certos locais ou coisas para prevenir que ele(a) próprio(a) colete mais itens.	Não Sim 0 1 2 3 4 5
10. Ser uma pessoa supersticiosa ou ter uma cor ou número de sorte ou azar	Não Sim 0 1 2 3 4 5
12. Que idade ele(a) tinha quando começou a ter esses comportamentos?	Antes dos 10 anos Entre 10 e 18 anos Depois dos 18 anos
13. Alguma vez ele(a) foi diagnosticado como tendo TOC?	Não Sim
14. Alguma vez ele (a) foi tratado de TOC?	Não Sim Drogas Psicoterapia

Freqüência

[0] Nunca;

[1] Eu me lembro dele(a) ter pensamentos ou comportamentos como estes mas eles nunca causavam preocupação séria a ele(a);

[2] Eu me lembro dele(a) ter pensamentos ou comportamentos como estes mas apenas quando alguma coisa realmente ruim acontecia ou estava para acontecer;

[3] Eu me lembro dele(a) ter pensamentos ou comportamentos como estes, as vezes eles eram totalmente sem sentido mas ele(a) não conseguia se livrar deles.

[4] Houve momentos na vida dele(a) em que esses pensamentos ou comportamentos eram muito freqüentes. Ele(a) tinha dificuldade em esquecê-los e eles eram muito incômodos, mesmo que ele(a) não tivesse que ficar tão preocupado;

[5] Houve momentos em que ele(a) esteve ocupado(a) com essas preocupações e comportamentos repetitivos quase todo o tempo. Eles eram muito incômodos mesmo que ele(a) soubesse que não precisavam se preocupar com eles.

TRANSTORNO AFETIVO BIPOLAR

Diagnóstico prévio de TAB: □ Não □ Sim: Por quem? _____ Quando_____ Onde_____
Tratamento prévio para TAB: □ Não □ Sim: Por quem? _____ Quando_____ Onde_____
Início dos sintomas e curso da doença:
Idade de início dos sintomas: _____ anos Primeiros Sintomas: _____
Idade de início dos piores sintomas: _____ anos _____
Início do uso da medicação: _____
Os sintomas de TAC foram precedidos de algum evento: doenças clínicas, neurológicas ou medicação

História evolutiva do TAB:

EPISÓDIO MANÍACO ATUAL (EMA)

EMA	CRITÉRIOS	
Se a avaliação preliminar detalhada da dç atual não fornecer indícios de EMA vá para EMP	A. Um período distinto de humor anormal e persistentemente elevado expansível ou irritável	
No último mês houve algum período de tempo em que ele(a) se sentiu tão bem, "para cima", agitado(a) ou excitado(a), que outras pessoas pensavam que ele(a) não estava no seu normal ou que estava tão excitado(a) que se envolvia em problemas? (Isso era mais do que apenas se sentir bem?)		
SE NÃO: E quanto a períodos de tempo em que ele(a) estava tão irritado(a) que se pegava gritando com as pessoas ou começando brigas ou discussões? (Ele(a) se pegava gritando com pessoas que nem conhecia direito?)	1. _____ humor elevado 2. _____ humor irritável	? 1 2 3 Se 1, vá para EMP
SE SIM: Como foi isso? Quanto tempo durou (+1sem)? Ele(a) teve que ir para algum hospital?		
.... e quanto a perder o interesse ou o prazer pelas coisas que costumava gostar?	Interesse ou prazer acentuadamente diminuídos por todas ou quase todas as atividades na maior parte do dia, quase todos os dias	? 1 2 3 Se 1 ou 2 vá para Hipomaníaco atual
SE NEM ITEM 1 OU 2 SÃO CODIFICADOS 3 VÁ PARA EMA PASSADO		
DURANTE ESSE PERÍODO (1sem) Focalize no pior período do último mês do episódio atual SE DÚBIO: Durante o episódio quando ele(a) esteve mais ..... (equivalente para mania)	B. Durante o período de perturbação do humor, três ou mais dos seguintes sintomas persistiram (4, se o humor está apenas irritável) e estiveram presentes em grau significativo.	
Durante aquele tempo....		
... como ele(a) se sentia em relação a sim mesmo(a)?	1. Auto-estima inflada ou grandiosidade ☐ mais confiante do que o habitual? ☐ com algum poder ou habilidade especial?	? 1 2 3
... Precisava dormir menos que o habitual? Ainda assim se sentia descansado?	2. Necessidade diminuída de sono (sente-se repousado(a) depois de apenas 3 horas de sono)	? 1 2 3
... falava mais do que o habitual? (as pessoas tinham dificuldade em interromper ou entendê-lo(a), ou conseguir uma brecha quando ele(a) falava?	3. Mais loquaz do que o habitual ou pressão para continuar falando	? 1 2 3
... os pensamentos passavam rapidamente pela cabeça dele(a)?	4. "Fuga de idéias" ou experiência subjetiva de que os pensamentos estão correndo	? 1 2 3
... era facilmente distraído(a) por coisas a sua volta que tinha dificuldade para se concentrar ou continuar o que estava fazendo?	5. Distratibilidade (atenção é desviada com excessiva facilidade para estímulos externos insignificantes ou irrelevantes)	? 1 2 3
... como passava o tempo? (trabalho, amigos, passatempos) Se envolvia em tantas atividades que os outros ficavam preocupados? SE NENHUMA ATIVIDADE AUMENTADA: estava fisicamente agitado(a)?	6. Aumento da atividade dirigida a objetivos (socialmente, no trabalho, na escola, sexualmente) ou agitação psicomotora ☐ aumento na atividade ☐ agitação psicomotora	? 1 2 3
... qual era a intensidade disso?		
Durante aquele tempo.... ... ele(a) fez qquer coisa que pudesse trazer problemas para ele(a) mesmo(a) ou para a família? (comprando coisas que não precisava, comportamento sexual não habitual, direção imprudente)	7. Envolvimento excessivo em atividades prazerosas com um alto potencial para conseqüências dolorosas (envolvimento em gastos desenfreados em compras, indiscrições sexuais, investimentos financeiros tolos)	? 1 2 3
PELO MENOS TRÊS DOS SINTOMAS ACIMA (1 – 7) SÃO CODIFICADOS COMO 3 (4 SE APENAS HUMOR IRRITÁVEL)		1 3 Se codificado 1 vá para EM passado; Se 3, seguir

SE DESCONHECIDO: Durante esse período ele(a) teve sérios problemas em casa ou no trabalho (escola) pq estava com os sintomas descritos, ou teve que ir para algum hospital? Descreva:	C. A perturbação do humor é suficientemente grave para causar prejuízo acentuado no funcionamento ocupacional, nas atividades sociais ou relacionamentos costumeiros com os outros ou para exigir hospitalização, como um meio de evitar danos a si mesmo e a outros ou existem aspectos psicóticos	? 1 2 3 Se 1 vá para critério C Hipomaníaco atual
Pouco antes disso começar ele(a) estava fisicamente doente? Ou Usando algum medicamento, álcool ou drogas?	D. Os sintomas não se devem aos efeitos fisiológicos diretos de uma substância ou de uma CMG (hipotireoidismo)	? 1 2 3 Se devido à CMG ou SUDST vá para EM passado Se 3, Episódio primário de humor, continua
OS CRITÉRIOS A, B, C e D PARA EMA SÃO CODIFICADOS COMO 3		1 3 1 = vá para EMP 3 = EMA atual
Qtas vezes diferentes esteve agitado(a)/ equivalente e teve sintomas maníacos reconhecidos, por pelo menos 1sem (ou hospitalizado) e teve muito dos sintomas descritos?	Numero total de EMA incluindo o atual CODIFIQUE 99 SE MUITOS NUMEROSOS OU INDISTINTO PARA CONTAR	

COM INÍCIO NO PÓS-PARTO	**CRITÉRIOS**	
SE DESCONHECIDO: quando iniciaram os sintomas?	Início do episódio dentro de 4 semanas após o parto	? 1 2 3 Se 3 = com início no pós-parto
COM CARACTERÍSTICAS CATATÔNICAS	**CRITÉRIOS**	
PELA OBSERVAÇÃO OU PELA HISTÓRIA Descrever comportamento específico:	O quadro clínico é denominado por pelo menos dois dos seguintes aspectos: 1. Imobilidade motora evidenciada por catalepsia (incluindo flexibilidade cérea) ou estupor 2. Atividade motora excessiva (aparentemente sem propósito e não influenciada por estímulos externos) 3. Negativismo extremo (resistência aparentemente imotivada a todas as instruções ou manutenção de uma postura rígida, contra tentativas de mobilização) ou mutismo 4. Peculiaridades do movimento voluntário evidenciado por posturas (adoção voluntária de posturas inadequadas ou bizarras), movimentos estereotipados, maneirismos proeminentes ou trejeitos faciais proeminentes 5. Ecolalia (repetição patológica, "tipo papagaio", aparentemente sem sentido, de uma palavra ou frase recém-falada por outra pessoa) ou ecopraxia (imitação repetitiva dos movimentos de outra pessoa	? 1 2 3 ? 1 2 3 ? 1 2 3 ? 1 2 3 ? 1 2 3
PELO MENOS DOIS SINTOMAS B SÃO CODIFICADOS COMO 3		SE 3 = COM CARACT MELANCÓLICAS

EPISÓDIO HIPOMANÍACO ATUAL (EHMA)

	CRITÉRIOS	
Se os critérios são preenchidos para um EMA vá para o próximo módulo	A. Um período distinto de humor anormal e persistentemente elevado expansível ou irritável, durando todo o tempo, ao longo de pelo menos 4 dias, nitidamente diferente do humor habitual não deprimido	
Quando ele(a) se sentiu tão bem, "para cima", agitado(a) ou excitado(a)/ equivalente, durou pelo menos 4 dias?	_____ humor elevado _____ humor irritável	? 1 2 3 Se 1, vá para EMP
Ele(a) já teve mais de um momento parecido com aquele? (FOCALIZE O PIOR PERÍODO)		

SE DESCONHECIDO: Durante esse período ele(a) teve sérios problemas em casa ou no trabalho (escola) pq estava com os sintomas descritos, ou teve que ir para algum hospital? Descreva:	C. A perturbação do humor é suficientemente grave para causar prejuízo acentuado no funcionamento ocupacional, nas atividades sociais ou relacionamentos costumeiros com os outros ou para exigir hospitalização, como um meio de evitar danos a si mesmo e a outros ou existem aspectos psicóticos	? 1 2 3 Se 1 vá para critério C Hipomaníaco atual
Pouco antes disso começar ele(a) estava fisicamente doente? Ou Usando algum medicamento, álcool ou drogas?	D. Os sintomas não se devem aos efeitos fisiológicos diretos de uma substância ou de uma CMG (hipotireoidismo)	? 1 2 3 Se devido à CMG ou SUBST vá para EM passado Se 3, Episódio primário de humor, continuar
OS CRITÉRIOS A, B, C e D PARA EMA SÃO CODIFICADOS COMO 3		1 3 1= vá para T. Distímico 2= EMP
Quantos anos ele(a) tinha quando começou? (EMP)	Idade de início do EMP codificado acima	
Qtas vezes diferentes esteve agitado(a)/ equivalente e teve sintomas maníacos reconhecidos, por pelo menos 1sem (ou hospitalizado) e teve muito dos sintomas descritos?	Número total de EMA incluindo o atual CODIFIQUE 99 SE MUITOS NUMEROSOS OU INDISTINTO PARA CONTAR	

EPISÓDIO HIPOMANÍACO PASSADO (EHMP)

	CRITÉRIOS	
	8. Um período distinto de humor anormal e persistentemente elevado expansível ou irritável, durando todo o tempo, ao longo de pelo menos 4 dias, nitidamente diferente do humor habitual não deprimido	
Quando ele(a) se sentiu tão bem, "para cima", agitado(a) ou excitado(a)/ equivalente, durou pelo menos 4 dias? Como foi isso?	_____ humor elevado _____ humor irritável	? 1 2 3 Se 1, vá para EMP
Ele(a) já teve mais de um momento parecido com aquele? (FOCALIZE O PIOR PERÍODO)		
SE NEM ITEM 1 OU 2 SÃO CODIFICADOS 3 VÁ PARA EMA PASSADO		
Durante aquele tempo....		
... como ele(a) se sentia em relação a sim mesmo(a)?	1. Auto-estima inflada ou grandiosidade ☐ mais confiante do que o habitual? ☐ com algum poder ou habilidade especial?	? 1 2 3
... Precisava dormir menos que o habitual? Ainda assim se sentia descansado?	2. Necessidade diminuída de sono (sente-se repousado(a) depois de apenas 3 horas de sono)	? 1 2 3
... falava mais do que o habitual? (as pessoas tinham dificuldade em interromper ou entendê-lo(a), ou conseguir uma brecha quando ele(a) falava?	3. Mais loquaz do que o habitual ou pressão para continuar falando	? 1 2 3
... os pensamentos passavam rapidamente pela cabeça dele(a)?	4. "Fuga de idéias" ou experiência subjetiva de que os pensamentos estão correndo	? 1 2 3
... era facilmente distraído(a) por coisas a sua volta que tinha dificuldade para se concentrar ou continuar o que estava fazendo?	5. Distratibilidade (atenção é desviada com excessiva facilidade para estímulos externos insignificantes ou irrelevantes)	? 1 2 3
... como passava o tempo? (trabalho, amigos, passatempos) Se envolvia em tantas atividades que os outros ficavam preocupados? SE NENHUMA ATIVIDADE AUMENTADA: estava fisicamente agitado(a)?	6. Aumento da atividade dirigida a objetivos (socialmente, no trabalho, na escola, sexualmente) ou agitação psicomotora ☐ aumento na atividade ☐ agitação psicomotora	? 1 2 3

