RAFAEL EMÍDIO DA SILVA

**Correspondência histológica de parâmetros de imagens de tensores de
difusão**

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

Programa de Radiologia
Orientador: Edson Amaro Junior

São Paulo

2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Silva, Rafael Emídio da

Correspondência histológica de parâmetros de imagens de tensores de difusão / Rafael Emídio da Silva. -- São Paulo, 2014.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Radiologia.

Orientador: Edson Amaro Junior.

Descritores: 1.Ressonância magnética 2.Imagem de tensores de difusão 3.Cérebro 4.Imunoistoquímica 5.Anisotropia 6.Envelhecimento

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA

RAFAEL EMÍDIO DA SILVA

Correspondência histológica de parâmetros de imagens de tensores de
difusão

São Paulo

2014

RAFAEL EMÍDIO DA SILVA

**Correspondência histológica de parâmetros de imagens de tensores de
difusão**

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

Programa de Radiologia
Orientador: Edson Amaro Junior

São Paulo

2014

Esta 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*.

EPÍGRAFE

"You can't always get what you want"

(Jagger e Richards, 1969)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para minha formação e no desenvolvimento deste trabalho.

Não posso deixar de agradecer a todas as famílias que, mesmo em momentos de luto, puderam ser solidárias e colaboraram com a doação de órgãos e informações sobre seus entes queridos, sem que para isso recebessem qualquer tipo de compensação. Esse gesto é de extrema importância, seja para pesquisa, seja para salvar diretamente a vida de outras pessoas. O progresso científico, também, depende muito desse tipo de solidariedade e compreensão. A todas essas famílias, meu muito obrigado.

Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Edson Amaro Junior, por todo o apoio, questionamentos e lições. Sua influência foi fundamental para a minha formação e se reflete em minha trajetória profissional e acadêmica.

A minha co-orientadora, Prof^a. Dra. Lea T. Grinberg, que me abriu as portas do mundo acadêmico e serviu de inspiração durante minha formação por meio de sua trajetória profissional.

Ao meu orientador na Universidade de Würzburg, Prof. Dr. Helmut Heinsen, que me recebeu em seu laboratório e proporcionou a oportunidade de aprender e aprimorar técnicas fundamentais para o desenvolvimento

deste projeto. Além do suporte profissional, sua ajuda foi muito importante nas experiências pessoais durante minha estadia na Alemanha.

A todos os professores com quem tive a oportunidade de aprender, agradeço de forma sincera o esforço em dividir seus conhecimentos, as lições passadas e os exemplos a serem seguidos.

A todos os colegas com quem tive a oportunidade de trabalhar no laboratório de Fisiopatologia no Envelhecimento e no Departamento de Radiologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Aos companheiros de trabalho que dividiram diariamente, e em algumas madrugadas, as discussões científicas, desafios e conquistas nestes últimos anos. Meus agradecimentos especiais a Glaucia Santos, Eduardo Alho, Luzia Lima, Ricardo Caires, Ana Tereza Alho, Katia Oliveira, Maria Otaduy, Alexandre Valota, Leonardo Molina e a todos os outros colegas que, mesmo pontualmente, contribuíram de forma direta ou indireta para a conclusão deste trabalho.

Agradeço também aos sempre prestativos Aderval Freitas, João Ricardo Sato, Marta Crocci, Eva Broschk, Angelika Bahrke, Inês L. Padrão, Edilaine Tampelini e Keila Maria Silva. Sem a colaboração de vocês, a execução deste trabalho teria sido muito mais difícil.

A Lia de Melo Souza Neta, Adelinda Gonçalves e aos colegas do Departamento de Radiologia por todo o suporte nos momentos de dúvida.

A Comissão de Cooperação Internacional do Programa CAPES - PDEE pelo apoio financeiro no Brasil e no exterior.

Gostaria de agradecer de forma especial as pessoas que contribuíram para minha formação pessoal, construíram meu caráter e me deram suporte durante toda minha vida.

Aos meus pais, Marco Emídio e Adna Cristina, que me ensinaram lições que nunca imaginei ser capaz de aprender. Ao meu irmão e amigo Alexandre Emídio e a toda a minha família. Sua compreensão, carinho e dedicação são fundamentais para minha vida.

A todos meus amigos, que próximos ou distantes, sempre estiveram presentes em todos os momentos importantes. Aos meus caros Thiago Jeferson, Camila Uchoa, Esdras Oliveira, Paula Franco, Álvaro Gomes, Robson Pereira, Lucas Lacerda, Anna Trondoli, André Sales, Thalita de Souza, Felipe Moraes e a todos os outros que estiveram presentes de alguma forma nos últimos anos, meu muito obrigado.

Finalmente, gostaria de agradecer a minha cara Denise. Agradeço imensamente por sua compreensão, amizade e companheirismo. Creio que qualquer tentativa de descrever sua colaboração e influência nos últimos anos não seria suficiente para expressar sua importância.

APOIO FINANCEIRO

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES: bolsas de estudos para alunos de doutorado regular no país e Programa de Doutorado no País com Estágio no Exterior – PDEE - na Universidade de Würzburg, Alemanha. Departamento de Radiologia do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo.

LISTA DE ABREVIATURAS

AASSB	Áreas de alteração de sinal na substância branca
AC	Comissura anterior
ADC	Coeficiente de difusão aparente (<i>apparent diffusion coefficient</i>)
AHAN	Área homóloga aparentemente normal
AVE	Acidente vascular encefálico
BEHGEEC	Banco de Encéfalos Humanos do Grupo de Estudos em Envelhecimento Cerebral
CAM	<i>Cell adhesion molecules</i>
CDR	Questionário para avaliação clínica da demência
CP	Comissura posterior
DA	Doença de Alzheimer
DICOM	<i>Digital imaging and communications in medicine</i>
DP	Desvio padrão
DTI	Imagens de tensores de difusão
EPI	<i>Echo planar imaging</i>
FA	Anisotropia fracional (<i>fractional anisotropy</i>)
FFE	<i>Fast field echo</i>
FLAIR	<i>Fluid attenuated inversion recovery</i>
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
FSE	<i>Fast spin echo</i>
GAG	Glicosaminoglicanas
GALL	Galocianina
GFAP	Proteína ácida fibrilar glial
HC	Hospital das Clínicas
HE	Hematoxilina-eosina
InRad	Instituto de Radiologia
KB	Técnica de Kluver-Barrera

mRNA	RNA mensageiro
MTR	Índice de transferência de magnetização (<i>magnetic transfer ratio</i>)
MBP	Proteína básica de mielina
NGC	Neuroglicana C
NF	Neurofilamento
NIfTI	<i>Neuroimaging informatics technology initiative</i>
ONU	Organização das Nações Unidas
PC	Comissura posterior
PG	Proteoglicanos
RF	Radiofrequência
RM	Ressonância Magnética
RNA	Ácido ribonucleico
ROI	Região de interesse (<i>region of interest</i>)
SNC	Sistema nervoso central
SNP	Sistema nervoso periférico
SSEPI	<i>Single shot echo planar imaging</i>
SVOC	Serviço de Verificação de Óbitos da Capital
TC	Tomografia computadorizada
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TE	Tempo de eco
TI	Tempo de inversão
TR	Tempo de repetição
TSE	<i>Turbo spin echo</i>
USP	Universidade de São Paulo
WMH	<i>White matter hyperintensities</i>

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Área de alteração de sinal na substância branca (AASSB) localizada em imagem ponderada em FLAIR: A – área de alteração de sinal na substância branca localizada no lobo frontal do hemisfério direito; B – Área homóloga aparentemente normal na substância branca localizada no lobo frontal do hemisfério contra-lateral.....	11
Figura 2-	Diagrama das distribuições da difusão em um tensor localizado em um feixe de fibras	22
Figura 3-	Resumo esquemático da metodologia empregada	34
Figura 4-	Bloco de celoidina posicionado para o corte seriado em micrótomo	51
Figura 5-	Cortes histológicos seriados de hemisfério cerebral embebido em celoidina.....	52
Figura 6-	Segmentação das áreas referentes ao encéfalo humano baseada em imagens de RM.....	55
Figura 7-	Reconstrução tridimensional de encéfalo humano baseada em imagens de RM	56
Figura 8-	Reconstrução tridimensional baseada em imagens de RM ponderadas em T1 e registradas espacialmente com imagens em FLAIR.	58
Figura 9-	Fluxo de edição de imagens e reconstrução 3D dos cortes histológicos.....	59
Figura 10-	Corregistro entre RM e histologia.....	60
Figura 11-	Identificação das AASSB em imagens de RM ponderadas em FLAIR. Cortes axiais em sequência crânio-caudal (A-D).....	62
Figura 12-	Mapas de FA (A) e ADC (B) gerados a partir de imagens de DTI adquiridas <i>post-mortem</i>	68
Figura 13-	AASSB identificadas em cortes axiais de imagens de RM ponderadas em FLAIR (A) e transferência de magnetização (B e C).....	69
Figura 14-	Representação gráfica da relaxação T2 nas áreas de alteração de sinal em substância branca (AASSB) e áreas homólogas aparentemente normais (AHAN).	70

Figura 15-	Diferenças de angulação entre imagens de RM e cortes histológicos. (A) demonstra a disparidade através da intersecção dos cortes nas duas modalidades	72
Figura 16-	Representação gráfica da distribuição das AASSB na substância branca cerebral.....	83
Figura 17-	Localização das AASSB nos sujeitos incluídos no estudo em imagens de RM adquiridas no plano axial e ponderadas em FLAIR	85
Figura 18-	Comparação entre anisotropia fracional nas áreas de hipersinal na substância branca e áreas homólogas aparentemente normais.....	89
Figura 19-	Comparação entre coeficiente de difusão aparente nas áreas de hipersinal na substância branca e áreas homólogas aparentemente normais.....	90
Figura 20-	Comparação entre índices de transferência de magnetização nas áreas de hipersinal na substância branca e áreas homólogas aparentemente normais.....	91
Figura 21-	Comparação entre valores de relaxometria T2 nas áreas de hipersinal na substância branca e áreas homólogas aparentemente normais.....	92
Figura 22-	AASSB corada por HE. Visão geral do campo em um aumento de 4 x 2.5. Em (A), são apontadas áreas difusas, próximas a vasos com coloração mais clara na substância branca. Em (B), a diferença de coloração é salientada por meio de um filtro na imagem.....	96
Figura 23-	Coloração de HE em AASSB apresentando heterogeneidade na substância branca. O detalhe (B) apresenta vasos com aumento do espaço perivascular e com um padrão que sugere acometimento por colagenose venosa.....	97
Figura 24-	Visão geral do campo observado em um aumento de 4 x 2,5. Revela AASSB sob efeito de coloração HE. Em (A), é possível observar áreas difusas, próximas a vasos com coloração mais clara na substância branca. Em (B), é possível identificar um aumento do espaço perivascular.....	98
Figura 25-	Detalhe de AASSB corada por HE. (A) destaca vasos com características comumente observados em alterações disóricas. O destaque (B) mostra a presença de macrófagos indicativos de inflamação crônica na área	99

Figura 26-	Coloração de HE na AASSB em um aumento de 20 x 2,5. Pode-se observar um comprometimento tecidual perivascular	100
Figura 27-	Detalhe de AASSB corada por HE. É possível observar um aumento do espaço perivascular.....	100
Figura 28-	AASSB coradas por técnica de Kluver-Barrera	101
Figura 29-	Regiões de AASSB imunocoradas por anticorpo anti-NF. Visão em detalhe do campo em um aumento de 40 x 2,5	103
Figura 30-	Regiões de AASSB imunocoradas por anticorpo anti-MBP. Visão em detalhe do campo em um aumento de 40 x 2,5	105
Figura 31-	Regiões de AASSB imunocoradas por anticorpo anti-GFAP. Visão em detalhe do campo em um aumento de 40 x 2,5.....	108
Figura 32-	Comparação entre valores médios de densidade óptica em lâminas coradas por hematoxilina-eosina nas áreas de alteração de sinal na substância branca e áreas homólogas aparentemente normais.....	112
Figura 33-	Comparação entre valores médios de densidade óptica em lâminas coradas por galocianina nas áreas de alteração de sinal na substância branca e áreas homólogas aparentemente normais	113
Figura 34-	Comparação entre valores médios de densidade óptica em lâminas coradas por Kluver-Barrera nas áreas de alteração de sinal na substância branca e áreas homólogas aparentemente normais	115
Figura 35-	Representação gráfica dos valores médios de impregnação de cromógeno por técnica de deconvolução de cor em lâminas imunocoradas por anti-neurofilamento nas AASSB	116
Figura 36-	Comparação entre valores médios de deconvolução de cor em lâminas imuno-coradas por anti-neurofilamento nas áreas de alteração de sinal na substância branca e áreas homólogas aparentemente normais.....	117
Figura 37-	Comparação sujeito a sujeito entre valores médios de deconvolução de cor em lâminas imuno-coradas por anti-neurofilamento nas áreas de alteração de sinal na substância branca e áreas homólogas aparentemente normais	119
Figura 38-	Representação gráfica dos valores médios de impregnação de cromógeno por técnica de deconvolução de cor em lâminas	

	imunocoradas por anti-proteína básica de mielina nas AASSB.....	120
Figura 39-	Representação gráfica dos valores médios de impregnação de cromógeno por técnica de deconvolução de cor em lâminas imunocoradas por anti-proteína básica de mielina nas AHAN.	121
Figura 40-	Comparação entre valores médios de deconvolução de cor em lâminas imuno-coradas por anti-proteína básica de mielina nas áreas de alteração de sinal na substância branca e áreas homólogas aparentemente normais	122
Figura 41-	Comparação sujeito a sujeito entre valores médios de deconvolução de cor em lâminas imuno-coradas por anti-proteína básica de mielina nas áreas de alteração de sinal na substância branca e áreas homólogas aparentemente normais... ..	123
Figura 42-	Representação gráfica dos valores médios de impregnação de cromógeno em lâminas imunocoradas por anti-proteína ácida fibrilar glial	125
Figura 43-	Representação gráfica dos valores médios de impregnação de cromógeno por técnica de deconvolução de cor em lâminas imunocoradas por anti-proteína ácida fibrilar glial nas AHAN	126
Figura 44-	Comparação entre valores médios de deconvolução de cor em lâminas imuno-coradas por anti-proteína ácida fibrilar glial nas áreas de alteração de sinal na substância branca e áreas homólogas aparentemente normais	127
Figura 45-	Comparação sujeito a sujeito entre valores médios de deconvolução de cor em lâminas imuno-coradas por anti-proteína ácida fibrilar glial nas áreas de alteração de sinal na substância branca e áreas homólogas aparentemente normais... ..	128

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Características dos sujeitos e encéfalos incluídos no estudo ...	36
Tabela 2-	Parâmetros de aquisição de imagens utilizados <i>in cranio</i>	43
Tabela 3-	Parâmetros para aquisição de imagens utilizados <i>extra situ</i>	46
Tabela 4-	Análise descritiva das características dos sujeitos incluídos no estudo	82
Tabela 5-	Localização nos tratos da substância branca e área das AASSB(mm ²)	86
Tabela 6-	Análise estatística descritiva sobre variáveis analisadas nos sujeitos incluídos no estudo	88
Tabela 7-	Comparação entre valores médios de variáveis de imagens aferidos nas AASSB e nas AHAN	93
Tabela 8-	Descrição das colorações imuno-histoquímicas em áreas de alteração de sinal na substância branca, com três tipos de anticorpos	109
Tabela 9-	Descrição dos valores médios de impregnação de cromógeno por técnica de deconvolução de cor em lâminas imunocoradas por anti-neurofilamento nas AASSB e nas AHAN	118
Tabela 10-	Descrição dos valores médios de impregnação de cromógeno por técnica de deconvolução de cor em lâminas imunocoradas por anti-proteína básica de mielina nas AASSB e nas AHAN	124
Tabela 11-	Descrição dos valores médios de impregnação de cromógeno por técnica de deconvolução de cor em lâminas imunocoradas por anti-proteína ácida fibrilar glial nas AASSB e nas AHAN.	128
Tabela 12-	Correlação entre variáveis histológicas e variáveis de imagem nas AASSB e AHAN	131
Tabela 13-	Média dos valores de FA e ADC obtidos neste estudo e apresentados anteriormente na literatura.....	146

RESUMO

Silva RE *Correspondência histológica de parâmetros de imagens de tensores de difusão* [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2014.

INTRODUÇÃO: Imagens por tensores de difusão (*diffusion tensor imaging* - DTI) do cérebro são parte fundamental de exames de ressonância magnética (RM) na rotina clínica. Entretanto, não há informação científica suficiente para inferir a base histológica de parâmetros de imagens de DTI. Um dos achados frequentes nos exames de RM são as áreas de alteração de sinal na substância branca (AASSB). Neste estudo, analisamos imagens de RM *post-mortem*, em particular as AASSB, e seus correlatos histológicos e imuno-histoquímicos. **OBJETIVOS:** Descrever os parâmetros quantitativos de imagens de DTI imagens obtidas *in cranio post-mortem*, comparar com parâmetros de relaxometria e transferência de magnetização e avaliar seus correlatos histológicos nas AASSB e AHAN, utilizando técnicas de correspondência espacial ponto-a-ponto. **MÉTODOS:** Analisamos áreas distribuídas na substância branca de encéfalos de quatro sujeitos submetidos ao exame de RM *post-mortem*, aproximadamente 12,87 horas ($\pm 2,59$). A RM foi realizada em sistema com campo de 3,0 T, sendo utilizadas imagens FLAIR; T2 multi-eco, DTI, Densidade de Prótons para cálculo da taxa de transferência de magnetização (*magnetization transfer ratio* – MTR). Foram delimitadas regiões de interesse (ROI) em 20 áreas contendo AASSB e 20 áreas homólogas aparentemente normais (AHAN). Para cada área, foram obtidos valores de anisotropia fracional (FA), coeficiente de difusão aparente (ADC), MTR e tempo T2. Os encéfalos foram seccionados em fatias de 0,4mm e fotografados em alta resolução. Estas imagens foram co-registradas tridimensionalmente com as imagens de RM, utilizando técnica semi-automatizada para correlação ponto-a-ponto. Os fragmentos analisados foram corados por hematoxilina-eosina (HE), Kluver-

Barrera (KB), galocianina (GALL), anti-neurofilamento (anti-NF), anti-proteína básica de mielina (anti-MBP) e anti-proteína ácida fibrilar glial (anti-GFAP). RESULTADOS: Os valores de FA foram $0,40 \pm 0,12$ nas AASSB, e $0,52 \pm 0,15$ nas AHAN. Os valores de ADC foram nas AASSB de $0,129 \pm 0,04 \times 10^{-3} \text{mm}^2/\text{s}$, e $0,108 \pm 0,03 \times 10^{-3} \text{mm}^2/\text{s}$ nas AHAN. Os valores de MTR foram $51,59 \pm 0,88 \%$ nas AASSB, e $52,88 \pm 4,09 \%$ nas AHAN. Os valores de RT2 foram $91,79 \pm 1,95 \%$ nas AASSB, e $69,94 \pm 4,54 \%$ nas AHAN. Os valores de HE foram $162,9 \pm 20,0$ nas AASSB, e $163,3 \pm 20,4$ nas AHAN. Os valores de GALL foram de $181,8 \pm 4,36$ nas AASSB, e $167,11 \pm 20,65$ nas AHAN. Os valores de KB foram de $168,9 \pm 19,08$ nas AASSB, e $182,82 \pm 20,65$ nas AHAN. Os valores de NF médios mensurados foram de $131,6 \pm 12,23$ nas AASSB, e $128,03 \pm 4,74$ nas AHAN. Os valores de MBP médios mensurados foram de $153,9 \pm 13,67$ nas AASSB, e $153,18 \pm 12,69$ nas AHAN. Os valores de GFAP médios mensurados foram de $94,61 \pm 7,85$ nas AASSB, e $81,23 \pm 6,29$ nas AHAN. Os testes não paramétricos de correlação (Spearman) entre variáveis de imagens de RM e histologia apresentaram correlação apenas entre FA e GFAP ($r = -0,59$; $p < 0,005$). DISCUSSÃO E CONCLUSÕES: De acordo com os resultados obtidos, podemos inferir que a presença de gliose é um processo patológico que pode ser detectado utilizando os parâmetros de FA nas imagens de DTI. Os resultados apresentados demonstram que imagens de RM adquiridas *post-mortem* podem servir para compreender melhor as alterações estruturais do tecido cerebral.

Descritores: 1.Ressonância magnética 2.Imagem de tensores de difusão 3.Cérebro 4.Imunoistoquímica 5.Anisotropia 6.Envelhecimento

SUMMARY

Silva RE. *Correspondence of histological parameters from diffusion tensor images* [Thesis]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2014.

BACKGROUND: Diffusion tensor imaging (DTI) is part of magnetic resonance imaging (MRI) acquisition methods available in clinical exams. However, there are not enough scientific basis to infer the histological substract of DTI parameters. White matter hyperintensities (WMH) are frequent findings in clinical MRI routine. In the last years, scientific evidences show that these injuries are not just age-related benign changes, but they could be associated to pathological processes. In this study we analyzed *post-mortem* MRI DTI data, specifically investigating WMH, their histological and immunohistochemical correlates. **OBJECTIVES :** At present study, we aimed to analyze quantifiable DTI parameters - Fractional Anisotropy (FA) and Apparent Diffusion Coefficient (ADC) - relaxometry (RT2) and magnetization transfer ratio (MTR) in WMH compared and normal appearing white matter (NAWM) from images obtained *postmortem* and *in situ*, and assess their histological substracts at WMH and NAWM using a point-to-point correlation platform. **METHODS :** We analyzed 20 regions of interest (ROI) encompassing WMH and NAWM selected from four subjects using *in situ post-mortem* MRI data acquired in 3.0T MR system. The subjects were scanned with a *post-mortem* interval of approximately 12h54m ($\pm 2h36m$). The MRI analysis included 3D T1, FLAIR; multi-echo T2, DTI, and proton density to calculate the rate of magnetization transfer (magnetization transfer ratio - MTR). In each ROI we obtained measures of FA, ADC, RT2 and MTR. Brain specimens were posteriorly fixed in celloidin, sectioned into 0.4mm slices and photographed in high resolution. These images were co-registered with three-dimensional MR images using semi-automated technique for correlation using a point-to-point method established in our group. WMH and

NAWM ROIs from MRI were submitted to quantitative histological analysis based on optical density color-deconvolution technique. Histological sections were stained in hematoxylin-eosin (HE) , Kluver-Barrera (KB) , galloccyanin (GALL), anti-neurofilament (anti-NF) , anti-basic myelin protein (anti-MBP) and anti-glial fibrillary acidic protein (anti-GFAP). RESULTS: The mean FA values were 0.40 ± 0.12 in WMH, and 0.52 ± 0.15 in NAWM. ADC in WMH was 0.1290 ± 0.04 , $\times 10^{-3} \text{mm}^2/\text{s}$ and $0.1081 \pm 0.03 \times 10^{-3} \text{mm}^2/\text{s}$ in NAWM. MTR was $51.59 \pm 0.88\%$ in WMH, and $52.88 \pm 4.09\%$ in NAWM. RT2 was $91.79 \pm 1.95\%$ in WMH, and $69.94 \pm 4.54\%$ in NAWM. FA, ADC and RT2 values were different between WMH and NAWM in a non-parametric analysis. On the quantitative histological analysis, the HE was 162.9 ± 20.0 in WMH , and $163.3 \pm 20.4\%$ in NAWM. GALL values at WMH was 181.8 ± 4.36 and 167.11 ± 20.65 at NAWM. KB was 168.9 ± 19.08 in WMH, and 182.82 ± 20.65 at NAWM. NF mean were 131.6 ± 12.23 in WMH, and 128.03 ± 14.74 at NAWM. MBP was 153.9 ± 13.67 at WMH, and 153.18 ± 12.69 at NAWM. Only GFAP values were different between WMH and NAWM. Mean GFAP was 94.61 ± 7.85 in WMH, and 81.23 ± 6.29 at NAWM. Non-parametric test (Spearman) between MR images and histology, showed correlation only for FA vs GFAP ($r = -0.594$, $p < 0.005$). DISCUSSION AND CONCLUSIONS: DTI FA and ADC parameters (and RT2 values) showed different patterns in WMH compared to NAWM, indicating that MR images acquired *post-mortem* may serve to understand the structural changes of the brain tissue. The presence of gliosis is a pathological process seems to be related to FA value from DTI.

Descriptors: 1.Magnetic Resonance Images, 2.Diffusion Tensor Images, 3.Brain, 4.Anisotrophy, 5.Ageing

Sumário

Apoio financeiro.....	i
Lista de abreviaturas.....	ii
Lista de figuras.....	iv
Lista de tabelas.....	viii
Resumo.....	ix
Summary.....	xi
1 INTRODUÇÃO.....	01
2 OBJETIVOS.....	04
2.1 Objetivos específicos.....	05
3 REVISÃO DA LITERATURA.....	06
3.1 A substância branca normal.....	07
3.2 Áreas de alteração de sinal na substância branca.....	09
3.3 Ressonância Magnética.....	14
3.3.1 Imagens de Tensores de Difusão (DTI).....	20
3.3.2 Parâmetros histológicos e DTI.....	25
3.4 Correlação neurorradio-histológica.....	29
4 MÉTODOS.....	32
4.1 Casuística.....	35
4.1.1 Aspectos Éticos.....	37
4.1.2 Critérios de inclusão.....	38
4.1.3 Critérios de exclusão.....	39
4.2 Imagens de Ressonância Magnética.....	40
4.2.1 Protocolo de aquisição de imagens <i>in cranio</i>	42
4.2.2 Protocolo de aquisição de imagens <i>extra situ</i>	44
4.3 Análise histológica.....	47
4.3.1 Autópsia e armazenamento.....	48
4.3.2 Processamento e corte histológico seriado.....	49

4.4 Correlação ponto-a-ponto entre imagem e histologia.....	54
4.4.1 Análise dos parâmetros de DTI nas AASSB.....	64
4.4.2 Identificação e amostragem.....	71
4.4.3 Coloração histológica.....	74
4.4.4 Caracterização imuno-histoquímica.....	76
4.5 Análise Estatística.....	80
5 RESULTADOS.....	81
5.1 Dados demográficos e variáveis extraimagem.....	82
5.1.1 Identificação topográfica.....	83
5.2 Análise de parâmetros de imagem.....	87
5.2.1 Análise de variáveis de DTI.....	89
5.2.2 Análise de variáveis de MTR e Relaxometria T2.....	91
5.3 Análise histológica.....	94
5.3.1 Descrição geral dos achados.....	95
5.3.2 Análise histológica quantitativa.....	111
5.4 Avaliação de correlação entre histologia e imagens de RM.....	130
6 DISCUSSÃO.....	132
6.1 Aspectos extra-imagem.....	137
6.2 Imagens de RM.....	143
6.3 Correlação entre histologia e imagens de RM	144
6.4 Limitações do estudo.....	148
6.5 Direções futuras.....	150
7 CONCLUSÕES.....	152
8 ANEXOS.....	154
9 REFERÊNCIAS.....	202

1 INTRODUÇÃO

Alterações morfológicas e fisiológicas podem ser observadas em imagens de Ressonância Magnética (RM) durante todo o processo de envelhecimento. Entretanto, a origem de algumas delas, bem como o significado clínico, ainda não estão estabelecidos, impossibilitando, dessa forma, uma correlação entre processos patológicos, alterações estruturais normais ao processo de senescência e achados de neuroimagem, uma vez que esses sinais podem ser observados *in vivo*, tanto em sujeitos sadios quanto em portadores de doenças neurodegenerativas (1–8).

Estimativas da Organização das Nações Unidas (ONU) apontam um provável crescimento em até quatro vezes da população idosa do planeta entre os anos 2000 a 2050 (UN Population Division, 2000). Este aumento inevitavelmente mudará o sistema social e será acompanhado da elevação da prevalência das doenças neurodegenerativas associadas à idade, em especial nos países em desenvolvimento (9,10).

Estudos na área do envelhecimento cerebral demonstram que a incidência de indivíduos afetados por algum tipo de doença neurodegenerativa segue aumentando gradativamente, aproximando-se de 10% de toda a população acima dos 65 anos (11,12). Constata-se que, com o avanço da idade, aumenta a porcentagem de pessoas afetadas, sendo que na faixa etária dos 60 aos 69 anos, apenas 1% deles possui algum tipo de neurodegeneração, enquanto que aos 85 anos, a porcentagem está

próxima dos 50%.

Durante o envelhecimento, muitos indivíduos passam por processos de declínio cognitivo relacionados a doenças neurodegenerativas que, em geral, são caracterizadas por perda das capacidades executivas, de planejamento e habilidades específicas. A incidência delas torna-se questão de saúde pública quando constata-se que esses sujeitos diminuem sua participação efetiva na sociedade e, em muitos casos, deixam seus postos de trabalho e hábitos sociais, demandando cuidados especiais (13,14).

Estudos minuciosos do cérebro humano durante o envelhecimento mostram perda de volume, alterações quantitativas regionais e perdas neuronais regionais e globais. Abordagens baseadas em imagens adquiridas com o encéfalo intracrânio em um curto intervalo *post-mortem* são apontadas como ideais para emular as condições observadas em sujeitos *in vivo* (1,11,12,15–17).

As técnicas atuais de diagnóstico por imagem, como a tomografia computadorizada (TC) e RM, mostram-se em franca expansão em estudos relacionados à morfologia cerebral durante o envelhecimento e suas possíveis aplicações clínicas. Desde o advento do radiodiagnóstico, muitas destas alterações foram mais bem compreendidas e tiveram sua correlação clínica estabelecida. Entretanto, um grande número de diagnósticos em neuroimagem é baseado em constatações empíricas, e não em correlação ponto-a-ponto e em estudos de correlação neurorradiológica e neuropatológica. Um completo entendimento desses achados nas imagens pode contribuir no processo de diagnóstico de doenças neurodegenerativas,

na análise dos indivíduos limítrofes que se encontram num estado de pré-manifestações clínicas, e tratamentos em estágios iniciais dessas enfermidades (18).

Nesse campo, existem vários esforços focados no estudo da relação entre o envelhecimento e as imagens de RM. Muitos deles têm dado atenção especial para as doenças relacionadas a alterações do sistema vascular, que podem resultar em lesões neurais. Elas podem estar relacionadas a achados de RM muito frequentes, mas não entendidos completamente, que se apresentam como áreas de alteração de sinal na substância branca (AASSB ou *white matter hyperintensities* - WMH), que não têm origem e caracterização histopatológica totalmente definidas. Podem ser observadas em imagens de RM ponderadas em T2 e também em técnicas não convencionais, como imagem de tensores de difusão (DTI) e índice de transferência de magnetização (MTR) (19–21).

Há, entretanto, evidências crescentes de que estas lesões não devem ser totalmente consideradas como alterações benignas relacionadas à idade, mas indicativas ou associadas à condição de processos patológicos com consequências clínicas (2). A presença dessas áreas de hipersinal que, em alguns casos, encontram-se associadas a outras alterações morfológicas, é descrita como um fator relacionado à perda de capacidade cognitiva e funções executivas em idosos (22,23). Estudos longitudinais corroboram essa hipótese, demonstrando a correlação das AASSB com sinais de declínio de memória, inteligência e autonomia (24–28).

2 OBJETIVOS

Descrever os parâmetros quantitativos de imagens de DTI obtidas *in cranio post-mortem*, comparar com parâmetros de transferência de magnetização e relaxometria T2 e avaliar seus correlatos histológicos nas AASSB e AHAN, utilizando técnicas de correspondência espacial ponto-a-ponto.

2.1 Objetivos específicos

1 - Avaliar parâmetros de anisotropia fracionada (FA) e coeficiente de difusão aparente (ADC) nas imagens em DTI, e compará-los a outras modalidades de imagem por RM, índice de transferência de magnetização (MTR) e relaxometria T2 (RT2) em relação aos valores obtidos em áreas de alteração do sinal na substância branca (AASSB) e áreas homólogas aparentemente normais (AHAN);

2 – Analisar o substrato histológico das AASSB assinaladas nas imagens de RM com análise quantitativa nas colorações de hematoxilina-eosina (HE), galocianina (GALL) e Kluver-Barrera (KB), e análise imuno-histoquímica por meio de anticorpos para Neurofilamento (NF), proteína básica de mielina (MBP) e proteína ácida fibrilar glial (GFAP) comparando os valores com AHAN;

3 - Avaliar se há correlações entre os parâmetros de imagem de RM de DTI (conjuntamente com MTR e relaxometria T2) e parâmetros quantitativos da histologia nas AASSB e AHAN.

3 REVISÃO DA LITERATURA

Devido ao carácter multidisciplinar dos assuntos aqui abordados, faz-se necessário apresentar resumidamente as bases teóricas das diversas linhas de pesquisa, que foram estudadas e combinadas para o desenvolvimento das metodologias utilizadas nesta tese.

3.1 A substância branca normal

A substância branca do sistema nervoso central, do encéfalo e da medula, é constituída por fibras nervosas de espessura variável. A sua cor esbranquiçada provém da bainha de mielina que reveste os axônios, que tem propriedades isolantes, fundamentais para a transmissão dos impulsos nervosos. A bainha de mielina, formada pelas células de Schwann, apresenta divisões regulares em regiões denominadas Nós de Ranvier, que conduzem com mais velocidade a propagação dos impulsos (29).