Durante aquele tempo.... ... ele(a) fez qualquer coisa que pudesse trazer problemas para ele(a) mesmo(a) ou para a família? (comprando coisas que não precisava, comportamento sexual não habitual, direção imprudente)	7. Envolvimento excessivo em atividades prazerosas com um alto potencial para conseqüências dolorosas (envolvimento em gastos desenfreados em compras, indiscrições sexuais, investimentos financeiros tolos)	? 1 2 3
PELO MENOS TRÊS DOS SINTOMAS ACIMA (1 – 7) SÃO CODIFICADOS COMO 3 (4 SE APENAS HUMOR IRRITÁVEL)		1 3 Se codificado 1 vá para EM passado Se 3, seguir
SE DESCONHECIDO: Isso foi muito diferente da forma como você costumava ser (quando você não estava deprimido) Em que ele(a) estava diferente? No trabalho? Com os amigos? Descreva:	C. O episódio está associado com uma inequívoca alteração no funcionamento, que não é característica da pessoa quando assintomática.	? 1 2 3 Se 1 vá para critério T. Distímico
SE DESCONHECIDO: Outras pessoas notavam a mudança nele(a)?	D.A perturbação do humor e a alteração no funcionamento são observáveis por outros?	? 1 2 3 Se 1 vá para critério T. Distímico
SE DESCONHECIDO: Naquele tempo, ele(a) teve sérios problemas em casa ou no trabalho (escola) porque estava com os sintomas ou teve que ir para algum hospital?	E. O episódio não é suficientemente grave para causar prejuízo acentuado no funcionamento social ou ocupacional, ou para exigir a hospitalização, nem existem aspectos psicóticos	? 1 2 3 Se grave o suficiente para requerer hospitalização considerar EMP
Pouco antes disso começar ele(a) estava fisicamente doente? Ou Usando algum medicamento, álcool ou drogas?	F. Os sintomas não se devem aos efeitos fisiológicos diretos de uma substância ou de uma CMG (hipotireoidismo)	? 1 2 3 Se devido à CMG ou SUBST vá para EM passado Se 3, Episódio plenário de humor, continuar
OS CRITÉRIOS A, B, C, D, E e F PARA EHMA SÃO CODIFICADOS COMO 3		1 3 1 = vá para T.Distímico 3 = EMP
Quantos anos ele(a) tinha quando começou?	Idade de início do episódio hipomaníaco passado	
Qtas vezes diferentes esteve agitado(a)/ equivalente e teve sintomas maníacos reconhecidos, por pelo menos 1sem (ou hospitalizado) e teve muito dos sintomas descritos?	Numero total de EMA incluindo o atual CODIFIQUE 99 SE MUITOS NUMEROSOS OU INDISTINTO PARA CONTAR	

SE NEM ITEM 1 OU 2 SÃO CODIFICADOS 3 VÁ PARA EM PASSADO		
Durante aquele tempo....		
... como ele(a) se sentia em relação a sim mesmo(a)?	1. Auto-estima inflada ou grandiosidade ☐ mais confiante do que o habitual? ☐ com algum poder ou habilidade especial?	? 1 2 3
... Precisava dormir menos que o habitual? Ainda assim se sentia descansado?	2. Necessidade diminuída de sono (sente-se repousado(a) depois de apenas 3 horas de sono)	? 1 2 3
... falava mais do que o habitual? (as pessoas tinham dificuldade em interromper ou entendê-lo(a), ou conseguir uma brecha quando ele(a) falava?	3. Mais loquaz do que o habitual ou pressão para continuar falando	? 1 2 3
... os pensamentos passavam rapidamente pela cabeça dele(a)?	4. "Fuga de Idéias" ou experiência subjetiva de que os pensamentos estão correndo	? 1 2 3
... era facilmente distraído(a) por coisas a sua volta que tinha dificuldade para se concentrar ou continuar o que estava fazendo?	5. Distratibilidade (atenção é desviada com excessiva facilidade para estímulos externos insignificantes ou irrelevantes)	? 1 2 3
... como passava o tempo? (trabalho, amigos, passatempos) Se envolvia em tantas atividades que os outros ficavam preocupados? SE NENHUMA ATIVIDADE AUMENTADA: estava fisicamente agitado(a)?	6. Aumento da atividade dirigida a objetivos (socialmente, no trabalho, na escola, sexualmente) ou agitação psicomotora ☐ aumento na atividade ☐ agitação psicomotora	? 1 2 3
... qual era a intensidade disso?		
Durante aquele tempo.... ... ele(a) fez qualquer coisa que pudesse trazer problemas para ele(a) mesmo(a) ou para a família? (comprando coisas que não precisava, comportamento sexual não habitual, direção imprudente)	7. Envolvimento excessivo em atividades prazerosas com um alto potencial para conseqüências dolorosas (envolvimento em gastos desenfreados em compras, indiscrições sexuais, investimentos financeiros tolos)	? 1 2 3
PELO MENOS TRÊS DOS SINTOMAS ACIMA (1 – 7) SÃO CODIFICADOS COMO 3 (4 SE APENAS HUMOR IRRITÁVEL)		1 3 Se codificado 1 vá para EM passado Se 3, seguir
SE DESCONHECIDO: Isso foi muito diferente da forma como você costumava ser (quando você não estava deprimido) Em que ele(a) estava diferente? No trabalho? Com os amigos? Descreva:	C. O episódio está associado com uma inequívoca alteração no funcionamento, que não é característica da pessoa quando assintomática.	? 1 2 3 Se 1 vá para critério EMP
SE DESCONHECIDO: Outras pessoas notavam a mudança nele(a)?	D.A perturbação do humor e a alteração no funcionamento são observáveis por outros?	? 1 2 3 Se 1 vá para critério EMP
SE DESCONHECIDO: Naquele tempo, ele(a) teve sérios problemas em casa ou no trabalho (escola) porque estava com os sintomas ou teve que ir para algum hospital?	E. O episódio não é suficientemente grave para causar prejuízo acentuado no funcionamento social ou ocupacional, ou para exigir a hospitalização, nem existem aspectos psicóticos	? 1 2 3 Se grave o suficiente para requerer hospitalização considerar EMP
Pouco antes disso começar ele(a) estava fisicamente doente? Ou Usando algum medicamento, álcool ou drogas?	F. Os sintomas não se devem aos efeitos fisiológicos diretos de uma substância ou de uma CMG (hipotireoidismo)	? 1 2 3 Se devido à CMG ou SUBST vá para EM passado Se 3, Episódio primário de humor, continuar
OS CRITÉRIOS A, B, C, D, E e F PARA EHMA SÃO CODIFICADOS COMO 3		1 3 1 = vá para EMP 3 = EHMA atual

EPISÓDIO MANÍACO PASSADO (EMP)

EMP	CRITÉRIOS	
Se os critérios não foram preenchidos para EMA substitua a frase "já houve algum outro momento..."	A. Um período distinto de humor anormal e persistentemente elevado expansível ou irritável	
Já houve algum período de tempo em que ele(a) se sentiu tão bem, "para cima", agitado(a) ou excitado(a), que outras pessoas pensavam que ele(a) não estava no seu normal ou que estava tão excitado(a) que se envolvia em problemas? (Isso era mais do que apenas se sentir bem?)		
SE NÃO: E quanto a períodos de tempo em que ele(a) estava tão irritado(a) que se pegava gritando com as pessoas ou começando brigas ou discussões? (Ele(a) se pegava gritando com pessoas que nem conhecia direito?)	1. _____ humor elevado 2. _____ humor irritável	? 1 2 3 Se 1, vá para Transtorno Distímico
SE SIM: Quando foi isso? Como foi isso? Quanto tempo durou (+1sem)? Ele(a) teve que ir para algum hospital? Já teve mais de um momento como aquele? (+ forte) Já teve qualquer momento como aquele no último ano?	Durando 1 semana ou menos se a hospitalização é necessária	
SE NEM ITEM 1 OU 2 SÃO CODIFICADOS 3 VÁ PARA EHM PASSADO		
DURANTE ESSE PERÍODO (1sem) Focalize no pior período do último mês do episódio atual SE DÚBIO: Durante o episódio quando ele(a) esteve mais ..... (equivalente para mania)	B. Durante o período de perturbação do humor, três ou mais dos seguintes sintomas persistiram (4, se o humor está apenas irritável) e estiveram presentes em grau significativo.	
Durante aquele tempo....		
... como ele(a) se sentia em relação a sim mesmo(a)?	1. Auto-estima inflada ou grandiosidade ☐ mais confiante do que o habitual? ☐ com algum poder ou habilidade especial?	? 1 2 3
... Precisava dormir menos que o habitual? Ainda assim se sentia descansado?	2. Necessidade diminuída de sono (sente-se repousado(a) depois de apenas 3 horas de sono)	? 1 2 3
... falava mais do que o habitual? (as pessoas tinham dificuldade em interromper ou entendê-lo(a), ou conseguir uma brecha quando ele(a) falava?	3. Mais loquaz do que o habitual ou pressão para continuar falando	? 1 2 3
... os pensamentos passavam rapidamente pela cabeça dele(a)?	4. "Fuga de idéias" ou experiência subjetiva de que os pensamentos estão correndo	? 1 2 3
... era facilmente distraído(a) por coisas a sua volta que tinha dificuldade para se concentrar ou continuar o que estava fazendo?	5. Distraibilidade (atenção é desviada com excessiva facilidade para estímulos externos insignificantes ou irrelevantes)	? 1 2 3
... como passava o tempo? (trabalho, amigos, passatempos) Se envolvia em tantas atividades que os outros ficavam preocupados? SE NENHUMA ATIVIDADE AUMENTADA: estava fisicamente agitado(a)?	6. Aumento da atividade dirigida a objetivos (socialmente, no trabalho, na escola, sexualmente) ou agitação psicomotora ☐ aumento na atividade ☐ agitação psicomotora	? 1 2 3
Durante aquele tempo.... ... ele(a) fez qualquer coisa que pudesse trazer problemas para ele(a) mesmo(a) ou para a família? (comprando coisas que não precisava, comportamento sexual não habitual, direção imprudente)	7. Envolvimento excessivo em atividades prazerosas com um alto potencial para conseqüências dolorosas (envolvimento em gastos desenfreados em compras, indiscrições sexuais, investimentos financeiros tolos)	? 1 2 3
PELO MENOS TRÊS DOS SINTOMAS ACIMA (1 – 7) SÃO CODIFICADOS COMO 3 (4 SE APENAS HUMOR IRRITÁVEL)		1 3 Se codificado 1 vá para transtorno distímico Se 3, seguir

SCID SEÇÃO A - EPISÓDIOS DE HUMOR

EPISÓDIO DEPRESSIVO MAIOR (EDM) ATUAL

EDM	CRITÉRIOS	
	A. Cinco ou mais dos seguintes sintomas estiveram presentes durante o mesmo período de 2 sem e representam uma alteração a partir de um funcionamento anterior; pelo menos um dos sintomas é 1 Humor Deprimido ou 2 Anedonia	
No último mês houve algum período de tempo em que ele(a) se sentiu deprimido(a), na pior, na maior parte do dia, quase todos os dias?	1. Humor deprimido na maior parte do dia, quase todos os dias, indicado por relato subjetivo (sente-se triste ou vazio) ou observação feita por outros (chora muito).	? 1 2 3
SE SIM: Como foi isso? Quanto tempo durou (+2sem)?		
.... e quanto a perder o interesse ou o prazer pelas coisas que costumava gostar?	2. Interesse ou prazer acentuadamente diminuídos por todas ou quase todas as atividades na maior parte do dia, quase todos os dias	? 1 2 3
SE SIM: Isso acontecia quase todos os dias? Quanto tempo durou (+2sem)?		
	SE NEM ITEM 1 OU 2 SÃO CODIFICADOS 1 VÁ PARA EDM PASSADO	
DURANTE ESSE PERÍODO (2sem) .. perdeu ou ganhou peso? Qto? SE NÃO: como estava seu apetite, comparado com o habitual? Tinha que forçar para comer/ comia menos do que o habitual? Quase todos os dias?	3. Perda ou ganho de peso significativo, sem estar em dieta (alteração de +5%/ 1m) OU diminuição ou aumento do apetite quase todos os dias? ☐ perda de peso ou diminuição do apetite ☐ ganho de peso ou aumento do apetite	? 1 2 3
... como estava seu sono? (dificuldades para pegar no sono, açodar freq, dificuldade para continuar dormindo, dormindo demais)	4. Insônia ou hipersonia quase todos os dias ☐ insônia ☐ hipersonia	? 1 2 3
... ele(a) estava tão inquieto(a) ou agitado(a) que não era capaz de ficar parado(a)? Isso era tão forte que outras pessoas notavam? Quase todos os dias?	5. Agitação ou retardo psicomotor quase todos os dias (observáveis por outros) ☐ retardo psicomotor ☐ agitação psicomotora	? 1 2 3
... com o estava sua energia? (cansado o tempo inteiro? Quase todos os dias?)	6. Fadiga ou perda de energia quase todos os dias	? 1 2 3
Como se sentia em relação a si mesmo? (inútil, sem valor? Quase todos os dias) SE NÃO: e quanto a se sentir culpado por coisas que fez ou deixou de fazer? Quase todos os dias?	7. Sentimento de inutilidade ou de culpa excessiva ou inadequada (que pode ser delirante), quase todos os dias (não recriminação ou culpa por estar doente) CODIFIQUE 1 OU 2 APENAS PARA BAIXA AUTO-ESTIMA ☐ inutilidade ☐ culpa inadequada	? 1 2 3
... tinha dificuldade de pensar ou de se concentrar? Quase todos os dias?	8. Capacidade diminuída de pensar ou concentrar-se, ou indecisão, quase todos os dias (relato ou observação feita outros) ☐ capacidade de pensar diminuída ☐ indecisão	? 1 2 3
... As coisas estavam tão ruins que ele(a) pensava em muito em morte ou que estaria em melhor situação se estivesse morto(a)? Pensava em se ferir? SE SIM: Fez alguma coisa para se ferir?	9. Pensamentos recorrentes de morte (não apenas medo de morrer), ideação suicida recorrente sem um plano específico, tentativa de suicídio ou plano suicida (CODIFIQUE 1 PARA AUTOMUTILAÇÃO SEM IDEAÇÃO SUICIDA) ☐ pensamentos de morte recorrentes ☐ ideação suicida ☐ plano específico ☐ tentativa de suicídio	? 1 2 3

PELO MENOS CINCO DOS SINTOMAS ACIMA (1 - 9) SÃO CODIFICADOS COMO 3 E PELO MENOS UM DELES É 1 OU 2		? 1 2 3 Se codificado 3, vá para EDM passado Se 3 siga
SE DÚBIO: Durante esse período ficou difícil para ele(a) trabalhar, cuidar das coisas em casa ou se relacionar com outras pessoas?	C. Os sintomas causam sofrimento clinicamente significativo ou prejuízo no funcionamento social ou ocupacional	? 1 2 3 Se 1 vá para EDM passado
Pouco antes disso começar ele(a) estava fisicamente doente? Ou Usando algum medicamento, álcool ou drogas?	D. Os sintomas não se devem aos efeitos fisiológicos diretos de uma substância ou de uma CMG (hipotireoidismo)	? 1 2 3 Se codifico 1 CMG ou SUBST vá para EDM passado Se 3, teve alguém período de humor, continuar
Isso começou logo após a morte de alguém próximo?	E. Os sintomas não são melhor explicados por luto. Após a perda de ente querido os sintomas permanecem por mais de 2m ou são caracterizados por acentuado prejuízo funcional, ideação suicida ou SS psicóticos	1 3 Se 1 = luto simples, vá para EDM passado Se 3 = Não é luto simples continuar
OS CRITÉRIOS A, C, D E E PARA EDM SÃO CODIFICADOS COMO 3		1 3 1 = EDM passado 3 = EDM atual
Qtas vezes diferentes esteve deprimido quase todos os dias, por 2sem, e teve muito dos sintomas descritos?	Numero total de EDM incluindo o atual CODIFIQUE 99 SE MUITOS NUMEROSOS OU INDISTINTO PARA CONTAR	

COM CARACTERÍSTICAS MELANCÓLICAS	CRITÉRIOS	
A. Qualquer um dos seguintes, ocorrendo durante o período mais intenso do episódio atual		? 1 2 3
Durante o período do episódio atual quando ele(a) se sentiu pior?	1. Perda de prazer por todas ou quase todas as atividades	? 1 2 3
Se alguma coisa boa lhe acontecesse ou alguém tentasse animálo(a), ele(a) se sentia melhor pelo menos por algum momento?	2. Falta de reatividade a estímulos habituais agradáveis (não se sente muito melhor, mesmo que temporariamente, quando alguma coisa boa acontece)	? 1 2 3 Se nem item 1 ou 2 são codificados como 3 vá para Caract atípicas
B. Três ou mais dos seguintes		? 1 2 3
Durante o período em que ele(a) se sentiu pior, o sentimento referido era diferente daquele que teria se alguém próximo morresse?	1. Qualidade distinta de humor depressivo (vivenciado como diferente do tipo de sentimento experimentado após a morte de alguém próximo)	? 1 2 3
Costumava se sentir pior pela manhã?	2. A depressão é regularmente pior pela manhã	? 1 2 3
A que horas acorda pela manhã (qto tempo mais cedo do que o habitual?)	3. Despertar muito cedo pela manhã (pelo menos 2h antes do habitual)	? 1 2 3
Retomar avaliação acima	4. Acentuado retardo ou agitação psicomotora	? 1 2 3
Retomar avaliação acima	5. Anorexia ou perda de peso significativa	? 1 2 3
Retomar avaliação acima	6. Culpa excessiva ou inadequada	? 1 2 3
PELO MENOS TRÊS ITENS B SÃO CODIFICADOS COMO 3		1 3 Se 1 vá para caract atípicas
OS CRITÉRIOS A E B SÃO CODIFICADOS COMO 3		1 3 SE 3 = COM CARACT MELANCÓLICAS

COM CARACTERÍSTICAS ATÍPICAS	CRITÉRIOS	
Se EDM atual tiver características melancólicas ou catatônicas vá para Episódio Atual Maníaco		
As seguintes características devem predominar durante as 2sem mais recentes de um EDM		
Nas últimas duas semanas, se alguma coisa boa lhe acontecesse ou alguém tentasse animálo(a), ele(a) se sentia melhor pelo menos por algum momento?	A. Reatividade do humor (humor melhora em resposta a eventos positivos reais ou potenciais)	? 1 2 3 Se 1 vá para Episódio maníaco Atual
B. Duas ou mais das seguintes características		
Codificar como anterior	1. Ganho de peso ou aumento de apetite significativos	? 1 2 3
Quantas horas costuma dormir?	2. Hipersonia.	? 1 2 3
Braços e pernas com freq. ficam pesados?	3. Paralisia de chumbo (sensação de peso)	? 1 2 3
Era especialmente sensível ao modo como os outros o(a) tratavam? Quando alguém o(a) rejeitava ele(a) ficava na pior ou com raiva? Evitava fazer coisas ou estar com pessoas com medo de ser rejeitado(a)?	4. Padrão persistente de sensibilidade a rejeição interpessoal que resulta em prejuízo social ou ocupacional significativo	? 1 2 3
PELO MENOS TRÊS ITENS B SÃO CODIFICADOS COMO 3		2 3 Se 3 = vá para episódio maníaco atual
C. Não preencheram os critérios para "Com características Catatônicas" Ou "melancólicas" durante o mesmo episódio		1 Vá para Episódio Maníaco Atual
OS CRITÉRIOS A, B e C SÃO CODIFICADOS COMO 3		1 3 SE 1 = vá para episódio maníaco atual Se 3 = com caract atípicas

EPISÓDIO DEPRESSIVO MAIOR (EDM) PASSADO

EDM PASSADO	CRITÉRIOS	
	A. Cinco ou mais dos seguintes sintomas estiveram presentes durante o mesmo período de 2 sem e representam uma alteração a partir de um funcionamento anterior; pelo menos um dos sintomas é 1 Humor Deprimido ou 2 Anedonia.	
Já houve alguma vez na vida, algum período de tempo em que ele(a) se sentiu deprimido(a), na pior, na maior parte do dia, quase todos os dias?	1. Humor deprimido na maior parte do dia, quase todos os dias, indicado por relato subjetivo (sente-se triste ou vazio) ou observação feita por outros (chora muito).	? 1 2 3
SE SIM: Como foi isso? Quanto tempo durou (+2sem)?		
.... durante aquele tempo, ele(a) perdeu o interesse ou o prazer pelas coisas que costumava gostar?	2. Interesse ou prazer acentuadamente diminuídos por todas ou quase todas as atividades na maior parte do dia, quase todos os dias	? 1 2 3
SE SIM: Isso acontecia quase todos os dias? Quanto tempo durou (+2sem)?		
Já houve algum outro momento como aquele? Qual foi o pior?		
SE NEM ITEM 1 OU 2 SÃO CODIFICADOS 3 VÁ PARA EPISÓDIO MANÍACO PASSADO		
DURANTE AQUELE PERÍODO (2sem)... perdeu ou ganhou peso? Qto? SE NÃO: como estava seu apetite, comparado com o habitual? Tinha que forçar para comer/ comia menos do que o habitual? Quase todos os dias?	3. Perda ou ganho de peso significativo, sem estar em dieta (alteração de +5%/ 1m) OU diminuição ou aumento do apetite quase todos os dias? ☐ perda de peso ou diminuição do apetite ☐ ganho de peso ou aumento do apetite	? 1 2 3

... como estava seu sono? (dificuldades para pegar no sono, açodar freq, dificuldade para continuar dormindo, dormindo demais)	4. Insônia ou hipersonia quase todos os dias ☐ insônia ☐ hipersonia	? 1 2 3
... ele(a) estava tão inquieto(a) ou agitado(a) que não era capaz de ficar parado(a)? Isso era tão forte que outras pessoas notavam? Quase todos os dias?	5. Agitação ou retardo psicomotor quase todos os dias (observáveis por outros) ☐ retardo psicomotor ☐ agitação psicomotora	? 1 2 3
... com o estava sua energia? (cansado o tempo inteiro? Quase todos os dias?)	6. Fadiga ou perda de energia quase todos os dias	? 1 2 3
Como se sentia em relação a si mesmo? (inútil, sem valor? Quase todos os dias) SE NÃO: e quanto a se sentir culpado por coisas que fez ou deixou de fazer? Quase todos os dias?	7. Sentimento de inutilidade ou de culpa excessiva ou inadequada (que pode ser delirante), quase todos os dias (não recriminação ou culpa por estar doente) CODIFIQUE 1 OU 2 APENAS PARA BAIXA AUTO-ESTIMA ☐ inutilidade ☐ culpa inadequada	? 1 2 3
... tinha dificuldade de pensar ou de se concentrar? Quase todos os dias?	8. Capacidade diminuída de pensar ou concentrar-se, ou indecisão, quase todos os dias (relato ou observação feita outros) ☐ capacidade de pensar diminuída ☐ indecisão	? 1 2 3
... As coisas estavam tão ruins que ele(a) pensava em muito em morte ou que estaria em melhor situação se estivesse morto(a)? Pensava em se ferir? SE SIM: Fez alguma coisa para se ferir?	9. Pensamentos recorrentes de morte (não apenas medo de morrer), ideação suicida recorrente sem um plano específico, tentativa de suicídio ou plano suicida (CODIFIQUE 1 PARA AUTOMUTILAÇÃO SEM IDEAÇÃO SUICIDA) ☐ pensamentos de morte recorrentes ☐ ideação suicida ☐ plano específico ☐ tentativa de suicídio	? 1 2 3
PELO MENOS CINCO DOS SINTOMAS ACIMA (1 - 9) SÃO CODIFICADOS COMO 3 E PELO MENOS UM DELES É 1 OU 2		1 3 Se codificado 1, vá para EMA Se 3, segue
SE DÚBIO: Durante esse período ficou difícil para ele(a) trabalhar, cuidar das coisas em casa ou se relacionar com outras pessoas?	C. Os sintomas causam sofrimento clinicamente significativo ou prejuízo no funcionamento social ou ocupacional	? 1 2 3 Se 1 vá para EMA
Pouco antes disso começar ele(a) estava fisicamente doente? Ou Usando algum medicamento, álcool ou drogas?	D. Os sintomas não se devem aos efeitos fisiológicos diretos de uma substância ou de uma CMG (hipotireoidismo)	? 1 2 3 Se devido à CMG ou SUBST vá para EDM passado Se 3, Episódio primário de humor, continuar
Isso começou logo após a morte de alguém próximo?	E. Os sintomas não são melhor explicados por luto. Após a perda de ente querido os sintomas permanecem por mais de 2m ou são caracterizados por acentuado prejuízo funcional, ideação suicida ou SS psicóticos	1 3 Se 1 = luto simples, vá para EDM passado Se 3 = Não é luto simples, continuar
OS CRITÉRIOS A, C, D e E PARA EDM SÃO CODIFICADOS COMO 3		1 3 1 = Vá para EMA 3 = EDM passado
Qtos anos ele(a) tinha quando começou (EDM passado)?	Idade de início do EDM passado	
Qtas vezes diferentes esteve deprimido quase todos os dias, por 2sem, e teve muito dos sintomas descritos?	Numero total de EDM incluindo o atual CODIFIQUE 99 SE MUITOS NUMEROSOS OU INDISTINTO PARA CONTAR	

Anexo E- Procedimento operacional padrão para envio de amostras à Würzburg

PROTOCOLO ENVIO DE CASOS PARA A JULIUS- MAXIMILIAN UNIVERSIDADE DE WÜZBURGB- PARCERIA INTERNACION AL

A) Preparo das amostras conforme normas da "Concepta", certificado pelo IMMETRO, para remessa expressa de amostras biológicas

1- Proteger as amostras com 2 sacos plásticos Ziplog ou plástico de seladora grosso. Colocar 100ml de conservante dentro do primeiro saco plástico;
2- Tirar o máximo de ar de todo o plástico e vedar bem;
3- Embrulhar com fita adesiva para proteção;
4- Colocar nos potes, CUIDADO! Não deixar espaço dentro do porte, preencher com jornal nas laterais e um papel mais leve (lenços de papel ou papel toalha) em cima. NÃO PODE FAZER BARULHO AO TAMPAR E CHACOALHAR. Coloque as sílicas dentro dos potes.
5- Colocar na caixa de isopor, completar os espaços com jornal, isopor, etc...
6- Pesar todo o embrulho inclusive a caixa UN de papelão.
7- Lacrar tudo com fita adesiva, tanto o isopor quanto a caixa de papelão.

B) Solicitação e pagamento de Guia de Recolhimento da União (GRU)

*A GRU deve ser solicitada no e-mail importacao@ffm.br

Seguir o modelo de solicitação:

Modelo de email para pedir AWB

Solicito a emissão de 01 GRU que será utilizada para envio de amostras biológicas para fins de diagnóstico para o exterior. Abaixo seguem os dados para a emissão das mesmas:

Título do estudo/0**:** "Análise estereológica postmortem de regiões cerebrais de portadores de transtorno bipolar"

Nº CAPPesq: 740/09 e Nº CONEP:573/10

Fato Gerador: Anuência de exportação por meio de remessa expressa de material de natureza humana biológica, resultante de pesquisa científica em desenvolvimento no Brasil até 20 itens.

Nº do reconhecimento aéreo: Numero AWB (ver ficha carbonada)

Quantidade de materiais: **X fragmentos de tecido de sistema nervoso central humano.**

OBS: As GRU‘s que serão emitidas para este estudo serão pagas pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo- Processo 2009/51482-0.

A GRU deve ser paga antes de marcar a coleta.

C) Documentos necessários para remessa

1-Taxa de GRU com comprovante de pagamento original *

2-AWB- International Air Waybill (folhas carbonadas previamente fornecidas pela empresa transportadora)

Em 4 vias

3-Invoice em inglês

4-Cópia do Certificado da Concepta em nome do Centro de Estudos em Envelhecimento Cerebral

5-Declaração do Médico em português e inglês

6-Aprovação do comitê de ética local e nacional

7-Termo de Responsabilidade Exportação destinada a diagnostico laboratorial.