Em termos funcionais, este sistema de fibras interconecta as variadas áreas corticais e estruturas subcorticais, formações de neurônios que constituem a substância cinzenta, integrantes imprescindíveis na composição das numerosas redes neurais e cuja interrupção leva ao aparecimento de síndromes clínicas por desconexão (30,31).

Os feixes de fibras na substância branca podem ser classificados como:

A – Fibras de associação: ligam áreas corticais de um mesmo hemisfério;

B – Fibras de projeção: interligam áreas corticais com os núcleos da base, tronco cerebral, cerebelo e medula espinhal, podendo ser classificadas como eferentes e aferentes;

C – Fibras comissurais: interligam áreas corticais entre os hemisférios opostos e incluem o corpo caloso e a comissura anterior, entre outros.

Historicamente, no período anterior ao desenvolvimento das técnicas de imagem disponíveis atualmente, as informações mais detalhadas acerca da

substância branca humana foram obtidas por meio de dissecções de cérebros especialmente fixados, nos quais os feixes da substância branca eram expostos (32–34). Esse tipo de abordagem possibilitou que suas características fossem mais bem compreendidas, servindo de base para o desenvolvimento dos primeiros estudos focados nas alterações deste tecido.

3.2 Áreas de alteração de sinal na substância branca

As AASSB são achados comumente detectados em exames de RM de rotina. Apresentam limites difusos e habitualmente não têm correlação unívoca com processos patológicos.

São observadas em encéfalos de adultos, sua incidência é mais elevada em indivíduos acima dos 60 anos de idade, afetando 94% da população nessa faixa etária e, em muitos casos, acometendo indivíduos que não apresentam qualquer tipo de doença neurodegenerativa. Com menor frequência, esses achados podem ser observadas em sujeitos jovens, próximos dos 30 ou 40 anos (35). Mesmo em adultos saudáveis, as AASSB são frequentemente observadas, e seu aparecimento é relacionado a doenças cardiovasculares e hipertensão (28).

No entanto, evidências crescentes indicam que estas lesões não devam ser consideradas apenas como alterações benignas relacionadas à idade, mas indicativas ou associadas à condição de processos patológicos com consequências clínicas (35).

As primeiras descrições baseadas em imagens de TC e RM do cérebro descreviam as AASSB de forma contraditória e sem uma denominação fixa, variando de acordo com o investigador condutor do estudo. Essa dificuldade é compreendida quando observamos que essas áreas mostram-se como regiões de diminuição da densidade na TC e sinais alterados nas imagens de RM, sem nenhuma outra mudança patológica diretamente relacionada, tampouco um déficit clínico específico relacionado às reproduções. O primeiro termo proposto

e largamente adotado para designar essas alterações foi *leucoaraíoses*, palavra originária do grego (*leuko* = branca; *araíosis* = rarefação) e que significa “rarefação na substância branca” (36–39).

Estas AASSB se apresentam como regiões de pequenas dimensões, em geral menores que 5 mm de diâmetro, com formas arredondadas e hiperintensidade de sinal da RM ponderada em T2. A alteração de sinal observada indica que, nessas regiões, ocorre um aumento localizado do conteúdo de água e que, na maioria dos casos, não tem correlação clínica específica (Figura 1). Dessa forma, as diferentes teorias e interpretações sobre as AASSB devem-se ao fato de que são heterogêneas neuropatologicamente, apesar de similares em imagens de RM ponderadas em T2 (22,40–42).

Não está claro em qual medida as lesões AASSB são originadas por patologia vascular, se são marcadores do processo, ou mesmo se podem ter outra procedência. Rarefação mielínica e alterações estruturais em pequenas artérias penetrantes têm sido descritas em conjunção a estas lesões, sugerindo etiologia isquêmica (43,44). Como alguns exemplos da literatura, pode-se citar Hoth *et cols.* (8), que associaram a integridade endotelial à presença de AASSB, enquanto outros autores as relacionaram com alterações vasculares (6,45). Por outro lado, Sachdev *et cols.* (21) sugeriam que as AASSB podem ser utilizadas como marcadores de alteração microvascular cerebral. Outros estudos apontam degradações regionais de axônios, perda de fibras mielinizadas e degradação das bainhas de mielina (24,46–49).

Figura 1. Área de alteração de sinal em substância branca (AASSB) localizada em imagem ponderada em FLAIR: A – área de alteração de sinal na substância branca localizada no lobo frontal do hemisfério direito; B – área homóloga aparentemente normal na substância branca localizada no lobo frontal do hemisfério contra-lateral.

Estes achados podem estar ligados a desequilíbrios hemodinâmicos relacionados a quadros de hipertensão, diabetes e acidentes vasculares encefálicos (43,44,50). Concomitantemente a esses panoramas, estão episódios de queda prolongada da oxigenação tecidual e diminuição da microvascularização destas áreas de hipersinal, pois a hipóxia tecidual, associada a um aumento do monóxido de carbono, tem efeito citotóxico que acelera o processo de lesão cerebral, além de promover alterações teciduais não específicas, como desmielinização e proliferação astrocítica (51–53). Devido a esse tipo de relação, ganha força a hipótese de que essas lesões não são apenas achados benignos relacionados à idade, mas sim indicativas ou

associadas a processos patológicos degenerativos com consequências clínicas (19).

Por outro lado, alguns autores encontraram subsídios para as AASSB em espaços perivasculares aumentados ou desmielinização, os quais também parecem estar implicados em processos degenerativos. Tominoto *et cols.* demonstraram, ao analisar dois casos com correlação neurorradiologia-neuropatologia, áreas de gliose, desmielinização e aumento perivascular correspondentes às AASSB (50). Ademais, estas áreas estão ligadas, aparentemente, à diminuição do volume cortical.

Existe um debate intenso na literatura sobre a patogênese das AASSB na substância branca profunda e periventricular (2,19,26,43,47).

Estudos propõem a existência de relações entre a incidência das AASSB e déficits cognitivos, desordens psiquiátricas - como depressão - e comprometimentos motores. Porém, não há vínculo específico com nenhuma doença (54). Além disso, discute-se a associação entre as AASSB e a diminuição do volume cortical, e se a ocorrência destas na substância branca profunda e periventricular teria ou não a mesma patogênese, bem como a influência da frequência em que elas ocorrem em um mesmo paciente. É importante ressaltar que as AASSB são heterogêneas neuropatologicamente, apesar de serem similares em imagens pesadas por T2 (55,56).

Vários estudos foram realizados com específico interesse em alterações relacionadas ao envelhecimento cerebral, mas apenas alguns são dedicados a essas mudanças, as quais são interpretadas em exames de RM da rotina clínica como inespecíficas e de origem indeterminada, como a incidência de metástases, mais recorrentes na população idosa, ou de doenças

desmielinizantes, relativamente maior em populações mais jovens. E, na vigência de suspeita clínica em um caso com achado de AASSB em RM, a dúvida é de maior impacto, uma vez que essas alterações são parte do critério de diagnóstico e acompanhamento de, por exemplo, esclerose múltipla. Essa interpretação limitada gera o aparecimento de múltiplos termos em relatórios de RM com técnica convencional e, conseqüentemente, cria possibilidade de conflito entre condutas clínicas, fato agravado pela alta frequência destes achados nessa faixa etária (6,57–59).

3.3 Ressonância Magnética

As imagens obtidas por meio de RM representam um grande salto para a Radiologia e uma grande expansão nas possibilidades diagnósticas do sistema nervoso. Pode-se afirmar que a RM é atualmente a técnica mais sofisticada para aquisição de imagens da morfologia do cérebro humano. Pela qualidade e precisão de suas imagens, resolução espacial e contraste, e características não invasivas e não ionizantes, este método é descrito em muitos momentos da literatura como revolucionário (60–62).

Entretanto, tais avanços diagnósticos só foram possíveis devido a grandes esforços de figuras importantes de diversas áreas. Mesmo sem um objetivo comum, proporcionaram estudos nos campos da química, física, matemática e engenharia, que serviram de base para o uso clínico da RM, tal qual é conhecido hoje.

Ao traçar uma linha do tempo com os principais estudos que culminaram nas modernas técnicas de RM, o levantamento histórico inicia-se em 1822, quando o matemático francês Jean-Baptiste Joseph Fourier (1768-1830) publicou a obra *“Théorie analytique de la chaleur”*. Fourier baseou-se nas leis de Newton sobre o resfriamento da matéria, indicando que entre duas moléculas adjacentes há um fluxo de calor e, conseqüentemente, energia, que é proporcional a diferença de suas temperaturas. Neste mesmo estudo, o francês tentou demonstrar que

qualquer função diferenciável pode ser expandida em uma série trigonométrica.

Essa teoria, aparentemente sem qualquer relação com a RM, inspirou um estudo do físico e químico dinamarquês Hans Christian Oersted (1777-1851), no qual, ao dispor um fio ligado a uma bateria elétrica próxima a uma bússola, observou que o ponteiro desta alterava seu comportamento e passava a se mover em direção ao cabo. Assim, tornou-se possível indicar a relação entre eletricidade e magnetismo (63,64).

O fenômeno em questão foi denominado eletromagnetismo, longamente estudado e apresentado pelo físico francês André Marie Ampère (1775 – 1836). Dentre os pontos citados em seu trabalho, encontra-se a lei de Ampère, que descreve matematicamente a interação da força magnética entre duas correntes elétricas.

Ainda no campo do magnetismo, os físicos e pesquisadores holandeses Pieter Zeeman (1865-1943) e Hendrick Antoon Lorentz (1853-1928) tiveram uma contribuição fundamental. Em trabalho publicado em 1895, foi apresentada a teoria das partículas carregadas, onde pela primeira vez os íons foram descritos e suas propriedades individuais puderam ser mensuradas como oscilações responsáveis pela emissão do espectro luminoso de alguns desses íons. Posteriormente, esse estudo levou a conclusão de que estas partículas, quando expostas a um campo magnético, sofreriam alterações em suas oscilações e em seu espectro luminoso.

Wolfgang Pauli (1900-1958) propôs a teoria dos spins eletrônicos, na qual indicava que certos núcleos atômicos comportam-se como pequenos ímãs giratórios e que possuem momentos angulares associados a um momento magnético.

Quando um corpo carregado eletricamente gira ao redor do seu próprio eixo, forma-se campo elétrico denominado spin. Cada átomo de hidrogênio (H^+), por exemplo, possui um próton e um elétron em sua órbita. Tanto o próton como o elétron giram ao redor de seus eixos e possuem spin. Como resultado do seu spin, prótons e nêutrons possuem um campo magnético chamado dipolo magnético. O momento magnético é um vetor que representa a intensidade e orientação deste dipolo.

Estudando as estruturas atômicas, Pauli concluiu que os núcleos apresentam diferentes spins e momentos magnéticos. Essas conclusões foram utilizadas como modelo para estudos posteriores, como os de Lorentz, que apresentou ao mundo a teoria dos íons, confirmando as pesquisas sobre radiação eletromagnética.

Ao demonstrar em seus trabalhos que um campo magnético podia surtir efeito sobre partículas carregadas de órbitas circulares, sobrepondo-se a frequência precessional destas, o físico e matemático irlandês Joseph Larmor (1857-1942) postulou matematicamente que a frequência de precessão das partículas é proporcional ao campo magnético aplicado sobre cada núcleo. Essa definição tornou-se conhecida como “Equação de Larmor”.

O fenômeno de ressonância consiste na frequência em que os prótons giram em torno do eixo de um campo magnético. O spin nada mais é que uma propriedade intrínseca da partícula atômica, assim como massa e carga. Para que essa propriedade se tornasse matematicamente verdadeira, fez-se necessário inserir uma constante átomo-dependente, trata-se da razão giromagnética, definida como um torque capaz de fazer com que os momentos magnéticos dos núcleos polarizados realizem o movimento precessional na presença de um campo magnético.

No ano de 1938, o físico estadunidense Isidor Isaac Rabi (1898-1988) publicou estudos sobre mensuração do momento magnético dos prótons. Ao obter sucesso em sua pesquisa, Rabi possibilitou a mensuração do momento magnético nuclear por dois grupos independentes, liderados pelo compatriota Edward Purcell (1912-1997) e pelo suíço Félix Bloch (1905-1983) em 1945. Enquanto o grupo de Bloch realizou um experimento com líquido, no qual a detecção dos sinais de ressonância se dava através da força eletromotriz induzida por precessão dos núcleos em uma bobina receptora, Purcell conseguiu medir a RM em um sólido (65–67).

Finalmente, em 1966, foi publicado o estudo *“Application of Fourier transform spectroscopy to magnetic resonance”*, de Ernst e Anderson. Neste trabalho, foi apresentada a técnica que permitiu a utilização da transformada de Fourier na espectroscopia por RM, tendo como princípio a conversão de sinais eletromagnéticos em informações dos materiais, que poderiam ser mensurados e analisados (68,69).

Na década seguinte, o médico e inventor estadunidense Raymond V. Damadian (1936-) apresentou ao mundo seus estudos onde, baseado nas descobertas anteriores, concluiu que a RM poderia ser um método capaz de diferenciar áreas de alteração, como massas tumorais, do tecido normal em órgãos. Na pesquisa, Damadian realizou testes com amostras de fígado de ratos, e pôde observar, em seu equipamento, que o sinal captado no tecido tumoral não era o mesmo daquele observado nos normais. Esse aspecto deveu-se a maior quantidade de átomos de hidrogênio presentes no tecido tumoral. Dessa forma, Damadian iniciou esforços para que essa mesma metodologia pudesse ser aplicada em maior escala para análises *in vivo* em humanos, o que dispensaria o uso da radiação dos exames convencionais baseados em raios X. Naquele momento, aparentava ser uma alternativa bastante promissora (70,71).

Mesmo com todo o esforço realizado por Damadian, as primeiras imagens coerentes do corpo humano só foram obtidas por Peter Mansfield (1933-) e Andrew Maudsley (1952-) que publicaram a primeira imagem seccional de um dedo humano (72,73). Até então, a RM realizava apenas leituras do espectro das moléculas, ao contrário de outras técnicas capazes de gerar imagens.

Esse quadro mudou quando o químico Paul Lauterbur (1929-2007) concebeu uma forma de adquirir imagens baseadas na RM. Utilizando gradientes de campo magnético, Lauterbur conseguiu mapear alguns pontos e, em 1973, obteve a primeira imagem de uma porção de água em um tubo

de ensaio. Em seguida, reconstruiu a reprodução com uma técnica similar à utilizada até então para TC.

Os sinais medidos na RM são uma combinação de sinais de todos os átomos do objeto avaliado. Porém, cada partícula apresenta ondas de frequência e amplitude diferentes, que demandam algum tipo de decodificação para que as imagens obtidas sejam coerentes. A transformada de Fourier permitiu indicar o que cada uma dessas frequências e amplitudes representam. Codificando o sinal com gradientes de campo magnético, é possível separar as frequências presentes no Espaço K e com isso obter uma representação por imagem (72).

Ainda que de forma bastante experimental, por meio de grandes esforços conjuntos de vários centros de pesquisa, foi possível obter as primeiras imagens do encéfalo em 1980, abrindo as portas para as atuais técnicas de diagnóstico por neuroimagem baseadas na RM (74,75).

3.3.1 Imagens de Tensores de Difusão (DTI)

Devido às limitações presentes nas técnicas tradicionais de aquisição de imagens por RM no estudo das áreas de alteração de sinal na substância branca, as imagens de tensores de difusão (DTI) apresentam-se como uma abordagem promissora para a pesquisa das AASSB (43,76–79).

Esta técnica é baseada em aquisições que são influenciadas pela magnitude e direção da difusão microscópica de prótons, principalmente presentes nas moléculas de água, permitindo a avaliação indireta de barreiras estruturais naturais do tecido.

Os exames convencionais de RM baseiam-se, principalmente, na diferença do conteúdo de água e gordura presente nos tecidos constituintes do cérebro (70% de água na substância branca, 80% na cinzenta e 99% nos fluidos cerebrais), e suas propriedades de relaxação, que geram o contraste observado nas imagens por RM.

Em 1986, Le Bihan *et al.* utilizaram um aparelho de 0,5 T para adquirir as primeiras imagens *in vivo*. Neste trabalho, foram adquiridas DTI de encéfalos de sujeitos saudáveis, e os dados obtidos foram comparados a imagens *in vitro* adquiridas seguindo os mesmos parâmetros (80–82).

A primeira aplicação prática das imagens em DTI na rotina clínica foi proposta por Warach *et al.* em 1992, como ferramenta para identificar isquemia cerebral em estágios iniciais. Em 1997, Makris *et al.* iniciaram a utilização de mapas de difusão nos tecidos, obtidos a partir da combinação

de dados da anisotropia celular e difusão no tecido. Esse estudo foi utilizado mais tarde no desenvolvimento da técnica de tractografia (83,84).

As imagens adquiridas em DTI mostram-se eficazes na análise das fibras da substância branca, pois nestas, em condições normais, a mobilidade da água ocorre preferencialmente paralela aos axônios, por causa da limitação exercida pela bainha de mielina que envolve os axônios, onde a direção predominante da difusibilidade coincide com a orientação principal das fibras que compõem os tratos e feixes. Isso é observado por meio de um tensor de difusão, que permite quantificar fenômenos físicos complexos a partir de uma matriz de números derivados de medidas de difusão em direções diferentes, possibilitando estimar a difusibilidade em qualquer direção arbitrária ou determinar sua direção máxima (85).

Em um meio no qual as moléculas podem mover-se em qualquer direção, a difusão pode ser classificada como isotrópica. Como esta movimentação está condicionada ao meio no qual estão dispostas as moléculas, podemos observar diferentes comportamentos dentro do SNC.

Enquanto no líquido há liberdade para a movimentação das moléculas, sem quaisquer barreiras, na substância branca a difusão ocorre em maior parte ao longo do eixo mais longo dos axônios, apresentando-se de forma heterogênea em outras direções. Esse comportamento recebe o nome de difusão anisotrópica (Figura 2):

Figura 2. Diagrama das distribuições da difusão em um tensor localizado em um feixe de fibras (A). A elipse mostrada em (B) representa os deslocamentos da difusão, que é altamente anisotrópica em tecidos fibrosos, como a substância branca; Extraído e adaptado de Alexander *et al.*, 2007.

Todos os fatores que afetam o ambiente celular, causando mudanças na mobilidade molecular ou modificando a disposição do tecido, exercem efeito mensurável no tensor de difusão. Normalmente, as macromoléculas, mielina, axônios e membranas celulares apresentam-se como obstáculos para a difusão aleatória das moléculas de água no meio. Em algumas condições de anormalidade estrutural, como nas AASSB, ocorrem alterações mensuráveis na liberdade de difusão da água (86).

Os parâmetros utilizados para caracterizar a difusão no cérebro são, principalmente, a anisotropia fracional (FA) e o coeficiente de difusão aparente (ADC), que podem ser calculados com base nos elementos do tensor, de forma a gerar mapas quantitativos cerebrais (87).

O ADC indica a difusibilidade da água no meio, mostrando o comportamento molecular na presença de restrições, como a viscosidade e

barreiras espaciais. Na substância branca, o valor do ADC depende da correlação entre a orientação dos feixes da substância branca e a direção dos gradientes de difusão. O valor do ADC é maior quando as fibras de substância branca são paralelas aos gradientes de difusão, e é menor quando os feixes são perpendiculares a eles.

Os valores de FA são dispostos em uma escala de 0 a 1, sendo que quanto mais próximo de 0, mais isotrópico, e quanto mais próximo de 1, mais anisotrópico. Valores entre 0,57 e 0,87 são obtidos como referência no corpo caloso em imagens adquiridas *in vivo*.

Este parâmetro indica a fração da magnitude da difusão, que pode ser relacionada à média quadrática da difusão anisotrópica, ou seja, ao grau de desvio da difusividade isotrópica em todas as direções (88).

O elemento λ representa a média dos *autovalores*, equivalente a difusibilidade direcional média. A direção da difusibilidade máxima pode ser expressa por meio de cores, divididas em vermelho, verde e azul (RGB). A intensidade da cor é modulada por FA, resultando em mapas que resumem o grau de anisotropia e a direção da fibra localmente (85).

O FA indica o quão direcional é a difusão em cada voxel. Pixels mais intensos representam zonas onde a anisotropia é elevada, como, por exemplo, o corpo caloso. Os valores da anisotropia mostram-se menores na substância cinzenta, e também são sensíveis às membranas celulares e aos tratos fibrilares (96, 112), alterando seu comportamento em regiões que apresentam alterações, como as AASSB, demonstrando anormalidades em

áreas com lesão na substância branca, onde a orientação preferencial de difusão imposta pelos feixes dos tratos deixa de existir.

As estruturas histológicas que contribuem para a difusão anisotrópica são as membranas celulares, a mielina e o citoesqueleto dos axônios. Esse aspecto indica que o sinal de DTI seja principalmente determinado pela membrana celular (53,90).

A presença de uma orientação primordial da estrutura determina que o processo de difusão aconteça de maneira não simétrica e, através da diagonalização dos vetores que descrevem o processo em cada eixo de aplicação dos gradientes, é possível determinar uma direção de difusão paralela ao eixo da estrutura e observar alterações microestruturais no tecido.

A difusão dos pulsos eletromagnéticos ao longo dos feixes de fibras permite a criação de mapas computadorizados dos tratos da substância branca encefálica, e uma localização precisa das AASSB.

Dessa forma, as DTI podem servir como uma ferramenta robusta para o estudo das AASSB, pois constituem uma metodologia eficaz para a análise de estruturas cerebrais previamente inacessíveis por métodos não invasivos (80,90–92).

3.3.2 Parâmetros histológicos e DTI

As técnicas de RM são fundamentalmente influenciadas pela presença e quantidade de água regional, sendo importante o estudo de suas propriedades locais e fatores dinâmicos associados.

As primeiras indicações de que o cérebro contém canais de água vieram de pesquisas de Jung *et cols.* e Hasegawa *et cols.* (56,93). Com a possibilidade de uso de anticorpos específicos, foi posteriormente demonstrado que o fluxo de água deve contribuir para mudanças dependentes de volume do espaço extracelular, que podem ser importantes para alterar as concentrações de solutos, modificando a textura e, conseqüentemente, o sinal de RM. Entretanto, até onde se sabe, não foram realizados estudos que correlacionem a presença destas alterações com a anisotropia ou difusibilidade global em imagens de Ressonância Magnética (59,94,95).

A água no tecido encefálico pode ser encontrada no meio intra e extracelular, e suas propriedades de difusão e macromoléculas são diferentes nestes dois compartimentos. A matriz extracelular do cérebro participa de interações célula-célula e célula-substrato, através de fatores neurotróficos, moléculas de adesão celular (*cell adhesion molecules* – CAMs) e outras moléculas, como glicosaminoglicanas (GAGs) e proteoglicanos (PGs) (96,97).

As GAGs são encontradas nas matrizes extracelulares de todos os tecidos e, exceto pelo ácido hialurônico, elas existem na forma de PGs. Esses compostos são também encontrados como receptores de membranas ligados à matriz extracelular. As moléculas estão implicadas ou associadas a doenças degenerativas. Por exemplo, modificações no conteúdo de GAGs e PGs foram demonstradas em pacientes com Doença de Alzheimer, alterações pós-traumáticas e gliomas infiltrativos (98–102).

Outros componentes celulares do substrato encefálico podem estar relacionados a alterações da difusibilidade. Os neurofilamentos (NF) são estruturas dinâmicas que contém diversos locais de fosforilação de um grande número de proteínas-quinases e modulam a estrutura intracelular dos axônios. Eles têm papel fundamental no controle do calibre axonal, além de afetar outros elementos citoesqueléticos, microtúbulos e filamentos de actina. Os de classe neurofilamento-L (NF-L ou neurofilamento de polipeptídeo leve), neurofilamento-M (NF-M ou neurofilamento de polipeptídeo médio) e neurofilamento-H (NF-H ou neurofilamento de polipeptídeo pesado) são membros da família de filamentos intermediários e os principais componentes do citoesqueleto neuronal. Alterações no metabolismo destes são frequentemente observadas em doenças neurodegenerativas, incluindo a esclerose lateral amiotrófica (ALS), doença de Parkinson e Alzheimer.

Em regiões onde a substância branca apresenta-se normal, áreas marcadas com as proteínas do NF apresentarão feixes de axônios íntegros. Concomitantemente, em regiões de aumento de espaço perivascular, edema

e diminuição da quantidade de fibras, haverá diminuição na densidade de neurofilamentos.

A proteína básica de mielina (MBP) é um dos principais constituintes da bainha de mielina no sistema nervoso. Esse componente atua tanto na formação quanto na estabilização dessas estruturas.

Redução de expressões de MBP são relacionadas a doenças desmielinizantes, como a esclerose múltipla e consequente perda de função dos feixes da substância branca. As técnicas de avaliação por NF e MBP podem ser utilizadas de forma paralela, pois possibilitam a análise das mesmas estruturas por abordagens diferentes.

A proteína ácida fibrilar glial (GFAP) é a principal constituição dos filamentos intermediários em astrócitos, e serve como um marcador específico que distingue os astrócitos diferenciados a partir de outras células gliais durante o desenvolvimento do SNC.

As GFAPs desempenham um papel importante na mitose, ajustando a rede de neurofilamentos celulares. Durante a mitose, há um aumento na quantidade de fosforilada GFAP e um movimento dessa proteína modificada ao sulco de clivagem. Essas proteínas também estão relacionadas a reparação celular após lesões no SNC, atuando na proliferação glial nas regiões alteradas.

Ainda não se sabe como estes componentes alteram o sinal de DTI. É de se esperar que estas moléculas estejam relacionadas a alterações do volume celular, proliferação glial e integridade neuronal, possam influenciar

o sinal de RM e, desta maneira, potencialmente ajudarem a entender o significado das AASSB (103).

3.4 Correlação entre Ressonância Magnética e Histologia

Várias teorias foram propostas para abordar o problema de correlação entre os achados indicados nas imagens de RM e as alterações histológicas no encéfalo analisado *post-mortem*. Entretanto, estas iniciativas ainda não foram suficientes para esclarecer as dúvidas relacionadas ao sinal de RM em AASSB (12,54,55,104).

Apesar de todos os esforços, no geral as tentativas para estabelecer uma correlação entre neuroimagem e neuropatologia ainda não foram além de todas as limitações, encontrando-se num patamar inferior ao ideal.

Em linhas gerais, as limitações encontradas nos diferentes estudos que utilizam imagens adquiridas *post-mortem* não apresentam grande variação, podendo ser agrupadas. As mais comuns são:

A - Modificação do sinal de RM após a fixação do tecido: notadamente, o sinal T1 da substância branca deixa de exibir o alto sinal relativo, invertendo o contraste com a camada cortical, após a fixação do encéfalo em formol. Como alternativa a esse tipo de alteração, a abordagem mais aconselhada é a correlação entre referências presentes no encéfalo e a construção de mapas cito e mieloarquitetônicos nos espaços correspondentes *in cranio* (sem processamento) e aplicá-los posteriormente, quando *extra situ*. Pode-se usá-la para calcular o grau de deformação ao se obter uma segunda imagem *extra situ* por RM, com os mesmos parâmetros empregados anteriormente no mesmo tecido (12, 54);

B - Deformações não lineares do cérebro após a remoção do crânio e durante o processamento histológico: as substâncias branca e cinzenta deformam de maneira imprevisível durante a fixação, desidratação e embedição (105,106). É impossível prever como o encéfalo se deformará durante o processamento, pois isso ocorre de forma totalmente randômica, como visto em estudos anteriores;

C - Ausência ou incongruência entre informações clínicas dos sujeitos da pesquisa, que podem revelar se as alterações cerebrais resultaram em sintomas neurológicos: muitos dos encéfalos utilizados nos estudos de correlação de achados de imagem pertenciam a indivíduos cujo perfil clínico funcional *pre mortem* não pôde ser acessado. Esse tipo de desencontro de informações é especialmente comum em países europeus, com leis que restringem a coleta de dados biográficos após a 2ª Guerra Mundial;

D - Custo operacional de processamento do encéfalo: os exames de RM, que empregam as mais avançadas técnicas, e o tipo de processamento histológico, que permite a confecção de fatias histológicas espessas, admite a realização de um mapeamento e correlação com os achados de imagem, ainda são procedimentos de alto custo, demandam muito tempo e capacitação específica para uma correta análise dos dados obtidos.

Além disso, outro importante fator para que a abordagem ideal não seja aplicada por outros grupos, é a combinação entre a diminuição drástica do número de autópsias em todo o mundo, limitando a disponibilidade de

sujeitos, e a dificuldade para a aquisição de imagens de RM em um intervalo *post-mortem* curto (107).

4 MÉTODOS

Todos os indivíduos incluídos neste trabalho tiveram seus encéfalos submetidos à RM e processados histologicamente como parte do projeto “*Avaliação histológica de áreas de alteração de sinal de RM associadas ao envelhecimento: plataforma de correlação tridimensional ponto-a-ponto*”. Este trabalho envolve a cooperação entre duas instituições da Alemanha: Labor für Morphologische Hirnforschung der Klinik und Poliklinik für Psychiatrie und Psychotherapie, Universität Würzburg, em Würzburg, e The Alzheimer Memorial Center Department of Radiology, Universität Ludwig-Maximilian, em Munique; e os Departamentos de Radiologia e Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP) e Banco de Encéfalos Humanos do Grupo de Estudos em Envelhecimento Cerebral (BEHGEEC), base para outros estudos sobre análises de imagens *post-mortem* (16,17,108).

O BEHGEEC-FMUSP foi criado em 2004, com o objetivo de coletar e armazenar tecidos encefálicos humanos *post-mortem*. Graças à colaboração do Serviço de Verificação de Óbitos da Capital (SVOC), em São Paulo, e à generosidade de familiares de pacientes falecidos e levados para este local, tem sido possível suprir as necessidades do Banco com êxito.

Mais de 1800 encéfalos de indivíduos acima de 50 anos foram coletados nos últimos sete anos. Grande parte destes encéfalos pertencia a sujeitos sem nenhuma alteração neurológica, diferenciando o BEHGEEC-

FMUSP dos outros bancos de encéfalos do mundo, garantindo uma pesquisa mais aprofundada sobre o envelhecimento humano não patológico.

O fluxo de trabalho descrito nessa seção, e aplicado na plataforma citada anteriormente, foi resumido esquematicamente e pode ser observado na Figura 3:

Figura 3. Resumo esquemático da metodologia empregada

4.1 Casuística

A seleção dos casos incluídos neste trabalho foi feita de forma aleatória, a partir do banco de informações e imagens, constituído por todos os projetos que integram a plataforma de correlação ponto-a-ponto.

Todos os sujeitos do estudo foram provenientes do SVOC, anexo à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP). O Serviço é responsável por esclarecer causas de óbito decorrentes de morte natural e realiza aproximadamente 13 mil autópsias por ano, de indivíduos que faleceram na região metropolitana de São Paulo. O local mostrou-se ideal para a coleta das amostras, pois se encontra próximo ao BEHGEEC e ao Departamento de Radiologia do Hospital das Clínicas da FMUSP, provendo uma estrutura ímpar e reconhecida mundialmente.

O procedimento de coleta de casos via BEHGEEC teve como ponto de partida a triagem e recrutamento de familiares dos sujeitos para participação na pesquisa. Essa etapa constitui parte da rotina estabelecida para todos os estudos realizados por este grupo, e contou com a participação de uma equipe de profissionais de enfermagem especificamente capacitada.

A equipe foi responsável por abordar o familiar ou responsável, convidando-o a participar do estudo, de forma ética e não invasiva. Este grupo foi treinado para reconhecer possíveis fatores que pudessem interferir na resposta dos informantes (3,108).

A entrevista aplicada foi estruturada para a coleta de dados demográficos, história pregressa de saúde do paciente, hábitos, vícios, assim como seus antecedentes familiares e pessoais, enfocando o período anterior à morte. Além do convite para fornecer informações sobre o histórico clínico e estado neurológico pré-óbito do indivíduo, os responsáveis consentiam ou não a doação do material e captação de imagens para a pesquisa (Anexos A e C).

Dentre os casos disponíveis, foram selecionadas 20 AASSB, distribuídas por quatro sujeitos, com características descritas na Tabela 1, que correspondiam aos critérios de inclusão e exclusão descritos a seguir. Informações demográficas e outras variáveis extraimagem dos objetos da pesquisa são apresentadas no Anexo D.

Tabela 1 – Características dos sujeitos e encéfalos incluídos no estudo

Sujeito	AASSB	Idade	Gênero	IPM (hrs)	T PRE (°C)	T POS (°C)	Massa do encéfalo (g)	Volume do encéfalo (mm ³)
1	6	94	F	11	27,5	27,2	1408	1500
2	6	64	M	16	24,5	25	1114	1000
3	4	80	M	14	24,9	26	1130	1100
4	4	79	F	10,5	21,2	21,4	1226	1100

AASSB - Áreas de alteração de sinal na substância branca; IPM – Intervalo *post-mortem*; RM – Ressonância Magnética; T PRE– Temperatura aferida antes do exame de RM (via auricular); T POS – temperatura aferida após o exame de RM (via auricular).

4.1.1 Aspectos Éticos

Todos os encéfalos incluídos neste estudo foram cedidos após a apreciação e concordância sobre Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), apresentado ao responsável legal dos indivíduos selecionados (Anexo A), e preenchimento de questionário para avaliação de aspectos cognitivos. A assinatura do Termo foi obtida individualmente para cada encéfalo doado, e todos os dados pessoais cedidos para a pesquisa foram mantidos em sigilo.

O presente estudo foi aprovado na 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, sob o número 1199/09 (Anexo B). O envio de tecidos e amostras biológicas para processamento com a técnica de celoidina na Universidade de Würzburg foi autorizado na Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP), sob o número 573/10. O projeto *“Avaliação histológica de áreas de alteração de sinal de RM associadas ao envelhecimento: plataforma de correlação tridimensional ponto-a-ponto”*, bem como todos os outros que utilizam suas informações, foram aprovados nos comitês de ética das instituições participantes.

4.1.2 Critérios de inclusão

A - Concordância do responsável legal em disponibilizar o encéfalo e imagens para análise científica, por meio da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE);

B - Indivíduos com idade igual ou superior a 50 anos na data do óbito;

C - Indivíduos que não passaram por quaisquer situações capazes de alterar a morfologia cerebral normal, como traumas cranianos, ou que pudessem causar lesões cerebrais isquêmicas secundárias, como encefalopatia anóxica de longa duração;

D - Intervalo entre a morte e a captação das imagens inferior a 16 horas;

E - Presença de AASSB observadas na análise das imagens.

F - Indivíduos portadores de implantes metálicos, próteses, marca-passos e dispositivos intracranianos não passíveis de remoção.

4.1.3 Critérios de exclusão

A - Presença de lesões nos encéfalos, como acidentes vasculares encefálicos antigos, encontrados durante análise das imagens de RM para localização das AASSB;

B - Quaisquer tipos de alterações morfológicas observadas posteriormente ao exame de RM, devido a traumas ou alterações drásticas de volume;

C - Ausência de AASSB passíveis de análise, devido a artefatos observados durante o processamento das imagens que impossibilitem uma avaliação correta dos dados;

D - Encéfalo não fixado ou fixado incorretamente;

E - Indivíduo com histórico de alcoolismo e/ou utilização de qualquer tipo de substância, capaz de gerar um viés durante a avaliação cognitiva, baseada no questionário preenchido pelos responsáveis;

F - Informações inconsistentes fornecidas pelos responsáveis sobre os aspectos cognitivos do indivíduo.

4.2 Imagens de Ressonância Magnética

Os exames de RM foram realizados no Instituto de Radiologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (InRad HC FMUSP), em um sistema de 3,0 T equipado com gradientes de 80 mT/ m e uma bobina de crânio de oito canais (Intera Achieva, Philips Healthcare, Holanda).

As imagens de RM foram adquiridas *in cranio*, com temperatura controlada e mensurada no espécime. O tempo de realização do exame de RM foi o menor possível, em um período inferior a 16 horas após o óbito, a fim de manter a integridade tecidual dos encéfalos e seguindo a premissa de não atrasar os rituais de luto das famílias (Tabela 1).

Para a aquisição de imagens seguindo as posições padronizadas nos protocolos utilizados no serviço de RM do InRad, todos os indivíduos foram dispostos em decúbito dorsal horizontal. A região do crânio foi introduzida na bobina apropriada e fixada com o auxílio de fitas adesivas e espumas de acolchoamento para evitar artefatos relacionados a vibrações do aparelho de RM e, conseqüentemente, movimentação do objeto de estudo.

Durante a preparação do cadáver para o exame de RM, foi feita minuciosa avaliação externa para a retirada de objetos com propriedades ferromagnéticas, potencialmente perigosos e/ou capazes de interferir nas imagens, gerando artefatos.

As imagens de RM do encéfalo foram adquiridas em um intervalo médio de 13,5 h ($\pm$ 2,08) após o óbito, antes da remoção do encéfalo do crânio. A temperatura da sala de exames foi controlada, permanecendo em torno de 22 °C, e a temperatura dos corpos aferida antes e depois do exame, por via auricular (Tabela 1).

4.2.1 Protocolo de aquisição de imagens *in cranio*

Todos os indivíduos incluídos neste estudo tiveram as imagens de RM adquiridas seguindo o mesmo protocolo. Na programação das sequências de Ressonância Magnética, a linha média entre comissura anterior (AC) e comissura posterior (PC) no plano axial, foi usada como referência.

O tempo médio de aquisição das imagens de RM *in cranio* foi de 110 minutos para cada indivíduo. O protocolo utilizado para a aquisição das imagens *in cranio* é descrito na Tabela 2:

Tabela 2 – Parâmetros de aquisição de imagens utilizados *in cranio*

Sequência	Localizador	FLAIR	T1	DTI	T2 MULTI-ECHO	MTR
Orientação	*	Axial	Sagital	Oblíquo	Sagital	Axial
Cortes	9	60	180	2.380	300	60
TR (ms)	63,7	9.686	6,53	23.650	3.300	7,3
TE (ms)	1,6	130	2,97	65	30/60/90/120/150	3,6
TI (ms)	*	2.800	791	*	*	*
<i>Flip Angle</i>	*	90	8	90	*	6
NEX	1	1	1	2	1	1
Resolução (mm)	5 x 0,5 x 1	1 x 0,3 x 2	1 x 1 x 1	2 x 2 x 2	0,78 x 0,8 x 2	2 x 2 x 2
FOV mm	240 x 240	512 x 512	240 x 240	256 x 256	230 x 185	240 x 180
<i>Sense</i>	*	*	2 (RL)	2 (AP)	*	*
2D / 3D	2D	2D	3D	2D	2D	3D
Fator b	*	*	*	3000	*	*
Gradientes	*	*	*	32	*	*
EPI	*	*	*	*	5	*
TSE	*	35	240	*	5	3

TR - Tempo de repetição; TE - Tempo de eco; TI - Tempo de inversão; NEX - Número de excitações; FOV - Campo de visão; EPI – Imagem eco planar; 2D – Bidimensional; 3D – Tridimensional; FLAIR - *Fluid attenuated inversion recovery*; DTI – Imagem de tensores de difusão; MTR - Índice de transferência de magnetização.

4.2.2 Protocolo de aquisição de imagens *extra situ*

Após um período de 120 dias de fixação, processo descrito a seguir, os encéfalos foram submetidos a uma nova aquisição de imagens. Este tempo de fixação foi obedecido com o objetivo de minimizar a incidência de artefatos na RM. Neste momento, os espécimes tiveram suas imagens captadas *extra situ*.

Para a obtenção das imagens, os encéfalos foram acondicionados em recipientes plásticos, adequados às suas dimensões, e compostos por materiais livres de indução de artefatos. Também foram minimizadas alterações causadas por bolhas de ar, presentes entre o tecido e o paraformol líquido no interior do objeto.

Os exames de RM *extra situ* foram realizados no InRad HC FMUSP, nas mesmas condições da aquisição *in situ*, no sistema de 3,0 T equipado com gradientes de 80 mT/ m e bobina de crânio de oito canais (Intera Achieva, Philips Healthcare, Holanda).

As amostras incluídas foram armazenadas em recipiente plástico cilíndrico, com dimensões aproximadas de 18 x 20 cm, contendo uma solução de paraformol a 4%. Este recipiente foi introduzido horizontalmente na bobina apropriada, e fixado de forma a impedir artefatos nas imagens de RM relacionados a vibrações.

O protocolo utilizado para a aquisição das imagens *extra situ* é descrito na Tabela 3. O tempo médio de aquisição das imagens de RM *extra*

situ, seguindo os parâmetros descritos anteriormente, foi de 110 minutos para cada indivíduo.

Tabela 2 - Parâmetros de aquisição de imagens utilizados *extra cranio*

Sequência	Localizador	FLAIR	T1	DTI	T2 MULTI-ECHO	MTR
Orientação	*	Axial	Sagital	Oblíquo	Sagital	Axial
Cortes	9	60	180	2380	300	60
TR (ms)	63,7	9686	6,53	23650	3300	7,3
TE (ms)	1,6	130	2,97	65	30/60/90/120/150	3,6
TI (ms)	*	2800	791	*	*	*
<i>Flip Angle</i>	*	90	8	90	*	6
NEX	1	1	1	2	1	1
Resolução (mm)	5 x 0,5 x 1	1 x 0,3 x 2	1 x 1 x 1	2 x 2 x 2	0,78 x 0,8 x 2	2 x 2 x 2
FOV mm	240 x 240	512 x 512	240 x 240	256 x 256	230 x 185	240 x 180
<i>Sense</i>	*	*	2 (RL)	2 (AP)	*	*
2D / 3D	2D	2D	3D	2D	2D	3D
Fator b	*	*	*	3000	*	*
Gradientes	*	*	*	32	*	*
EPI	*	*	*	*	5	*
TSE	*	35	240	*	5	3

TR - Tempo de repetição; TE - Tempo de eco; TI - Tempo de inversão; NEX - Número de excitações; FOV - Campo de visão; EPI – Imagem eco planar; 2D – Bidimensional; 3D – Tridimensional; FLAIR - *Fluid attenuated inversion recovery*; DTI – Imagem de tensores de difusão; MTR - Índice de transferência de magnetização.

4.3 Análise histológica

Após a realização dos exames de RM, os encéfalos do estudo tiveram suas imagens analisadas paralelamente ao processamento histológico de cada sujeito, como descrito nos itens a seguir.

4.3.1 Autópsia e armazenamento

O procedimento de autópsia dos casos foi realizado pelo SVOC, anexo à FMUSP, seguindo os protocolos estabelecidos na rotina de verificação de óbitos. Todos os cadáveres incluídos neste estudo foram submetidos à avaliação especializada de um médico legista, a fim de apontar a causa do falecimento. Este processo foi realizado em um intervalo de até quatro horas após a aquisição das imagens, garantindo a integridade tecidual dos encéfalos.

Durante a coleta, feita após a abertura da caixa craniana, os encéfalos foram cuidadosamente retirados, pesados e tiveram seu volume e massa aferidos.

A fixação dos espécimes foi realizada, submergindo-os em solução de paraformolaldeído com concentração de 4%, em um recipiente com dimensões apropriadas, evitando qualquer tipo de contato do tecido com superfícies sólidas capazes de gerar alterações durante o processo. Três dias depois, foi feita uma incisão de aproximadamente 5 mm no joelho do corpo caloso, pela qual o paraformolaldeído pôde entrar nos ventrículos laterais e, dessa forma, homogeneizar a retenção da porção interna do encéfalo.

Todos os espécimes utilizados foram, então, enviados à Universidade de Würzburg, para os processamentos subsequentes.

4.3.2 Processamento e corte histológico seriado

Após os procedimentos de fixação, os encéfalos foram submetidos a desidratação por gradientes alcoólicos. A princípio, o tronco cerebral e o cerebelo foram retirados por meio de incisão na porção rostral da ponte, e os hemisférios foram separados por uma secção longitudinal no corpo caloso seguindo a fissura inter-hemisférica. Os ventrículos laterais receberam pequenas aberturas por meio da remoção dos septos pelúcidos. Subsequentemente, os hemisférios foram dispostos em recipientes plásticos separados, com tampa para vedação, onde permaneceram submersos em soluções de etanol com diferentes concentrações (70%, 80% e 96%), por uma semana a cada estágio.

Meninges e vasos exteriores também foram removidos após o término do processo de desidratação por álcool. Esse passo pôde ser realizado apenas quando o tecido nervoso adquiriu maior consistência, de forma que pudesse ser manipulado e possibilitasse a remoção dos vasos, meninges, e pequenas calcificações, sem lesionar o tecido cortical do encéfalo. Essa etapa ocorreu sete dias após o início da desidratação por etanol.

Encerrada a desidratação, os hemisférios foram depositados em recipientes plásticos (de tamanho mínimo de 240 × 140 × 135 mm), contendo solução de celoidina a 8%, na proporção de 180g de celoidina dissolvida em 750 ml de etanol 100% e 750 ml de dietil éter. Os recipientes

permaneceram por 48 horas em um dispositivo de selagem a vácuo, no qual foram retirados todos os vapores de etanol presentes na solução, e, dessa forma, concentrando a celoidina em 16%.

Durante o procedimento de embedição, a celoidina conformou-se sobre a superfície encefálica, e se infiltrou em todos os espaços disponíveis, como os sulcos mais profundos e os ventrículos. Por meio da evacuação dos vapores de etanol, evitou-se a formação de bolhas gasosas sobre a superfície do tecido. Ademais, as perfurações nos septos pelúcidos facilitaram a infusão da celoidina nos ventrículos laterais, evitando a ocorrência de colapamento e consequentes deformações nos hemisférios.

Em seguida, os hemisférios foram acondicionados em recipientes plásticos dispostos dentro de uma caixa de vidro (volume: 30L), juntamente a um disco de petri (diâmetro: 185 mm) contendo clorofórmio. Nesta caixa fechada, a celoidina foi submetida a um processo lento de secagem e endurecimento, por meio da interação química entre os vapores de clorofórmio.

O bloco de celoidina adquiriu um aspecto opaco e teve o volume reduzido durante este passo do processamento, em um período que pode variar entre 14 a 16 dias. O processo de endurecimento, utilizando vapores de clorofórmio, é interrompido quando o bloco adquire consistência semelhante a da borracha.

Após este estágio, os hemisférios cerebrais estavam em condições ideais para a secção seriada. Assim, o bloco de celoidina foi afixado em um suporte plástico, que possibilita a montagem sobre um micrótomo (Polycut,

Cambridge Instruments, Reino Unido) à bandeja deste. Para a completa fixação, a base do bloco foi colada com uma liga de celoidina e etanol a 70% e secou durante quatro horas (Figura 4).

Figura 4. Bloco de celoidina posicionado para o corte seriado em micrótomo.

As secções foram realizadas com a espessura de 440 μm de forma serial, no sentido coronal. A celoidina, disposta em torno da superfície do encéfalo, atua como suporte e guia para a lâmina do micrótomo, evitando variações no ângulo de corte e lesões nos tecidos. Este procedimento demandou tempo médio de 90 minutos por hemisfério. É importante

ressaltar que, durante a secção do bloco, a superfície da celoidina e a lâmina do micrótomo foram mantidas umidificadas com solução de etanol a 70% (109). Todos os cortes foram fotografados individualmente com uma câmera digital DSLR (Fujifilm S2 pro, Fuji Photo Film Co., Japão), resolução de 12 megapixels e lente focal macro 50 m (Sigma F2.8 EX, Sigma Co., Japão). As imagens foram armazenadas em formato JPEG (Figura 5).

Figura 5. Cortes histológicos seriados de hemisfério cerebral embebido em celoidina.

As secções dos tecidos foram guardadas em recipientes plásticos, identificadas, lacradas e submersas em solução de etanol a 70%. Este tipo de armazenamento permitiu a preservação das características histológicas do objeto de estudo, fazendo com que pudesse ser utilizado neste e em outros trabalhos (109).

4.4 Correlação ponto-a-ponto entre imagem e histologia

Uma vez determinadas as AASSB nas imagens de RM, o passo seguinte do processamento foi identificá-las nas fotografias dos cortes seriados do encéfalo.

Para o corregristo espacial das imagens de RM e das fotos dos cortes histológicos, foi utilizado o *software* Amira 5.5.1 (Mercury Systems Inc. Chelmsford, Massachusetts, EUA) (110), onde foram gerados volumes referentes a cada modalidade de imagem por meio de uma modalidade de segmentação de superfície semiautomatizada, descrita nas etapas a seguir.

A primeira fase consistiu na criação das superfícies correspondentes ao encéfalo, utilizando como base as imagens de RM ponderadas em T1. Essa sequência serviu como fundamento para os passos subsequentes, devido a sua notada capacidade de representação morfológica.

O encéfalo foi dividido por uma ferramenta baseada em um histograma, que possui escala em tons de cinza, com delimitação da faixa de interesse. No passo seguinte, por meio de segmentação manual, executada com auxílio de uma placa gráfica, os limites do tecido foram definidos de maneira mais refinada (Figura 6). A partir disso, foi possível gerar superfícies poligonais referentes a cada encéfalo (Figura 7). Esse tipo de reconstrução tridimensional foi demonstrado anteriormente por colaboradores deste trabalho (17,107,108).

Figura 6. Segmentação das áreas referentes ao encéfalo humano baseada em imagens de RM. A coluna (A) ilustra a segmentação automatizada, obtida por meio de histogramas de intensidade de sinal, enquanto a (B) ilustra a segmentação semiautomatizada, que combina estes histogramas com segmentação humana.

Figura 7. Reconstrução tridimensional de encéfalo humano baseada em imagens de RM. O quadro (A) representa a vista lateral, enquanto (B) e (C) mostram detalhadamente a superfície poligonal gerada através da segmentação semiautomatizada.

O processo de segmentação semiautomatizada foi repetida, utilizando como referência as sequências de imagens ponderadas em FLAIR. Novamente, foi gerada uma superfície poligonal, registrada espacialmente com a superfície criada através das imagens de T1. A marcação utilizada neste ponto emprega apenas transformações de corpo rígido, uma vez que são reproduções obtidas do mesmo indivíduo e com os mesmos parâmetros espaciais.

A seguir, as AASSB presentes nas imagens FLAIR também tiveram seus limites segmentados, e devido ao registro espacial com as imagens ponderadas em T1, como descrito anteriormente, puderam ser observadas tridimensionalmente, como mostra a Figura 8.

O passo seguinte deste método foi a reconstrução tridimensional, baseada na sequência de fotografias dos cortes histológicos seriados. Nesta etapa, as imagens adquiridas no momento do corte do encéfalo foram modificadas em um *software* de edição de imagens, passando do modo RGB para escala de cinza (ImageJ v. 1.45 - Maryland, EUA). Em seguida, novamente empregando Amira 5.4.1, elas foram alinhadas e possíveis distorções espaciais foram corrigidas.

Novamente, o processo de segmentação semiautomatizada foi usada para delimitação dos limites do encéfalo. Contudo, devido à secção dos hemisférios no início da preparação do material, esse estágio foi realizado separadamente para cada um deles, resultando em duas superfícies (Figura 9).

Figura 8. Reconstrução tridimensional baseada em imagens de RM ponderadas em T1 e registradas espacialmente com imagens ponderadas em FLAIR. A sequência ilustra a superfície gerada através de T1 em (A), seguida por um aumento na transparência desta (B) e identificação tridimensional das AASSB apontadas em FLAIR (C) após completo esmaecimento da superfície de T1.

Figura 9. Fluxo de edição de imagens e reconstrução 3D dos cortes histológicos. Temos (A) imagem em RGB, (B) imagem em escala de cinza, (C) alinhamento tridimensional das imagens vista sagital, (D) segmentação semiautomatizada e (E) superfície 3D.

Para cada uma das superfícies dos hemisférios, a homóloga gerada anteriormente foi corregistrada, utilizando as imagens de T1. Neste estágio do processo, foi empregado um algoritmo de normalização espacial, inserido no software Amira, que, através do uso de funções de transformação espacial, possibilitou o registro de imagens de diferentes modalidades.

Devido às características inerentes aos tipos de imagens utilizadas, foi necessário realizar o corregristo em duas etapas. Na primeira, foram utilizadas transformações geométricas de corpo rígido, sendo que nesta modalidade de transformação, a característica principal é a preservação das distâncias e ângulos nas imagens, aplicando apenas rotações, translação e alterações de escalonamento horizontal, vertical e oblíquo. Como consequência, altera-se a posição espacial, mas as formas das superfícies tridimensionais geradas não se modificam.

Figura 10. Corregistro entre RM e histologia. Na reprodução, (A) são imagens de RM e fotos dos cortes com área cortical destacada como

exemplo e (B) são imagens sobrepostas e corregistradas com mesma área destacada; Extraído e adaptado de Grinberg *et al.*, 2009.

Com o intuito de refinar o registro entre as imagens, foi aplicada uma segunda modalidade de transformação, denominada registro não rígido. Desta forma, foi possível adequar localmente as deformações espaciais necessárias.

Uma vez feito o corregistro tridimensional, o passo seguinte foi localizar as fatias histológicas exatas, nas quais se encontravam as AASSB. As fases e ferramentas aplicadas nesse processo são descritas na seção seguinte.

As AASSB são localizadas e descritas, utilizando os *softwares* ImageJ (v. 1.45 - Maryland, EUA) e Osirix (v. 4.1 32bit - Genebra, Suíça). No início do processamento, todas as sequências foram convertidas de formato de saída do aparelho de RM DICOM (*Digital Imaging and Communications in Medicine*) para NIfTI (*Neuroimaging Informatics Technology Initiative*), compatível com os *softwares* utilizados posteriormente. A conversão foi feita, empregando sistemas específicos para tal (Dcm2niiGUI - Maryland, EUA). A recomendação corrente é que os dados sejam retirados do console da RM no formato DICOM, evitando, assim, qualquer perda de informação (111,112).

Utilizando as imagens ponderadas na sequência FLAIR, adquiridas no plano axial, foram traçadas regiões de interesse em torno de cada AASSB. Durante a seleção das AASSB, foram excluídas as áreas que apresentavam

maior intensidade de sinal, próximas às regiões com perda tecidual identificável como, por exemplo, AVEs, e também nas bordas dos ventrículos.

Para manter um controle durante a análise, as AASSB foram distinguidas, seguindo o número de identificação atribuído a cada sujeito e numeração da fatia na qual foram observadas (Figura 11).

Figura 11. Identificação das AASSB em imagens de RM ponderadas em FLAIR. Cortes axiais em sequência crânio-caudal (A-D).

As AASSB assinaladas nas imagens ponderadas em FLAIR tiveram topografia identificada com o auxílio de atlas radiológico da substância branca (113). Dessa forma, foi possível descrever o padrão de localização nos sujeitos deste estudo. A localização das áreas de AASSB foi checada por neurorradiologista (EAJ) com 15 anos de experiência nesta especialidade.

4.4.1 Análise dos parâmetros de DTI nas AASSB

O primeiro passo do processamento das imagens de DTI consistiu na obtenção dos arquivos referentes às tabelas de gradientes. Estes arquivos, denominados *bvecs* (b vectors) e *bvals* (b values), formam a lista contendo as direções dos tensores e magnitudes de sensibilização utilizados em cada aquisição. Estas informações geralmente são armazenadas como cabeçalho dos arquivos DICOM e, após a conversão para NifTi, armazenadas como arquivos de texto.

Entretanto, devido às particularidades do formato de saída do equipamento de RM Phillips utilizado neste estudo, em alguns casos estes arquivos não são corretamente gerados no momento da conversão de formatos, e devem ser extraídos manualmente, utilizando um editor de texto.

Durante a coleta das imagens de DTI, seguindo o padrão empregado para esse tipo de sequência, foram adquiridas quatro imagens de referência, denominadas b_0 , sem influência de gradientes de difusão como base para o cálculo dos parâmetros de DTI. Devido às características dos tecidos *post-mortem*, usou-se valor de $b = 3000 \text{ mm}^2/\text{s}$ para codificar a difusão nas demais direções.

Para a análise dos parâmetros referentes às imagens de DTI, foram utilizadas as ferramentas contidas na plataforma FSL (v. 5.0.1 - Oxford Centre for Functional Magnetic Resonance Imaging of the Brain, Oxford University, Oxford, Reino Unido) (114,115). Por meio da mensuração das

propriedades das imagens da sequência de difusão de RM, aplicando tal ferramenta, é possível determinar nos tecidos, de forma local, as características inerentes a cada voxel representado nas imagens, estipulando a principal direção e magnitude de difusão de cada um deles (91).

Porém, esse tipo de abordagem está sujeito a interferências, ruídos na imagem, artefatos de movimento e outros, relacionados à aquisição das reproduções (116).

A não uniformidade da intensidade de sinal em aquisições de RM pode ser influenciada pelas propriedades físicas e construtivas dos aparelhos de RM, gerando, assim, impactos no desempenho de algoritmos computacionais de análise de imagens (138). Há a necessidade de uniformizar a intensidade do sinal pela aplicação de um algoritmo de correção. Neste trabalho, utilizou-se para a correção das correntes espúrias (*Eddy current correction*), ferramenta integrante da plataforma FSL, para correção das distorções da imagem decorrentes de correntes elétricas de gradiente – inerente às aquisições do tipo *eco planar* utilizadas para coleta das imagens de DTI.

Esta ferramenta repara os efeitos indesejados causados por fortes gradientes de campo, no momento em que se alternam velozmente durante a sequência de aquisição. Quando os pulsos de gradientes de difusão são trocados rapidamente, o tempo de variação do campo magnético dos gradientes resulta em uma indução de corrente em várias superfícies de condução do equipamento de RM, como nas bobinas de RF, por exemplo.

As correntes espúrias são ondas responsáveis por modificar a forma dos pulsos de gradientes de campo, fazendo com que os sinais produzidos pelos ecos não sejam refocalizados com um tempo mínimo, ou seja, que estejam desalinhados, produzindo um artefato fantasma na direção de codificação da fase. Essas distorções são diferentes para cada direção de gradiente. O mecanismo também é capaz de corrigir pequenas distorções na imagem, causadas por movimento do sujeito.

Para o cálculo dos valores de ADC, foi utilizada a seguinte fórmula simplificada:

$$ADC = \frac{\lambda_1 + \lambda_2 + \lambda_3}{3}$$

onde,

ADC = coeficiente de difusão aparente

λ_1 = auto-vetor principal

λ_2 , λ_3 = auto-vetores perpendiculares

Para o cálculo dos valores de FA, foi utilizada a seguinte fórmula simplificada:

$$FA = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^3 (\lambda_i - \bar{\lambda})^2}{2 \sum_{i=1}^3 \lambda_i^2}}$$

onde,

FA = anisotropia fracionada

λ_i = auto-vetor

i = indexador da direção de gradientes

A etapa seguinte consistiu em retirar das imagens todos os tecidos adjacentes ao encéfalo, usando uma máscara implementada no algoritmo *Brain Extraction Tool* (BET). Por meio dessa extração, evitou-se que dados referentes aos gradientes de outros tecidos pudessem ser interpretados como dados referentes ao cérebro na sequência da análise (117,118).

Figura 12. Mapas de FA (A) e ADC (B) gerados a partir de imagens de DTI adquiridas *post-mortem*.

Esta fase foi realizada com a aplicação de um histograma de intensidade de sinal, por meio do qual é possível identificar os pontos de maior e menor intensidade nas imagens e delimitar uma faixa de sinal na qual está contido o cérebro. Após a identificação automatizada do centro gravitacional e do tamanho aproximado da cabeça do sujeito, uma superfície poligonal com faces triangulares foi gerada, expandida e deformada individualmente em cada vértice, até adequar-se aos limites cerebrais (118).

Depois da extração do encéfalo, ainda utilizando a plataforma FSL, foram geradas as representações dos tensores de difusão. Empregando a ferramenta DTI FIT, foram calculados os mapas referentes ao FA e ADC gerados e armazenados como imagem paramétricas, cuja escala armazenada variou de 0 a 1 para FA, e valores positivos para ADC (Figura

12). Essas fases de processamento, com o uso do FSL, demandaram aproximadamente 16 horas para cada encéfalo incluído no estudo.

Subsequentemente, os segmentos de imagens gerados nesta etapa foram corrigidas com as sequências ponderadas em FLAIR. Esta fase teve como objetivo o registro espacial de imagens intermodais, processo de adequação envolvendo aquisições de um mesmo indivíduo, mas em modalidades diferentes.

Uma vez feito o correto registro, foi possível transpor as coordenadas das AASSB identificadas nas imagens ponderadas em FLAIR para os mapas adquiridos no passo anterior e, dessa forma, traçar as ROIs (regiões de interesse) de cada uma delas.

Figura 13. AASSB identificada em cortes axiais de imagens de RM ponderadas em FLAIR (A) e transferência de magnetização (B e C).

Nesse ponto, foi possível obter os valores de FA e ADC médios nas áreas delimitadas. O cálculo desses dados é feito através da razão entre cada um desses fatores e a área do ROI demarcada.

Os valores referentes à MTR (índice de transferência de magnetização) e a relaxometria T2 nas AASSB e nos controles AHAN, também foram aferidos durante a análise. Os valores de MTR foram calculados, levando-se em conta a diferença entre as imagens sem e com pulso de transferência dividido pelo valor do pixel da imagem sem o pulso (Figura 13). A medida de relaxometria (valor R2) foi obtida pelo ajuste da curva de decaimento livre da relaxação T2 com técnica de Marquant-Levenberg implementada no *software* Osirix (v. 4.1 - 32bit - Genebra, Suíça). A figura 14 mostra os gráficos de relaxação T2 obtidos na análise das AASSB e AHAN, respectivamente.

Figura 14. Representação gráfica da relaxação T2 nas áreas de alteração de sinal em substância branca (AASSB) e áreas homólogas aparentemente normais (AHAN).

4.4.2 Identificação e amostragem

Como apresentado na seção 4.3.2, as imagens dos cortes histológicos foram adquiridas na orientação coronal do encéfalo. Entretanto, mesmo com as características tridimensionais da sequência T1 utilizada nesse protocolo, a princípio o ângulo de aquisição da imagem de RM e o da fotografia não são equivalentes.

O passo posterior ao fluxo de trabalho consistiu na obtenção do ângulo de corte, por meio de comparação entre as sequências de imagens nas duas modalidades. A etapa foi realizada de forma semiautomatizada através da ferramenta de *reslice*, fornecida no *software* Amira. A Figura 15 ilustra a diferença entre os ângulos das reproduções.

Figura 15. Diferenças de angulação entre imagens de RM e cortes histológicos. (A) demonstra a disparidade através da intersecção dos cortes nas duas modalidades.

Uma vez que as superfícies tridimensionais foram alinhadas espacialmente e os cortes referentes à RM coincidiam sobre as imagens da histologia, a etapa seguinte foi identificar o número da fatia contendo as AASSB. Após essa identificação, as duas figuras foram sobrepostas e, finalmente, a área de interesse demarcada.

Como controle de qualidade, cada AASSB identificada por meio do processo de corregristo foi avaliada por dois especialistas (um radiologista e

um anatomista), a fim de confirmar a correlação entre as áreas apontadas como homólogas.

As AASSB foram amostradas nas fatias histológicas e novamente fotografadas por uma câmera DSLR, fixada a altura constante. Como passo seguinte ao processamento, os fragmentos retirados foram embebidos em parafina e cortados de forma seriada, em fatias de 8 μm .

4.4.3 Coloração histológica

As lâminas referentes a cada uma das AASSB passaram por diferentes processos de coloração. Neste estágio, foram aplicados os seguintes métodos:

A – Coloração de hematoxilina-eosina (HE), através da qual foi possível diferenciar regiões basófilas, ressaltadas por meio da hematoxilina, e acidófilas, por meio da ação da eosina. Nos tecidos nervosos analisados neste estudo, o componente basófilo (eosina) permitiu a avaliação das estruturas do citoplasma, estruturas fibrosas e colagenosas, enquanto o componente acidófilo (hematoxilina) possibilitou a visualização dos núcleos celulares e outras estruturas de constituição proteica;

B – Coloração de Nissl (galocianina - GALL), utilizada para caracterização do tecido nervoso. Com esta técnica, foi possível realçar características estruturais dos neurônios, salientando os corpos celulares e os retículos endoplasmáticos;

C – Coloração de Kluver-Barrera (KB), empregada para a visualização da substância branca, ressaltando as áreas mielinizadas e corpos celulares.

Após o uso dessas técnicas, todas as lâminas foram preparadas para microscopia, sendo desidratadas e montadas com resina sintética (*Permout, Toulene Solution SP15-500, Fischer Scientific*), seguindo o protocolo descrito em Heinsen *et al.* (109).

Os cortes histológicos passaram por uma avaliação quantitativa da integridade tecidual nas AASSB e nas áreas controle, utilizando a técnica de densidade óptica.

Para esta análise, todos os cortes histológicos corados por HE, KB e GALL foram fotografados por uma câmera DSLR, fixada a altura constante em microscópio óptico, utilizando objetivas de 4 x 2.5 e 10 x 2.5 de aumento. Posteriormente, as imagens obtidas foram analisadas no *software* ImageJ (Maryland, EUA), com o uso da ferramenta de análise baseada no índice de absorbância e refração de luz nos tecidos apresentados nas imagens selecionadas. Os resultados foram tabulados e comparados entre AASSB e áreas de controle.

Em seguida, todos os cortes histológicos foram avaliados qualitativamente por dois observadores independentes, com o objetivo de identificar alterações específicas em cada área amostrada. Após esta etapa, os observadores se reuniram e definiram o valor para cada ROI em consenso. Para tal, foi utilizada escala de 4 níveis, em relação à avaliação da coloração de fundo. O nível máximo 3 se refere à coloração mais evidente que no restante da lâmina; nível 2 coloração semelhante ao restante da lâmina; nível 1 coloração presente, mas inferior ao restante da lâmina; e nível 0, coloração ausente.

4.4.4 Caracterização imuno-histoquímica

Os estudos imuno-histoquímicos foram realizados pelo método bioativo de imunoperoxidase.