Em 1 via:

8-Termo de Consentimento Livre e Esclarecido das amostras selecionadas.

CUIDADOS ESSENCIAIS

Todos os documentos devem estar prontos no horário agendado.

Atenção ao preencher os documentos, datas e pesos devem ser corrigidos.

D) Modelo dos documentos

BIOLOGICAL COMMERCIAL INVOICE - FATURA COMERCIAL P/ BIOLOGICOS

(Preencher em INGLÊS)

International Air Waybill No. - No.Conhecimento Aéreo:	All shipments must be accompanied by a Fedex International Air Waybill. Todos os embarques devem ser acompanhados de Conhecimento Aéreo da Fedex.
CNPJ / CPF:	
Passport / Passaporte (for Foreigners / para Estrangeiros):	

1. Date of Exportation - Data de Envio:	2. Export References - Referências de Exportação:
3. Shipper/Exporter (complete name & address) - Embarcador/Exportador (razão social & endereço completo)	4. Consignee (complete name & address) Consignatário (razão social & endereço completo)
5. Country of Export - País de Exportação	8. Importer - If other than Consignee (complete name & address) - Importador - caso haja outro que não o Consignatário (razão social & endereço completo)
6. Country of Manufacture - País de Fabricação	
7. Country of Ultimate Destination - País de destino final	

9.Marks/No. Códigos/No.	10.No.of Pkgs. No. Pacotes	11. Pack-aging Emba-lagem	12. Biological Samples - Amostra Biológicos ( )Blood/Sangue - Type/Tipo:_____ ( )Others/Outros (Bellow full Description & purpose / Descrição completa e finalidade abaixo)	13.Qty Quanti-dade	14. Unit of Measure Unidade de medida	15.Weight Peso	16.Unit Value Valor Unitario	17. Total Value Valor Total
	18.Total No. of Pkgs Total de Pacotes		( ) Dry Ice / Gelo Seco (X) Doctor´s Declaration/A.Médico (em inglês /CRM-Médico / CNPJ-Hospital) ( ) Helth Dept. Declaration / Declaração p/ Minis. Saúde			19. Total Weight Peso total	20. Total Invoice Value Valor total da Fatura	

I declare all the information contained in this invoice to be true and correct.
Declaro serem verdadeiras e corretas todas as informações contidas nesta fatura.

21. Signature of Shipper/Exporter (Type name and title and sign) Assinatura do Embarcador/Exportador (nome, título e assinatura) Title/Cargo _____ Name/Nome Signature/Assinatura	22. Date - Data

Declaração médica

São Paulo, de de

Declaro que o material biológico que está sendo enviado nesse carregamento se trata de material não-infeccioso. O diagnostico clínico de todos os pacientes é de suspeita de Doença de Alzheimer.

O material está sendo enviado ao Prof. Dr_____do Departamento de _____da Universidade _____, _____ para que análises de imagem e laboratoriais realizados naquela clinica possam auxiliar no esclarecimento diagnóstico desses casos. O próprio está em posse do material

A cópia da autorização expedida pelo Conselho de Ética para Pesquisas do Hospital das Clinicas da Universidade de São Paulo, assim como dos Termos de Consentimentos autorizando o uso deste material, se encontram em anexo.

Coloco-me a disposição para quaisquer esclarecimentos que venham a ser necessários

Sem mais,

_____

Nome e assinatura

Medical Declaration

Sao Paulo, th

I declare that the biological material being sent charging that it is non-infectious material. The clinical diagnosis of all patients is suspected bipolar diseases or Alzheim er's Disease

The material is being sent to Prof.Dr. _____Department of _____, _____University, _____for analysis and image Clinical laboratory findings that may help clarify the diagnosis in these cases.

A copy of the authorization issued by the Board of Ethics Research for the Clinic Hospital of , University Sao Paulo, as well as the Terms of Consents authorizing the use of this material, are annexed.

I am disposal for any clarifications.

_____

Name and signature

TERMO DE RESPONSABILIDADE

EXPORTAÇÃO DESTINADA A DIAGNÓSTICO LABORATORIAL CLÍNICO

São Paulo, de de 20

À
Agência Nacional de Vigilância Sanitária
Gerência Geral de Portos, Aeroportos e Fronteiras
Coordenação de Vigilância Sanitária de Portos, Aeroportos e Fronteiras
Posto Aeroportuário de Guarulhos
A Fundação Faculdade de Medicina neste ato representado pelo seu representante legal e pelo profissional responsável pelo ensaio, declara que a mercadoria:

Seqüencial	**Identificação do material biológico sob exportação**	**Nº. de unidades**	**Especificação do(s) tipo(s) de análise(s)**

Será exportada para não utilização em seres humanos e destinada exclusivamente para a finalidade de:

	- diagnóstico laboratorial clínico com fins comerciais
	- diagnóstico laboratorial clínico com fins não comerciais
	- desenvolvimento/instalação de metodologia para diagnóstico laboratorial
x	- diagnóstico laboratorial clínico vinculado à pesquisa clínica no território nacional
	- diagnóstico laboratorial clínico vinculado à pesquisa clínica no exterior
	- diagnóstico laboratorial clínico vinculado à triagem para transplante

Participamos ainda as seguintes informações:

a) Nome do Projeto: Análise estereológica postmortem de regiões cerebrais de portadores de transtorno bipolar
b) *Número do CE (código de ética) O nome e endereço completo e país da instituição remetente*;
c) *O país de origem do material que integra o material importado*;
d) *Nome e endereço completo da instituição destinatária*;
Nome e endereço completo do local onde irá realizar-se o diagnóstico laboratorial;
e) *Nome e respectivo resgistro no conselho de classe do pesquisador da instituição responsável pela pesquisa*;

_____

Assinatura do Responsável pela Pesquisa

N° 3718/11

CERTIFICATE OF CONFORMANCE

CUSTOMER:
ADDRESS:
ZIP CODE:
CITY: **STATE:** **COUNTRY:**
C.N.P.J.: **STATE REGISTER:**

This CERTIFICATE OF CONFORMANCE, is the guarantee that all the materials described below, were tested and controlled accordingly with the specifications, projects, and the international regulations, attending all the solicitations and requirements.

Part Number	Quant.	Packaging Number	Serial Number	Shipper's Declaration	N° UN
GU7	07	-	242 389 A 242 395	**********	UN 3373

This Certificate of Conformance shall accompany the UN classified dangerous goods shipment.

São Paulo,

CONCEPTA
DG COMPLIANCE LTDA.

The quality of the fibreboard box mentioned herein is guaranteed for 2 years from the manufacturing date when storage under controlled conditions – temperature at 23°C ± 2°C and humidity at 50% ± 2% RH.

Rua Teresina, 185/187 - Mooca - CEP: 03105-010 - São Paulo - SP - Brasil - Tel.: +55 (11) 2692-1700 - Fax.: +55 (11) 2692-1701
www.conceptaconf.br - conceptaa@conceptaconf.br

concepta
D.G. COMPLIANCE

EMBALAGEM GU7

INSTRUÇÃO DE MONTAGEM

1º Passo: Feche o fundo da caixa e aplique 3 tiras de fita adesiva no centro, e 1 em cada lateral, conforme figura acima.

2º Passo: Vire a caixa, abra suas abas e insira a caixa de EPS.

3º Passo: Insira o disco de absorção no fundo do pote. Coloque a sua embalagem já com o produto no saco polibolha, feche-o e mais dentro do pote.
OBS.: Não coloque gelo seco dentro do pote.

4º Passo: Encaixe o caço de EPS na tampa do pote, conforme indicado acima.

5º Passo: Coloque o pote centralizando-o no fundo da caixa de EPS e preencha o restante dos espaços com gelo seco ou gelo reutilizável.

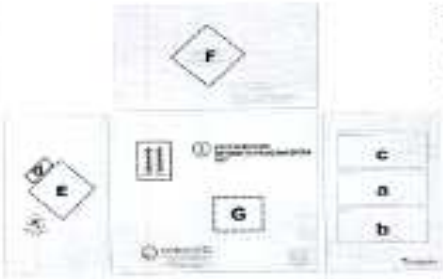
6º Passo: Encaixe a tampa da caixa de EPS.

7º Passo: Feche as abas menores, e em seguida a aba que contém o texto "CAUTION".

8º Passo: Feche encaixando a lingueta conforme o detalhe. Aplique 1 tira de fita adesiva no centro da caixa e 1 em cada lateral, como demonstrado na figura acima.

INSTRUÇÃO DE ROTULAGEM

Insira na caixa apenas as etiquetas assinaladas na legenda:



- a- Shipper (X)
- b- Consignee (X)
- c- Etiqueta UN (X)
- d- Net Quantity (X)
- E- Etiqueta de Risco Principal (X)
- F- Etiqueta de Risco Secundário ( )
- G- Etiqueta de Manuseio ( )

OBS.: _____

INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

- *OPÇÕES DE POTES*

PTAC 10* | PTPI 2,6** | PTPI 10**

Torque*: 2,0 - 2,4 kgf.m | T**: 0,8 - 1kgf.m

OBS.: Não coloque gelo seco dentro do pote. Não manuseie gelo seco sem luvas, pois há risco de queimaduras graves.

concepta
D.G. COMPLIANCE

EMERGENCY GUIDE – UN3373

GUIDE 158
ORANGE PAGE 262
INFECTIOUS SUBSTANCES
POTENTIAL HAZARDS

HEALTH

- Inhalation or contact with substance may cause infection, disease or death.
- Runoff from fire control may cause pollution.
- **Note: Damaged packages containing solid CO2 as a refrigerant may produce water or frost from condensation of air. Do not touch this liquid as it could be contaminated by the contents of the parcel.**

FIRE OR EXPLOSION

- Some of these materials may burn, but none ignite readily.
- Some may be transported in flammable liquids.

PUBLIC SAFETY

- **CALL Emergency Response Telephone Number on Shipping Paper first. If Shipping Paper not available or no answer, refer to appropriate telephone number listed on the inside back cover.**
- As an immediate precautionary measure, isolate spill or leak area for at least 25 meters (75 feet) in all directions.
- Keep unauthorized personnel away.
- Stay upwind.
- Obtain identity of substance involved.

PROTECTIVE CLOTHING

- Wear positive pressure self-contained breathing apparatus (SCBA).
- Structural firefighters' protective clothing will only provide limited protection.

FIRE

Small Fire

- Dry chemical, soda ash, lime or sand.

Large Fire

- Use extinguishing agent suitable for type of surrounding fire.
- Do not scatter spilled material with high pressure water streams.
- Move containers from fire area if you can do it without risk.

SPILL OR LEAK

- Do not touch or walk through spilled material.
- Do not touch damaged containers or spilled material unless wearing appropriate protective clothing.
- Absorb with earth, sand or other non-combustible material.
- Cover damaged package or spilled material with damp towel or rag and keep wet with liquid bleach or other disinfectant.
- **DO NOT CLEAN-UP OR DISPOSE OF, EXCEPT UNDER SUPERVISION OF A SPECIALIST.**

FIRST AID

- Move victim to a safe isolated area.

CAUTION: Victim may be a source of contamination.

- Call 911 or emergency medical service.
- Remove and isolate contaminated clothing and shoes.
- In case of contact with substance, immediately flush skin or eyes with running water for at least 20 minutes.
- Effects of exposure (inhalation, ingestion or skin contact) to substance may be delayed.
- **For further assistance, contact your local Poison Control Center.**
- Ensure that medical personnel are aware of the material(s) involved and take precautions to protect themselves.

Anexo F- Guias rápidos dos programas computacionais aplicados

1-Tratamento das imagens pré-reconstrução no Amira

Enumerar as fatias dentro da imagem (foto) - Usar o programa Irfanview;

Criar uma pasta semelhante das fatias e assumí-la ao final como enumeradas;

Para renomear a pasta nova usar comandos F2, selecionar arquivo, ctrl c+ ctrl e renomear;

2- Edição no Irfan view

Usar a ferramenta *batch conversion rename;*

Selecionar a pasta de origem (lado esquerdo);

Selecionar a pasta de destino (lado direito);

Selecionar opção avançada de configurações: *advanced* e seguir os passos:

Add overlay text > *Settings* - Atribuir os valores para as coordenadas: x: 1500 e750; y: 20 e 150

Selecionar a posição ond eo número deve aparaecer: *Left bottom*: $F e a fonte: Arial size 72

Fazer um teste: Selecionar a primeira figura , clicar em *start batch* (abrir a pasta e verificar se o nome está em boa posição na figura)

Clicar em *Return batch*

Por fim, deletar a pasta não nomeada

3- Edição no Photoshop - PSD CS5

O Amira trabalha com imagens em preto e branco, por isso, nesta etapa precisamos mudar a cor da imagem de todas as fatias.

Criar uma ação para preto e branco e redução de tamanho.para isso seguir:

Open> seleciona a primeira foto> clica em *Image*> em seguida em *Mode*> escolhe a escala de cores: *Grayscale*> e autoriza a retirada da cor atual, clica em *Discard color*

Para mudar o tamanho: clica em *Image*> seleciona a opção*: Image size*>

Precisa deselecionar o *Resample image*> atribui os valores 18 ou 180 e 12 ou 120 > e seleciona *Resample image* novamente . (Depende do tamanho da figura: se tem pixels na ordem de 1000 usa 18, se tem pixels na ordem de 100, salva 120)

Escolha a resolução: 80 ou 72.

Salve na nova pasta com *Save as e* fecha;

Em File, selecione *Automate batch.*

Selecione a pasta com todas as imagens como a de origem e uma nova pasta para as imagens em preto e branco. Clique em Enter. Todas as imagens mudarão automaticamente.

4- Uso do Amira versão 5.2.2

Ao abrir o progarama clicar em *Open Data*

Selecionar a pasta em preto e branco e com redução de tamanho, editada no PSD CS5;

Selecionar todas as imagens;

Abrir o *Orthoslice* e verificar na rolagem se estão todas as imagens em sequencia;

Para alinhar as secções, ir na barra de ferramentas clicar em *Compute* e *Align Slices>* em seguida em *Edit>* escolher a opção: *Red and Green*;

Alinhar as imagens, as cores vermlha e verde precisam se sobrepor;

Ao finalizar clique em *Resample*, e salve: *file* e *save network as*. Nomeie com o numero, hemisfério, espessura. Selecionar *script and data files*. Clique em *save* e autorize a substituição *owerwrite;*

Para começar a a reconstruir clicar em *Compute*, em seguida, *Labelling* e *Label Field Inside* e *ok*

Calibrar a imagem, para isso: clicar no desenho da régua e medir 10 mm na régua da foto, aparecerá o valor em pixels

Calcular voxel de 1mm, considerar 1 mm= x pixels

voxel= espessura (0,44 mm) x pixel (x)= voxel

Entrar em especificações e inserir o voxel calculado

Delineando com o Amira

Na janela principal, clicar *em Label field*. Selecionar a opção *freehand* e *autotrace*.

Em seguida selecionar *trace edges*

Traçar a borda de todas as fatias ao finalizar voltar para a janela principal clicar em *Labels* e *surface gen*. A imagem reconstruída aparacerá ao clicar em *surface view*

Salvar, como save network as e selecionar na janela de salvamento.

Anexo G - Tabela de dados brutos

Individuo	Diag.	Nv AM (Ne/mm³)	Nv MO (Ne/mm³)	Nv AL (Ne/mm³)	Nv COF (Ne/mm³)F	V AM (mm³)	VMO (mm³)	V AL (mm³)	V COF(mm³)	Ne AM	Ne MO	Ne AL	Ne COF	Ne COF2
1	TAB	20.296	19.968	18.846	19.703	381	366	424	1.172	7.739.910	7.313.153	7.999.693	23.093.732	23.052.757
2	TAB	11.737	11.504	11.644	11.628	304	448	392	1.145	3.579.074	5.158.913	4.569.098	13.323.621	13.307.086
3	TAB	10.475	10.709	10.195	10.459	357	563	459	1.379	3.742.551	6.029.390	4.684.757	14.432.483	14.456.699
4	TOC	21.698	19.313	20.408	20.373	351	753	562	1.668	7.629.701	14.558.829	11.315. 370	33.986.156	33.503.901
5	TOC	14.730	16.227	16.086	15.681	345	442	203	992	5.090.555	7.187.041	3.280.032	15.561.950	15.557.629
6	SOC	17.910	18.097	20.108	18.705	409	499	448	1.357	7.340.403	9.034.560	9.021.554	25.396.408	25.396.518
7	TOC	13.421	16.180	15.806	15.135	278	490	408	1.178	3.740.663	7.944.214	6.459.365	17.835.450	18.144.243
8	TOC	19.547	18.705	20.108	19.453	482	478	521	1.482	9.440.263	8.953.086	10.479.259	28.844.378	28.872.609
9	SOC	13.000	14.917	14.777	14.231	524	439	375	1.339	6.815.004	6.551.971	5.552.757	19.059.031	18.919.732
10	TOC	15.525	17.957	14.637.	16.040	348	652	486	1.487	5.413.102	11.714.370	7.113.987	23.851.909	24.241.460
11	Controle	15.993	17.162	17.817	16.990	449	826	387	1.662	7.182.000	14.177.074	6.903.469	28.248.792	28.262.543
12	Controle	18.892	24.410	20.482	21.262	547	638	715	1.901	10.334.419	15.593.407	14.661283	40.431.654	40.589.111
13	Controle	21.791	21.604	19.781	21.059	154	411	334	900	3.369.390	8.890.172	6.616.555	18.965.890	18.876.119
14	Controle	21.230	20.716	21.371	21.106	274	409	375	1.059	5.819.794	8.486.275	8.030.411	22.362.359	22.336.481
15	Controle	23.381	23.241	27.497	24.706	433	697	514	1.645	10.139.917	16.206.699	14.143.456	40.651.227	40.490.074
16	Controle	19.032	17.817	18.986	18.612	442	628	526	1.596	8.418.032	11.194.814	9.987.934	29.717.333	29.600.781
17	Controle	35.493	34.839	34.371	34.901	251	557	570	1.379	8.775.510	19.422.119	19.872.798	48.158.463	48.072.427

9. REFERÊNCIAS

9. Referências

Adler, C M, Mcdonough-Ryan, P, Sax, K W, *et al.* fMRI of neuronal activation with symptom provocation in unmedicated patients with obsessive compulsive disorder. *J.Psychiatr.Res.* 2000; 34 (4-5): 317-24.

Alcântara, I, Schmitt, R, Schwarzthaupt, a W, *et al.* Avanços no diagnóstico do transtorno do humor bipolar. *R. Psiquiatr.* 2003; 25 (1): 22-32.

Alexander, G E, Delong, M R e Strick, P L. Parallel organization of functionally segregated circuits linking basal ganglia and cortex. *Annu.Rev.Neurosci.* 1986; 9: 357-81.

Almeida, P e Wickerhauser, H. *O critério ABA/ ABIPME - em busca de uma atualiazação: um estudo e uma proposta submetidos á ABA e ABIPEME*. São Paulo: Editora da Associação Brasileira dos Institutos de Pesquisa de Mercado 1991.

Altshuler, L L, Bartzokis, G, Grieder, T, *et al.* Amygdala enlargement in bipolar disorder and hippocampal reduction in schizophrenia: an MRI study demonstrating neuroanatomic specificity. *Arch.Gen.Psychiatry.* 1998; 55 (7): 663-64.

Altshuler, L L, Bookheimer, S Y, Townsend, J, *et al.* Blunted activation in orbitofrontal cortex during mania: a functional magnetic resonance imaging study. *Biol Psychiatry.* 2005; 58 (10): 763-69.

American Psychiatry Association. *Diagnostic and statistical manual of mental disorders*. Arlington: American Psychiatry Publishing 4ª. 2000.

American Psychiatry Association, A. *Consensus report of the APA work group on neuroimaging amrkers of psychiatry disorders- resource document*. p.1-39. 2012

Andrade, L, Walters, E E, Gentil, V, *et al.* Prevalence of ICD-10 mental disorders in a catchment area in the city of Sao Paulo, Brazil. *Soc.Psychiatry Psychiatr.Epidemiol.* 2002; 37 (7): 316-25.

Andrade, L H, Viana, M C, Tofoli, L F, *et al.* Influence of psychiatric morbidity and sociodemographic determinants on use of service in a catchment area in the city of Sao Paulo, Brazil. *Soc. Psychiatry Psychiatr.Epidemiol.* 2008; 43 (1): 45-53.

Andreazza, a C, Kauer-Sant'anna, M, Frey, B N, *et al.* Oxidative stress markers in bipolar disorder: a meta-analysis. *J Affect.Disord.* 2008; 111 (2-3): 135-44.

Angst, J, Azorin, J M, Bowden, C L, *et al.* Prevalence and characteristics of undiagnosed bipolar disorders in patients with a major depressive episode: the BRIDGE study. *Arch.Gen.Psychiatry.* 2011; 68 (8): 791-98.

Angst, J e Marneros, A. Bipolarity from ancient to modern times: conception, birth and rebirth. *J Affect.Disord.* 2001; 67 (1-3): 3-19.

Angst, J e Sellaro, R. Historical perspectives and natural history of bipolar disorder. *Biol Psychiatry.* 2000; 48 (6): 445-57.

Aouizerate, B, Cuny, E, Martin-Guehl, C, *et al.* Deep brain stimulation of the ventral caudate nucleus in the treatment of obsessive-compulsive disorder and major depression. Case report. *J.Neurosurg.* 2004; 101 (4): 682-86.

Arumugham, S S e Reddy, J Y. Augmentation strategies in obsessive-compulsive disorder. *Expert.Rev.Neurother.* 2013; 13 (2): 187-202.

Atmaca, M, Yildirim, H, Ozdemir, H, *et al.* Hippocampus and amygdalar volumes in patients with refractory obsessive-compulsive disorder. *Prog.Neuropsychopharmacol.Biol.Psychiatry.* 2008; 32 (5): 1283-86.

Barbas, H. Specialized elements of orbitofrontal cortex in primates. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 2007; 1121: 10-32.

Bartholomeusz, C F, Whittle, S L, Montague, A, *et al.* Sulcogyral patterns and morphological abnormalities of the orbitofrontal cortex in psychosis. *Prog.Neuropsychopharmacol.Biol Psychiatry.* 2013; 44: 168-77.

Baxter, L R, Jr., Schwartz, J M, Phelps, M E, *et al.* Reduction of prefrontal cortex glucose metabolism common to three types of depression. *Arch.Gen.Psychiatry.* 1989; 46 (3): 243-50.

Baxter, L R, Jr., Thompson, J M, Schwartz, J M, *et al.* Trazodone treatment response in obsessive-compulsive disorder--correlated with shifts in glucose metabolism in the caudate nuclei. *Psychopathology.* 1987; 20 (1): 114-22.

Bearden, C E, Soares, J C, Klunder, a D, *et al.* Three-dimensional mapping of hippocampal anatomy in adolescents with bipolar disorder. *J.Am.Acad.Child Adolesc.Psychiatry.* 2008; 47 (5): 515-25.

Beasley, C L, Chana, G, Honavar, M, *et al.* Evidence for altered neuronal organisation within the planum temporale in major psychiatric disorders. *Schizophr Res.* 2005; 73 (1): 69-78.

Bechara, A, Damasio, H e Damasio, a R. Emotion, decision making and the orbitofrontal cortex. *Cereb.Cortex.* 2000; 10 (3): 295-307.

Beck, E. A cytoarchitectural investigation into the boundaries of cortical areas 13 and 14 in the human brain. *J Anat.* 1949; 83 (Pt 2): 147-57.

Becker, a C, Oliveira, K C, Ferretti, R E L, *et al. Deteção de transtornos psiquiátricos em idosos através de entrevista postmortem*. XVIII Congresso Brasileiro de Geriatria e Gerontologia - 22/05/2012 a 25/05/2012 Rio de Janeiro, 2012. 504-04 p

Benes, F M, Lim, B, Matzilevich, D, *et al.* Circuitry-based gene expression profiles in GABA cells of the trisynaptic pathway in schizophrenics versus bipolars. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008; 105 (52): 20935-40.

Benes, F M, Vincent, S L e Todtenkopf, M. The density of pyramidal and nonpyramidal neurons in anterior cingulate cortex of schizophrenic and bipolar subjects. *Biol.Psychiatry.* 2001; 50 (6): 395-406.

Berrios, G E. Obsessive-compulsive disorder: its conceptual history in France during the 19th century. *Compr.Psychiatry.* 1989; 30 (4): 283-95.

Beyer, J L, Kuchibhatla, M, Payne, M E, *et al.* Hippocampal volume measurement in older adults with bipolar disorder. *Am.J.Geriatr.Psychiatry.* 2004; 12 (6): 613-20.

Bezchlibnyk, Y B, Sun, X, Wang, J F, *et al.* Neuron somal size is decreased in the lateral amygdalar nucleus of subjects with bipolar disorder. *J Psychiatry Neurosci.* 2007; 32 (3): 203-10.

Bielau, H, Trubner, K, Krell, D, *et al.* Volume deficits of subcortical nuclei in mood disorders A postmortem study. *Eur.Arch.Psychiatry Clin.Neurosci.* 2005; 255 (6): 401-12.

Blumberg, H P, Leung, H C, Skudlarski, P, *et al.* A functional magnetic resonance imaging study of bipolar disorder: state- and trait-related dysfunction in ventral prefrontal cortices. *Arch.Gen.Psychiatry.* 2003; 60 (6): 601-09.

Bouras, C, Kövari, E, Hof, P R, *et al.* Anterior cingulate cortex pathology in schizophrenia and bipolar disorder. *Acta Neuropathol.* 2001; 102 (4): 373-9.

Brambilla, P, Barale, F, Caverzasi, E, *et al.* Anatomical MRI findings in mood and anxiety disorders. *Epidemiol.Psichiatr.Soc.* 2002; 11 (2): 88-99.

Brambilla, P, Harenski, K, Nicoletti, M, *et al.* MRI investigation of temporal lobe structures in bipolar patients. *J.Psychiatr.Res.* 2003; 37 (4): 287-95.

Breiter, H C, Rauch, S L, Kwong, K K, *et al.* Functional magnetic resonance imaging of symptom provocation in obsessive-compulsive disorder. *Arch.Gen.Psychiatry.* 1996; 53 (7): 595-606.

Bremner, J D, Vythilingam, M, Vermetten, E, *et al.* Reduced volume of orbitofrontal cortex in major depression. *Biol.Psychiatry.* 2002; 51 (4): 273-79.

Burke, W J, Miller, J P, Rubin, E H, *et al.* Reliability of the Washington University Clinical Dementia Rating. *Arch.Neurol.* 1988; 45 (1): 31-32.

Byers, a L, Yaffe, K, Covinsky, K E, *et al.* High occurrence of mood and anxiety disorders among older adults: The National Comorbidity Survey Replication. *Arch Gen Psychiatry.* 2010; 67 (5): 489-96.

Byne, W, Hazlett, E A, Buchsbaum, M S, *et al.* The thalamus and schizophrenia: current status of research. *Acta Neuropathol.* 2009; 117 (4): 347-68.

Cacilhas, a A, Magalhaes, P V, Cereser, K M, *et al.* Bipolar disorder and age-related functional impairment. *Rev Bras Psiquiatr.* 2009; 31 (4): 354-57.

Caetano, S C, Kaur, S, Brambilla, P, *et al.* Smaller cingulate volumes in unipolar depressed patients. *Biol.Psychiatry.* 2006; 59 (8): 702-06.