Foram utilizados os seguintes anticorpos primários: anti-neurofilamento (*NF-H antibody*, Millipore Corporation, Billerica, EUA), anti-proteína básica de mielina - *Myelin basic protein antibody* (Millipore Corporation, Billerica, EUA) e anti-proteína ácida fibrilar glial (*GFAP antibody*, (Millipore Corporation, Billerica, EUA). Esses anticorpos foram selecionados para estudos específicos dos seguintes cenários:

A - Anticorpo NF: neurofilamento - relacionado à modulação da estrutura intracelular e fosforilação de proteínas. Alterações no metabolismo dos neurofilamentos são frequentemente observadas em doenças neurodegenerativas, incluindo esclerose lateral amiotrófica, Parkinson e Alzheimer;

B - Anticorpo MBP: proteína básica de mielina - essa proteína é uma das principais constituintes da bainha de mielina. Alterações no metabolismo destas são relacionadas à desmielinização e consequente perda de função dos feixes da substância branca;

C - Anticorpo GFAP: proteína ácida fibrilar glial - é o principal constituinte dos filamentos intermediários em astrócitos, e serve como um marcador específico que distingue os astrócitos diferenciados a partir de outras células gliais. É utilizada na identificação de lesões teciduais.

Todos os protocolos de imuno-histoquímica foram aprimorados no BEHGEEC (Alho *et al.*, 2006; Grisoli *et al.*, 2006), sendo que as técnicas de recuperação antigênica, realizadas em panela a vapor com citrato em pH 6.0, possibilitaram ótima visualização da proteína marcada.

Os casos submetidos ao exame imuno-histoquímico foram embebidos em parafina e cortados de forma seriada em fatias de 8 µm. As fatias histológicas foram dispostas em bandejas para a separação das que seriam alvo para imuno-histoquímica. Foram usadas seis fatias de cada caso, para cada um dos três anticorpos. As fatias foram dispostas em lâminas, passaram pelo processo de retirada da parafina, reidratação, bloqueio da peroxidase endógena, recuperação antigênica em panela a vapor com citrato pH 6.0, bloqueio de ligações inespecíficas com leite em pó desnatado, incubação do anticorpo primário em geladeira por aproximadamente 15 horas, incubação do anticorpo secundário por uma hora à temperatura ambiente, incubação do sistema de detecção SABC por uma hora à temperatura ambiente, marcação com o cromógeno diaminobenzidina e, para finalizar, coloração do tecido com hematoxilina de Harris.

Após a aplicação dessas técnicas, todas as lâminas foram preparadas para microscopia, sendo desidratadas e montadas com resina sintética (*Permunt, Toulene Solution SP15-500, Fischer Scientific*), seguindo o protocolo descrito em Heinsen *et al.* (109).

Os cortes histológicos passaram por uma avaliação quantitativa da integridade tecidual nas AASSB e nas áreas controle, aplicando técnica de

deconvolução de cor. Esta técnica consiste na avaliação da impregnação do cromógeno, utilizado no protocolo de imuno-histoquímica, por meio de imagens digitais.

Para tal análise, os cortes imuno-marcados por GFAP, MBP e NF foram fotografados por uma câmera DSLR, fixada a altura constante em microscópio óptico, utilizando objetivas de 4 x 2.5, 10 x 2.5 e 40 x 2.5 de aumento. Posteriormente, as imagens obtidas foram analisadas no *software* ImageJ (versão 1.45s - <http://info.nih.gov> - Maryland, EUA).

As lâminas coradas por HE, GALL e KB, após fotografadas, foram avaliadas quantitativamente por meio de técnica de densidade óptica, na qual as imagens obtidas foram convertidas para uma escala de cinza e tiveram a intensidade de marcação de cada pixel avaliada de forma automatizada. Os valores obtidos foram aferidos em unidades arbitrárias (UA).

As lâminas imuno-coradas por GFAP, MBP e NF, após fotografadas, tiveram suas imagens divididas de acordo com os canais RGB (Red, Green, Blue) - correspondendo, respectivamente, a marcação por cromógeno, intertício corado não específico e coloração por hematoxilina - e as intensidades de marcação aferidas automaticamente em unidades arbitrárias (UA).

A seguir, todos os cortes histológicos foram avaliados qualitativamente por observadores independentes (ILP, ETS e ATA), com anos de experiência em análise imuno-histoquímica, a fim de identificar alterações específicas em cada área amostrada. Após esta etapa, os

observadores se reuniram e definiram o valor para cada ROI em consenso. Para tal, foi utilizada escala de 4 níveis, em relação à avaliação da coloração de fundo. O nível máximo 3 se refere à coloração mais evidente que no restante da lâmina; nível 2 coloração semelhante ao restante da lâmina; nível 1 coloração presente, mas inferior ao restante da lâmina; e nível 0, coloração ausente.

4.5 Análise estatística

Foi realizada a análise descritiva, com cálculo de medidas de tendência central e de distribuição/dispersão das variáveis.

Para análise comparativa entre os parâmetros de imagem e histologia, foi utilizado o teste de Mann-Whitney, considerando-se independência das ROIs e englobando as AASSB e AHAN.

Para avaliar a correlação entre as variáveis, foi utilizado o teste não-paramétrico de Spearman (Spearman's rho).

Todas as análises foram realizadas utilizando-se o pacote estatístico Prism (v. 6.0 – GraphPad – San Diego – EUA). Foi estabelecido o critério do nível de significância (alfa) de 5% para todos os testes empregados.

5 RESULTADOS

Nesta seção, serão apresentados os resultados obtidos através dos procedimentos descritos anteriormente. Para facilitar a interpretação, os dados deste estudo referentes às imagens de RM e às análises histológicas serão mostrados separadamente. Os parâmetros mensurados serão revelados individualmente e, depois, comparados no final desta seção.

5.1 Dados demográficos e variáveis extraimagem

Os dados referentes às variáveis de idade, intervalo *post-mortem*, temperatura corpórea pré-exame de RM, temperatura corpórea pós-exame de RM e variação de temperatura, são apresentados na Tabela 4. Em resumo, a média de idade foi de 79,3 anos, a média do intervalo *post-mortem* foi de 12h54m, e a média de temperatura variou em menos de 20% ao redor de 24 °C.

Tabela 4 - Análise descritiva das características dos sujeitos incluídos no estudo

	<i>Post-mortem</i>
Média de idade (anos)	79,3 ±12,3
Média de intervalo <i>post-mortem</i> (horas, minutos)	12h54m ±2h36m
Temperatura média pré RM (°C)	24,5 ±2,6
Temperatura média pós RM (°C)	24,9 ±2,5
Variação média de temperatura pré e pós RM (°C)	0,37 ±0,6

± - Desvio padrão; °C graus Celsius; RM – ressonância magnética.

5.1.1 Identificação topográfica

A distribuição das AASSB, nos casos incluídos neste estudo, é apresentada graficamente na Figura 16, sendo possível observar que a incidência destes achados foi maior no lobo parietal (45%), seguida por lobo frontal (35%), lobo occipital (15%) e lobo temporal (5%).

Figura 16. Representação gráfica da distribuição das AASSB na substância branca cerebral.

Em cada um dos lobos, foram identificados os locais de incidência das AASSB – resumidos na tabela 5.

A - Frontal: fascículo longitudinal superior, fibras curtas de associação, fórceps menor, região anterior da corona radiata e região superior da corona radiata;

B - Temporal: fascículo fronto-occipital inferior; no lobo occipital, região posterior da corona radiata, fascículo longitudinal inferior e fascículo longitudinal superior;

C - Parietal: região superior da corona radiata e cíngulo.

A Figura 17 apresenta todas as AASSB classificadas como ROIs nas imagens de RM, adquiridas no plano axial e ponderadas em FLAIR dos sujeitos incluídos neste estudo. As regiões topográficas onde as AASSB foram observadas e descritas (vide a tabela 5).

Figura 17. Localização das AASSB nos sujeitos incluídos no estudo em imagens de RM adquiridas no plano axial e ponderadas em FLAIR.

Tabela 5 - Localização nos tratos da substância branca e área das AASSB (mm²)

AASSB	Localização	Hemisfério	Lobo	Área (mm²)
1A	Região superior da corona radiata	Esquerdo	Frontal	16,5
1B	Fibras curtas de associação	Direito	Frontal	11,1
1C	Fascículo longitudinal superior	Direito	Frontal	13,9
1D	Região anterior da corona radiata	Esquerdo	Frontal	15,2
1E	Região superior da corona radiata	Direito	Parietal	27,8
1F	Fórceps menor	Esquerdo	Frontal	21,3
2A	Região anterior da corona radiata	Direito	Frontal	15,4
2B	Fascículo longitudinal superior	Direito	Occipital	8,1
2C	Região superior da corona radiata	Esquerdo	Frontal	7,8
2D	Fascículo longitudinal inferior	Esquerdo	Occipital	20,7
2E	Cíngulo	Direito	Parietal	16,1
2F	Região posterior da corona radiata	Direito	Occipital	9,5
3A	Região superior da corona radiata	Esquerdo	Parietal	14,9
3B	Região superior da corona radiata	Esquerdo	Parietal	14,9
3C	Região superior da corona radiata	Direito	Parietal	10,6
3D	Fascículo fronto-occipital inferior	Direito	Temporal	12,5
4A	Região superior da corona radiata	Esquerdo	Parietal	10,4
4B	Região superior da corona radiata	Esquerdo	Parietal	14,9
4C	Região posterior da corona radiata	Esquerdo	Parietal	20,9
4D	Região superior da corona radiata	Esquerdo	Parietal	20,4

5.2 Análise de parâmetros de imagens de RM

Os valores referentes a cada uma das variáveis de imagem, foram mensurados nas AASSB demarcadas e nas respectivas AHAN (Anexo E). O valor médio da área de cada AASSB, identificada nas imagens de RM ponderadas em FLAIR, foi de $15,4 \pm 5,3 \text{ mm}^2$.

Nas imagens ponderadas em FLAIR, as intensidades de sinal, mensuradas nas AASSB, apresentaram como média o valor de $545,5 \pm 268,4$ U.A. Nas AHAN, a média dos valores mensurados foi de $440,3 \pm 222,5$ U.A.

Os valores médios de FA aferidos nas AASSB foram de $0,40 \pm 0,13$; enquanto nas AHAN, os valores médios foram de $0,52 \pm 0,15$.

Os valores médios de ADC referentes às AASSB, foram de $0,129 \pm 0,040 \times 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{s}$; enquanto nas AHAN, foram observados valores médios de $0,1081 \pm 0,034 \times 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{s}$.

Os valores de MTR referentes às AASSB e seus controles AHAN apresentaram-se como $51,6 \pm 0,9\%$ nas AASSB; enquanto nas AHAN, foram observados valores médios de $54,2 \pm 4,1\%$.

Os valores de relaxometria T2, referentes às AASSB e seus controles AHAN, também foram avaliados estatisticamente. Estes parâmetros apresentaram como média $91,8 \pm 2,0 \text{ ms}$ nas AASSB, enquanto nas AHAN foram observados valores médios de $69,9 \pm 4,5 \text{ ms}$.

Os valores médios dos parâmetros aferidos nas AASSB e em suas AHAN, bem como o desvio padrão, mínimas, máximas e medianas em cada

grupo, são apresentados na Tabela 6. Os valores individuais de cada variável em todas as AASSB e AHAN estão presentes no Anexo E.

Tabela 6 - Análise estatística descritiva sobre variáveis analisadas nos sujeitos incluídos no estudo

Variáveis	ROIs	Mínima	Máxima	Mediana	Média	DP	CV
FLAIR AASSB	20	545.5	831.5	627.3	545.5	268.5	49,22%
FLAIR AHAN	20	116.1	727.7	509.2	440.3	222.5	50,53%
FA AASSB	20	0,22	0,62	0,36	0,40	0,13	32,37%
FA AHAN	20	0,29	0,81	0,57	0,52	0,15	30,30%
ADC AASSB *	20	0,079	0,216	0,1149	0,1290	0,04	31,05%
ADC AHAN *	20	0,065	0,1722	0,0945	0,1081	0,03	32,23%
MTR AASSB **	20	42,18	55,23	53,29	51,59	0,88	7,70%
MTR AHAN**	20	44,24	58,34	54,17	52,88	4,09	7,74%
T2 AASSB	20	88,93	94,34	92,03	91,79	1,95	1,95%
T2 AHAN	20	62,01	76,88	69,95	69,94	4,54	6,50%

FA - Anisotropia fracional; AASSB - Áreas de alteração de sinal na substância branca; AHAN - Áreas homólogas aparentemente normais; ADC - Coeficiente de difusão aparente; * Valores multiplicados por $\times 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{s}$; MTR - Índice de transferência de magnetização; ** Valores descritos em % DP – Desvio padrão; CV – Coeficiente de variação.

5.2.1 Análise de variáveis de DTI

Os valores obtidos na análise de imagens foram comparadas estatisticamente para cada variável, utilizando o teste não paramétrico de Mann Whitney.

A média de FA nas AASSB foi 23,07% menor que a média aferida nas regiões controle AHAN ($p < 0,05$). A Figura 18 apresenta graficamente os valores médios FA e sua diferença nas AASSB e nas AHAN.

Figura 18. Comparação entre anisotropia fracional nas áreas de hipersinal na substância branca e áreas homólogas aparentemente normais; FA AASSB – anisotropia fracional nas áreas de hipersinal na substância branca; FA AHAN anisotropia fracional nas áreas homólogas aparentemente normais; * $p < 0.05$.

Para os valores de ADC aferidos nas AASSB, a média foi 16,20% maior que a média verificada nas regiões de controle AHAN ($p < 0,05$). A Figura 19 apresenta graficamente os valores médios ADC e sua diferença nas AASSB e nas AHAN:

Figura 19. Comparação entre coeficiente de difusão aparente nas áreas de hipersinal na substância branca e áreas homólogas aparentemente normais; ADC AASSB – coeficiente de difusão aparente nas áreas de hipersinal na substância branca; ADC AHAN coeficiente de difusão aparente nas áreas homólogas aparentemente normais; * $p < 0.05$.

5.2.2 Análise de variáveis de MTR e Relaxometria T2

Os valores obtidos na análise de imagens foram comparadas estatisticamente para cada variável, utilizando o teste não paramétrico de Mann Whitney.

Os valores de MTR, aferidos nas AASSB e nas AHAN, não foram diferentes ($p>0,05$). A Figura 20 apresenta graficamente os valores médios MTR e sua diferença nas AASSB e nas AHAN.

Figura 20. Comparação entre índices de transferência de magnetização nas áreas de hipersinal na substância branca e áreas homólogas aparentemente normais; MTR AASSB – transferência de magnetização nas áreas de

hipersinal na substância branca; MTR AHAN transferência de magnetização nas áreas homólogas aparentemente normais.

Os valores da média de relaxometria T2 nas AASSB foi 91,79% maior que a média aferida nas regiões de controle AHAN ($p < 0,001$). A Figura 21 apresenta graficamente os valores da mediana, e a tendência dos valores de relaxometria aferidos nas AASSB e AHAN:

Figura 21. Comparação entre valores de relaxometria T2 nas áreas de hipersinal na substância branca e áreas homólogas aparentemente normais; RT2 AASSB – relaxometria T2 áreas de hipersinal na substância branca; RT2 AHAN relaxometria T2 nas áreas homólogas aparentemente normais. ** $p < 0,001$.

Em resumo, constatamos diferenças estatísticas significativas entre valores obtidos nas AASSB e nas AHAN nas aferições realizadas em FLAIR, FA, ADC e RT2 ($p < 0,05$). Os resultados obtidos na análise de MTR nas AASSB e AHAN não demonstraram correlação estatística.

A tabela 7 sumariza as diferenças descritas nas regiões avaliadas.

Tabela 7 – Comparação entre valores médios de variáveis de imagens aferidos nas AASSB e nas AHAN

	AASSB	AHAN	Diferença %	p-valor***
FA	0,40 $\pm$ 0,13	0,52 $\pm$ 0,15	23,07	0,015
ADC*	1,290 $\pm$ 0,40	1,081 $\pm$ 0,34	16,20	0,049
MTR**	51,59 $\pm$ 0,88	54,17 $\pm$ 4,09	4,76	0,208
RT2	91,79 $\pm$ 1,95	69,94 $\pm$ 4,54	23,89	0,0001

FA - Anisotropia fracional; AASSB - Áreas de alteração de sinal na substância branca; AHAN - Áreas homólogas aparentemente normais; ADC - Coeficiente de difusão aparente; * Valores multiplicados por $\times 10^{-3} \text{mm}^2/\text{s}$; MTR - Índice de transferência de magnetização; RT2 – relaxometria T2; ** Valores descritos em % $\pm$ – Desvio padrão; CV – Coeficiente de variação. *** Teste de Mann Whitney.

5.3 Análise histológica

As 20 regiões de tecido correspondentes às AASSB selecionadas para este estudo foram analisadas qualitativa e quantitativamente, por meio de colorações histológicas, como descrito em Métodos. As observações foram realizadas por um patologista (ILP), com 15 anos de prática clínica.

5.3.1 Descrição geral dos achados

Usando a coloração de HE, foram observadas características semelhantes às AASSB nos diferentes sujeitos. A análise do tecido em microscópio, com um aumento de 4 x 2.5, mostrou locais de menor impregnação dos reagentes utilizados.

Estas áreas tinham características difusas, próximas a vasos com coloração mais clara na substância branca encefálica, e puderam ser observadas em todas as AASSB. Este achado sugere a presença de diferenças nas concentrações e disposições mielínicas entre as regiões. Essa configuração do tecido é ilustrada na Figura 22.

Quando coradas por HE, também foram observadas áreas de heterogeneidade de substância branca nas AASSB, localizadas em regiões próximas a confluência de vasos. A Figura 23 ilustra esse tipo de alteração, apresentando paredes vasculares com aumento do espaço perivascular e um padrão sugestivo de acometimento por colagenose venosa, porém esse tipo de achado não foi frequente, sendo observado apenas em 10% das áreas amostradas.

Espaços perivasculares dilatados também foram relatados como frequentes, e puderam ser observados em 60% nas AASSB observadas. As Figuras 23 a 24 mostram estes achados.

Dentre as alterações vasculares observadas, podemos destacar as que aparecem na Figura 25, onde sobressaem os vasos presentes em uma AASSB, que apresentam características comumente verificadas em

alterações disóricas (alterações do substrato celular). Ainda nessa figura, podemos ver a presença de macrófagos indicativos de inflamação crônica na área. Entretanto, esse tipo de achado foi observado em apenas quatro AASSB dispostas em um único sujeito – 20% das AASSB – e não pôde ser identificado em outros indivíduos incluídos neste estudo.

Figura 22. AASSB corada por HE. Visão geral do campo em um aumento de 4 x 2.5. Em (A), são apontadas áreas difusas, próximas a vasos com

coloração mais clara na substância branca. Em (B), a diferença de coloração é ressaltada por meio de um filtro na imagem.

Figura 23. Coloração de HE em AASSB, apresentando heterogeneidade na substância branca. O detalhe (B) apresenta vasos com aumento do espaço perivascular e com um padrão que sugere um acometimento por colagenose venosa.

Figura 24. Visão geral do campo observado em um aumento de 4 x 2.5. Revela AASSB sob efeito de coloração HE. Em (A), é possível observar áreas difusas, próximas a vasos com coloração mais clara na substância branca. Em (B), é possível identificar um aumento do espaço perivascular.

Figura 25. Detalhe de AASSB corada por HE. (A) destaca vasos com características comumente observados em alterações disóricas. O destaque (B) mostra a presença de macrófagos indicativos de inflamação crônica na área.

Figura 26. Coloração de HE na AASSB em um aumento de 20 x 2.5. Pode-se observar um comprometimento tecidual perivascular.

Figura 27. Detalhe de AASSB corada por HE. É possível observar um aumento do espaço perivascular.

A Figura 28 ilustra os principais achados histológicos observados nas AASSB, utilizando a coloração de Kluver-Barrera. Foi possível observar

alterações da integridade da substância branca, bem como alterações na conformação espacial de fibras da substância branca em todos os sujeitos analisados.

Assim como nas regiões coradas por HE, também foram verificadas heterogeneidade nos campos de estudo (A, B e C). Concomitantemente, também foram notadas áreas periventriculares com espaçamento tecidual aumentado (A), e lacunas teciduais decorrentes dos processos de fixação tecidual em todos os sujeitos.

Figura 28. AASSB coradas por técnica de Kluver-Barrera.

Na análise imuno-histoquímica com anticorpo anti-NF, notou-se marcação de aspecto e padrões comuns a áreas íntegras de substância branca em todas as regiões observadas nos quatro casos. Foi possível notar parâmetros de marcação difusa em forma de fibras, com prolongamentos em formato de feixes de orientação coerente, associados a feixes de menor prolongamento, justapostos nas áreas observadas. A Figura 29 apresenta as regiões de AASSB imunocoradas por anticorpo anti-NF:

Figura 29. Regiões de AASSB imunocoradas por anticorpo anti-NF. Visão em detalhe do campo, em um aumento de 40 x 2.5.

Para os anticorpos anti-MBP, a análise sugere baixo teor de imunorreatividade para MBP em todas as regiões imunocoradas. Este tipo de padrão indica que, mesmo nas AASSB, as fibras mantêm a integridade das bainhas de mielina. Como consequência, nas regiões analisadas, não ocorreu aumento da liberação da proteína básica de mielina no substrato extracelular.

A Figura 30 apresenta as regiões de AASSB imunocoradas por anticorpo anti-MBP:

Figura 30. Regiões de AASSB imunocoradas por anticorpo anti-MBP. Visão em detalhe do campo, em um aumento de 40 x2.5.

Para os anticorpos anti-GFAP, a análise subjetiva realizada (padrão visual ao microscópio) mostrou resultados heterogêneos em todos os sujeitos analisados, com diferenças de marcação presentes tanto entre indivíduos quanto em diferentes AASSB em um mesmo sujeito.

Nas AASSB imuno-coradas por GFAP, quantidades maiores de proteína fibrilar, situadas principalmente nos citoplasmas e prolongamentos celulares, puderam ser constatadas, em resposta as lesões das bainhas de mielina. Elas possivelmente foram provocadas por processos autoimunes, em especial nos astrócitos gemistocíticos hipertróficos.

As AASSB analisadas mostraram, em sua maioria, características sugestivas de áreas de gliose crônica, devido ao seu aspecto ricamente fibrilado e eosinófilo, conjugado a presença frequente de astrócitos e corpúsculos amiláceos. É importante ressaltar que, nestas regiões, nota-se diminuição da quantidade celular, provavelmente relacionada às alterações metabólicas antigas, e também podem relacionar-se a alterações do substrato histológico decorrentes de estados agônicos.

Em dezesseis das vinte áreas observadas, foi possível verificar alterações com características sugestivas destas lesões crônicas (aspecto gliótico). Essas características também foram vistas, de forma mais branda, nas outras áreas amostradas nesse estudo, porém sem caracterização típica de gliose.

Nas outras AASSB analisadas, foi observada menor marcação para GFAP. Contudo, focos difusos e menor intensidade de marcação também puderam ser identificados. A Tabela 8 sintetiza os resultados desta análise,

baseada na avaliação de consenso entre os observadores a partir de 4 níveis de graduação, conforme descrita anteriormente na seção Métodos.

A Figura 31 apresenta regiões de AASSB imunocoradas por anticorpo anti-GFAP e regiões de AHAN:

Figura 31. Regiões de AASSB imunocoradas por anticorpo anti-GFAP. Visão em detalhe do campo em um aumento de 40 x 2.5.

Tabela 8 - Descrição das colorações imuno-histoquímicas em áreas de alteração de sinal na substância branca, com três tipos de anticorpos

		Anticorpos		
		NF	MBP	GFAP
Sujeito 1	1A	++	+	++
	1B	++	+++	++
	1C	+	++	+++
	1D	+++	++	+++
	1E	+	++	+++
	1F	+++	++	++
Sujeito 2	2A	++	+	+
	2B	+	++	+++
	2C	++	++	+++
	2D	+++	++	+++
	2E	++	++	+++
	2F	++	+	+
Sujeito 3	3A	++	+	+++
	3B	++	++	++
	3C	++	++	+++
	3D	-	-	-
Sujeito 4	4A	++	+	++
	4B	++	++	+++
	4C	++	++	+++
	4D	+	++	++
NF – Anticorpo para neurofilamento; GFAP – Anticorpo para proteína ácida fibrilar glial; MBP – Anticorpo para proteína básica de mielina.				

Concomitantemente aos achados nas regiões imunocoradas descritos anteriormente, também podem ser apontadas alterações celulares relacionadas à fixação e processamento dos tecidos *post-mortem*. Foram verificadas áreas de tumefação aguda na substância branca, oligodendroglia, com presença de vacúolos associados.

5.3.2 Análise histológica quantitativa

Foram analisadas, quantitativamente, as regiões de tecido correspondentes às AASSB e suas áreas homólogas aparentemente normais (AHAN), por meio de colorações histológicas, como descrito em Métodos. Foi utilizado o teste estatístico não paramétrico de Mann Whitney, para comparação entre as médias.

Os fragmentos histológicos corados por HE, quando analisados com a técnica de avaliação de densidade óptica, apresentaram valores médios iguais a $162,9 \pm 20,0$ nas AASSB.

A variação entre os valores máximos e mínimos, obtidos na análise das diferentes AASSB, foi de 12,3%. Nas AHAN, os valores médios foram iguais a $163,3 \pm 20,4$. A variação entre os valores máximos e mínimos, obtidos na análise das diferentes AHAN, foi de 12,50%. Quando comparadas nas lâminas coradas por HE, as médias dos valores observados nas AASSB não foram diferentes das médias nas AHAN ($p > 0,05$).

A Figura 32 descreve graficamente os valores aferidos por densidade óptica nos fragmentos histológicos corados por HE, nas AASSB e AHAN. :

Figura 32. Comparação entre valores médios de densidade óptica em lâminas coradas por hematoxilina-eosina nas áreas de alteração de sinal na substância branca e áreas homólogas aparentemente normais; HE AASSB – densidade óptica em lâminas coradas por hematoxilina-eosina nas áreas de alteração de sinal na substância branca; HE AHAN densidade óptica em lâminas coradas por hematoxilina-eosina nas áreas homólogas aparentemente normais.

Os fragmentos histológicos corados por galocianina, quando analisados com o uso da técnica de avaliação de densidade óptica, apresentaram valores médios iguais a $181,84 \pm 4,36$ nas AASSB. A variação entre os valores máximos e mínimos, obtidos na análise das diferentes AASSB, foi de 2,40%.

Nas AHAN, os valores médios apresentados foram iguais a $167,11 \pm 20,65$. A variação entre os valores máximos e mínimos, obtidos na

análise das diferentes AHAN, foi de de 12,36%. Quando comparadas nas lâminas coradas por GALL, as médias dos valores observados nas AASSB foram 10,21% maiores que as AHAN ($p < 0.05$).

A Figura 33 apresenta graficamente os valores aferidos por densidade óptica nos fragmentos histológicos corados por GALL nas AASSB e AHAN:

Figura 33. Comparação entre valores médios de densidade óptica em lâminas coradas por galocianina nas áreas de alteração de sinal na substância branca e áreas homólogas aparentemente normais; GALL AASSB – densidade óptica em lâminas coradas por galocianina nas áreas de alteração de sinal na substância branca; GALL AHAN densidade óptica em lâminas coradas por galocianina nas áreas homólogas aparentemente normais; * $p < 0.05$.

Os fragmentos histológicos corados pela técnica de Kluver-Barrera, quando analisados com o uso da técnica de avaliação de densidade óptica, apresentaram valores médios iguais a $168,92 \pm 19,08$ nas AASSB.

A variação entre os valores máximos e mínimos, obtidos na análise das diferentes AASSB, foi de 11,30%. Nas AHAN, os valores médios foram iguais a $182,82 \pm 20,65$. A variação entre os valores máximos e mínimos, obtidos na análise das diferentes AHAN, foi de 2,53%.

Quando comparadas nas lâminas coradas por KB, as médias dos valores observados nas AASSB não foram diferentes das médias nas AHAN ($p > 0.05$).

A Figura 34 apresenta graficamente os valores aferidos por densidade óptica nos fragmentos histológicos corados por KB nas AASSB e AHAN:

Figura 34. Comparação entre valores médios de densidade óptica em lâminas coradas por Kluver-Barrera nas áreas de alteração de sinal na substância branca e áreas homólogas aparentemente normais; KB AASSB – densidade óptica em lâminas coradas por Kluver-Barrera nas áreas de alteração de sinal na substância branca; KB AHAN densidade óptica em lâminas coradas por Kluver-Barrera nas áreas homólogas aparentemente normais.

Foram analisadas quantitativamente as regiões de tecido imunocoradas, correspondentes às AASSB e suas áreas homólogas aparentemente normais (AHAN), por meio de colorações histológicas, utilizando três anticorpos (NF, GFAP e MBP), como descrito em Métodos.

Quando analisadas por sujeito, os fragmentos histológicos de AASSB imunocorados por NF apresentaram valores médios de marcação tecidual iguais a $137,83 \pm 13,93$ no sujeito 1; $132,18 \pm 6,18$ no sujeito 2; $126,49 \pm 8,26$ no sujeito 3; e $125,50 \pm 17,63$ no sujeito 4.

A Figura 35 ilustra graficamente os valores da média, mediana e a tendência dos valores aferidos nos fragmentos histológicos de AASSB, imunocorados por NF nos quatro sujeitos.

Figura 35. Representação gráfica dos valores médios de impregnação de cromógeno por técnica de deconvolução de cor em lâminas imunocoradas por anti-neurofilamento nas AASSB.

Quando avaliados globalmente, os fragmentos histológicos imunocorados por NF apresentaram valores médios de $131,66 \pm 12,23$ nas AASSB e $128,03 \pm 14,74$ nas AHAN. A variação entre os valores máximos e mínimos, obtidos na análise das foi 9,29% nas AASSB e de 11,52% nas AHAN. Os valores de impregnação do cromógeno nas lâminas imunocoradas foram diferentes nas AASSB, em relação aos observados nas AHAN ($p > 0.05$), vide Figura 36:

Figura 36. Comparação entre valores médios de deconvolução de cor em lâminas imuno-coradas por anti-neurofilamento nas áreas de alteração de

sinal na substância branca e áreas homólogas aparentemente normais; NF AASSB – deconvolução de cor em lâminas imuno-coradas por anti-neurofilamento nas áreas de alteração de sinal na substância branca; NF AHAN deconvolução de cor em lâminas imuno-coradas por anti-neurofilamento nas áreas homólogas aparentemente normais;

Quando analisadas por sujeito, os fragmentos histológicos de AHAN imunocorados por NF apresentaram valores médios de marcação tecidual iguais a $129,21 \pm 13,93$ no sujeito 1; $134,82 \pm 13,81$ no sujeito 2; $127,32 \pm 6,71$ no sujeito 3; e $116,61 \pm 8,79$ no sujeito 4.

Quando comparadas sujeito a sujeito, as lâminas imuno-coradas por NF apresentam como valores ilustrados na Tabela 9.

Tabela 9 – Descrição dos valores médios de impregnação de cromógeno por técnica de deconvolução de cor em lâminas imunocoradas por anti-neurofilamento (NF) nas AASSB e nas AHAN

	AASSB (UA)	AHAN (UA)	Diferença
Sujeito 1	$137,83 \pm 13,93$	$129,21 \pm 13,79$	6,24%
Sujeito 2	$132,18 \pm 6,18$	$134,82 \pm 13,81$	1,96%
Sujeito 3	$126,49 \pm 8,26$	$127,32 \pm 16,61$	0,63%
Sujeito 4	$125,50 \pm 17,63$	$116,61 \pm 17,59$	7,09%
Média	$131,66 \pm 12,23$	$128,03 \pm 14,74$	2,80%

AASSB – Áreas de alteração de sinal na substância branca; AHAN – Áreas homólogas aparentemente normais; DP – Desvio padrão.

Figura 37. Comparação sujeito a sujeito entre valores médios de deconvolução de cor em lâminas imuno-coradas por anti-neurofilamento nas áreas de alteração de sinal na substância branca e áreas homólogas aparentemente normais; AASSB – deconvolução de cor em lâminas imuno-coradas por anti-neurofilamento nas áreas de alteração de sinal na substância branca; AHAN deconvolução de cor em lâminas imuno-coradas por anti-neurofilamento nas áreas homólogas aparentemente normais;

Os fragmentos histológicos de AASSB imunocorados por MBP, quando analisados com a técnica de avaliação de deconvolução de cor para análise da impregnação do cromógeno, apresentaram valores médios de marcação tecidual iguais a $153,92 \pm 13,67$. A variação entre os valores máximos e mínimos, obtidos na análise foi 8,88%.

Quando analisados por sujeito, os fragmentos histológicos de AASSB imunocorados por MBP apresentaram valores médios de marcação tecidual iguais a $153,91 \pm 7,96$ no sujeito 1; $150,36 \pm 10,52$ no sujeito 2; $153,88 \pm 22,34$ no sujeito 3; e $159,30 \pm 20,84$ no sujeito 4.

A Figura 38 apresenta graficamente os valores da média, mediana e a tendência dos valores aferidos nos fragmentos histológicos de AASSB, imunocorados por MBP nos quatro sujeitos:

Figura 38. Representação gráfica dos valores médios de impregnação de cromógeno por técnica de deconvolução de cor em lâminas imunocoradas por anti-proteína básica de mielina nas AASSB.

Quando avaliados globalmente, os fragmentos histológicos imunocorados por MBP apresentaram valores médios de $153,92 \pm 13,67$ nas

AASSB e $153,18 \pm 12,69$ nas AHAN. A variação entre os valores máximos e mínimos, obtidos na análise das diferentes áreas, foi de 8,88% nas AASSB e de 8,28% nas AHAN. Os valores de impregnação do cromógeno nas lâminas imunocoradas por MBP não foram diferentes dos valores nas AASSB ($p > 0.05$), vide figura 39.

Figura 39. Representação gráfica dos valores médios de impregnação de cromógeno por técnica de deconvolução de cor em lâminas imunocoradas por anti-proteína básica de mielina nas AHAN.

Quando avaliados globalmente, os fragmentos histológicos imunocorados por MBP apresentaram valores médios de $153,92 \pm 13,67$ nas AASSB e $153,18 \pm 12,69$ nas AHAN. A variação entre os valores máximos e mínimos, obtidos na análise das diferentes áreas, foi de 8,88% nas AASSB e de 8,28% nas AHAN. Os valores de impregnação do cromógeno nas lâminas

imunocoradas por MBP não foram diferentes dos valores nas AASSB ($p>0.05$), vide figura 40.

Figura 40. Comparação entre valores médios de deconvolução de cor em lâminas imuno-coradas por anti-proteína básica de mielina nas áreas de alteração de sinal na substância branca e áreas homólogas aparentemente normais; MBP AASSB – deconvolução de cor em lâminas imuno-coradas por anti-proteína básica de mielina nas áreas de alteração de sinal na substância branca; MBP AHAN deconvolução de cor em lâminas imuno-coradas por anti-proteína básica de mielina nas áreas homólogas aparentemente normais.

Os resultados dos valores nas lâminas imunocoradas por MBP nas AASSB e AHAN são mostradas na Tabela 10.

Os valores mensurados, utilizando a técnica de avaliação de deconvolução de cor para impregnação do cromógeno na análise das áreas imunocoradas, indicam que as AASSB e as AHAN mostraram-se similares.

Figura 41. Comparação sujeito a sujeito entre valores médios de deconvolução de cor em lâminas imuno-coradas por anti-proteína básica de mielina nas áreas de alteração de sinal na substância branca e áreas homólogas aparentemente normais; AASSB – deconvolução de cor em lâminas imuno-coradas por anti-proteína básica de mielina nas áreas de alteração de sinal na substância branca; AHAN deconvolução de cor em lâminas imuno-coradas por anti-proteína básica de mielina nas áreas homólogas aparentemente normais.

Tabela 10 – Descrição dos valores médios de impregnação de cromógeno por técnica de deconvolução de cor em lâminas imunocoradas por anti-proteína básica de mielina (MBP) nas AASSB e nas AHAN

	AASSB (UA)	AHAN (UA)	Diferença
Sujeito 1	153,91 $\pm$ 7,96	150,22 $\pm$ 5,24	2,40%
Sujeito 2	150,36 $\pm$ 10,52	158,32 $\pm$ 4,57	5,25%
Sujeito 3	153,88 $\pm$ 22,34	144,56 $\pm$ 17,75	6,04%
Sujeito 4	159,30 $\pm$ 20,84	156,28 $\pm$ 22,75	1,88%
Média	153,92 $\pm$ 13,67	153,18 $\pm$ 12,69	0,45%
AASSB – Áreas de alteração de sinal na substância branca; AHAN – Áreas homólogas aparentemente normais; $\pm$ – Desvio padrão.			

Os fragmentos histológicos de AASSB imuno-corados por GFAP, quando analisados com a técnica de avaliação de deconvolução de cor para verificar a impregnação do cromógeno, apresentaram valores médios de marcação tecidual iguais a 94,61 $\pm$ 7,85.

Quando analisadas por sujeito, os fragmentos de AASSB imunocorados apresentaram valores médios de marcação tecidual iguais a 97,54 $\pm$ 5,11 no sujeito 1; 88,32 $\pm$ 4,95 no sujeito 2; 94,72 $\pm$ 6,97 no sujeito 3; e 99,56 $\pm$ 11,15 no sujeito 4.

A Figura 42 expõe graficamente os valores da média, mediana e a tendência dos valores aferidos nos fragmentos histológicos de AASSB imunocorados por GFAP nos quatro sujeitos:

Figura 42. Representação gráfica dos valores médios de impregnação de cromógeno por técnica de deconvolução de cor em lâminas imunocoradas por anti-proteína ácida fibrilar glial nas AASSB.

Os fragmentos histológicos de AHAN imunocorados por GFAP, quando analisados com a técnica de avaliação de deconvolução de cor para verificar a impregnação do cromógeno, apresentaram valores médios de marcação tecidual iguais a $81,23 \pm 6,29$. Os valores de impregnação do cromógeno nas lâminas imunocoradas por GFAP, foram 14,13% maiores nas AASSB, em comparação aos valores observados nas AHAN ($p < 0.0001$), vide figura 43.

Figura 43. Representação gráfica dos valores médios de impregnação de cromógeno por técnica de deconvolução de cor em lâminas imunocoradas por anti-proteína ácida fibrilar glial nas AHAN.

Quando avaliados globalmente, os fragmentos histológicos imunocorados por GFAP apresentaram valores médios de $94,61 \pm 7,85$ nas AASSB e $81,23 \pm 6,29$ nas AHAN. Os valores de impregnação do cromógeno nas lâminas imunocoradas por GFAP foram 14,13% maiores nas AASSB, em comparação aos valores observados nas AHAN ($p < 0.0001$), vide figura 44.

Figura 44. Comparação entre valores médios de deconvolução de cor em lâminas imuno-coradas por anti-proteína ácida fibrilar glial nas áreas de alteração de sinal na substância branca e áreas homólogas aparentemente normais; GFAP AASSB – deconvolução de cor em lâminas imuno-coradas por anti-proteína ácida fibrilar glial nas áreas de alteração de sinal na substância branca; GFAP AHAN deconvolução de cor em lâminas imuno-coradas por anti-proteína ácida fibrilar glial nas áreas homólogas aparentemente normais; *** $p < 0.0001$.

A Tabela 11 sumariza os resultados das lâminas imunocoradas por GFAP nas AASSB e nas AHAN.

Tabela 11– Descrição dos valores médios de impregnação de cromógeno por técnica de deconvolução de cor em lâminas imunocoradas por anti-proteína ácida fibrilar glial (GFAP) nas AASSB e nas AHAN

	AASSB (UA)	AHAN (UA)	Diferença
Sujeito 1	97,,54 ±5,11	84,31 ±2,79	13,56%
Sujeito 2	88,32 ±4,95	75,55 ±6,32	14,46%
Sujeito 3	94,72 ±6,97	85,26 ±5.99	9,97%
Sujeito 4	99,56 ±11,15	82,11 ±5.77	17,52%
Média	94,61 ±7,85	81,23 ±6.29	14,13%

AASSB – Áreas de alteração de sinal na substância branca; AHAN – Áreas homólogas aparentemente normais; ± – Desvio padrão.

Figura 45. Comparação sujeito a sujeito entre valores médios de deconvolução de cor em lâminas imuno-coradas por anti-proteína ácida

fibrilar glial nas áreas de alteração de sinal na substância branca e áreas homólogas aparentemente normais; AASSB – deconvolução de cor em lâminas imuno-coradas por anti-proteína ácida fibrilar glial nas áreas de alteração de sinal na substância branca; AHAN deconvolução de cor em lâminas imuno-coradas por anti-proteína ácida fibrilar glial nas áreas homólogas aparentemente normais.

Os valores mensurados na análise das áreas imunocoradas indicam que, nas AASSB, houve maior sensibilização para marcação por GFAP em relação às AHAN.

5.4 Avaliação de correlação entre histologia e imagem de RM

Foi avaliada a presença de correlação entre os resultados da análise imuno-histoquímica quantitativa e as variáveis de imagens mensuradas nas AASSB, como descrito em Métodos.

A análise estatística da correlação (teste não paramétrico de Spearman) entre valores de FA e variáveis histológicas nas AASSB, indicou que: houve correlação entre valores de FA e GFAP ($p < 0,05$; $r = -0.59$); não houve correlação entre valores de FA e MBP ($p > 0,05$; $r = -0.18$); e não houve correlação entre valores de FA e NF ($p > 0,05$; $r = -0.08$).

Por outro lado, a análise estatística da correlação (teste não paramétrico de Spearman) entre valores de ADC e variáveis histológicas nas AASSB, indicou que: não houve correlação entre valores de ADC e GFAP ($p > 0,05$; $r = 0.21$); não houve correlação entre valores de ADC e MBP ($p > 0,05$; $r = 0.04$); e não houve correlação entre valores de ADC e NF ($p > 0,05$; $r = 0.15$).

A análise estatística da correlação (teste não paramétrico de Spearman) entre valores de decaimento RT2 e variáveis histológicas nas AASSB, indicou que: não houve correlação entre valores de RT2 e GFAP ($p > 0,05$; $r = 0.21$); não houve correlação entre valores de RT2 e MBP ($p > 0,05$; $r = -0.39$); e não houve correlação entre valores de RT2 e NF ($p > 0,05$; $r = 0.21$).

Por outro lado, a análise estatística da correlação (teste não paramétrico de Spearman) entre valores de MTR e variáveis histológicas nas AASSB, indicou que: não houve correlação entre valores de MTR e GFAP ($p > 0,05$; $r = 0.17$); não houve correlação entre valores de MTR e MBP ($p > 0,05$; $r = -0.10$); e não houve correlação entre valores de MTR e NF ($p > 0,05$; $r = 0.01$).

A tabela 12 sumariza os valores de correlação entre as variáveis analisadas.

Tabela 12 - Correlação entre variáveis histológicas e variáveis de imagem nas AASSB e AHAN

Variáveis	AASSB (r)	AHAN (r)
FA vs. NF	-0,08	-0,20
FA vs. MBP	-0,18	-0,14
FA vs. GFAP	-0,59*	-0,54*
ADC vs. NF	0,14	0,05
ADC vs. MBP	0,03	0,27
ADC vs. GFAP	0,21	0,38
RT2 vs. NF	0,05	-0,24
RT2 vs. MBP	-0,39	0,02
RT2 vs. GFAP	0,20	0,10
MTR vs. NF	-0,01	0,01
MTR vs. MBP	-0,10	-0,04
MTR vs. GFAP	0,17	-0,36

FA – Anisotropia fracional; NF – Anticorpo para neurofilamento; GFAP – Anticorpo para proteína ácida fibrilar glial; MBP – Anticorpo para proteína básica de mielina; ADC – Coeficiente de difusão aparente; MTR - Índice de transferência de magnetização; Teste não paramétrico de Spearman (alpha = 0.05); * p<0,005.

6 DISCUSSÃO

Este trabalho foi motivado pela necessidade de investigar melhor achados frequentes da rotina clínica radiológica. A RM é a modalidade de imagem que traz maior número de parâmetros quantitativos a respeito do tecido cerebral, de maneira não invasiva. Das técnicas mais promissoras na avaliação da substância branca, as imagens de DTI têm se destacado, pois permitem não apenas avaliação quantitativa, quando de organização de sua estrutura espacial a partir de propriedade de movimentação molecular. A técnica de DTI já tem valor clínico incontestável em aplicações críticas, como acidente vascular encefálico. Entretanto, seu papel em achados atualmente considerados inespecíficos ainda está para ser determinado. Assim, temos novas técnicas promissoras para análise do tecido cerebral, mas sem informações suficientes para afirmar qual o significado de alterações de imagem em relação à histologia.

Por outro lado, a avaliação do tecido cerebral ao microscópio e com técnicas de imuno-histoquímica é, hoje, o padrão para verificar os substratos das afecções neuropsiquiátricas. A utilização de baterias com diversos marcadores tissulares, permite investigar a natureza molecular e microestrutural além da informação fornecida pela organização microscópica via análise clássica do patologista. A utilização destes marcadores permite aumentar a especificidade de achados morfológicos na microscopia comuns à diversas doenças, sendo hoje, prática comum na análise de tecidos de biópsia de tumores e outras lesões cerebrais presentes na rotina clínica.

Assim, a utilização de uma plataforma que permitisse investigar o sinal de imagens de RM corregistradas à dados da histologia, é uma das formas mais

diretas de se investigar a natureza dos achados radiológicos em exames clínicos. Mais ainda, considerando que ambas as técnicas podem fornecer dados que possibilitam serem tratados quantitativamente (RM: parâmetros FA, ADC, MTR e RT2; histologia: marcadores anti-NF, anti-MBP, anti-GFAP), nos parece importante avaliar não apenas a presença/ausência destes marcadores, mas também, como a variação de sua magnitude está correlacionada no tecido cerebral normal e patológico. E para investigar áreas não normais, elegemos um dos achados mais comuns: as áreas de alteração de sinal na substância branca encefálica. Neste estudo, procurou-se caracterizar parâmetros de técnicas quantitativas de RM nas AASSB em relação à parâmetros de análise histológica quantitativa.

Considerando o desenho experimental adotado, dividiremos esta sessão em relação à três principais objetivos da tese: os achados de imagem (e extraimagem), os achados de histologia e a avaliação da correlação entre os parâmetros de RM e histologia. Durante esta sessão, as características de imagem de RM e histológicas também serão ponderadas em relação à comparação de AASSB e AHAN. Esta comparação de regiões aparentemente normais e patológicas, torna possível avaliar o potencial de aplicações dos achados deste trabalho em condição clínica.

A plataforma de aquisição de imagens utilizada nesta tese, foi descrita em detalhes em artigos anteriores de nosso grupo (107–109). Este é um dos pontos únicos deste trabalho, uma vez que poucos centros de pesquisa contam com a organização e estrutura de coleta de dados *post-mortem* utilizando técnicas de investigação integradas. Este estudo requer um curto intervalo pós óbito para que as características de sinal nas imagens de RM sejam mais semelhante às aquelas observadas *in vivo*.

De acordo com o levantamento bibliográfico realizado, esta e outras pesquisas derivadas da mesma plataforma são pioneiras na utilização de sistemas de imagem de uso clínico para a aquisição de imagens de RM *post-mortem* e *in cranio* em humanos. Podemos identificar apenas os estudos de Dashner *et al.* (2003) e Larsson *et al.* (2004) - que usaram apenas um sujeito submetido a RM *post-mortem* - Bendersky *et al.* (2003) - no qual foram analisadas imagens *post-mortem* de fetos humanos (142–144). Em comum, a maioria dos estudos citam como primeira limitação o número restrito de sujeitos disponíveis para a análise.

Ainda, dada a complexidade de cada exame, os custos envolvidos e as restrições de tempo para a utilização do aparelho de RM, o número de sujeitos elegíveis para inclusão em nosso estudo foi reduzido. E por outro lado, a necessidade de fixação por um período considerável, além do tempo necessário para processamento histológico da casuística, representou um limite para inclusão de maior número de casos. Dessa maneira, o número de indivíduos presentes em nosso estudo é menor em contexto principalmente operacional. Entende-se que essa população poderia maior, e a estrutura tem o potencial de gerar casuística com característica para ser representativa dos sujeitos que são encaminhados ao SVOC e, conseqüentemente, da população da cidade de São Paulo. Um cálculo formal de poder estatístico para estimar quantos indivíduos seriam necessários para verificar determinado tamanho de efeito entre as médias dos parâmetros estudados não seria possível, uma vez que, mesmo a variabilidade do teste estaria limitada (seria interessante termos dados independentes em N maior que seis para aplicação de técnicas mais robustas de cálculo amostral). Vamos comentar este ponto em mais detalhes, tendo em vista aspectos estatísticos formais que são passíveis de críticas quanto às premissas necessárias à aplicação dos testes.

Ao realizar os testes estatísticos aqui apresentados, temos que considerar a independência entre as medidas – o que é passível de críticas, uma vez que a constituição biológica dos tecidos (e a susceptibilidade para doenças) é, também, determinada geneticamente. Ou seja, nos quatro indivíduos utilizados nesta tese, temos motivos para supor que haja fatores que levam à modular de maneira semelhante os valores encontrados nas ROIs intra-sujeito. E pela mesma razão, é possível que a variabilidade entre as ROIs entre-sujeitos seja diferente. Ainda assim, ao considerar os valores de inferência estatística apresentados, todos de base não-paramétrica, pode-se ter ideia da possível amplitude do efeito.

Há, entretanto, argumentos a favor da validade de considerar a quantidade total de áreas de alteração de sinal na substância branca, e não o número de sujeitos. Pode-se argumentar que, características do ambiente interno (tipo de vascularização, magnitude variada de agressão por características tissulares distintas, processos localizados) podem se manifestar como alterações etiológicamente distintas em um mesmo indivíduo (6,40,57,145). De fato, este é um ponto de debate: em base científica, não é possível confirmar a independência entre as ROIs analisadas intra e entre-sujeitos. Premissas para aplicação de testes estatísticos envolvem conhecimento da natureza da medida, e isto é um formalismo sem instrumentos matemáticos de consenso. Assim, este ponto poderia ser abordado apenas com aumento da casuística, o que demandaria tempo maior que o limite máximo regimental para conclusão do doutorado.

Outro ponto a ser observado, é a distribuição etária dos sujeitos. Todos os indivíduos incluídos apresentavam idades iguais ou superiores a 50 anos na data do óbito. Essa característica deve-se a via de captação dos encéfalos: a casuística do Banco de Encéfalos Humanos da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo compreende apenas indivíduos idosos e visa observar os fenômenos

fisiopatológicos envolvidos no processo de envelhecimento. É possível que os resultados em AHAN não sejam extensíveis à outras faixas etárias. Entretanto, a análise de AASSB e sua comparação com AHAN são bastante pertinentes à faixa etária de interesse clínico: é nesta idade que as AASSB são mais comuns.

De acordo com a literatura, as AASSB são achados comumente detectados desde adultos jovens a idosos (146,147). Alguns autores versam sobre sua relação com doenças degenerativas, como o Alzheimer (24,44,148,149). Porém, não há nenhum tipo de relação de causa e efeito totalmente estabelecida entre a incidência destas áreas de alteração e fenômenos relacionados ao envelhecimento (20,47).

6.1 Aspectos extra-imagem

Inicialmente gostaríamos de considerar as limitações metodológicas previamente descritas por diversos grupos de pesquisa, e que são argumentos contra a utilização de imagens de RM adquiridas *post-mortem in cranio*. Estes argumentos são fundamentalmente relacionados à logística e à alguns pontos de tradução de achados *post-mortem* para *in vivo*.

Em relação às dificuldades logísticas, a expertise adquirida da equipe e o suporte multidisciplinar de todos os colaboradores ao longo destes dez anos de interação trouxe a cultura de grupo necessária para implementar, rotineiramente: a) equipe de entrevista com familiares; b) equipe de coleta de dados de imagem; c) equipe de coleta de material biológico. Estes processos que acontecem rotineiramente no SVOC-FMUSP foram revisados, redefinidos e otimizados para que permitissem a implementação de projetos de execução virtualmente inviável em outros contextos. Assim, grande parte das limitações levantadas por outros autores foram drasticamente mitigadas: desafios para apresentar o termo de consentimento em momento de luto, escassez de material, disponibilidade de equipamentos de imagem, equipe treinada para coleta de material específico para a pesquisa em questão, experiência em análise de imagem e técnicas de corregristo digital.

Ainda, a seleção dos encéfalos para um estudo baseado em correlação entre neuroimagem e neuropatologia, é um importante passo para que não ocorra nenhum tipo de viés na análise e consequente perda de tempo e recursos. A triagem, seguindo os critérios de inclusão e exclusão estritos, ao mesmo tempo que reduziu o número de sujeitos viáveis para o estudo, possibilitou a obtenção de

dados com qualidade superior àquelas observadas em estudos publicados anteriormente. Estes, em sua maioria, tratam de análise de material obtido em amostra de conveniência.

Em relação aos limites técnicos dos sinais adquiridos nas imagens de RM *post-mortem* em relação àqueles observados *in vivo*, é possível observar alterações nas variáveis de imagens adquiridas no protocolo proposto nesse estudo. Em geral, esta correlação é função inversamente proporcional ao tempo de óbito do indivíduo. Ou seja, ao reduzir o tempo entre o falecimento e a aquisição de imagens, obtêm-se sinais de tecidos mais fidedignos aos captados em indivíduos vivos (173,174). Como conduta ideal, é preconizado na literatura a aquisição de imagens em um intervalo pós-óbito de até 16 horas, sem procedimentos para resfriamento do cadáver antes do exame (130,172,175).

A temperatura tecidual e o conteúdo de água podem ser apontados como fatores determinantes para a intensidade do sinal de RM obtidos ser similar ao dos tecidos biológicos analisados *in vivo*. *Post-mortem*, o decaimento da temperatura cerebral está sujeito a influências da temperatura ambiente. Cientes disso, buscamos evitar a diminuição da temperatura corpórea.

Usualmente, os cadáveres são armazenados em câmaras resfriadas a 4°C antes do procedimento de autópsia, para diminuição das alterações teciduais geradas por autólise. Porém, isso pode gerar artefatos e mudanças de intensidade de sinal na RM (164).

Em nossa amostra, cuidamos para que o tempo de óbito tenha sido mantido o mínimo possível, com média inferior ao preconizado pela literatura. Ainda, tivemos o cuidado de verificar a temperatura amostrada no interior dos condutos auditivos, local mais próximo do encéfalo. Este procedimento poderá ser utilizado

para investigações futuras a respeito do impacto deste fator nas medidas de DTI e outras modalidades de exame adquiridas durante este trabalho.

Alguns estudos utilizam imagens de RM adquiridas após a remoção do encéfalo do sujeito – mas sem utilização de processo de fixação química. Esse tipo de abordagem está sujeita a desvios estruturais (deformações morfológicas do cérebro), que diminuem a reprodutibilidade e aplicabilidade de técnicas de registros, cuja precisão é maior em proporção inversa ao grau de deformidade, e ao grau de deformidades não lineares (também maiores em encéfalos *extra cranium* não fixados). O método proposto neste estudo preserva a integridade do encéfalo, e permite uma correlação entre neuroimagem e neuropatologia mais acurada (99,145,176).

Por outro lado, os parâmetros utilizados para seleção dos encéfalos ainda apresentam limitações.

Diferentemente de estudos conduzidos com modelos animais, os encéfalos humanos estão sujeitos a fatores agonais pré-óbito que não podem ser controlados (130), possuem etiologias variadas e podem causar desvios nos resultados finais, mesmo quando os parâmetros de seleção são respeitados. De qualquer forma, ao seguir rigidamente os critérios de escolha sugeridos para o estudo, nossa postura foi otimista ao assumir que os tecidos utilizados apresentariam qualidade suficiente para a aquisição de resultados confiáveis.

Publicações de outros grupos correlacionam imagens de RM adquiridas em um curto período de tempo antes do óbito a aspectos neuropatológicos (160, 172, 173). Esta abordagem permite localização adequada de prováveis lesões, mas fatores pré-agonais possuem um grande impacto sobre o encéfalo, que não é apropriadamente representado em imagens adquiridas semanas ou meses antes do falecimento. As alterações ocorridas pós-aquisição de imagens podem gerar

um viés de correlação entre imagens e secções histológicas, gerando resultados que não refletem apropriadamente as características do tecido (178).

Como alternativa, as pesquisas mais recentes no campo de correlação entre RM e histologia seguem uma linha de aquisição de imagens *ex cranio* de encéfalos fixados por formalina. Entretanto, grande parte dos autores relata alterações de sinal consideráveis nos casos fixados (179,180). Essa característica deve-se ao fato de que os processos de fixação levam a uma alteração do conteúdo de água tecidual, associada à modificação da densidade protônica do tecido e, conseqüentemente, do sinal da imagem de RM. Mudanças de sinal em imagens ponderadas em T1 e T2 em tecidos fixados, foram amplamente discutidas e exemplificadas na literatura (43,181,182).

O tipo de fixador e o protocolo de fixação utilizado exercem grande influência no processamento e análise do encéfalo. Durante testes preliminares para este estudo, o método de perfusão e uso de solução de manitol a 20%, somada a paraformolaldeído a 20%, foi empregado seguindo referências de outros autores como o mais indicado para a preservação das características morfológicas e estruturais dos tecidos. Entretanto, testes revelaram que a técnica de fixação por imersão (descrita no item 4.4) adequou-se aos objetivos deste trabalho. Esse aspecto corrobora com as observações feitas anteriormente por Yong-Hing (2005), pois foi o mais indicado para a manutenção da morfologia encefálica, volume e parâmetros de imagem (T1, T2 e DP) próximos aos originais observados *in vivo*, preservação celular e mielínica e viabilidade para estudos patológicos (132,183).

Também são reconhecidas as alterações ventriculares decorrentes da fixação. Devido aos rearranjos proteicos teciduais e as diferenças de pressão sobre o interstício, os ventrículos tendem a colapsar, aumentando a dificuldade para o diagnóstico e distinção entre as AASSB periventriculares e profundas. Este

ponto tem grande importância, uma vez que se presume que as AASSB periventriculares e profundas diferem na patogênese, correlatos histopatológicos e evolução.

A alteração de volume dos tecidos durante a fixação é resultante de severas reações físico-químicas. O processo mais importante é a ligação cruzada das proteínas, onde a estrutura das proteínas nativas é alterada devido a um rearranjo em suas diversas ligações químicas, como as de hidrogênio, covalentes, dativas e hidrofóbicas, assim como as forças eletrostática e de Van der Waals (184,185).

O procedimento encontrado para minimizar essa distorção do tecido foi realizar a correlação em etapas, utilizando as imagens adquiridas *in cranio*, *ex cranio* e os cortes histológicos. Essa via mostrou-se mais eficaz, pois as deformações não lineares teciduais sofridas são menos bruscas quando comparadas em três etapas. Essa observação permite que, técnicas de correção sejam mais eficazes, um resultado semelhante a estudos que discutem as alterações estruturais nos tecidos fixados (127,129,130).

Outro fator que pode ser apontado como importante para o desenvolvimento deste trabalho, foi o emprego de emblocamento e cortes seriados do tecido embebido em celoidina. A parafina convencional, largamente utilizada no processamento de encéfalos humanos, é um método de custo elevado e que demanda maior tempo para aplicação (131,132).

A reconstrução 3D assistida por computador foi indispensável para a correlação neuroimagem-neuropatológica ponto-a-ponto, e para corrigir deformações lineares e não lineares (186). Também por este meio, a forma e o volume das lesões histopatológicas puderam ser avaliados e comparados aos resultados de MRI. Pode-se debater se a Ressonância Magnética não exagera alterações patológicas (182), ou se elas são significativamente mais amplas que

os resultados de MRI correspondentes. Acreditamos que o protocolo utilizado neste estudo pode ser empregado para responder a tais questões futuramente.

O método deste trabalho, que utilizou cortes de tecido em celoidina de 440 µm de espessura, permitiu uma melhor manipulação e gerenciamento das fatias histológicas, além de satisfatória preservação morfológica e menor deformação, se comparado a metodologias semelhantes baseadas em parafina.

Entretanto, uma vez que o cérebro foi completamente fixado e as secções individuais da série puderam ser adequadas homogeneamente nos eixos x e y, alterações no eixo z podem ter ocorrido de forma difusa no tecido, o que é ainda mais difícil de distinguir. Esta última modificação pôde ser detectada apenas no decurso do processo de alinhamento, quando houve tentativas para coincidir o perfil da secção homogeneamente encolhido com o anterior e das secções subsequentes.

Como esperado, ao empregar esta técnica, foi possível manter as características dos tecidos, ao ponto em que pequenos detalhes e alterações teciduais até o nível celular pudessem ser verificadas após a coloração de galocianina. Além disso, foram realizadas reconstruções 3D usadas para o correio das diferentes imagens.

6.2 Imagens de RM

Os resultados obtidos na análise das imagens de DTI demonstram que existem diferenças mensuráveis entre as AASSB e as áreas aparentemente normais na substância branca em encéfalos *post-mortem in situ*. Tanto nos valores de FA quanto nos valores de ADC, essas diferenças podem ser observadas, ainda que a distinção entre os valores destes dois parâmetros seja de 23,09% para FA e 16,27% para ADC.

De maneira geral, os resultados seguem a mesma linha de outros estudos publicados anteriormente, que também demonstraram a relação entre variáveis mensuradas através das DTI e alterações estruturais no tecido encefálico (142,149). Dessa forma, como se trata de um trabalho baseado em imagens obtidas *post-mortem*, fatores intrínsecos à degradação dos tecidos devem ser considerados.

Pesquisas conduzidas por Hesseltine *et al.* (2006) demonstraram que existem relações entre os valores de ADC e FA e o estado axonal dos tecidos em imagens *post-mortem* (94,150). Entretanto estes estudos envolviam material fixado em formalina 10% e imagens em equipamento de 1.5T, com imagens seccionais – e não cérebro total. Assim, a análise de correlação entre estes parâmetros e estudos *in vivo* é limitada. Por outro lado, em geral, estudos a respeito de parâmetros quantitativos de ADC e FA em tecido humano *post-mortem* ainda são escassos (55,151).

6.3 Correlação entre histologia e imagens de RM

Embora a relação entre a integridade de mielina e os parâmetros de DTI não esteja exatamente determinado, é consenso que sua estrutura é um determinante dos valores obtidos. Acredita-se que, nas fibras da substância branca, o sinal de DTI pode ser um dos parâmetros que reflita a integridade da mielina nos axônios, ainda que esta relação não seja unívoca. Estudos conduzidos por Horsfield *et al.* (1998), Werring *et al.* (1999), Mukherjee *et al.* (2001) e Huppi *et al.* (1998), demonstraram que as medidas de anisotropia neste tecido sofrem sensíveis alterações relacionadas a doenças desmielinizantes (152–155). Em relação às fibras, fatores como volume e composição da matriz extracelular e diâmetro axonal também devem ser considerados (156).

Outro fator a ser considerado, é que a elevação do conteúdo de água nos tecidos, em forma de edema, também interfere nos parâmetros relacionados à anisotropia. Edemas não influem diretamente na integridade da mielina e dos axônios. Porém, a proporção de água nos tecidos pode alterar os valores de intensidade de sinal apresentados em cada pixel (157,158).

É preciso ressaltar, ainda, que os parâmetros de ADC e FA observados *post-mortem* nas áreas de controle normais mostraram diferenças em relação aos mensurados anteriormente em regiões saudáveis da substância branca *in vivo* descritas na literatura (114,159,160). Mesmo com pequeno intervalo pós-óbito, as características de DTI nos tecidos cerebrais podem sofrer alterações em comparação a análises *in vivo*.

A Tabela 13 apresenta os valores de FA e ADC obtidos nesse estudo e outros trabalhos realizados anteriormente. Podemos observar que, enquanto os

valores referentes ao FA apresentam-se abaixo dos descritos por outros autores, os valores de ADC mostram-se sensivelmente elevados.

Os resultados aqui obtidos levam-nos a postular que essa diferença relativa aos valores de ADC deve-se à condição tecidual dos encéfalos incluídos neste estudo, uma vez que mostram-se mais próximos àqueles conseguidos por Jones (1999), Helenius (2002) e Bhagat (2004), que utilizaram sujeitos vivos em suas análises (159,161–163).

Os valores de ADC tendem a estar elevados, principalmente, devido à condição tecidual *post-mortem* pois, mesmo sob um curto intervalo pós óbito, os processos de degradação tecidual agem sobre a substância branca, gerando um aumento do conteúdo líquido e, conseqüentemente, aumento dos valores de ADC observados.

Os valores de FA, dependentes da anisotropia/integridade dos feixes de fibras da substância branca, como o ADC, também são afetados devido aos processos de degradação celular que, neste cenário, atuam diretamente sobre as membranas celulares dos axônios pós óbito.

Tabela 13 – Média dos valores de FA e ADC na substância branca aparentemente normal obtidos neste estudo e apresentados anteriormente na literatura

	FA	ADC
Dados da literatura		
Jones <i>et al.</i> ^{A, B}	0,74±0,08	0,795±0,09
Helenius <i>et al.</i> ^{A, B, C}	-	0,700±0,05
Bhagat <i>et al.</i> ^{A, D, E}	0,48±0,02	0,730±0,05
Iwata ^{A, D, F}	0,58±0,03	0,720±0,03
Chaddock-Heyman ^{A, D, G}	0,47±0,001	0,756±0,03
Borich ^{A, D, H}	0,50±0,01	0,827±0,17
Dados deste estudo		
<i>Post-mortem</i> ^D	0,52±0,15	0,108±0,03

A – Valores obtidos de controles vivos; B – RM 1,5T; C- Valores médios de ADC mensurados no lobos frontais à direita e à esquerda, occipitais à direita e à esquerda, temporais à direita e à esquerda e parietais à direita e à esquerda; D – RM 3 T; E - Valores do grupo de indivíduos idosos; F - valores do trato cortico-espinhal; G – Valores médios de ADC e FA mensurados na corona radiata e fascículo longitudinal superior; H – Valores médios mensurados na corona radiata e centrum semiovale; FA – anisotropia fracional; ADC – Coeficiente de difusão aparente $\times 10^{-3} \text{mm}^2/\text{s}$; $\pm$ - desvio padrão.