Caetano, S C, Sassi, R, Brambilla, P, *et al.* MRI study of thalamic volumes in bipolar and unipolar patients and healthy individuals. *Psychiatry Res.* 2001; 108 (3): 161-68.

Carmichael, S T e Price, J L. Architectonic subdivision of the orbital and medial prefrontal cortex in the macaque monkey. *J Comp Neurol.* 1994; 346 (3): 366-402.

Casanova, M F, Kreczmanski, P, Trippe, J, *et al.* Neuronal distribution in the neocortex of schizophrenic patients. *Psychiatry Res.* 2008; 158 (3): 267-77.

Casanova, M F, Van Kooten, I A, Switala, a E, *et al.* Minicolumnar abnormalities in autism. *Acta Neuropathol.* 2006; 112 (3): 287-303.

Cassano, G B, Rucci, P, Benvenuti, A, *et al.* The role of psychomotor activation in discriminating unipolar from bipolar disorders: a classification-tree analysis. *J.Clin.Psychiatry.* 2012; 73 (1): 22-28.

Chana, G, Landau, S, Beasley, C, *et al.* Two-dimensional assessment of cytoarchitecture in the anterior cingulate cortex in major depressive disorder, bipolar disorder, and schizophrenia: evidence for decreased neuronal somal size and increased neuronal density. *Biol Psychiatry.* 2003; 53 (12): 1086-98.

Chiavaras, M M e Petrides, M. Orbitofrontal sulci of the human and macaque monkey brain. *J Comp Neurol.* 2000; 422 (1): 35-54.

Choi, J S, Kang, D H, Kim, J J, *et al.* Left anterior subregion of orbitofrontal cortex volume reduction and impaired organizational strategies in obsessive-compulsive disorder. *J Psychiatr Res.* 2004; 38 (2): 193-9.

Cordás, T. *Depressão: da bile negra aos neurotransmissores - uma introdução histórica*: Lemos. 2002.

Cotter, D, Hudson, L e Landau, S. Evidence for orbitofrontal pathology in bipolar disorder and major depression, but not in schizophrenia. *Bipolar.Disord.* 2005; 7 (4): 358-69.

Cotter, D, Mackay, D, Chana, G, *et al.* Reduced neuronal size and glial cell density in area 9 of the dorsolateral prefrontal cortex in subjects with major depressive disorder. *Cereb.Cortex.* 2002; 12 (4): 386-94.

Cross - Disorder Group of the Psychiatric Genomics, C. *Identification of risk loci with shared effects on five major psychiatric disorders: a genome - wide analysis* 2013.

Cummings, J L. Frontal-subcortical circuits and human behavior. *Arch.Neurol.* 1993; 50 (8): 873-80.

Cummings, J L, Mega, M, Gray, K, *et al.* The Neuropsychiatric Inventory: comprehensive assessment of psychopathology in dementia. *Neurology.* 1994; 44 (12): 2308-14.

Damasio, a R, Tranel, D e Damasio, H. Individuals with sociopathic behavior caused by frontal damage fail to respond autonomically to social stimuli. *Behav.Brain Res.* 1990; 41 (2): 81-94.

Damasio, H, Grabowski, T, Frank, R, *et al.* The return of Phineas Gage: clues about the brain from the skull of a famous patient. *Science.* 1994; 264 (5162): 1102-05.

De Abreu, L N, Nery, F G, Harkavy-Friedman, J M, *et al.* Suicide attempts are associated with worse quality of life in patients with bipolar disorder type I. *Compr.Psychiatry.* 2012; 53 (2): 125-29.

De Mathis, M A, Diniz, J B, Do Rosario, M C, *et al.* What is the optimal way to subdivide obsessive-compulsive disorder? *CNS.Spectr.* 2006; 11 (10): 762-4, 76.

De Oliveira, K C, Nery, F G, Ferreti, R E, *et al.* Brazilian psychiatric brain bank: a new contribution tool to network studies. *Cell Tissue Bank.* 2012; 13 (2): 315-26.

Deep-Soboslay, A, Akil, M, Martin, C E, *et al.* Reliability of psychiatric diagnosis in postmortem research. *Biol.Psychiatry.* 2005; 57 (1): 96-101.

Deep-Soboslay, A, Benes, F M, Haroutunian, V, *et al.* Psychiatric brain banking: three perspectives on current trends and future directions. *Biol.Psychiatry.* 2011; 69 (2): 104-12.

Deep-Soboslay, A, Iglesias, B, Hyde, T M, *et al.* Evaluation of tissue collection for postmortem studies of bipolar disorder. *Bipolar.Disord.* 2008; 10 (7): 822-28.

Del-Ben, C M, Rodrigues, C R e Zuardi, a W. Reliability of the Portuguese version of the structured clinical interview for DSM-III-R (SCID) in a Brazilian sample of psychiatric outpatients. *Braz.J.Med.Biol.Res.* 1996; 29 (12): 1675-82.

Delbello, M P, Zimmerman, M E, Mills, N P, *et al.* Magnetic resonance imaging analysis of amygdala and other subcortical brain regions in adolescents with bipolar disorder. *Bipolar.Disord.* 2004; 6 (1): 43-52.

Divac, I, Bjorklund, A, Lindvall, O, *et al.* Converging projections from the mediodorsal thalamic nucleus and mesencephalic dopaminergic neurons to the neocortex in three species. *J Comp Neurol.* 1978; 180 (1): 59-71.

Doris, A, Belton, E, Ebmeier, K, *et al.* Reduction of cingulate gray matter density in poor outcome bipolar illness. *Psychiatry Research: Neuroimaging.* 2004; 130 (2): 153-59.

Dorph-Petersen, K A e Lewis, D A. Stereological approaches to identifying neuropathology in psychosis. *Biol.Psychiatry.* 2011; 69 (2): 113-26.

Doty, T J, Payne, M E, Steffens, D C, *et al.* Age-dependent reduction of amygdala volume in bipolar disorder. *Psychiatry Res.* 2008; 163 (1): 84-94.

Drapier, D, Surguladze, S, Marshall, N, *et al.* Genetic liability for bipolar disorder is characterized by excess frontal activation in response to a working memory task. *Biol.Psychiatry.* 2008; 64 (6): 513-20.

Drevets, W C, Price, J L e Furey, M L. Brain structural and functional abnormalities in mood disorders: implications for neurocircuitry models of depression. *Brain Struct.Funct.* 2008a; 213 (1-2): 93-118.

Drevets, W C, Savitz, J e Trimble, M. The subgenual anterior cingulate cortex in mood disorders. *CNS.Spectr.* 2008b; 13 (8): 663-81.

Duman, R S, Malberg, J e Thome, J. Neural plasticity to stress and antidepressant treatment. *Biol Psychiatry.* 1999; 46 (9): 1181-91.

Dwork, a J, Susser, E S, Keilp, J, *et al.* Senile degeneration and cognitive impairment in chronic schizophrenia. *Am.J.Psychiatry.* 1998; 155 (11): 1536-43.

Etain, B e Bonnet-Perrin, E. Value of fluoxetine in obsessive-compulsive disorder in the adult: review of the literature. *Encephale.* 2001; 27 (3): 280-89.

Falkai, P, Bogerts, B e Rozumek, M. Limbic pathology in schizophrenia: the entorhinal region--a morphometric study. *Biol. Psychiatry.* 1988; 24 (5): 515-21.

Farfel, J M, Nitrini, R, Suemoto, C K, *et al.* Very low levels of education and cognitive reserve: A clinicopathologic study. *Neurology.* 2013; 81 (7): 650-57.

Ferrer, I, Martinez, A, Boluda, S, *et al.* Brain banks: benefits, limitations and cautions concerning the use of post-mortem brain tissue for molecular studies. *Cell Tissue Bank.* 2008; 9 (3): 181-94.

Ferreti, R E L, Damin, a E, Brucki, S M D, *et al.* Postmortem diagnosis of dementia by informant interwiew. *Dement Neuropsychol.* 2010; 4 (2): 138-44.

Filimonoff, I N. A rational subdivision of the cerebral cortex. *Arch.Neurol Psychiatry.* 1947; 58 (3): 296-311.

First, M B, Donovan, S e Frances, A. Nosology of chronic mood disorders. *Psychiatr.Clin.North Am.* 1996; 19 (1): 29-39.

Fitzgerald, P B, Laird, a R, Maller, J, *et al.* A meta-analytic study of changes in brain activation in depression. *Hum.Brain Mapp.* 2008; 29 (6): 683-95.

Fornito A, S., M G, J., L, *et al.* In vivo evidence for early neurodevelopmental anomaly of the anterior cingulate cortex in bipolar disorder. *Acta Psychiatr Scand.*. 2007; 116 (6): 467-72.

Friedman, W J, Olson, L e Persson, H. Cells that Express Brain-Derived Neurotrophic Factor mRNA in the Developing Postnatal Rat Brain. *Eur J Neurosci.* 1991; 3 (7): 688-97.

Funayama, M e Mimura, M. Orbitofrontal cortex and morality. *Brain Nerve.* 2012; 64 (10): 1121-9.

Geuna, S. Disector Principle in Morphological Researchhe Revolution of Counting "Tops": Two Decades of the disector principle in morphological research. *Microscopy research and technique.* 2005; 66: 270-74.

Gigante, a D, Andreazza, a C, Lafer, B, *et al.* Decreased mRNA expression of uncoupling protein 2, a mitochondrial proton transporter, in post-mortem prefrontal cortex from patients with bipolar disorder and schizophrenia. *Neurosci.Lett.* 2011a; 505 (1): 47-51.

Gigante, a D, Young, L T, Yatham, L N, *et al.* Morphometric post-mortem studies in bipolar disorder: possible association with oxidative stress and apoptosis. *Int.J.Neuropsychopharmacol.* 2011b; 14 (8): 1075-89.

Goodman, W K, Price, L H, Rasmussen, S A, *et al.* The Yale-Brown Obsessive Compulsive Scale. I. Development, use, and reliability. *Arch.Gen.Psychiatry.* 1989; 46 (11): 1006-11.

Goodwin, F K e Jamison, K R. *Maniac-depressive illness: Bipolar Disorder and recurrent depression*. New York: Oxford, v.2. 2007.

Grinberg, L T, Amaro, E, Jr., Teipel, S, *et al.* Assessment of factors that confound MRI and neuropathological correlation of human postmortem brain tissue. *Cell Tissue Bank.* 2008; 9 (3): 195-203.

Grinberg, L T, Ferretti, R E, Farfel, J M, *et al.* Brain bank of the Brazilian aging brain study group - a milestone reached and more than 1,600 collected brains. *Cell Tissue Bank.* 2007; 8 (2): 151-62.

Gundersen, H J e Jensen, E B. The efficiency of systematic sampling in stereology and its prediction. *J.Microsc.* 1987; 147 (Pt 3): 229-63.

Heimer, L. A new anatomical framework for neuropsychiatric disorders and drug abuse. *Am.J.Psychiatry.* 2003; 160 (10): 1726-39.

Heinsen, H, Arzberger, T, Roggendorf, W, *et al.* 3 D reconstruction of celloidin-mounted serial sections. *Acta Neurophatol.* 2004.

Heinsen, H, Arzberger, T e Schmitz, C. Celloidin mounting (embedding without infiltration) - a new, simple and reliable method for producing serial sections of high thickness through complete human brains and its application to stereological and immunohistochemical investigations. *J.Chem.Neuroanat.* 2000; 20 (1): 49-59.

Heinsen, H, Rub, U, Bauer, M, *et al.* Nerve cell loss in the thalamic mediodorsal nucleus in Huntington's disease. *Acta Neuropathol.* 1999; 97 (6): 613-22.

Heinsen, H, Strik, M, Bauer, M, *et al.* Cortical and striatal neurone number in Huntington's disease. *Acta Neuropathol.* 1994; 88 (4): 320-33.

Herculano-Houzel, S, Mota, B, Wong, P, *et al.* Connectivity-driven white matter scaling and folding in primate cerebral cortex. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 2010; 107 (44): 19008-13.

Hirschfeld, R M, Lewis, L e Vornik, L A. Perceptions and impact of bipolar disorder: how far have we really come? Results of the national depressive and manic-depressive association 2000 survey of individuals with bipolar disorder. *J.Clin.Psychiatry.* 2003; 64 (2): 161-74.

Hoexter, M Q, De Souza Duran, F L, D'alcante, C C, *et al.* Gray matter volumes in obsessive-compulsive disorder before and after fluoxetine or cognitive-behavior therapy: a randomized clinical trial. *Neuropsychopharmacology.* 2012; 37 (3): 734-45.

Hoexter, M Q, Shavitt, R G, D'alcante, C C, *et al.* The drug-naive OCD patients imaging genetics, cognitive and treatment response study: methods and sample description. *Rev.Bras.Psiquiatr.* 2009; 31 (4): 349-53.

Hof, P R, Mufson, E J e Morrison, J H. Human orbitofrontal cortex: cytoarchitecture and quantitative immunohistochemical parcellation. *J.Comp Neurol.* 1995; 359 (1): 48-68.

Hornboll, B, Macoveanu, J, Rowe, J, *et al.* Acute serotonin 2A receptor blocking alters the processing of fearful faces in the orbitofrontal cortex and amygdala. *J Psychopharmacol.* 2013.

Insel, T R. Phenomenology of obsessive compulsive disorder. *J.Clin.Psychiatry.* 1990; 51 Suppl: 4-8.

Jackowski, a P, Araujo Filho, G M, Almeida, a G, *et al.* The involvement of the orbitofrontal cortex in psychiatric disorders: an update of neuroimaging findings. *Rev.Bras.Psiquiatr.* 2012; 34 (2): 207-12.

Jeste, D V e Lohr, J B. Hippocampal pathologic findings in schizophrenia. A morphometric study. *Arch.Gen.Psychiatry.* 1989; 46 (11): 1019-24.

Johnstone, E C, Crow, T J, Frith, C D, *et al.* Cerebral ventricular size and cognitive impairment in chronic schizophrenia. *Lancet.* 1976; 2 (7992): 924-6.