Grande parte dos estudos utilizando DTI *post-mortem* ainda está baseada em uso de modelos animais. Dentre eles, podemos citar os de D’Arceuil *et al.* (2007), Dauguet (2006), Mishra (2007), Oguz (2012) e Dyrby *et al.* (2011) como

referências sobre alterações estruturais observadas em encéfalos *post-mortem* (164–168).

Dentre os fatores citados na literatura como componentes principais das alterações de sinal na RM, está a autólise tecidual, que consiste no processo de autodegeneração celular decorrente da ação de suas enzimas autógenas, que causa sérias degradações teciduais durante as primeiras 24 horas pós-óbito (169).

As diferenças observadas entre os valores de FA e ADC aferidos *post-mortem* também podem estar relacionadas à diminuição da temperatura corpórea no momento da aquisição das imagens, e consequente alteração da mobilidade molecular. Os valores obtidos no presente estudo estão alinhados às observações anteriores, onde a diminuição da temperatura corpórea, associada à desidratação tecidual e à paralisação dos mecanismos de transporte iônicos celulares, impede a manutenção da difusibilidade tecidual *post-mortem* (170,171).

As alterações na difusão tecidual também foram demonstradas através de comparações entre valores obtidos em indivíduos pré e pós-óbito. Em tecidos de animais, esse fenômeno foi observado em gatos com alterações significativas no ADC de até 10% em um intervalo de três minutos, e até 50% em um intervalo de 15 minutos (170). Resultados similares foram demonstrados em roedores (94).

Por fim, os resultados aqui demonstrados carecem de reprodução, e mesmo a comparação com a literatura atual é dificultada pela notável carência de estudos sobre os aspectos de DTI humanos *post-mortem*. Conforme citado anteriormente, os autores citam limitações por fatores éticos e logísticos na aquisição deste tipo de dado (99,131,172).

6.4 Limitações do estudo

Nos parágrafos anteriores citamos alguns pontos que limitam a interpretação ou extensão dos resultados. Neste item, resumimos as considerações a respeito de limitações deste estudo nos seguintes pontos:

A - Impossibilidade de utilização de celoidina para inclusão do encéfalo no Brasil: a celoidina (nitrocelulose) é um material de uso controlado pelo Exército Brasileiro devido às suas características explosivas quando na forma sólida. É imprescindível para que os cortes do encéfalo fossem feitos com a espessura correta, característica fundamental nesta pesquisa. Desta maneira, após a fixação em formol, os casos foram enviados para inclusão em celoidina na Alemanha, onde o uso científico deste produto não é restrito. O envio de material biológico humano para o exterior também é monitorado e requer procedimentos alfandegários para que o estudo atenda a diversos critérios, fazendo com que o tempo hábil para o processamento e análise dos dados fosse reduzido;

B - Número relativamente reduzido de casos: ainda considerando a estrutura desenvolvida em nosso grupo, a coleta de casos de interesse ainda ofereceu desafios: a metodologia trabalhosa, alto custo, critérios de seleção mais estritos, somados ao tempo elevado do processamento do material biológico, restringiu o número de casos a serem estudados no período disponível para a conclusão deste estudo. Ainda assim, a casuística apresentada não é inferior ao número de casos apresentados em estudos similares da literatura. A principal consequência formal é restringir a interpretação da análise estatística utilizada nesse estudo. Torna-se mais útil a descrição dos resultados obtidos devido às

características da amostra. Ainda que tenhamos aplicados testes não paramétricos para análise de variáveis em alguns pontos deste trabalho, esta análise é passível de críticas. A variabilidade dos dados e o pequeno número de áreas/sujeitos incluídos não permitiu realizar análise com técnicas mais robustas. Não obstante, a descrição de comportamento dos parâmetros de imagem em AASSB em relação à AHAN e dos parâmetros quantitativos de dados de histologia constituem informação original. Assim, entendemos que o valor da inferência estatística apresentada neste trabalho deve ser obtido com limitações. Esta avaliação requer expansão da casuística e verificação em outras condições com dados cuja condição de independência seja mais consensual (onde a unidade a ser considerada é o indivíduo e a lesão, e não apenas a lesão).

C - Coloração dos casos: notou-se variação na coloração das lâminas, que pode ter acontecido por diversos fatores, não incomuns em tecidos desta natureza. Entre eles, o intervalo *post-mortem* e o tempo da fixação, e características do produto utilizado para este fim. É possível que em condições de processamento histológico em massa (alto volume de material) a homogeneização de processos possa reduzir esta variação.

6.5 Direções futuras

O presente estudo demonstra que as técnicas de correlação ponto-a-ponto mostrou-se adequada aos objetivos propostos. Planeja-se, como próximo passo, o aumento da casuística que, conseqüentemente, aumentará o poder da amostra. Consideramos que o estudo atual tenha valor como gerador de hipóteses. Assim, é importante prosseguir nesta linha de investigação, com as sugestões indicadas a seguir.

As perspectivas para a estrutura utilizada durante a realização desse trabalho nos faz acreditar que os aspectos metodológicos indicados como limitações deste estudo possam realisticamente ser minimizados. Em particular, a Plataforma de Imagem em Sala de Autópsia na Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – um projeto em plena implementação (Plataforma de Imagens na Sala de Autópsia (PISA) – Multiusuário FAPESP 09/54323-0) contribuirá com recursos de processamento e coleta de dados de maior amplitude para correlação entre imagens radiológicas e histologia de tecidos. Neste projeto, está prevista a instalação de um sistema de RM de 7 Teslas, o que tornará factível a coleta de dados de imagem com resolução espacial e de contraste significativamente melhores que as atuais. Ainda, a transferência tecnológica para a aplicação da celoidina em nosso meio, recentemente tornou-se realidade, com a aprovação regimental da manipulação deste material. Na fase final desta tese foi realizado teste com sucesso da inclusão de espécime em celoidina, concluindo integralmente no Brasil o ciclo de processamento histológico utilizado nesta tese. Estes são aspectos que podem ser apontados como determinantes para futuras

pesquisas no campo da imagem *post-mortem* e concretamente indicam possibilidades promissoras para o seguimento da linha de pesquisa desta tese.

Ainda, o artigo submetido para publicação por nosso grupo (Anexo G) sintetiza a viabilidade de estudos sobre alterações na substância branca com uma casuística maior. No artigo em questão, mostramos o resultado da análise de parâmetros quantificáveis de DTI – FA e ADC - nas imagens de RM de 24 sujeitos *post-mortem* – uma expansão considerável da casuística deste trabalho. Naquele artigo, comunicamos achados em um total de 83 AASSB, amostra quatro vezes maior que os dados aqui apresentados. Entretanto, neste manuscrito não consta a análise dos correlatos histológicos. É consequência natural submeter estes casos à mesma metodologia de correlação ponto-a-ponto desta tese, e assim, expandir e tornar mais robusta a nossa casuística.

De acordo com nossas perspectivas apontadas acima, acreditamos que, em um futuro próximo, teremos a capacidade de utilizar os métodos de estudo ponto-a-ponto demonstrados nesta tese em larga escala, e totalmente realizados em nosso meio. Desta maneira, será possível verificar as diferenças e propriedades do sinal de RM apontados neste trabalho, com a chance de obter maior poder estatístico para inferência e generalização dos resultados.

Em síntese, planejamos como próximos passos o aumento da casuística e a aplicação de técnicas modernas de RM, incluindo a utilização de imagens de DTI de alta resolução. Esta possibilidade deverá ser potencializada em imagens adquiridas no sistema de RM de 7T – e com a entrada de operação da rotina de processamento histológico para correlação entre histologia e imagens de alta produtividade e eficiência temporal.

7 CONCLUSÕES

A análise conjunta dos dados de RM e aspectos de histologia deste estudo permitiu concluir que:

1 – Os parâmetros de imagem de DTI (FA e ADC) nas áreas de alteração de sinal da substância branca (AASSB) mostram comportamento diferente em relação à substância branca aparentemente normal (AHAN) do encéfalo humano em imagens post-mortem *in cranium*: a média dos valores de FA foi menor e os valores de ADC foram maiores nas AASSB que nas AHAN. Esta diferença também foi observada no parâmetro de relaxometria T2 (maior nas AASSB), mas não entre os valores de MTR;

2 – A avaliação descritiva mostra que, as AASSB representam padrões heterogêneos na histologia, com áreas de gliose, rarefação mielínica, e espaços perivasculares presentes na maior parte das regiões. Ao analisarmos as AASSB por meio de técnicas de imuno-histoquímica, quantitativas, podemos observar que o parâmetro com maior diferenciação entre AASSB e áreas controles foi o anticorpo anti-GFAP. Os dados sugerem que as AASSB relacionam-se de forma mais íntima a alterações da expressão de proteínas ácidas fibrilares gliais, ligadas à gliose fibrilar;

3 – Foi observada correlação negativa entre os valores de FA e a expressão de GFAP no tecido (tanto nas AASSB, quanto nas AHAN). Desta maneira, infere-se que o padrão histológico de gliose é uma variável que se correlaciona à DTI. A avaliação das diferenças entre AASSB e AHAN, encontradas em imagens de RM e de histologia, sugerem que a diminuição

focal da quantidade de fibras íntegras na substância branca e proliferação de células gliais e astrócitos sejam associados à maiores valores de relaxometria T2 e ADC, e menores valores de FA. Isso se deve, possivelmente, ao aumento proporcional do coeficiente de moléculas livres em meio líquido nos tecidos. A diminuição dos valores de FA nas AASSB em relação às AHAN é condizente com a constatação da diminuição da quantidade de feixes de fibras nas regiões estudadas, à análise qualitativa.

Este estudo é um dos primeiros a ter êxito em demonstrar a viabilidade de correlação entre imagem e histologia ponto-a-ponto com possíveis aplicações clínicas. Entretanto, é necessário aprofundamento do tema com esforços que sigam a mesma linha desta pesquisa, a fim de que a abordagem aqui proposta possa produzir resultados com maior poder de generalização.

8 ANEXOS

ANEXO A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

HOSPITAL DAS CLÍNICAS
DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
CAIXA POSTAL, 8091 – SÃO PAULO - BRASIL

Anexo I

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: Correspondência histológica de parâmetros de imagens de tensores de difusão
- PESQUISADOR: Edson Amaro Junior.....
- CARGO/FUNÇÃO: Médico - pesquisador INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº .
- UNIDADE DO HCFMUSP: Departamento de Radiologia
3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:
SEM RISCO	X	RISCO MÍNIMO	☐	RISCO MÉDIO	☐
RISCO BAIXO	☐	RISCO MAIOR	☐		
4. DURAÇÃO DA PESQUISA : 4 anos.....
-

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

Muito obrigado 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. 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 enfermeiro 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. Caso não saiba a resposta, diga "não sei".

Durante a autópsia serão retirados o cérebro e pedaços de órgãos cujo comprometimento podem afetar a função cerebral, incluindo coração, rim e carótidas. De acordo com sua autorização, esses órgãos serão analisados com bastante cuidado para verificar alterações que possam prejudicar o funcionamento do cérebro. 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 o corpo não será mutilado.

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 por conhecermos melhor doenças como Alzheimer e mal de Parkinson. Algumas das doenças passam de pai para filho e, além disso, podem afetar grande parte da população. Então, os resultados que conseguiremos poderão ajudar muitas pessoas a não ficarem doentes.

O estudo não lhe causará nenhum transtorno e este estudo não atrasará a realização da autópsia.

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 para o(a) senhor(a). A qualquer momento, se for sua vontade, o seu familiar pode ser retirado da pesquisa e todas as informações obtidas serão sigilosas. Caso não queira participar deste estudo, não haverá prejuízo nem para o(a) senhor(a), nem para seu parente.

Uma cópia deste documento será entregue para o(a) 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,

Dr. Edson Amaro Junior
Telefone: (011)

CRM-SP:

VI - CONSENTIMENTO LIVRE E 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 20 .

assinatura do sujeito da pesquisa ou responsável legal

assinatura do pesquisador
(carimbo ou nome Legível)

**ANEXO B - Aprovação do projeto na 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**

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

APROVAÇÃO

A 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 sessão de 16/12/2009, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **1199/09**, intitulado: **"CORRESPONDÊNCIA HISTOLÓGICA DE PARÂMETROS DE IMAGENS DE TENSORES DE DIFUSÃO"**, apresentado pelo Departamento de **RADIOLOGIA**.

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 (a) Responsável: **DR. EDSON AMARO JR.**

Pesquisador (a) Executante: **RAFAEL EMÍDIO DA SILVA**

CAPPesq, 17 de Dezembro de 2009.

Prof. Dr. Carlos Alberto Buchpiguel
Coordenador da Área de Radiologia
FMUSP

PROF. DR. EDUARDO MASSAD
Presidente

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
matc

ANEXO C - Entrevista clínica

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? ☐ Frequentemente ☐ Às vezes ☐ Raramente
3. Ele/ela pode se lembrar de uma lista curta de itens (compras)? ☐ Frequentemente ☐ 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? ☐ Frequentemente ☐ Às vezes ☐ Raramente
7. Ele/ela se esquece de detalhes pertinentes de um evento importante? ☐ Frequentemente ☐ 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)? ☐ Frequentemente ☐ Às vezes ☐ Raramente
9. OBS - Questão removida por não ser aplicável.

QUESTÕES SOBRE ORIENTAÇÃO PARA O INFORMANTE

Com que frequência ele/ela sabe o exato:

1. Dia do Mês?
☐ Frequentemente ☐ Às vezes ☐ Raramente ☐ Não sabe
2. Mês?
☐ Frequentemente ☐ Às vezes ☐ Raramente ☐ Não sabe
3. Ano?
☐ Frequentemente ☐ Às vezes ☐ Raramente ☐ Não sabe
4. Dia da semana?
☐ Frequentemente ☐ Às vezes ☐ Raramente ☐ Não sabe
5. Ele/ela tem dificuldades com relações temporais (quando os eventos ocorreram em relação uns com os outros)?
☐ Frequentemente ☐ Às vezes ☐ Raramente ☐ Não sabe

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

☐ Frequentemente ☐ Às vezes ☐ Raramente ☐ Não sabe

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

☐ Frequentemente ☐ Às vezes ☐ Raramente ☐ Não sabe

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

☐ Frequentemente ☐ 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?

☐ Frequentemente ☐ 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?

☐ Frequentemente ☐ 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 significativa em seu trabalho por causa de problemas com memória ou pensamento (raciocínio)?
☐ Raramente ou nunca ☐ Às vezes ☐ Frequentemente ☐ 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 ☐ Frequentemente ☐ 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 ☐ Frequentemente ☐ Não sabe
(Frequentemente 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?
Se não, por que não? _____ ☐ SIM ☐ 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, investigue 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 investigue 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.

SB: _____

Inventário Neuropsiquiátrico

(Cummings et al – 1994)

- Responder baseando-se nas mudanças que ocorreram desde que o paciente começou a ter problemas de memória
- Marcar sim apenas quando o sintoma estiver presente no último mês. Do contrário, marcar não.
- Responda honestamente e meticulosamente às questões

Total: _____ /144 pontos

Delírios			O paciente acredita que alguém está tentando rouba-lo ou prejudica-lo?															
Sim	Não	NA	Frequência	1	2	3	4	Severidade	1	2	3	Estresse	0	1	2	3	4	5
Alucinações			O paciente age como se escutasse vozes? Fala com pessoas que não existem?															
Sim	Não	NA	Frequência	1	2	3	4	Severidade	1	2	3	Estresse	0	1	2	3	4	5
Agitação/ Agressividade			O paciente é teimoso e rejeita ajuda dos outros? Tem períodos que se recusa a cooperar?															
Sim	Não	NA	Frequência	1	2	3	4	Severidade	1	2	3	Estresse	0	1	2	3	4	5
Depressão/ Disforia			O paciente age como se estivesse triste ou de "baixo astral"? Refere sentir-se triste ou deprimido?															
Sim	Não	NA	Frequência	1	2	3	4	Severidade	1	2	3	Estresse	0	1	2	3	4	5
Ansiedade			O paciente fica agitado quando se separa de você? Ele apresenta sinais de nervosismo, preocupado, assusta-se por razões não aparentes? Parece muito tenso ou irrequieto?															
Sim	Não	NA	Frequência	1	2	3	4	Severidade	1	2	3	Estresse	0	1	2	3	4	5
Elação/ Euforia			O paciente parece animado demais ou excessivamente feliz – sem razão? Acha graça onde outros não acham?															
Sim	Não	NA	Frequência	1	2	3	4	Severidade	1	2	3	Estresse	0	1	2	3	4	5
Apatia/ Indiferença			O paciente parece menos interessado em suas atividades habituais ou nas atividades e planos dos outros?															
Sim	Não	NA	Frequência	1	2	3	4	Severidade	1	2	3	Estresse	0	1	2	3	4	5
Desinibição			O paciente parece agir impulsivamente? Ex, diz coisas que podem magoar as pessoas sem qualquer constrangimento ou fala abertamente coisas íntimas que em geral não se diz em público? Tira a roupa em frente de outras pessoas/ público – momentos não apropriados?															
Sim	Não	NA	Frequência	1	2	3	4	Severidade	1	2	3	Estresse	0	1	2	3	4	5
Irritabilidade/ Labilidade			O paciente é impaciente e mau-humorado? Ele tem dificuldades para lidar com atrasos ou para ficar esperando algo que esteja programado? Seu humor é instável?															
Sim	Não	NA	Frequência	1	2	3	4	Severidade	1	2	3	Estresse	0	1	2	3	4	
Distúrbios Motores			O paciente fica fazendo coisas repetitivas, como lidar andando ao redor da casa, mexendo nos botões da roupa, enrolando um cordão ou fazendo outras coisas repetitivamente? Anda sem motivo aparente?															
Sim	Não	NA	Frequência	1	2	3	4	Severidade	1	2	3	Estresse	0	1	2	3	4	5
Comportamentos Noturnos			O paciente acorda você a noite, acorda muito cedo, cochila muito durante o dia? Tem dificuldade para dormir? Ele levanta à noite (não contar vezes que levanta p/ urinar e volta a dormir imediatamente)? Anda ao acaso à noite, veste-se ou perturba seu sono?															
Sim	Não	NA	Frequência	1	2	3	4	Severidade	1	2	3	Estresse	0	1	2	3	4	5
Apetite e alimentação			O paciente perdeu ou ganhou peso? Mudou o gosto pelos alimentos?															
Sim	Não	NA	Frequência	1	2	3	4	Severidade	1	2	3	Estresse	0	1	2	3	4	5

FREQUENCIA

- 1 – ocasionalmente – menos que 1X/sem
 2 – Algumas vezes – cerca de 1X/sem
 3 – Frequentemente – várias vezes, menos que todos os dias
 4 – Muito frequentemente – 1 ou + vezes/ dia

SEVERIDADE

- 1 – Leve – presente, mas produzindo pouca aflição no paciente
 2 – Moderada – aflitiva e perturbadora
 3 – Marcada – muito perturbadora

ESTRESSE DO CUIDADOR

- 0 = Nenhum
 1 = Mínimo (levemente estressante, lidar com a situação não chega a ser um problema)
 2 = Leve (não muito estressante, geralmente fácil de lidar com a situação)
 3 = Moderado (razoavelmente estressante, nem sempre fácil de lidar com a situação)
 4 = Importante (muito estressante, difícil de lidar com a situação)
 5 = Muito importante (extremamente estressante, incapaz de lidar com a situação)

Índice de Katz para Atividades de Vida Diária

(Katz, S; Down, TD; Cash, HR et al – 1970)

Banho	I - Independente – não necessita de auxílio A - Auxílio – recebe assistência para banhar uma parte do corpo (dorso/pernas) D - Dependente - necessita que alguém o banhe
Vestuário	I - Alcança as roupas e se veste sem auxílio A - Necessita de auxílio apenas para amarrar sapatos D - Necessita de auxílio para alcançar as roupas, para se vestir – do contrário não se veste completamente ou permanece totalmente despido
Uso de sanitário	I - Consegue chegar ao banheiro, usa o sanitário, e recoloca o vestuário sem auxílio (pode usar equipamento auxiliar como bengala, cadeira de roda, usar comadre e esvaziar pela manhã) A - Necessita de auxílio para ir até o banheiro, ou para sua higienização/ recomposição do vestuário após uso do sanitário/ ou no uso de comadre D - Não usa o banheiro para eliminações
Transferência	I - Independente (cama/ cadeira)– pode necessitar de bengala, andador. A - Necessita de ajuda para sentar-se/ deitar-se/ levantar-se D - Não sai da cama
Continência	I - Tem controle de esfíncter vésico – intestinal A - Apresenta “acidentes ocasionais” – perder urina/ conteúdo fecal ocasionalmente D - Necessita de auxílio para o controle urinário/intestinal; uso de SVD; incontinência
Alimentação	I - Se alimenta sem auxílio A - Se alimenta sozinho, mas necessita de assistência para cortar os alimentos ou passar manteiga no pão. D - Necessita de auxílio para alimentar-se; usa SNG/SNE; Soroterapia/ Nutrição parenteral.

I = 1 ponto e D = 0 ponto

TOTAL: ____/6

Avaliação de Parkinsonismo (Adaptado de Tanner et al, 1990)

	SIM	NÃO
1. Tinha dificuldade para se levantar de uma cadeira?		
2. Notou se a letra (escrita) ficou pequena, se reduziu de tamanho?		
3. Notou ou alguém comentou se a sua voz estava mais baixa ou mais fraca que era antes?		
4. Tinha alterações do equilíbrio ao caminhar?		
5. Os pés ficavam presos ou agarrados no chão ao atravessar portas?		
6. Acha o seu rosto ficou mais “parado”, menos expressivo do que era antes?		
7. Tinha tremores nos braços ou nas pernas?		
8. Tinha dificuldades de abotoar as roupas?		
9. Arrastava os pés ou dava passos curtos ao caminhar?		

☐ NA ☐ PARK: _____

ESCALA DE ATIVIDADES INSTRUMENTAIS DA VIDA DIÁRIA (IADL)

(Lawton & Brody)

A – Habilidade para usa o telefone

1. Utiliza o telefone por iniciativa própria	1
2. Disca alguns números conhecidos	1
3. Atende mas não faz ligações	1
4. Não usa o telefone de modo algum	0

B – Compras

1. Faz compras independente/e	1
2. Faz pequenas compras independente/e	0
3. Precisa ser acompanhado nas compras	0
4. Incapaz de fazer compras	0

C – Preparo de alimentos

1. Planeja, prepara e serve adequadamente as refeições independentemente	1
2. Prepara adequadamente as refeições se alguém lhe fornecer os ingredientes	0
3. Aquece, serve e prepara refeições, mas não garante uma dieta adequada	0
4. Necessita que alguém prepare e sirva a refeição	0

D – Tarefas domésticas

1. Matem a casa sozinho ou com auxílio ocasional (p.ex: auxílio para tarefas pesadas)	1
2. Realiza tarefas diárias leves, como lavar louça, fazer a cama	1
3. Realiza tarefas diárias leves, mas não consegue fazê-las dentro dos padrões de limpeza	1
4. Necessita de auxílio com todas as tarefas domésticas	1
5. Não faz/ participa de nenhuma tarefa doméstica	0

E – Lavanderia

1. Lava completamente as roupas	1
2. Lava pequenas peças: meias, etc	1
3. Toda a roupa deve ser lavada por terceiros	0

F – Transporte

1. Usa independentemente transportes públicos ou dirige seu próprio carro	1
2. Chama de táxi, mas não usa transporte público	1
3. Usa transporte público se acompanhado	1
4. Locomove-se limitadamente de táxi ou carro com auxílio de outros	0
5. Não sai de casa/ Não usa nenhum transporte	0

G – Medicação

1. É responsável por tomar sua medicação em dose e horários corretos	1
2. Assume responsabilidade por tomar sua medicação se separada anteriormente por outros	0
3. Não é capaz de tomar sua medicação	0

H – Finanças

1. Controla suas finanças independentemente (conta de banco, talão de cheque, preenche cheques, paga contas)	1
2. Controla contas no dia a dia, mas necessita de auxílio com banco, compras maiores,...	1
3. Incapaz de controlar finanças	0

Lawton,MP; Brody, EM - The instrumental activities of Daily Living Scale. Gerontologist, 1969, 9: 179 - 186

Total: _____ / 8 pontos

Perguntas adicionais:

Ele(a) esquece panela no fogo, torneira aberta ou ferro ligado? _____

Ele(a) pode ser deixado(a) em casa sozinho(a) de forma segura? _____

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 ()

Critério: 1 2 3

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 frequentemente, 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

Episódio Maníaco no Passado - SCID

Critérios para classificar como mania no passado : Humor elevado e mais três dos outros sintomas, ou humor irritável e mais quatro dos outros sintomas.

HUMOR ELEVADO: Já houve algum período de tempo em ele(a) estava se sentindo tão bem, agitado(a) ou excitado(a) que vocês perceberam que ele(a) não estava no seu normal? Ou ficava tão excitado(a) que se envolvia em problemas?

Critério 1 2 3 ?

Durou pelo menos 1 semana? Ou ele(a) teve que procurar um hospital? Sim () Não ()

Quando foi isso? _____

HUMOR IRRITÁVEL: Houve algum período em que ele(a) estava tão irritado(a), que era pego(a) gritando com as pessoas ou começando brigas ou discussões?

Durou mais que 1 semana? Ou ele(a) teve que procurar um hospital? Sim () Não ()

Critério: 1 2 3 ? Quando foi isso? _____

3) Naquele período como ele(a) se sentia em relação a si mesmo? (Mais confiante do que o habitual? Com algum poder ou habilidade especial?)

Critério 1 2 3 ?

4) Naquele tempo ele(a) tinha que dormir menos que o habitual? (Mesmo assim se sentia descansado?)

Critério: 1 2 3 ?

5) Naquele tempo ele(a) estava muito mais falante que o habitual? (Vocês tinham dificuldade para interromper ou entender o que ele(a) estava falando?)

Critério: 1 2 3 ?

6) Naquele tempo os pensamentos passavam rapidamente pela cabeça dele(a)?

Critério: 1 2 3 ?

7) Naquele tempo ele(a) era tão facilmente distraído(a) por coisas a sua volta que tinha dificuldades para se concentrar ou continuar o que estava fazendo?

Critério: 1 2 3 ?

8) Naquele período, como ele(a) passava o tempo? (Ele(a) se envolvia em tantas atividades a ponto de vocês ficarem preocupados?)

SE NÃO: Ele(a) estava fisicamente inquieto(a)? (Qual a intensidade disso?)

Critério: 1 2 3 ? Assinalar: aumento na atividade _____ agitação psicomotora _____

9) Naquele tempo, ele(a) fez alguma coisa que pudesse trazer problemas para ele(a) mesmo(a) ou para vocês (Comprando coisas que não precisava?) (Tendo comportamento sexual inadequado?)

Critério: 1 2 3 ?

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(a) estava bebendo em excesso ou usando drogas?

SIM () NÃO ()

12) Pouco antes disso começar, ele(a) estava fisicamente doente?

SIM () NÃO ()

CONSIDERAR:

1 – ausente ou falso

2 – subliminar (duvidoso)

3 – limiar ou verdadeiro

? – informação inadequada

Transtorno Obsessivo-Compulsivo (TOC)

Seu parente alguma vez apresentou:

- Medos, preocupações, idéias ou imagens repetitivos que causavam desconforto a ele(a)? (? 1 2 3)
- Comportamentos repetitivos (manias) que a pessoa tinha que fazer várias vezes e não conseguia evitar, tais como (**perguntar TODOS os itens de 1 a 9**):

1) Verificar fechaduras, fogão, se não se feriu ou feriu outros, ou perguntar se foi responsável por algo terrível que tenha acontecido (Agressão e verificação) (? 1 2 3) _____

2) Lavar excessivamente mãos e objetos, tomar banhos demorados, parecer preocupado com sujeira ou micróbios, com ficar contaminado e adoecer por isso, ter nojo de secreções do próprio corpo (Contaminação, limpeza e lavagem) (? 1 2 3) _____

3) Guardar objetos inúteis, manter o quarto ou casa entulhados (Colecionamento) (? 1 2 3) _____

4) Preocupação excessiva com: desrespeito a Deus; certo e errado; moralidade (Religião) (? 1 2 3) _____

5) Mania de arrumação, simetria, exatidão, perfeccionismo, ter que deixar as coisas organizadas do seu jeito (? 1 2 3) _____

6) Preocupação excessiva com doenças sem ser por contaminação, com partes do corpo, com a aparência física: (? 1 2 3) _____

7) Compulsões de repetição, reler ou reescrever várias vezes, repetir atividades rotineiras como entrar e sair de casa, levantar-se da cadeira, vestir roupas) (? 1 2 3) _____

8) Compulsões de contagem (contar telhas, tijolos, riscas do chão) (? 1 2 3) _____

9) Comportamentos extremamente supersticiosos (medo de passar perto de cemitérios, medo de gato preto, de números ou cores que representem azar). (? 1 2 3) _____

Qualquer um dos itens de 1 a 9 foi positivo? ? 1 3

? ou 1 = pule para Transtornos de tiques; 3 = Continue abaixo

Você acha que seu parente gastava muito tempo por dia com esses sintomas? (? 1 2 3) _____

Quanto tempo? _____ (juntando tudo chegava a 1 hora por dia?) (? 1 2 3) _____

Os sintomas interferiam na vida dele? (? 1 2 3) _____

Causavam ansiedade, sofrimento? (? 1 2 3) Com que idade os sintomas começaram? _____

Transtornos de tiques

Tiques, também chamados de **sestos** ou **cacoetes**, são movimentos involuntários (que a pessoa faz sem querer), que geralmente começam na infância. Podem ser motores ou vocais. Os principais exemplos são (mostrar exemplos): piscar os olhos, fazer caretas, colocar a língua para fora, sacudir os ombros, sacudir a cabeça, fungar, pigarrear, assoviar, estalar etc.

1) A pessoa tinha tiques motores (? 1 2 3) Idade de início: _____ Tipos de tiques: _____

2) Tinha tiques vocais (? 1 2 3) Idade de início: _____ tipos de tiques: _____

Se **Não** para as respostas 1 e 2, passe para o próximo questionário. Se **Sim** para alguma das respostas:

Os tiques duraram mais de um ano? (? 1 2 3) _____

Os tiques duraram entre 3 meses e um ano? (? 1 2 3) _____

A pessoa tem tiques motores e vocais? (? 1 2 3) _____

Outras informações relevantes: _____

CRITÉRIO DE CLASSIFICAÇÃO ECONÔMICA BRASIL (CCEB)

A- Em sua casa tem?

Posse de itens

	Quantidade de Itens				
	0	1	2	3	4 ou +
Televisão em cores	0	1	2	3	4
Rádio	0	1	2	3	4
Banheiro	0	4	5	6	7
Automóvel	0	4	7	9	9
Empregada mensalista	0	3	4	4	4
Máquina de lavar	0	2	2	2	2
Videocassete e/ou DVD	0	2	2	2	2
Geladeira	0	4	4	4	4
Freezer (aparelho independente ou parte da geladeira duplex)	0	2	2	2	2

TOTAL: _____

B- Qual a instrução do chefe de família?

Grau de Instrução do chefe de família

Nomenclatura Antiga	Nomenclatura Atual	
Analfabeto/ Primário incompleto	Analfabeto/ Até 3ª série Fundamental/ Até 3ª série 1º. Grau	0
Primário completo/ Ginásial incompleto	Até 4ª série Fundamental / Até 4ª série 1º. Grau	1
Ginásial completo/ Colegial incompleto	Fundamental completo/ 1º. Grau completo	2
Colegial completo/ Superior incompleto	Médio completo/ 2º. Grau completo	4
Superior completo	Superior completo	8

TOTAL: _____

CORTES DO CRITÉRIO BRASIL

Classe	Pontos
A1	42 - 46
A2	35 - 41
B1	29 - 34
B2	23 - 28
C1	18 - 22
C2	14 - 17
D	8 - 13
E	0 - 7

Classe: _____

ANEXO D - Dados demográficos dos sujeitos incluídos no estudo

ANEXO D – Características dos sujeitos e encéfalos incluídos no estudo				
Sujeito	1	2	3	4
Idade	94	64	80	79
Gênero	F	M	M	F
Escolaridade	0	8	4	4
Raça	Pardo	Caucasiano	Caucasiano	Caucasiano
Peso (kg)	70	58	47,5	86,5
Altura (cm)	180	163	166	162
Massa do encéfalo (g)	1408	1114	1130	1226
Volume do encéfalo (mm ³)	1500	1000	1100	1100
AASSB	6	6	4	4
CDR	3	0	0	0,5
IQCODE	4,11	3	3	3,23
NPI	25	6	18	10
KATZ	5	4	6	6
IADL	0	3	6	6
PARK	7	6	0	1
ABIPEME	B	C	C	B
Causa do Óbito	Hematoma Perirenal	Broncopneumonia	Hemopericárdio	Miocardiópatia Isquêmica
Ocupação	Costureira	Metalúrgico	Marceneiro	Do lar
IPM (hrs)	11	16	14	10,5
T pré RM (°C)	27,5	24,5	24,9	21,2
T pós RM (°C)	27,2	25	26	21,4

AASSB – Áreas de alteração de sinal na substância branca; IPM – Intervalo *post-mortem*; RM – Ressonância Magnética; T – Temperatura; CDR: *Clinical dementia rating*; IQCODE- *Informant questionnaire on cognitive decline in the elderly*; NPI - *Neuropsychiatric inventory*; KATZ - Índice de Katz para atividades de vida diária (AVD); IADL - Escala de atividades instrumentais de vida diária (AIVD); PARK- Avaliação de parkinsonismo (Adaptado de Tanner *et al.*, 1990); ABIPEME- Avaliação socioeconômica da Associação Brasileira dos Institutos de Pesquisa de Mercado.

**ANEXO E - Parâmetros de imagem aferidos de forma individual nas
AASSB e AHAN**

ANEXO E - Variáveis de imagem aferidas nas AASSB e AHAN

Áreas	FLAIR AASSB	FLAIR AHAN	FA AASSB	FA AHAN	ADC AASSB	ADC AHAN	MTR AASSB	MTR AHAN	RT2 AASSB	RT2 AHAN
1A	152.000	116.119	0,316	0,369	0,1763	0,1541	49,51%	51,26%	93,20	68,49
1B	141.649	127.140	0,222	0,336	0,2169	0,1722	51,79%	53,60%	93,34	73,51
1C	174.687	134.435	0,283	0,407	0,1626	0,1273	55,08%	54,74%	89,77	72,21
1D	150.557	117.133	0,226	0,309	0,1911	0,1511	42,18%	55,59%	89,15	65,42
1D	177.739	134.250	0,358	0,451	0,1458	0,1684	53,35%	51,66%	90,01	74,13
1E	167.511	118.385	0,338	0,311	0,1842	0,1645	52,93%	56,00%	94,07	76,02
2A	625.334	516.441	0,362	0,636	0,1106	0,0651	55,23%	55,33%	94,31	64,06
2B	601.636	501.919	0,601	0,572	0,0993	0,0809	54,51%	58,34%	92,02	76,88
2C	629.349	489.487	0,526	0,638	0,1218	0,0795	53,23%	57,49%	92,55	74,19
2D	608.513	495.432	0,480	0,815	0,1632	0,1109	45,16%	54,89%	88,93	72,93
2E	709.963	653.113	0,623	0,687	0,0792	0,0769	53,14%	56,82%	89,07	71,04
2F	755.917	438.542	0,605	0,688	0,0902	0,0888	49,89%	56,42%	90,78	65,59
3A	776.820	658.672	0,297	0,608	0,1068	0,0871	53,42%	45,27%	92,78	67,92
3B	788.232	646.048	0,457	0,603	0,1051	0,0857	54,12%	48,85%	92,13	67,48
3C	831.535	603.873	0,330	0,581	0,1192	0,0972	49,31%	50,74%	91,54	62,72
3D	786.470	727.690	0,544	0,293	0,1250	0,1021	42,69%	56,61%	90,87	62,01
4A	656.782	547.342	0,339	0,482	0,1061	0,0967	54,17%	48,39%	93,55	72,74
4B	598.008	575.278	0,233	0,356	0,0967	0,0923	54,18%	52,42%	93,71	75,13
4C	824.110	594.742	0,465	0,656	0,0912	0,0821	53,61%	44,24%	92,04	68,85
4D	752.829	609.967	0,477	0,685	0,0889	0,0785	54,23%	48,85%	91,03	67,42

FA - Anisotropia fracional; AASSB - Áreas de alteração de sinal na substância branca; AHAN - Áreas homólogas aparentemente normais; ADC - Coeficiente de difusão aparente; MTR - Índice de transferência de magnetização.

ANEXO F – Protocolo básico da técnica imuno-histoquímica

IMUNO-HISTOQUÍMICA

O princípio da imuno-histoquímica envolve a utilização de um anticorpo específico a proteína estudada, cuja interação é identificada por um marcador. Tornou-se um método auxiliar de diagnóstico de extrema importância e utilidade, além de uma ótima ferramenta para indicar a presença ou não de um antígeno.

A imuno-histoquímica é uma técnica muito importante para a pesquisa científica, pois complementa a pesquisa dando um diagnóstico diferencial, na qual métodos mais convencionais, como a coloração de hematoxilina-eosina, não dariam. É de fácil execução, com a possibilidade de fazer diferentes marcações e localização bastante precisa, e, ainda, alta especificidade.

Esta ferramenta é extremamente útil na confirmação do diagnóstico, combinando técnicas morfológicas, imunológicas e bioquímicas. Pode ser realizada a partir de tecido parafinizado.

PROTOCOLO E MATERIAIS UTILIZADOS

Primeiro dia

A imuno-histoquímica se inicia a partir das 08h. É preciso separar todos os materiais, reagentes químicos a serem utilizados e etapas a serem seguidas:

- Caderno de imuno-histoquímica;
- Caneta (com ponta de diamante para identificação de lâminas);
- Álcool 70%;
- Álcool 95%;
- Álcool 100%;
- Xilol;
- Ácido fórmico;
- Água oxigenada;
- Leite em pó;
- Solução tampão PBS;
- Água amoniacal 1%;
- Cubas de vidro devidamente identificadas;
- Carrinhos/ berços preenchidos com lâminas - sempre lembrando de colocar o caso controle (positivo);
- *Timer*;
- Luvas – devem ser colocadas antes da manipulação de quaisquer reagentes listados acima;

- Preencher uma cuba de vidro com xilol e deixá-la na estufa a 60 °C, durante 40 minutos, para aquecer;
- Identificar as lâminas com a caneta com ponta de diamante, sempre conferindo pelo caderno de imuno-histoquímica;
- Anotar a data de início da rotina de imuno-histoquímica;
- Deve-se verificar se existe quantidade suficiente de solução tampão PBS.

Em caso negativo, realizar as seguintes orientações abaixo:

Solução mãe de PBS

- Cloreto de sódio 410g;
- Fosfato de sódio monobásico 17,5 g;
- Fosfato de sódio dibásico 52,5 g;
- Água destilada 5L.

Este protocolo deve ser devidamente seguido e colocado em um galão de 5L (identificado como solução mãe de PBS), sendo diluído posteriormente em soluções a 10% e separado em galões de 5L (identificados como solução PBS) pH = 7,0 – 7,4

Deve ser verificada também a quantidade de citrato (encontra-se na geladeira a 4 °C). Caso não esteja disponível, deve ser preparado conforme descrito abaixo:

Solução mãe de citrato

- Ácido cítrico anidro 42 g;
- Água destilada 2L;
- Armazenar em balão volumétrico de 2L refrigerado a 4 °C;
- Manter o pH da solução igual a 6,0.

Após a realização de toda a organização dos materiais e preparação de reagentes e soluções da técnica de imuno-histoquímica, inicia-se o protocolo descrito a seguir:

Desparafinização e reidratação dos tecidos

Após o aquecimento do xilol a 60 °C, as lâminas deverão ser então colocadas dentro da cuba por cinco minutos (utiliza-se o *timer* para controle do tempo). Este será o passo do processo de desparafinização do tecido.

A seguir, as lâminas devem ser retiradas cuidadosamente, desprezando todo o excesso de xilol.

As lâminas devem ser submersas em cuba com álcool a 100%, depois em álcool a 95%, e, por fim, em álcool a 70%. Cada submersão deve durar um minuto. Este é o processo de reidratação dos tecidos.

Subsequentemente, as lâminas devem passar por duas lavagens de solução PBS por cinco minutos, utilizando novas cubas sem nenhum vestígio de álcool/ xilol.

Os tecidos não devem ser deixados expostos em nenhum momento do protocolo, ou seja, sem algum tipo de solução, pois podem secar e se deteriorar, impossibilitando a realização adequada da técnica. Entre as etapas do protocolo, quando necessário, as lâminas devem ser deixadas submersas em solução tampão de PBS.

Bloqueio de peroxidase endógena

Após seguir os passos anteriores e lavagens em solução PBS, as lâminas devem ser submetidas a três banhos de peróxido de hidrogênio (10 minutos cada) em câmara escura.

Ao finalizar o terceiro banho, os tecidos devem ser lavados novamente em solução de PBS (três banhos de três minutos cada).

Recuperação antigênica

A fixação de tecido é extremamente importante, pois é um processo que impede com que os tecidos se deteriore, além de permitir a preservação da morfologia do mesmo.

Dentre os diversos tipos de fixadores para tecidos, o paraformaldeído é o mais popular, em grande parte pelo baixo custo, fácil preparação e porque preserva os detalhes morfológicos com poucos artefatos.

Entretanto, ele pode causar problemas na antigenicidade do tecido, resultando em pouca imunorreatividade por mascarar e danificar muitos

epítomos, fazendo com que a ligação antígeno-anticorpo não ocorra perfeitamente.

Por essa razão, uma etapa de extrema importância da imuno-histoquímica é o método de recuperação antigênica, que visa expor epítomos do tecido e favorecer a ligação antígeno-anticorpo.

Recuperação antigênica através da digestão proteolítica

Nesta fase, utiliza-se a enzima Proteinase K (armazenada sob refrigeração a 4 °C) diluída a uma concentração de 1:800 (sendo 1 µL de enzima Proteinase K e 800 µL de solução PBS).

Neste processo, devem ser retiradas todas as lâminas do carrinho/berço, movimentando-as delicadamente a fim de desprezar todo o excesso de solução PBS. Em seguida, elas devem ser dispostas em bandejas para incubação de imuno-histoquímica, e a Proteinase K, diluída anteriormente, deverá ser colocada individualmente sobre cada fragmento de tecido, permanecendo por 20 minutos.

Recuperação antigênica através do calor

Nesta etapa, deve ser realizada a diluição do citrato (armazenado na geladeira a 4 °C) a 10%. Por exemplo: uma cuba de 400 ml requer 40 ml de citrato concentrado e 360 ml de água destilada.

Em seguida, as lâminas são dispostas nas cubas preenchidas por citrato aquecido, permanecendo por 40 minutos.

Incubação do anticorpo primário

Bloqueio de reações inespecíficas

Nesta etapa, o leite em pó deve ser diluído a 5%, sendo o padrão utilizado para 400 ml de solução: 20 g de leite Molico em pó + 400 ml de solução PBS + 1% de Triton X - 100 (4 ml).

O emprego desta solução tem como objetivo bloquear reações inespecíficas, melhorando o resultado das marcações.

Diluição do anticorpo primário

Cada anticorpo é específico para o protocolo e para o estudo proteico específico, bem como sua diluição. Nesta fase, o leite é o diluente, substituindo a solução PBS.

Neste estudo os anticorpos empregados foram: anti-MBP, anti-NF e anti-GFAP.

Incubação dos tecidos

Após passar uma hora na solução de leite, as lâminas começam a ser preparadas para a incubação, seguindo o passo a passo abaixo:

- Retirar uma lâmina por vez com o auxílio de uma pinça e secar ao redor do tecido e atrás da lâmina com gaze ou papel absorvente;
- Riscar com a caneta hidrofóbica ao redor do tecido;
- Colocar na bandeja para incubação de imuno-histoquímica;
- Pingar o anticorpo primário no tecido;
- Armazenar na geladeira a 4 °C durante a noite - este processo deve ser realizado em câmara úmida. Nas próprias bandejas há espaço entre as lâminas e a base onde se coloca água e algodão, ou gaze, para manter as lâminas úmidas durante o processo;
- Finalização do primeiro dia da imuno-histoquímica.

Segundo dia da imuno-histoquímica

Dando continuidade ao protocolo iniciado no dia anterior, as bandejas, refrigeradas a 4 °C, deverão ser retiradas e as lâminas depositadas em uma cuba com solução PBS. A seguir, serão lavadas com a mesma solução três vezes por três minutos cada.

Incubação do anticorpo secundário

- Após a lavagem com solução PBS, retirar as lâminas uma por vez, excluindo o excesso, e colocá-las nas bandejas de incubação;
- Pingar o anticorpo secundário;
- Incubar em câmara úmida na estufa a 37 °C por uma hora.

Diluição do anticorpo secundário

Deve ser verificado qual anticorpo será utilizado no processo para cada fragmento de tecido analisado.

Incubação do anticorpo terciário complexo abc

- Retirar da estufa as bandejas de incubação;
- Retirar as lâminas das bandejas;
- Colocar nos carrinhos/ berços nas cubas com solução PBS;
- Lavar três vezes, sendo que cada lavagem tenha duração de três minutos;
- Retirar novamente lâmina por lâmina, removendo o excesso de solução PBS;
- Colocar nas bandejas de incubação;
- Pingar o Complexo ABC ou ABC elite;
- Manter durante uma hora em estufa a 37 °C.

Incubação do cromógeno dab

Diluição do cromógeno DAB

Para cada 5 µL de solução PBS, utilizam-se: duas gotas de solução tampão (homogeneizar), quatro gotas de cromógeno (homogeneizar) e duas gotas de peróxido de hidrogênio (homogeneizar).

Para esta etapa, é preciso:

- Retirar as bandejas de incubação da estufa a 37 °C;
- Retirar as lâminas e colocar nos carrinhos/ berços nas cubas com solução PBS;
- Lavar três vezes durante minutos cada;
- Retirar apenas o caso controle do carrinho/ berço e colocá-lo na bandeja de incubação;
- Pingar o cromógeno DAB no tecido e deixar agir por nove minutos;
- Ligar o microscópio;
- Retirar a lâmina e passar pela solução PBS para remover excesso de DAB;
- Colocar no microscópio, ajustar a objetiva 10X e verificar se ocorreram as marcações;
- Em caso de marcação positiva, continuar o processo de incubação com o DAB com o restante das lâminas.

Contra-coloração com hematoxilina

- Durante o processo do item anterior, deve-se filtrar a hematoxilina com um papel filtro, funil e *erlenmeyer*, e despejá-la filtrada na mesma cuba;
- Após os cinco minutos em água corrente, colocar na cuba com hematoxilina e deixar por 15 minutos;
- Retirar da hematoxilina e remover possíveis excessos da coloração;
- Lavar em água corrente por cinco minutos;
- Enquanto isso, preparar a água amoniacal 1%: para um carrinho de 500 ml, usa-se a proporção de 495 ml de água destilada + 1 ml de amônia;
- Após retirar da água corrente, deixar por um minuto na água amoniacal;
- Retirar da água amoniacal e lavar por cinco minutos em água corrente.

Desidratação e diafanização dos tecidos

- Após lavagem em água corrente, retirar e passar pelo álcool 70% durante um minuto;
- Retirar do álcool 70% e manter por um minuto no álcool 95%;
- Retirar do álcool 95% e deixar por um minuto no álcool 100%;
- Deixar no xilol até o momento da montagem.

Montagem das lâminas

- Retirar a lâmina com o auxílio da pinça;
- Retirar uma lamínula e pingar resina sintética;
- Colocar sobre o tecido;
- Limpar com uma gaze excessos de resina e verificar a presença de bolhas no tecido;
- Colocar em bandejas de madeira e esperar a secagem por aproximadamente dois dias;
- Etiquetá-las com número de identificação (NSVO), anticorpo, diluição e data de saída da imuno-histoquímica.

**ANEXO G – Artigo “DTI measures in white matter hyperintensities from
in situ post-mortem human subjects”**

Title: DTI measures in white matter hyperintensities from *in situ post-mortem* human subjects

(Running Title: DTI WMH *in situ post-mortem*)

Authors: SILVA, R.E.^{1,2}; SANTOS, G.A.B.^{3, 4}; ALHO, A.T.D.L.^{3,4}; NEVES, R.C.⁴; CARREIRA, L.L.⁴; SGOBIN L. M.⁴; GRINBERG, L.T.^{4,5}; HEINSEN, H.²; AMARO JR E¹.

Authors affiliations:

¹ Departamento de Radiologia, Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil;

² Morphological Brain Research Unit, Universität Würzburg, - Würzburg, Germany;

³ Hospital Israelita Albert Einstein, São Paulo, SP, Brazil, Instituto do Cérebro;

⁴ Human Brain Bank of the Study Group on Brain Aging, Faculdade de Medicina da University of Sao Paulo, Sao Paulo, Brasil;

⁵ Memory and Aging Center - UCSF - San Francisco, USA.

Abstract

T2-weighted white matter hyperintensities (WMH) areas are frequent findings in clinical Magnetic Resonance Images (MRI) exams of the adult and elderly population. Their neuropathological correlate is non-specific: usually reported as possible site of gliosis, small lacunar infarcts, demyelinated areas or perivascular space. Diffusion Tensor Imaging (DTI) is a relatively new MRI technique used to investigate various aspects of the white matter in the brain, allowing for non-invasive quantitative information at a level non detectable by conventional MR images. Most literature on the nature of DTI alterations in WMH have been based on animal models or formalin-fixated human brain samples - both methods have limitations when compared to clinical MR data. In this study we used an experimental setup not limited by tissue deformation or MR signal alterations due to the fixation process in order to evaluate two parameters obtained from DTI: Fractional Anisotropy - FA; and Apparent Diffusion Coefficient – ADC. We analyzed 160 regions of interest defined on FLAIR images in WMH and NAWM from two groups of participants: one group

consisted of *in situ post-mortem* (PM) brain MRI data from 24 subjects (12 males; mean age: 67.2 ± 14.7 years; average *post-mortem* interval - PMI: 14.35 ± 2.26 hours) in which 83 WMH, and homologous 83 normal appearing white matter (NAWM) regions were identified. The second group consisted of data from ten healthy volunteers (5 males; mean age 46.3 ± 17.96 years) *in vivo* (IV) from which 21 WMH and 33 NAWM regions were analyzed. Both to *in vivo* and *post-mortem* MR data were acquired in the same 3.0T MR system. The results showed that the mean FA in PM group at WMH was 26.75% lower than in NAWM (0.34 ± 0.07 vs 0.47 ± 0.06 , respectively; $p < 0.001$). Mean FA in WMH was also reduced (by 18.60%) compared to NAWM (0.35 ± 0.04 vs 0.43 ± 0.04 ; $p < 0.02$) in the IV group. Mean ADC was not different in WMH ($1.30 \pm 0.32 \times 10^{-3} \text{mm}^2/\text{s}$) compared to NAWM ($1.21 \pm 0.30 \times 10^{-3} \text{mm}^2/\text{s}$) in the PM group or in the IV group ($0.670 \pm 0.08 \times 10^{-3} \text{mm}^2/\text{s}$ vs $0.593 \pm 0.04 \times 10^{-3} \text{mm}^2/\text{s}$). Only ADC values at both WMH and NAWM differed when comparing between PM and IV groups, showing increased values in the latter. In conjunction, our data showed that intra-group comparison between WMH and NAWM allowed similar results (for FA and ADC values) in both *in situ post-mortem* and *in vivo* groups. We believe that *in situ post-mortem* DTI can be used to better understand the structural changes in WMH brain tissue without interference from tissue fixation. Moreover, higher ADC observed at WMH and NAWM in *in situ post-mortem* data suggest that even under a short *post-mortem* interval, structural characteristics of brain tissue could be detected – and these effects seemed to affect FA only to a lesser degree (here not statistically significant).

Keywords:

MRI; White Matter Hyperintensities; Diffusion Tensor Imaging; *post-mortem*.

Introduction

Methods that allow precise investigation of histological correlations of T2-weighted white matter hyperintensities (WMH) in magnetic resonance images (MRI) are still in development. These areas, also regarded as UBOs' ("Unidentified Bright Objects") are common in MRI: frequently observed on healthy adults, reaching 94% of the elderly population and often described in medical reports as nonspecific findings 1–3. Although several studies addressed this topic, there is no categorical definition of the etiology of these areas solely based on MR characteristics 4,5. Nevertheless, WMH incidence have important statistical association with clinical conditions, such as migraine, diabetes, cerebral ischemia 1,6,7. Previous studies have shown WMH histological correlations including demyelination, metastases, gliosis and perivascular space increase 5,8–10. Although, WMH is related to cardiovascular disease and hypertension, its etiology is not exactly known 4,6,11,12.

These areas appear as regions of approximate 5mm in diameter, with rounded shapes, and hyperintense on T2-weighted MRI. The long T2 decay time indicates a localized increase in the content of hydrogen ions, most likely in water molecules. Structurally, WMH tissue substrates have been associated to decreased endothelial integrity, axonal regional degradations, such as loss of myelinated fibers, degradation of myelin sheaths and micro-vascular changes 2,5,10,13.

Some authors associate the incidence of WMH to functional and cognitive changes. This hypothesis is presented with the correlation of these findings and signs of memory decline, intelligence and autonomy, as well as psychiatric disorders such as depression 14–17. However, there are no evidences establishing a direct relationship between WMH and neuropsychological performance at individual level.

At the moment, there is no evidence of an MR parameter showing specificity regarding the histological correlates of WMH. However, most scientific publications on MR-histology correlations are based on images acquired from animal brains, or human fixated brain specimens 18–21. The authors of these reports frequently mention limitations from species differences or tissue fixation artifacts (both in spatial distortion and MR tissue signal changes). Considerable signal abnormalities are described in gray and white matter MR brain images from fixated specimens (in general consisting of increased T1 and T2 relaxation times). These changes are most likely related to the chemicals used in the fixation processes, leading to change the

water tissue content and proton density at tissue, and consequently alteration of the MR image signal 22–25. Spatial distortions are also considerable due to fixation-induced brain swelling/shrinkage and can impair immuno-histochemistry and stereological precise correlation protocols.

An alternative approach to the above mentioned limitation is to acquire MRI from *intra cranial* brain specimens in a short *post-mortem* interval. Although temperature and perfusion parameters do not emulate the conditions observed at *in vivo* subjects, MRI signal on T1 and T2-weighted images and spatial characteristics are remarkably comparable 10.

We believe that *in situ post-mortem* data could improve understanding the histological properties of MRI signal in normal and diseased areas of human brain. In particular, the corresponding neuropathological alterations of areas detected by modern (non-classical) quantitative MR techniques currently used in the clinical setting could benefit from such approach.

One of the relatively new MR quantitative techniques is Diffusion Tensor Images (DTI), mainly used to investigate the properties of the white matter in the brain. DTI basic properties have been extensively described and reviewed in the literature 23,26–32. In short, DTI is based on patterns of molecular Brownian movement from water at biological tissues 27,33–35. This property allows indirect evaluation of microscopic characteristics related to the direction of the white matter fibers, cell membranes, myelin, cytoskeleton and spatial arrangement of axons. With DTI it is possible to infer, in each voxel, properties such as the fractional anisotropy (FA) and apparent diffusion coefficient (ADC). FA indicates how directional is the diffusion in each voxel. Cell membranes and white matter tracts are one of the factors modulating this parameter, with values ranging from 0 (corresponding to fully isotropic diffusion) to 1.0 (indicating a completely anisotropic diffusion, i.e., the water molecules only would diffuse in a single direction). ADC indicates the magnitude of the diffusivity of water in the tissue, related to overall molecular movement. Its value is reduced in the presence of spatial restrictions, such as viscosity and structural barriers 18,29,36,37 presents at extra-cellular, cellular and intra-cellular levels.

DTI histological correlates in human brain are not fully determined (or at least, only partially determined) in most clinical conditions – except, perhaps, for acute ischemia 19,26,38. This technique, however, has characteristics that can potentially improve significantly the accuracy of the images in relation to different

changes detected in WMH 1,10. Recent studies of white matter brain imaging techniques based on DTI showed promising results towards a better understanding of WMH etiology 35,39–43. In most reports, this ability was due to its sensitivity to white matter organization, mainly related to myelin content and tissue spatial orientation. Reports using *post-mortem* formalin fixated brain specimens showed that DTI parameters are altered in WMH and are correlated to gliosis in Alzheimer's disease as well as in previously healthy controls 44. Even considering the relevance of this finding, the authors mention limitations of their method due to MR signal changes induced by the fixations process. Likewise, Gouw *et al* reviewed the literature on histological-MRI correlations and showed that WMH were related to different levels of severity, as well as etiology in WMH in histology reports 44. They conclude that, in general, *post-mortem* studies showed that WMH are also heterogeneous in terms of histopathology. In this scenario, DTI data seems to be one of the best tools in terms of sensitivity to possible molecular changes in different histopathology entities.

In this paper we aimed at describing the quantifiable properties diffusion tensor Images (FA and ADC) at WMH areas found *in situ post-mortem* specimens. Our hypothesis is that the properties of WMH would be different from normal appearing white matter (NAWM) in the DTI images in *post-mortem*, and that such differences would be similar to *in vivo* data acquired in the same 3.0T MR system. In parallel, we investigated differences between *in situ post-mortem* and *in vivo* data in order to evaluate the applicability of the results in clinical settings.

Methods

All subjects were recruited by the Human Brain Bank of the Study Group on Brain Aging, located at Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo. Following the standardized protocols of this bank, all donated brains had an informed consent signed by a legal guardian 45. This study was approved by Ethics Committee (CAPPesq - HCFMUSP) under numbers 285/04 and 1199/09.

We analyzed MR *post-mortem* images from 24 subjects (12 males; mean age: 67.2±14.7 years) with no previous history of neurological impairment. These images were compared to *in vivo* MR images from 10 healthy volunteers (5 males;

mean age: 46.3±18.0 years) that gave their written informed consent to participate on this study. Demographics from the participants are depicted in Table 1.

[Insert Table 1 about here]

All data in this study was acquired in a 3.0T MR system installed at the Institute of Radiology, University of São Paulo (Intera Achieva, Philips Medical Systems, Netherlands; 80 mT/m, 100mT/s rise time gradients; eight channel head coil). In the PM group the images are acquired with the brain *in situ*, on a shortest viable *post-mortem* interval mean interval: 14.4±2.3 hours. The corpses was laid on supine position, with arms at beside body and legs straight. No surgical procedure or manipulation was performed in the corpses before the MR examination. The temperature in the MRI exam room was kept within 20.0°± 2 °C during all image data acquisition period.

All participants underwent to the same protocol, including the acquisition of the two datasets used in the analysis presented here: a) FLAIR: AC-PC oriented PC orientated oblique axial slices, TR = 9686.7 ms, TI = 2800 ms, TE = 130 ms, 0.65 mm x 0,87 mm in-plane voxel size, 1 NEX, 3 mm / 0.3 mm slice thickness/gap, FOV = 230 mm x 183 mm; b) DTI: axial oblique slices, TR = 23,650 ms, TE = 65 ms, 2/0, 0 mm slice thickness/gap; b value= 3000, FOV = 256 mm x 256 mm, 2.0 mm x 2.0 mm in-plane voxel size, 2 NEX; 32 directions, SENSE = 2. Data acquisition also included other MR acquisitions, to be presented elsewhere: 3D T1-weighted structural, proton density magnetization transfer, and 2D T2* and T2-wieghted and multi-echo (R2) images with whole brain coverage.

All images underwent visual assessment for pathological changes, MR signal, image noise and contrast by an experienced neuroradiologist (board-certified with 15 years of professional practice) that considered them appropriate for the proposed analysis. Areas with diffuse higher signal intensity near 3mm from the borders of ventricles or associated to tissue loss were excluded from WMH analysis and no areas of suspect bleeding (based on T2* and DTI B0 images) or CSF alterations were included.

Region-of-interest (ROI) were traced in FLAIR-weighted images by a single observer and were checked by the same neuroradiology. We did not include areas with deposits of hemosiderin, or areas located in subependymal white matter, adjacent to basal ganglia or to vessels. The procedure was conducted using the

oval-shaped tool from the software package ImageJ (version 1.45s - <http://info.nih.gov>). The limits of each ROIs were included inside the boundaries of the WMH regions in order to reduce partial volume sampling effects. Subsequently, the NAWM ROI was positioned manually placing ROIs in the contralateral homologous anatomical areas in the same slice, maintaining the same shape and area of the original WMH ROI as illustrated in Figure 1.

[Insert Figure 1 about here]

The DTI processing was made using the FSL analysis platform v. 5.0.2 (Oxford Centre for Functional Magnetic Resonance Imaging of the Brain, Oxford University, Oxford, UK). The steps included in the pre-processing were: correction of eddy-current-induced distortions, slice realignment and brain segmentation. FA and ADC maps were generated using the conventional mathematical definitions described in the literature 38,46. No spatial transformation to any template was adopted in this paper. Figure 2 shows an example of FA and ADC map from *post-mortem* subject.

[Insert Figure 2 about here]

The FA and ADC maps were spatially registered with FLAIR sequences of each case as described by our group (10). In brief, we use an automated linear registration approach, with minimal user interference, from FSL platform. This method uses interpolation to transport an image from one space coordinate to another, using a cost function that attempts to minimize the dissimilarity between images. FA and ADC values of each WMH and NAWM areas were assessed transposing the delimited white matter ROIs from FLAIR images to both maps under visual inspection to avoid sampling areas with imaging artifacts. Group and Lesion mean differences were compared using non-parametric (Mann-Whitney) test. Results were considered statistically significant at $\alpha < 5\%$.

Results

The average FA of *post-mortem* subjects was 0.34 ± 0.05 at WMH and 0.47 ± 0.06 at NAWM, corresponding to a 26.75% reduction of FA in WMH ($p < 0.001$) depicted in figure 3. On the other hand, average ADC from *post-mortem* subjects were $1.300 \pm 0.32 \times 10^{-3} \text{mm}^2/\text{s}$ at WMH regions and $1.120 \pm 0.30 \times 10^{-3} \text{mm}^2/\text{s}$ in NAWM areas. The 6.89% apparent increase in ADC of WMH did not reached statistical significance (Figure 4).

[Insert Figure 3 about here]

The analysis of the parameters in the *in vivo* reference subjects had similar results. The average FA values was 0.35 ± 0.04 in WMH and 0.43 ± 0.04 in NAWM areas, a difference of 18.60% ($p < 0.05$) depicted in figure 3. Average ADC values from *in vivo* reference subjects were $0.675 \pm 0.03 \times 10^{-3} \text{mm}^2/\text{s}$ in WMH and $0.593 \pm 0.04 \times 10^{-3} \text{mm}^2/\text{s}$ at NAWM areas, representing a 12.51% difference that did not reached statistical significance (Figure 4).

[Insert Figure 4 about here]

The NAWM FA was 6.16% higher in *post-mortem* (0.47 ± 0.06) than *in vivo* subjects (0.43 ± 0.04), but this difference did not reached statistical significance. Similarly, although nominally the WMH FA values were 5.40% lower in *post-mortem* (0.34 ± 0.04) than *in vivo* values (0.35 ± 0.04), this difference did not reached statistical significance (Figure 3).

On the other hand PM and IV groups had different ADC values in NAWM and WMH. ADC values were increased at *post-mortem* ($1.210 \pm 0.30 \times 10^{-3} \text{mm}^2/\text{s}$) compared to *in vivo* ($0.593 \pm 0.03 \times 10^{-3} \text{mm}^2/\text{s}$; $p < 0.001$) in NAWM and WMH ($1.300 \pm 0.32 \times 10^{-3} \text{mm}^2/\text{s}$ vs $0.593 \pm 0.04 \times 10^{-3} \text{mm}^2/\text{s}$, respectively; $p < 0.001$). The difference reached 50,99% in NAWM and 51.84% at WMH (Figure 4).

Table 2 summarizes the mean FA and ADC values at WMH and NAWM areas from *post-mortem* and *in vivo* subjects. The descriptive statistical analyses from *post-mortem* subjects are shown at Table 3.

[Insert Tables 2 and 3 about here]

Discussion

Our results have demonstrated similar intra-group differences in quantitative DTI data between WMH and NAWM areas obtained from *in situ post-mortem* and *in vivo*. On the other hand, the absolute value of ADC parameter was increased in *post-mortem* compared to *in vivo*, but the FA value was not significantly different. Not only that, ADC and FA values from *post-mortem* in NAWM were also different to the values previously measured in NAWM *in vivo* described by literature 20,45–49.

In order to better compare our data with the literature, we present the average values of FA and ADC depicted in our current study, and data from previous work using *in vivo* subjects (tables 3 and 4, respectively). As can be noted, the values of ADC and FA have quite a large range. Most authors explain the variability listing factors such as difference in image acquisition, sampling ROI methods and other technical differences. In fact, when analyzing the ROI areas in similar location of apparent normal white matter the results tend to be less variable. Data from white matter DTI in healthy human brains are notably known to vary according to anatomy of tracts and structural properties of the tissue 4 20,45–49. In our study, in order to maintain the focus in the comparison between homologous regions of WM (with and without WMH), we did not systematically sample different anatomical parts. Nevertheless, most of the ROIs selected in our analysis were located closer to the cortical mantle (subcortical WMH).

[Insert Table 4 about here]

The absolute FA values obtained from normal white matter in our study were apparently lower than those reported previously in the literature 20,45–49. Considering our experimental setup, this result suggests that even in relatively reduced *post-mortem* interval, fractional anisotropy value tends to decline. Although technical differences play a role, FA decrease suggests that even a scenario where image acquisition is made under the lowest possible *post-mortem* interval, it is still likely that factors related to autolysis and other tissues changes should be considered – at least in part - as potential FA modulators.