Jorm, a F, Broe, G A, Creasy, H, *et al.* Further data on the validity of the informant questionnaire on cognitive decline in the elderly (IQCODE). *Int. J. Geriat. Psychiatry.* 1996; 11: 131-39.

Kalache, A, Veras, R P e Ramos, L R. [The aging of the world population. A new challenge]. *Rev Saude Publica.* 1987; 21 (3): 200-10.

Kang, D H, Kim, J J, Choi, J S, *et al.* Volumetric investigation of the frontal-subcortical circuitry in patients with obsessive-compulsive disorder. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci.* 2004; 16 (3): 342-9.

Kapczinski, F, Frey, B N e Zannatto, V. [Physiopathology of bipolar disorders: what have changed in the last 10 years?]. *Rev.Bras.Psiquiatr.* 2004; 26 Suppl 3: 17-21.

Kato, T. The role of mitochondrial dysfunction in bipolar disorder. *Drug News Perspect.* 2006; 19 (10): 597-602.

Kato, T. Molecular neurobiology of bipolar disorder: a disease of 'mood-stabilizing neurons'? *Trends Neurosci.* 2008; 31 (10): 495-503.

Katz, S, Ford, a B, Moskowitz, R W, *et al.* Studies of Illness in the aged. The index of ADL: a strandardized measure of biological and psychosocial function. *JAMA.* 1963; 185: 914-19.

Kawaguchi, A, Watanabe, N, Nakano, Y, *et al.* Group cognitive behavioral therapy for patients with generalized social anxiety disorder in Japan: outcomes at 1-year follow up and outcome predictors. *Neuropsychiatr.Dis.Treat.* 2013; 9: 267-75.

Kessler, R C, Berglund, P, Demler, O, *et al.* Lifetime prevalence and age-of-onset distributions of DSM-IV disorders in the National Comorbidity Survey Replication. *Arch.Gen.Psychiatry.* 2005; 62 (6): 593-602.

Khundakar, A, Morris, C, Oakley, A, *et al.* A morphometric examination of neuronal and glial cell pathology in the orbitofrontal cortex in late-life depression. *Int Psychogeriatr.* 2011; 23 (1): 132-40.

Kichuk, S A, Torres, a R, Fontenelle, L F, *et al.* Symptom dimensions are associated with age of onset and clinical course of obsessive-compulsive disorder. *Prog.Neuropsychopharmacol.Biol.Psychiatry.* 2013; 44: 233-39.

Kim, J J, Lee, M C, Kim, J, *et al.* Grey matter abnormalities in obsessive-compulsive disorder: statistical parametric mapping of segmented magnetic resonance images. *Br.J.Psychiatry.* 2001; 179: 330-34.

Kolada, J L, Bland, R C e Newman, S C. Epidemiology of psychiatric disorders in Edmonton. Obsessive-compulsive disorder. *Acta Psychiatr.Scand.Suppl.* 1994; 376: 24-35.

Konradi, C, Eaton, M, Macdonald, M L, *et al.* Molecular evidence for mitochondrial dysfunction in bipolar disorder. *Arch.Gen.Psychiatry.* 2004; 61 (3): 300-08.

Kreczmanski, P, Heinsen, H, Mantua, V, *et al.* Volume, neuron density and total neuron number in five subcortical regions in schizophrenia. *Brain.* 2007; 130 (Pt 3): 678-92.

Kreczmanski, P, Schmidt-Kastner, R, Heinsen, H, *et al.* Stereological studies of capillary length density in the frontal cortex of schizophrenics. *Acta Neuropathol.* 2005; 109 (5): 510-8.

Kringelbach, M L e Rolls, E T. The functional neuroanatomy of the human orbitofrontal cortex: evidence from neuroimaging and neuropsychology. *Prog.Neurobiol.* 2004; 72 (5): 341-72.

Kuhn, S, Schubert, F e Gallinat, J. Structural correlates of trait anxiety: reduced thickness in medial orbitofrontal cortex accompanied by volume increase in nucleus accumbens. *J Affect.Disord.* 2011; 134 (1-3): 315-19.

Kwon, J S, Shin, Y W, Kim, C W, *et al.* Similarity and disparity of obsessive-compulsive disorder and schizophrenia in MR volumetric abnormalities of the hippocampus-amygdala complex. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2003; 74 (7): 962-4.

Lafer, B, Caetano, S, Kleinman, A, *et al. Transtorno bipolar ao longo da vida*. In: Manole (Ed.). *Compêncio da Clínica Psiquiátrica*. Barueri, SP, 2012: p.315-36

Lafer, B, De Almeida, K, De Abreu, L, *et al. Trantorno Bipolar*. In: Manole (Ed.). *Clínica Psiquiátrica*. Barueri, SP, 2011: p.711-31

Lai, T, Payne, M E, Byrum, C E, *et al.* Reduction of orbital frontal cortex volume in geriatric depression. *Biol. Psychiatry.* 2000; 48 (10): 971-75.

Law, a J e Harrison, P J. The distribution and morphology of prefrontal cortex pyramidal neurons identified using anti-neurofilament antibodies SMI32, N200 and FNP7. Normative data and a comparison in subjects with schizophrenia, bipolar disorder or major depression. *J Psychiatr.Res.* 2003; 37 (6): 487-99.

Lawton, M P e Brody, E M. Assessment of older people: self-maintaining and instrumental activities of daily living. *Gerontologist.* 1969; 9 (3): 179-86.

Lee, H Y, Tae, W S, Yoon, H K, *et al.* Demonstration of decreased gray matter concentration in the midbrain encompassing the dorsal raphe nucleus and the limbic subcortical regions in major depressive disorder: An optimized voxel-based morphometry study. *J.Affect.Disord.* 2011; 133 (1-2): 128-36.

Leite, R E P. *Determinação de elementos-traço no encéfalo de idosos em diferentes estados cognitivos*. [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina USP; 2009.

Lenze, E J. Comorbidity of depression and anxiety in the elderly. *Curr.Psychiatry Rep.* 2003; 5 (1): 62-67.

Lochhead, R A, Parsey, R V, Oquendo, M A, *et al.* Regional brain gray matter volume differences in patients with bipolar disorder as assessed by optimized voxel-based morphometry. *Biol.Psychiatry.* 2004; 55 (12): 1154-62.

López, J F, Akil, H e Watson, S J. Neural circuits mediating stress. *Biol Psychiatry.* 1999; 46 (11): 1461-71.

Lyoo, I K, Kim, M J, Stoll, a L, *et al.* Frontal lobe gray matter density decreases in bipolar I disorder. *Biol.Psychiatry.* 2004; 55 (6): 648-51.

Malloy, P, Bihrle, A, Duffy, J, *et al.* The orbitomedial frontal syndrome. *Arch.Clin.Neuropsychol.* 1993; 8 (3): 185-201.

Marchand, W R, Bennett, P J e Dilda, D S. Evidence for frontal-subcortical circuit abnormalities in bipolar affective disorder. *Psychiatry (Edgmont.).* 2005; 2 (4): 26-33.

Marneros, A. Expanding the group of bipolar disorders. *J.Affect.Disord.* 2001; 62 (1-2): 39-44.

Marneros, A e Angst, J. *Bipolar dirsoders: 100 years after maniac depressive insanity*. New York, Boston, Dordrecht, London, Moscow: Kluwer Academic Publishers. 2002.

Mayberg, H S. Limbic-cortical dysregulation: a proposed model of depression. *The Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neurosciences.* 1997; 9 (471): 481.

Mayberg, H S. Modulating dysfunctional limbic-cortical circuits in depression: towards development of brain-based algorithms for diagnosis and optimised treatment. *Br Med Bull.* 2003; 65: 193-207.

Mayberg, H S, Brannan, S K, Tekell, J L, *et al.* Regional metabolic effects of fluoxetine in major depression: serial changes and relationship to clinical response. *Biol. Psychiatry.* 2000; 48 (8): 830-43.

Mcdonald, C, Bullmore, E T, Sham, P C, *et al.* Association of genetic risks for schizophrenia and bipolar disorder with specific and generic brain structural endophenotypes. *Arch.Gen.Psychiatry.* 2004; 61 (10): 974-84.

Merikangas, K R, Akiskal, H S, Angst, J, *et al.* Lifetime and 12-month prevalence of bipolar spectrum disorder in the National Comorbidity Survey replication. *Arch.Gen.Psychiatry.* 2007; 64 (5): 543-52.

Merikangas, K R, Jin, R, He, J P, *et al.* Prevalence and correlates of bipolar spectrum disorder in the world mental health survey initiative. *Arch.Gen.Psychiatry.* 2011; 68 (3): 241-51.

Miguel, E C, Leckman, J F, Rauch, S, *et al.* Obsessive-compulsive disorder phenotypes: implications for genetic studies. *Mol.Psychiatry.* 2005; 10 (3): 258-75.

Miller, C J, Klugman, J, Berv, D A, *et al.* Sensitivity and specificity of the Mood Disorder Questionnaire for detecting bipolar disorder. *J Affect.Disord.* 2004; 81 (2): 167-71.

Moll, J, De Oliveira-Souza, R, Bramati, I E, *et al.* Functional networks in emotional moral and nonmoral social judgments. *Neuroimage.* 2002; 16 (3 Pt 1): 696-703.

Monkul, E S, Nicoletti, M A, Spence, D, *et al.* MRI study of thalamus volumes in juvenile patients with bipolar disorder. *Depress.Anxiety.* 2006; 23 (6): 347-52.

Moreno, D H e Andrade, L H. The lifetime prevalence, health services utilization and risk of suicide of bipolar spectrum subjects, including subthreshold categories in the Sao Paulo ECA study. *J.Affect.Disord.* 2005; 87 (2-3): 231-41.

Morris, J C. The Clinical Dementia Rating (CDR): current version and scoring rules. *Neurology.* 1993; 43 (11): 2412-14.

Muller, M B, Lucassen, P J, Yassouridis, A, *et al.* Neither major depression nor glucocorticoid treatment affects the cellular integrity of the human hippocampus. *Eur J Neurosci.* 2001; 14 (10): 1603-12.

Munhoz, T N, Santos, I S e Matijasevich, A. Major depressive episode among Brazilian adults: A cross-sectional population-based study. *J.Affect.Disord.* 2013.

Murray, C J e Lopez, a D. Evidence-based health policy--lessons from the Global Burden of Disease Study. *Science.* 1996; 274 (5288): 740-43.

Nakao, T, Nakagawa, A, Yoshiura, T, *et al.* A functional MRI comparison of patients with obsessive-compulsive disorder and normal controls during a Chinese character Stroop task. *Psychiatry Res.* 2005; 139 (2): 101-14.

Nery, F G, Chen, H H, Hatch, J P, *et al.* Orbitofrontal cortex gray matter volumes in bipolar disorder patients: a region-of-interest MRI study. *Bipolar Disord.* 2009; 11 (2): 145-53.

Nery, F G, Matsuo, K, Nicoletti, M A, *et al.* Association between prior alcohol use disorders and decreased prefrontal gray matter volumes in bipolar I disorder patients. *Neurosci.Lett.* 2011; 503 (2): 136-40.

Nery, F G, Stanley, J A, Chen, H H, *et al.* Bipolar disorder comorbid with alcoholism: a 1H magnetic resonance spectroscopy study. *J.Psychiatr.Res.* 2010; 44 (5): 278-85.

Nieuwenhuys. *The human central nervous system*. 2008.

Nieuwenhuys, R. The insular cortex: a review. *Prog.Brain Res.* 2012; 195: 123-63.

O'sullivan, R L, Rauch, S L, Breiter, H C, *et al.* Reduced basal ganglia volumes in trichotillomania measured via morphometric magnetic resonance imaging. *Biol Psychiatry.* 1997; 42 (1): 39-45.

Okasha, A, Saad, A, Khalil, a H, *et al.* Phenomenology of obsessive-compulsive disorder: a transcultural study. *Compr.Psychiatry.* 1994; 35 (3): 191-97.

Ongur, D, Drevets, W C e Price, J L. Glial reduction in the subgenual prefrontal cortex in mood disorders. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1998; 95 (22): 13290-95.

Ongur, D, Ferry, a T e Price, J L. Architectonic subdivision of the human orbital and medial prefrontal cortex. *J Comp Neurol.* 2003; 460 (3): 425-49.

Ongur, D e Price, J L. The organization of networks within the orbital and medial prefrontal cortex of rats, monkeys and humans. *Cereb.Cortex.* 2000; 10 (3): 206-19.

Organização Mundial Da Saúde. *Envelhecimento ativo: uma política*. Brasília: Organização Pan-Americana da Saúde. 2005.

Pakkenberg, B. Pronounced reduction of total neuron number in mediodorsal thalamic nucleus and nucleus accumbens in schizophrenics. *Arch.Gen.Psychiatry.* 1990; 47 (11): 1023-28.

Petrides, M P D N. *Comparative analysis of the human and macaque ventrolateral prefrontal cortex and corticocortical connection patterns in the monkey*. 16**:** 291-310 p. 2001.

Phillips, M L e Kupfer, D J. Bipolar disorder diagnosis: challenges and future directions. *Lancet.* 2013; 381 (9878): 1663-71.

Pini, S, De, Q V, Pagnin, D, *et al.* Prevalence and burden of bipolar disorders in European countries. *Eur.Neuropsychopharmacol.* 2005; 15 (4): 425-34.

Pujol, J, Soriano-Mas, C, Alonso, P, *et al.* Mapping structural brain alterations in obsessive-compulsive disorder. *Arch.Gen.Psychiatry.* 2004; 61 (7): 720-30.

Radua, J e Mataix-Cols, D. Voxel-wise meta-analysis of grey matter changes in obsessive-compulsive disorder. *Br.J.Psychiatry.* 2009; 195 (5): 393-402.

Rajkowska, G. Histopathology of the prefrontal cortex in major depression: what does it tell us about dysfunctional monoaminergic circuits? *Prog.Brain Res.* 2000; 126: 397-412.

Rajkowska, G, Halaris, A e Selemon, L D. Reductions in neuronal and glial density characterize the dorsolateral prefrontal cortex in bipolar disorder. *BIOL PSYCHIATRY.* 2001; 49 (9): 741-52.

Rajkowska, G, Miguel-Hidalgo, J J, Wei, J, *et al.* Morphometric evidence for neuronal and glial prefrontal cell pathology in major depression. *BIOL PSYCHIATRY.* 1999; 45 (9): 1085-98.

Ranjekar, P K, Hinge, A, Hegde, M V, *et al.* Decreased antioxidant enzymes and membrane essential polyunsaturated fatty acids in schizophrenic and bipolar mood disorder patients. *Psychiatry Res.* 2003; 121 (2): 109-22.

Rao, J S, Harry, G J, Rapoport, S I, *et al.* Increased excitotoxicity and neuroinflammatory markers in postmortem frontal cortex from bipolar disorder patients. *Mol.Psychiatry.* 2010; 15 (4): 384-92.

Rao, J S, Kellom, M, Reese, E A, *et al.* Dysregulated glutamate and dopamine transporters in postmortem frontal cortex from bipolar and schizophrenic patients. *J Affect.Disord.* 2012; 136 (1-2): 63-71.

Rasmussen, S A e Eisen, J L. The epidemiology and clinical features of obsessive compulsive disorder. *Psychiatr.Clin.North Am.* 1992; 15 (4): 743-58.

Rauch, S L, Jenike, M A, Alpert, N M, *et al.* Regional cerebral blood flow measured during symptom provocation in obsessive-compulsive disorder using oxygen 15-labeled carbon dioxide and positron emission tomography. *Arch.Gen.Psychiatry.* 1994; 51 (1): 62-70.

Regier, D A, Farmer, M E, Rae, D S, *et al.* One-month prevalence of mental disorders in the United States and sociodemographic characteristics: the Epidemiologic Catchment Area study. *Acta Psychiatr.Scand.* 1993; 88 (1): 35-47.

Roccatagliata, G e Barclay-Temperini, K. *History of ancient psychiatry*. In: (Ed.). *Storia della Psichiatria Antica*. New York: Greenwood, v.[trans. of: Storia della Psichiatria Antica. Milan: Ulrico Hoepli Editore, 1973]. 1986

Rosario-Campos, M C, Miguel, E C, Quatrano, S, *et al.* The Dimensional Yale-Brown Obsessive-Compulsive Scale (DY-BOCS): an instrument for assessing obsessive-compulsive symptom dimensions. *Mol.Psychiatry.* 2006; 11 (5): 495-504.

Rosso, I M, Killgore, W D, Cintron, C M, *et al.* Reduced amygdala volumes in first-episode bipolar disorder and correlation with cerebral white matter. *Biol.Psychiatry.* 2007; 61 (6): 743-49.

Ruscio, a M, Stein, D J, Chiu, W T, *et al.* The epidemiology of obsessive-compulsive disorder in the National Comorbidity Survey Replication. *Mol.Psychiatry.* 2010; 15 (1): 53-63.

Sakai, T, Oshima, A, Nozaki, Y, *et al.* Changes in density of calcium-binding-protein-immunoreactive GABAergic neurons in prefrontal cortex in schizophrenia and bipolar disorder. *Neuropathology.* 2008; 28 (2): 143-50.

Sasson, Y, Zohar, J, Chopra, M, *et al.* Epidemiology of obsessive-compulsive disorder: a world view. *J.Clin.Psychiatry.* 1997; 58 Suppl 12: 7-10.

Saxena, S, Brody, a L, Ho, M L, *et al.* Differential brain metabolic predictors of response to paroxetine in obsessive-compulsive disorder versus major depression. *Am J Psychiatry.* 2003; 160 (3): 522-32.

Saxena, S, Brody, a L, Maidment, K M, *et al.* Cerebral glucose metabolism in obsessive-compulsive hoarding. *Am J Psychiatry.* 2004; 161 (6): 1038-48.

Schloesser, R J, Huang, J, Klein, P S, *et al.* Cellular plasticity cascades in the pathophysiology and treatment of bipolar disorder. *Neuropsychopharmacology.* 2008; 33 (1): 110-33.

Schmitt, A, Bauer, M, Heinsen, H, *et al.* How a neuropsychiatric brain bank should be run: a consensus paper of Brainnet Europe II. *J Neural Transm.* 2007; 114 (5): 527-37.

Schmitt, A, Parlapani, E, Bauer, M, *et al.* Is brain banking of psychiatric cases valuable for neurobiological research? *Clinics.* 2008; 63 (2): 255-66.

Schmitz, C. Variation of fractionator estimates and its prediction. *Anat.Embryol.(Berl).* 1998; 198 (5): 371-97.

Schmitz, C e Hof, P R. Design-based stereology in neuroscience. *Neuroscience.* 2005; 130 (4): 813-31.

Schnieder, T P e Dwork, a J. Searching for neuropathology: gliosis in schizophrenia. *Biol. Psychiatry.* 2011; 69 (2): 134-39.

Schoenbaum, G, Setlow, B, Nugent, S L, *et al.* Lesions of orbitofrontal cortex and basolateral amygdala complex disrupt acquisition of odor-guided discriminations and reversals. *Learn.Mem.* 2003; 10 (2): 129-40.

Seminowicz, D A, Mayberg, H S, Mcintosh, a R, *et al.* Limbic-frontal circuitry in major depression: a path modeling metanalysis. *Neuroimage.* 2004; 22 (1): 409-18.

Sharma, V, Menon, R, Carr, T J, *et al.* An MRI study of subgenual prefrontal cortex in patients with familial and non-familial bipolar I disorder. *J.Affect.Disord.* 2003; 77 (2): 167-71.

Smoller, J W e Finn, C T. Family, twin, and adoption studies of bipolar disorder. *Am.J.Med.Genet.C.Semin.Med.Genet.* 2003; 123C (1): 48-58.

Spitzer, R L, Williams, J B, Gibbon, M, *et al.* The Structured Clinical Interview for DSM-III-R (SCID). I: History, rationale, and description. *Arch.Gen.Psychiatry.* 1992; 49 (8): 624-29.

Stevenson, R J e Miller, L A. Taste and odour-induced taste perception following unilateral lesions to the anteromedial temporal lobe and the orbitofrontal cortex. *Cogn Neuropsychol.* 2013; 30 (1): 41-57.

Stockmeier, C A, Mahajan, G J, Konick, L C, *et al.* Cellular changes in the postmortem hippocampus in major depression. *Biol.Psychiatry.* 2004; 56 (9): 640-50.

Strakowski, S M, Adler, C M, Almeida, J, *et al.* The functional neuroanatomy of bipolar disorder: a consensus model. *Bipolar Disord.* 2012; 14 (4): 313-25.

Strakowski, S M, Delbello, M P e Adler, C M. The functional neuroanatomy of bipolar disorder: a review of neuroimaging findings. *Mol.Psychiatry.* 2005; 10 (1): 105-16.

Strakowski, S M, Williams, J R, Sax, K W, *et al.* Is impaired outcome following a first manic episode due to mood-incongruent psychosis? *J.Affect.Disord.* 2000; 61 (1-2): 87-94.

Swedo, S E, Schapiro, M B, Grady, C L, *et al.* Cerebral glucose metabolism in childhood-onset obsessive-compulsive disorder. *Arch.Gen.Psychiatry.* 1989; 46 (6): 518-23.

Szeszko, P R, Christian, C, Macmaster, F, *et al.* Gray matter structural alterations in psychotropic drug-naive pediatric obsessive-compulsive disorder: an optimized voxel-based morphometry study. *Am J Psychiatry.* 2008; 165 (10): 1299-307.

Tanner, C, Gilley, D e Goetz, C. *A brief screening questionnarie for Parkinsonism*. 28**:** 267-68 p. 1990.

Teachman, B A. Linking obsessional beliefs to OCD symptoms in older and younger adults. *Behav.Res.Ther.* 2007; 45 (7): 1671-81.

Teipel, S J, Flatz, W H, Heinsen, H, *et al.* Measurement of basal forebrain atrophy in Alzheimer's disease using MRI. *Brain.* 2005; 128 (Pt 11): 2626-44.

Todtenkopf, M S, Vincent, S L e Benes, F M. A cross-study meta-analysis and three-dimensional comparison of cell counting in the anterior cingulate cortex of schizophrenic and bipolar brain. *Schizophr Res.* 2005; 73 (1): 79-89.

Torres, a R e Lima, M C. Epidemiology of obsessive-compulsive disorder: a review. *Rev.Bras.Psiquiatr.* 2005; 27 (3): 237-42.

Torresan, R C, Ramos-Cerqueira, a T, Shavitt, R G, *et al.* Symptom dimensions, clinical course and comorbidity in men and women with obsessive-compulsive disorder. *Psychiatry Res.* 2013.

Torrey, E F, Webster, M, Knable, M, *et al.* The stanley foundation brain collection and neuropathology consortium. *Schizophr.Res.* 2000; 44 (2): 151-55.

Tranel, D, Damasio, a R e Damasio, H. Intact recognition of facial expression, gender, and age in patients with impaired recognition of face identity. *Neurology.* 1988; 38 (5): 690-96.

Trede, K, Salvatore, P, Baethge, C, *et al.* Manic-depressive illness: evolution in Kraepelin's Textbook, 1883-1926. *Harv.Rev.Psychiatry.* 2005; 13 (3): 155-78.

Uylings, H B, Sanz-Arigita, E J, De, V K, *et al.* 3-D cytoarchitectonic parcellation of human orbitofrontal cortex correlation with postmortem MRI. *Psychiatry Res.* 2010; 183 (1): 1-20.

Uylings, H B M, Rajkowska, G, Sanz-Arigita, E, *et al.* Consequences of large interindividual variability for human brain atlases: converging macroscopical imaging and microscopical neuroanatomy. *Anat.Embryol.* 2005; 210 (5-6): 423-31.

Valente, a a, Jr., Miguel, E C, Castro, C C, *et al.* Regional gray matter abnormalities in obsessive-compulsive disorder: a voxel-based morphometry study. *Biol.Psychiatry.* 2005; 58 (6): 479-87.

Van Eijndhoven, P, Van Wingen, G, Katzenbauer, M, *et al.* Paralimbic Cortical Thickness in First-Episode Depression: Evidence for Trait-Related Differences in Mood Regulation. *Am J Psychiatry.* 2013.

Van Kooten, I A, Palmen, S J, Von Cappeln, P, *et al.* Neurons in the fusiform gyrus are fewer and smaller in autism. *Brain.* 2008; 131 (Pt 4): 987-99.

Vogt, B, Nimchinsky, E A, Vogt, L J, *et al.* Human cingulate cortex: surface features, flat maps, and cytoarchitecture. *J Comp Neurol.* 1995 (359 (3)): 490-506.

Von Economo, C e Koskinas, G N. *Cytoarchitektonik der Hirnrinde des Erwachsenen Menschen*. Berlin: Springer, Verlag. 1925.

Vostrikov, V M, Uranova, N A e Orlovskaya, D D. Deficit of perineuronal oligodendrocytes in the prefrontal cortex in schizophrenia and mood disorders. *Schizophr.Res.* 2007; 94 (1-3): 273-80.

Waldvogel, H J, Curtis, M A, Baer, K, *et al.* Immunohistochemical staining of post-mortem adult human brain sections. *Nat.Protoc.* 2006; 1 (6): 2719-32.

Wang, L, Dai, W, Su, Y, *et al. Amplitude of low frequency oscillations in first-episode, treatment-naive,patientes with major depressive disorder: a resting - state functional MRI study*. 7 2012.

Weibel, E R. *Stereological Methods*. London: Academic Press. 1979.

West, M J. Stereological methods for estimating the total number of neurons and synapses: issues of precision and bias. *Trends Neurosci.* 1999; 22 (2): 51-61.

West, M J. Design-based stereological methods for counting neurons. *Prog.Brain Res.* 2002; 135: 43-51.

West, M J, Danscher, G e Gydesen, H. A determination of the volumes of the layers of the rat hippocampal region. *Cell Tissue Res.* 1978; 188 (3): 345-59.

Williams, R W e Herrup, K. The control of neuron number. *Annu.Rev Neurosci.* 1988; 11: 423-53.

Williams, R W e Rakic, P. Three-dimensional counting: an accurate and direct method to estimate numbers of cells in sectioned material. *J Comp Neurol.* 1988; 278 (3): 344-52.

World Health Organization. *The ICD-10 Classification of Mental and Behavioural Disorders: Clinical Descriptions and Diagnostic Guidelines*. Geneva: World Health Organization (WHO) 1992.

World Health Organization. *Revised global burden of disease (GBD) 2002 estimates.* http://www.who.int/healthinfo/bodgbd2002revised/en/ 2006.

World Health Organization. *10 facts on ageing and the life course*: World Health Organization (WHO) 2013.

Xu, G, Knutsen, a K, Dikranian, K, *et al.* Axons pull on the brain, but tension does not drive cortical folding. *J Biomech.Eng.* 2010; 132 (7): 071013.

Yoo, S Y, Roh, M S, Choi, J S, *et al.* Voxel-based morphometry study of gray matter abnormalities in obsessive-compulsive disorder. *J Korean Med.Sci.* 2008; 23 (1): 24-30.

Young, R C, Gyulai, L, Mulsant, B H, *et al.* Pharmacotherapy of bipolar disorder in old age: review and recommendations. *Am.J.Geriatr.Psychiatry.* 2004; 12 (4): 342-57.

Zilles, K, Palomero-Gallagher, N e Schleicher, A. Transmitter receptors and functional anatomy of the cerebral cortex. *J.Anat.* 2004; 205 (6): 417-32.

Zivanovic, O e Nedic, A. Kraepelin's concept of manic-depressive insanity: one hundred years later. *J.Affect.Disord.* 2012; 137 (1-3): 15-24.