We initially believed that the *in situ post-mortem* specimens would have reduced FA since microstructural organized restrictions to water mobility would be reduced as the tissue loses its characteristics in the necrosis. But, contrary to initial our expectations, when directly comparing our *post-mortem* to *in vivo* data FA obtained at normal white matter from *post-mortem* subjects was 18.6% higher. In previous publications using fixated human brain tissue have shown FA values around 0.69 (44). In these studies the fixation process (10% formalin) is known to alter the white matter, which could explain the differences. In fact, both T1 and T2 relaxation measures are not only prolonged, but the nature of the signal may not be directly associated to the biological tissue, as the amount of external protons due the chemicals in the fixation process also contribute to the signal. One possible explanation for this unexpected result may be head movement artifacts in the data from *in vivo* group. A more thorough analysis involving different NAWM regions may help clarifying this point.

We could confirm our initial hypothesis regarding ADC data: as expected, higher ADC values were found *in situ post-mortem* subjects compared to our *in vivo* data (as well as those ADC values reported in the literature). This characteristic may be related to decreased body temperature (mostly) but also due to changes in histological integrity, as *post-mortem* brain tissue necrosis process is installed in minutes after perfusion cessation 38,47–51. Once more, our results suggest that, even with relatively reduced *post-mortem* range, the DTI characteristics of brain tissue may undergo changes compared with *in vivo*.

Although some authors believe that myelin integrity plays a major role to determine FA and ADC values, there is no unequivocal relationship between these two parameters and a specific biologic variable. Factors other than myelin integrity could define the FA and ADC values of a tissue, especially if the particular area under analysis has been involved in microstructural changes due to vascular injury – one, if not the most, common cause of WMH. Other studies demonstrated that anisotropy measurements in white matter hyperintensities tissue suffer slight changes related to demyelinating diseases. Interesting enough, such alterations are in the same direction as the observed in WMH in the *in situ post-mortem* data: reduced FA and increased ADC parameters. Since the *in situ* material can be maintained for fixation and future histological analysis, each WMH lesion can be further characterized using not only classic microscopic analysis, but also quantification and immunochemistry methods 10.

Factors such as voxel volume, composition of the extracellular matrix and axonal diameter should also be considered when analyzing the relationship between DTI parameters and myelin integrity. The tissue autolysis – defined by a process, which consists of a cellular auto degeneration process resulting from the action of their autogenous enzymes that causes serious degradation tissue during the first 24 hours after death – and edema may be more involved in the source of WMH than other factors influencing myelin turnover 19,52.

At *post-mortem* tissue, water content increase, in edema form, also interferes with the parameters related to anisotropy FA/ADC, and this factor must be considered. Edema is not directly related to the integrity of myelin and axons, but the proportion of water in the tissues may change the signal intensity values measured in each ROI 16,19,25.

The current literature shows a majority of studies investigating *post-mortem* changes of MR signal performed with the help of animal models. In these models, it is possible to dissect the components of the MR signal. In fact, we recommend the excellent work of D'Arceuil, Smolinski, Hukkanen & Roytta, and Dyrby 53–56 as a reference on structural changes observed in *post-mortem* brains. On the other hand, these results are not directly comparable to human values.

In summary, among other factors that may influence the DTI parameters are: the tissue autolysis, which consists of a cellular auto degeneration process resulting from the action of their autogenous enzymes that causes serious degradation tissue during the first 24 hours after death. 9,10.

The differences observed between the FA and ADC values measured *post-mortem* may also be related to reduction of body temperature and molecular mobility change at image acquisition time. The values obtained in this study are in line with previous observations, which the reduction of body temperature, associated with tissue dehydration and standstill of cellular ion transport mechanisms inhibit the maintenance of *post-mortem* tissue diffusivity 57,58.

Changes in diffusion tissue properties were also analyzed by a direct comparison between pre and *post-mortem* data from the same subject. On the other hand, the DTI values in cats showed significant changes in ADC up to 10% at an interval of 3 minutes and up to 50% at an interval of 15 minutes. Similar results were demonstrated in rodents 21,59–61.

The lack of studies on aspects of human *post-mortem* DTI is evident. Nevertheless *post-mortem* studies are of great importance, since this method can provide a histological verification of the findings encountered in living humans.

Conclusion

The areas of signal abnormality in white matter showed higher values of ADC and lower FA values than those in areas apparently normal in *post-mortem* brains. These findings are similar to the differences found *in vivo* when performing the same comparison. The results are in accordance with previous data in the literature and are consistent with structural changes. Moreover, similar were also found when compared to values previously measured in healthy areas of *in vivo* white matter. The natures of those differences are not yet fully understood.

The proposed platform can be used to investigate the nature of WMH by combining MR images *in situ* with immunohistochemistry analysis of histological sections of these same brains, without interference from tissue fixation artifacts in the MR images. This platform represents another step to bridge the gap between DTI data obtained from *post-mortem fixated* tissue and clinical data. The results presented show evidences that *in situ post-mortem* DTI findings could be extended translated to clinical routine. Finally, we postulate that characterization of DTI parameters in the areas of WMH could help of strategies adopted in diagnosis and treatment in specific groups of patients.

9 REFERÊNCIAS

1. Heinsen H, Henn R, Eisenmenger W, Götz M, Bohl J, Bethke B, *et al.* Quantitative investigations on the human entorhinal area: left-right asymmetry and age-related changes. *Anat Embryol (Berl)*. 1994;190(2):181–94.
2. Marstrand JR, Garde E, Rostrup E, Ring P, Rosenbaum S, Mortensen EL, *et al.* Cerebral perfusion and cerebrovascular reactivity are reduced in white matter hyperintensities. *Stroke: A Journal of Cerebral Circulation*. 2002 p. 972–6.
3. O’Sullivan M, Jones DK, Summers PE, Morris RG, Williams SC, Markus HS. Evidence for cortical “disconnection” as a mechanism of age-related cognitive decline. *Neurology*. AAN Enterprises; 2001;57(4):632–8.
4. Liao D, Cooper L, Cai *Et Al* J. Presence and severity of cerebral white matter lesions and hypertension, its treatment, and its control. *Stroke*. 1996;27:2262–70.
5. Schmierer K, Scaravilli F, Altmann, Barker G, Miller D. Magnetization transfer ratio and myelin in postmortem multiple sclerosis brain. *Ann Neurol*. WILEY-LISS; 2004;56(3):407–15.

6. Pantoni L, Garcia JH. The significance of cerebral white matter abnormalities 100 years after Binswanger's report. A review. *Stroke A J Cereb Circ. Am Heart Assoc*; 1995;26(7):1293–301.
7. Pico F, Dufouil C, Lévy C, Besançon V, De Kersaint-Gilly A, Bonithon-Kopp C, *et al.* Longitudinal study of blood pressure and white matter hyperintensities: the EVA MRI Cohort. *Cerebrovasc Dis Basel Switz*. 2002;56(2):921–6.
8. Hoth KF, Tate DF, Poppas A, Forman DE, Gunstad J, Moser DJ, *et al.* Endothelial function and white matter hyperintensities in older adults with cardiovascular disease. *Stroke A J Cereb Circ*. 2007;38(2):308–12.
9. Ferri CP, Prince M, Brayne C, Brodaty H, Fratiglioni L, Ganguli M, *et al.* Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. *Lancet. Lancet*; 2005;366(9503):2112–7.
10. Herrera E, Caramelli P, Silveira ASB, Nitrini R. Epidemiologic survey of dementia in a community-dwelling Brazilian population. *Alzheimer Dis Assoc Disord*. 2002;16(2):103–8.
11. Haug H. Brain sizes, surfaces, and neuronal sizes of the cortex cerebri: a stereological investigation of man and his variability and a comparison with some mammals (primates, whales, marsupials, insectivores, and one elephant). *Am J Anat*. 1987;180(2):126–42.

12. Simic G, Bexheti S, Kelovic Z, Kos M, Grbic K, Hof PR, *et al.* Hemispheric asymmetry, modular variability and age-related changes in the human entorhinal cortex. *Neuroscience*. 2005;130(4):911–25.
13. West MJ. New stereological methods for counting neurons. *Neurobiol Aging*. 1993;14(4):275–85.
14. Pakkenberg B, Boesen J, Albeck M, Gjerris F. Unbiased and efficient estimation of total ventricular volume of the brain obtained from CT-scans by a stereological method. *Neuroradiology*. 1989;31(5):413–7.
15. Joaquim E, Alho L, Grinberg L. Chapter Number Review of Printed and Electronic Stereotactic Atlases of the Human Brain. 2009;1–30.
16. Grinberg LT, Heinsen H. Toward a pathological definition of vascular dementia. *J Neurol Sci*. Elsevier B.V.; 2010 Dec 15;299(1-2):136–8.
17. Ewers M, Frisoni GB, Teipel SJ, Grinberg LT, Amaro E, Heinsen H, *et al.* Staging Alzheimer's disease progression with multimodality neuroimaging. *Prog Neurobiol*. Elsevier Ltd; 2011 Jun 22;1–12.
18. Gunning-dixon FM, Brickman AM, Cheng JC, Alexopoulos GS. Aging of cerebral white matter: a review of MRI findings. *Vascular*. 2009;(April 2008):109–17.
19. DeCarli C, Fletcher E, Ramey V, Harvey D, Jagust WJ. Anatomical mapping of white matter hyperintensities (WMH): exploring the

relationships between periventricular WMH, deep WMH, and total WMH burden. *Stroke A J Cereb Circ.* 2005;36(1):50–5.

20. Sachdev P, Wen W, Chen X, Brodaty H. Progression of white matter hyperintensities in elderly individuals over 3 years. *Neurology.* 2007;68(3):214–22.
21. Sachdev P, Chen X, Wen W. White matter hyperintensities in mid-adult life. *Curr Opin Psychiatry.* 2008;21(3):268–74.
22. Gunning-Dixon FM, Raz N. The cognitive correlates of white matter abnormalities in normal aging: a quantitative review. *Neuropsychology.* APA AMERICAN PSYCHOLOGICAL ASSOCIATION; 2000;14(2):224–32.
23. Gunning-Dixon FM, Raz N. Neuroanatomical correlates of selected executive functions in middle-aged and older adults: a prospective MRI study. *Neuropsychologia.* 2003;41(14):1929–41.
24. Bartzokis G, Sultzer D, Lu PH, Nuechterlein KH, Mintz J, Cummings JL. Heterogeneous age-related breakdown of white matter structural integrity: implications for cortical “disconnection” in aging and Alzheimer’s disease. *Neurobiology of Aging.* 2004 p. 843–51.
25. Cook IA, Leuchter AF, Morgan ML, Dunkin JJ, Witte E, David S, *et al.* Longitudinal progression of subclinical structural brain disease in

normal aging. *Am J Geriatr psychiatry Off J Am Assoc Geriatr Psychiatry*. 2004;12(2):190–200.

26. Gunning-Dixon FM, Brickman AM, Cheng JC, Alexopoulos GS. Aging of cerebral white matter: a review of MRI findings. *Int J Geriatr Psychiatry*. Wiley Online Library; 2009;24(2):109–17.
27. Raz N. Differential aging of the brain: patterns, cognitive correlates and modifiers. *Neurosci & Biobehav Rev*. 2006 Jan;30(6):730–48.
28. Raz N, Rodrigue KM, Kennedy KM, Acker JD. Vascular health and longitudinal changes in brain and cognition in middle-aged and older adults. *Neuropsychology*. 2007;21(2):149–57.
29. Hess A, Young JZ. The nodes of Ranvier. *Proc R Soc London Ser B Contain Pap a Biol character R Soc Gt Britain*. JSTOR; 1952;140(900):301–20.
30. Catani M, Ffytche DH. The rises and falls of disconnection syndromes. *Brain A J Neurol*. Nature Publishing Group; 2005;128(Pt 10):2224–39.
31. Zhang K, Sejnowski TJ. A universal scaling law between gray matter and white matter of cerebral cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A*. The National Academy of Sciences; 2000;97(10):5621–6.
32. Williams TH, Gluhbegovic N, Jew JY. The human brain: dissections of the real brain. *Vitr Hosp Univ Iowa*. 1997;1–133.

33. Mori S, Zijl PCM Van. Fiber tracking : principles and strategies ± a technical review. 2002;468–80.
34. Mori S, Wakana S, Nagae-Poetscher LM, Van Zijl PCM. MRI Atlas of Human White Matter. Elsevier, editor. American Journal of Neuroradiology. Elsevier; 2005.
35. Spilt A, Goekoop R, Westendorp RGJ, Blauw GJ, De Craen AJM, Van Buchem MA. Not all age-related white matter hyperintensities are the same: a magnetization transfer imaging study. *Ajnr Am J Neuroradiol*. 2006;27(9):1964–8.
36. Junqué C, Pujol J, Vendrell P, Bruna O, Jódar M, Ribas JC, *et al*. Leuko-araiosis on magnetic resonance imaging and speed of mental processing. *Arch Neurol*. 1990;47(2):151–6.
37. Smith RR, Hendrie HC. Leuko-araiosis: description and clinical correlates. *Compr Ther*. 1992;18(1):7–16.
38. Tarvonen-Schröder S, Röyttä M, Räihä I, Kurki T, Rajala T, Sourander L. Clinical features of leuko-araiosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1996;60(4):431–6.
39. Schmidt R, Petrovic K, Ropele S, Enzinger C, Fazekas F. Progression of leukoaraiosis and cognition. *Stroke*. 2007 Sep;38(9):2619–25.

40. Carmelli D, DeCarli C, Swan GE, Jack LM, Reed T, Wolf PA, *et al.* Evidence for genetic variance in white matter hyperintensity volume in normal elderly male twins. *Stroke A J Cereb Circ.* 1998;29(6):1177–81.
41. DeCarli C, Murphy DG, Tranh M, Grady CL, Haxby J V, Gillette JA, *et al.* The effect of white matter hyperintensity volume on brain structure, cognitive performance, and cerebral metabolism of glucose in 51 healthy adults. *Neurology.* Lippincott Williams & Wilkins; 1995;45(11):2077–84.
42. Madden DJ, Bennett IJ, Song AW. Cerebral white matter integrity and cognitive aging: contributions from diffusion tensor imaging. *Neuropsychol Rev.* Springer; 2009;19(4):415–35.
43. Fazekas F, Kleinert R, Offenbacher H, Schmidt R, Kleinert G, Payer F, *et al.* Pathologic correlates of incidental MRI white matter signal hyperintensities. *Neurology.* AAN Enterprises; 1993;43(9):1683–9.
44. Englund E. Neuropathology of white matter changes in Alzheimer's disease and vascular dementia. *Dement Geriatr Cogn Disord.* 1998;9 Suppl 1:6–12.
45. Decarli C, Fletcher E, Ramey V, Harvey D, Jagust WJ. Anatomical Mapping of White Matter Hyperintensities (WMH). *Stroke.* 2005;36:50–5.

46. Peters A. The effects of normal aging on myelin and nerve fibers: a review. *J Neurocytol.* 2003;31(8-9):581–93.
47. Tang Y, Nyengaard JR, Pakkenberg B, Gundersen HJ. Age-induced white matter changes in the human brain: a stereological investigation. *Neurobiol Aging.* 1997;18(6):609–15.
48. Meier-Ruge W, Ulrich J, Brühlmann M, Meier E. Age-related white matter atrophy in the human brain. *Ann N Y Acad Sci.* 1992;673:260–9.
49. Kemper TL. Neuroanatomical and neuropathological changes during aging and in dementia. In: Albert ML, Knoefel JE, editors. *Clinical neurology of aging.* Oxford University Press; 1994. p. 3–67.
50. Tomimoto H, Lin J, Ihara M, Ohtani R, Matsuo A, Miki Y. Subinsular vascular lesions: an analysis of 119 consecutive autopsied brains. *Eur J Neurol Off J Eur Fed Neurol Soc.* 2007;14(1):95–101.
51. Polman CH, Wolinsky JS, Reingold SC. Multiple sclerosis diagnostic criteria: three years later. *Mult Scler Houndmills Basingstoke Engl.* 2005;11(1):5–12.
52. Wen W, Sachdev PS, Chen X, Anstey K. Gray matter reduction is correlated with white matter hyperintensity volume: a voxel-based morphometric study in a large epidemiological sample. *Neuroimage.* Elsevier B.V.; 2006;29(4):1031–9.

53. Parker GJM. Analysis of MR diffusion weighted images. Br J Radiol. Br Inst Radiology; 2004;77(suppl_2):S176–S185.
54. Kim JH, Budde MD, Liang H-F, Klein RS, Russell JH, Cross AH, *et al.* Detecting axon damage in spinal cord from a mouse model of multiple sclerosis. Neurobiol Dis. 2006;21(3):626–32.
55. Mottershead JP, Schmierer K, Clemence M, Thornton JS, Scaravilli F, Barker GJ, *et al.* High field MRI correlates of myelin content and axonal density in multiple sclerosis--a *post-mortem* study of the spinal cord. J Neurol. DR DIETRICH STEINKOPFF VERLAG; 2003;250(11):1293–301.
56. Jung JS, Bhat R V, Preston GM, Guggino WB, Baraban JM, Agre P. Molecular characterization of an aquaporin cDNA from brain: candidate osmoreceptor and regulator of water balance. Proc Natl Acad Sci U S A. National Acad Sciences; 1994;91(26):13052–6.
57. Ovbiagele B, Saver JL. Cerebral white matter hyperintensities on MRI: Current concepts and therapeutic implications. Cerebrovasc Dis. 2006 Jan;22(2-3):83–90.
58. Zhou F, Shiroishi M, Gong H, Zee C-S. Multiple sclerosis: hyperintense lesions in the brain on T1-weighted MR images assessed by diffusion tensor imaging. J Magn Reson Imaging. 2010;31(4):789–95.

59. Frigeri A, Gropper MA, Umenishi F, Kawashima M, Brown D, Verkman AS. Localization of MIWC and GLIP water channel homologs in neuromuscular, epithelial and glandular tissues. *J Cell Sci.* 1995;108 (Pt 9:2993–3002.
60. Glover GH, Herfkens RJ. Research directions in MR imaging. *Radiology.* 1998. p. 289–95.
61. Hage MCFNS, Iwasaki M. Imagem por ressonância magnética: princípios básicos. *Ciência Rural.* 2009;39(4):1275–83.
62. Amaro Júnior E, Yamashita H. Aspectos básicos de tomografia computadorizada e ressonância magnética. *Rev Bras Psiquiatr.* 2001 May;23:2–3.
63. Saffman PG, Delbruck M. Brownian motion in biological membranes. *PNAS. National Acad Sciences;* 1975;72(8):3111–3.
64. Chaib JPMC, Assis AKT. Experiência de Oersted em sala de aula. *Rev Bras Ensino Física.* 2007;29(1):41–51.
65. Bloch F. Nuclear Induction. *Phys Rev. American Physical Society;* 1946;70(7-8):460–74.
66. Wangsness RK, Bloch F. The Dynamical Theory of Nuclear Induction. *Phys Rev. APS;* 1953;89(4):728–39.

67. Purcell EM, Torrey HC, Pound R V. Resonance Absorption by Nuclear Magnetic Moments in a Solid. *Phys Rev. APS*; 1946;69(1-2):37–8.
68. Ernst RR, Anderson WA. Application of Fourier Transform Spectroscopy to Magnetic Resonance. *Rev Sci Instrum. AIP*; 1966;37(1):93.
69. Hahn EL. Spin Echoes. *Phys Rev. American Physical Society*; 1950;80(4):580–94.
70. Macchia RJ, Termine JE, Buchen CD. Raymond V. Damadian, M.D.: magnetic resonance imaging and the controversy of the 2003 Nobel Prize in Physiology or Medicine. *J Urol*. 2007;178(3 Pt 1):783–5.
71. Laval-Jeantet M, Fischgold H. The history of tomography. *J Radiol Delect Med Nucl*. 1995;78(5):284–8.
72. Mansfield P, Grannell PK. NMR diffraction in solids. *J Phys C Solid State Phys*. 1973;6(22):L422–L426.
73. Mansfield P, Pykett IL, Morris PG, Coupland RE. Human whole body line-scan imaging by NMR. *Br J Radiol*. 1978;51(611):921–2.
74. Holland GN, Hawkes RC, Moore WS. Nuclear magnetic resonance (NMR) tomography of the brain: coronal and sagittal sections. *J Comput Assist Tomogr*. 1980;4(4):429–33.

75. Holland GN, Moore WS, Hawkes RC. NMR neuroradiography. Br J Radiol. 1980;53(627):253–5.
76. Alexander AL, Lee JE, Lazar M, Field AS. Diffusion Tensor Imaging of the Brain. Society. 2007;4(July):316–29.
77. Assaf Y, Pasternak O. Diffusion tensor imaging (DTI)-based white matter mapping in brain research: a review. J Mol Neurosci. 2008 Jan;34(1):51–61.
78. McNab JA, Jbabdi S, Deoni SCL, Douaud G, Behrens TEJ, Miller KL. NeuroImage High resolution diffusion-weighted imaging in fixed human brain using diffusion-weighted steady state free precession. Neuroimage. Elsevier Inc.; 2009;46(3):775–85.
79. Schmierer K, Wheeler-Kingshott C a M, Boulby P a, Scaravilli F, Altmann DR, Barker GJ, *et al.* Diffusion tensor imaging of *post-mortem* multiple sclerosis brain. Neuroimage. 2007 Apr 1;35(2):467–77.
80. Beaulieu C. The basis of anisotropic water diffusion in the nervous system - a technical review. NMR Biomed. Hillview Gardens, London, UK: Heyden \& Son Ltd.; 2002;15(7-8):435–55.
81. Jones DK. Studying connections in the living human brain with diffusion MRI. Cortex. Elsevier Masson; 2008;44(8):936–52.
82. Peled S. New Perspectives on the Sources of White Matter DTI Signal. IEEE Transactions on Medical Imaging 2007 p. 1448–55.

83. Mori S, Crain BJ, Chacko VP, Van Zijl PC. Three-dimensional tracking of axonal projections in the brain by magnetic resonance imaging. *Ann Neurol*. Wiley Online Library; 1999;45(2):265–9.
84. Warach S, Chien D, Li W, Ronthal M, Edelman RR. Fast magnetic resonance diffusion-weighted imaging of acute human stroke. *Neurology*. 1992;42(9):1717–.
85. Jellison BJ, Field AS, Medow J, Lazar M, Salamat MS, Alexander AL. Diffusion tensor imaging of cerebral white matter: a pictorial review of physics, fiber tract anatomy, and tumor imaging patterns. *Ajnr Am J Neuroradiol*. Am Soc Neuroradiology; 2004;25(3):356–69.
86. Mori S, Barker PB. Diffusion magnetic resonance imaging: its principle and applications. *Anat Rec*. 1999;257(3):102–9.
87. Chanraud S, Zahr N, Sullivan E V, Pfefferbaum A. MR diffusion tensor imaging: a window into white matter integrity of the working brain. *Neuropsychol Rev*. 2010;20(2):209–25.
88. Papanikolaou N, Karampekios S, Papadaki E, Malamas M, Maris T, Gourtsoyiannis N. Fractional anisotropy and mean diffusivity measurements on normal human brain: comparison between low-and high-resolution diffusion tensor imaging sequences. *Eur Radiol*. 2006 Jan;16(1):187–92.

89. Mori S, Zhang J. Principles of diffusion tensor imaging and its applications to basic neuroscience research. *Neuron*. Elsevier; 2006;51(5):527–39.
90. Pierpaoli C, Chiro D, Basser J, Trace D. Diffusion Tensor MRI Imaging of the Human Brain. *Radiology*. 1996;201:637–48.
91. Basser PJ, Mattiello J, LeBihan D. MR diffusion tensor spectroscopy and imaging. *Biophys J*. Elsevier; 1994;66(1):259–67.
92. Le Bihan D, Mangin JF, Poupon C, Clark CA, Pappata S, Molko N, *et al*. Diffusion tensor imaging: concepts and applications. *J Magn Reson Imaging*. John Wiley & Sons; 2001;13(4):534–46.
93. Hasegawa H, Ma T, Skach W, Matthay MA, Verkman AS. Molecular cloning of a mercurial-insensitive water channel expressed in selected water-transporting tissues. *J Biol Chem*. 1994;269(8):5497–500.
94. Nielsen S, Nagelhus EA, Amiry-Moghaddam M, Bourque C, Agre P, Ottersen OP. Specialized membrane domains for water transport in glial cells: high-resolution immunogold cytochemistry of aquaporin-4 in rat brain. *J Neurosci*. 1997;17(1):171–80.
95. Venero JL, Vizuite ML, Machado A, Cano J. Aquaporins in the central nervous system. *Prog Neurobiol*. 2001;63(3):321–36.

96. Oohira A, Matsui F, Matsuda M, Shoji R. Developmental change in the glycosaminoglycan composition of the rat brain. *J Neurochem.* 1986;47(2):588–93.
97. Maeda N, Matsui F, Oohira A. A chondroitin sulfate proteoglycan that is developmentally regulated in the cerebellar mossy fiber system. *Dev Biol.* 1992;151(2):564–74.
98. Zhang H, Kelly G, Zerillo C, Jaworski DM, Hockfield S. Expression of a cleaved brain-specific extracellular matrix protein mediates glioma cell invasion *In vivo*. *J Neurosci.* 1998;18(7):2370–6.
99. Brückner G, Hausen D, Härtig W, Drlicek M, Arendt T, Brauer K. Cortical areas abundant in extracellular matrix chondroitin sulphate proteoglycans are less affected by cytoskeletal changes in Alzheimer's disease. *Neuroscience. Elsevier;* 1999;92(3):791–805.
100. Lindahl B, Eriksson L, Spillmann D, Caterson B, Lindahl U. Selective loss of cerebral keratan sulfate in Alzheimer's disease. *J Biol Chem.* 1996;271(29):16991–4.
101. Haas CA, Rauch U, Thon N, Merten T, Deller T. Entorhinal cortex lesion in adult rats induces the expression of the neuronal chondroitin sulfate proteoglycan neurocan in reactive astrocytes. *J Neurosci.* 1999;19(22):9953–63.

102. Barnea G, Grumet M, Milev P, Silvennoinen O, Levy JB, Sap J, *et al.* Receptor tyrosine phosphatase beta is expressed in the form of proteoglycan and binds to the extracellular matrix protein tenascin. *J Biol Chem.* 1994;269(20):14349–52.
103. Bandtlow CE, Zimmermann DR. Proteoglycans in the developing brain: new conceptual insights for old proteins. *Physiol Rev.* 2000;80(4):1267–90.
104. Amunts K, Kedo O, Kindler M, Pieperhoff P, Mohlberg H, Shah NJ, *et al.* Cytoarchitectonic mapping of the human amygdala, hippocampal region and entorhinal cortex: intersubject variability and probability maps. *Anat Embryol (Berl).* Springer; 2005;210(5-6):343–52.
105. Uylings HB, Van Eden CG, Hofman MA. Morphometry of size/volume variables and comparison of their bivariate relations in the nervous system under different conditions. *J Neurosci Methods.* 1986;18(1-2):19–37.
106. Kretschmann HJ, Tafesse U, Herrmann A. Different volume changes of cerebral cortex and white matter during histological preparation. *Microsc Acta.* 1982;86(1):13–24.
107. Grinberg LT, Amaro E, Teipel S, Dos Santos DD, Pasqualucci CA, Leite REP, *et al.* Assessment of factors that confound MRI and neuropathological correlation of human postmortem brain tissue. *Cell Tissue Bank.* 2008;9(3):195–203.

108. Grinberg LT, Amaro Junior E, da Silva AV, da Silva RE, Sato JR, dos Santos DD, *et al.* Improved detection of incipient vascular changes by a biotechnological platform combining *post-mortem* MRI *in situ* with neuropathology. J Neurol Sci. Elsevier B.V.; 2009 Aug 15;283(1-2):2–8.
109. Heinsen H, Arzberger T, 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.
110. Stalling D, Westerhoff M, Hege H. Amira - a Highly Interactive System for Visual Data Analysis. Techniques. 1:1–18.
111. Kahn CE, Carrino JA, Flynn MJ, Peck DJ, Horii SC. DICOM and radiology: past, present, and future. J Am Coll Radiol JACR. 2007;4(9):652–7.
112. Abramoff MD, Magelhaes PJ, Ram SJ. Image Processing with ImageJ. Biophotonics Int. Laurin Publishing; 2004;11(7):36–42.
113. Mori S, Oishi K, Faria A V. White matter atlases based on diffusion tensor imaging. Curr Opin Neurol. 2009;22(4):362–9.

114. Catani M, Howard RJ, Pajevic S, Jones DK. Virtual *in vivo* interactive dissection of white matter fasciculi in the human brain. *Neuroimage*. Elsevier; 2002;17(1):77–94.
115. Kanaan R a, Shergill SS, Barker GJ, Catani M, Ng VW, Howard R, *et al*. Tract-specific anisotropy measurements in diffusion tensor imaging. *Psychiatry Res*. 2006 Jan 30;146(1):73–82.
116. Behrens TEJ, Johansen-Berg H, Woolrich MW, Smith SM, Wheeler-Kingshott C a M, Boulby P a, *et al*. Non-invasive mapping of connections between human thalamus and cortex using diffusion imaging. *Nat Neurosci*. 2003 Jul;6(7):750–7.
117. Jenkinson M, Pechaud M, Smith S. BET2 - MR-Based Estimation of Brain, Skull and Scalp Surfaces. *Elev Annu Meet Organ Hum Brain Mapp*. 2002;17(3):2002–2002.
118. Smith SM. Fast robust automated brain extraction. *Hum Brain Mapp*. Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company; 2002;17(3):143–55.
119. Gouw AA, Seewann A, Flier WM Van Der, Barkhof F, Rozemuller AM, Scheltens P, *et al*. Heterogeneity of small vessel disease : a systematic review of MRI and histopathology correlations. 2011;2.

120. Schmidt R, Schmidt H, Kapeller P, Enzinger C, Ropele S, Saurugg R, *et al.* The natural course of MRI white matter hyperintensities. *J Neurol Sci.* 2002 Nov 15;203-204:253–7.
121. Herrmann LL, Le Masurier M, Ebmeier KP. White matter hyperintensities in late life depression: a systematic review. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2008;79(6):619–24.
122. Young VG, Halliday GM, Kril JJ. Neuropathologic correlates of white matter hyperintensities. *Neurology.* 2008;71(11):804–11.
123. Awad IA, Spetzler RF, Hodak JA, Awad CA, Carey R. Incidental subcortical lesions identified on magnetic resonance imaging in the elderly. I. Correlation with age and cerebrovascular risk factors. *Stroke A J Cereb Circ.* 1986;17(6):1084–9.
124. Yoshita M, Fletcher E, DeCarli C. Current concepts of analysis of cerebral white matter hyperintensities on magnetic resonance imaging. *Top Magn Reson Imaging.* 2005 Dec;16(6):399–407.
125. Schmidt R, Schmidt H, Haybaeck J, Loitfelder M, Weis S, Cavalieri M, *et al.* Heterogeneity in age-related white matter changes. *Acta Neuropathol.* 2011 Aug;122(2):171–85.
126. Yoshita M, Fletcher E, Harvey D, Ortega M, Martinez O, Mungas DM, *et al.* Extent and distribution of white matter hyperintensities in normal aging, MCI, and AD. *Neurology.* 2006;67(12):2192–8.

127. Werring DJ, Frazer DW, Coward LJ, Losseff NA, Watt H, Cipolotti L, *et al.* Cognitive dysfunction in patients with cerebral microbleeds on T2*-weighted gradient-echo MRI. *Brain*. 2004 Oct 1;127(Pt 10):2265–75.
128. Meyer JS, Kawamura J, Terayama Y. White matter lesions in the elderly. *J Neurol Sci*. 1992;110(1-2):1–7.
129. Tamura H, Kurihara N, Machida Y, Nishino A, Shimosegawa E. How does water diffusion in human white matter change following ischemic stroke? *Magn Reson Med Sci*. 2009 Jan;8(3):121–34.
130. Mascalchi M, Filippi M, Floris R, Fonda C, Gasparotti R, Villari N. Diffusion-weighted MR of the brain: methodology and clinical application. *Radiol Med*. 2005;109(3):155–97.
131. Boyko OB, Alston SR, Fuller GN, Hulette CM, Johnson GA, Burger PC. Utility of postmortem magnetic resonance imaging in clinical neuropathology. *Arch Pathol Lab Med*. 1994 Mar;118(3):219–25.
132. Miller KL, Stagg CJ, Douaud G, Jbabdi S, Smith SM, Behrens TEJ, *et al.* Diffusion imaging of whole, *post-mortem* human brains on a clinical MRI scanner. *Neuroimage*. Elsevier Inc.; 2011 Jul 1;57(1):167–81.
133. Shepherd TM, Flint JJ, Thelwall PE, Stanis GJ, Mareci TH, Yachnis AT, *et al.* Postmortem interval alters the water relaxation and diffusion properties of rat nervous tissue--implications for MRI studies of human autopsy samples. *Neuroimage*. Elsevier B.V.; 2009 Feb 1;44(3):820–6.

134. Pfefferbaum A, Sullivan E V, Adalsteinsson E, Garrick T, Harper C. Postmortem MR imaging of formalin-fixed human brain. *Neuroimage*. 2004 Apr;21(4):1585–95.
135. Yang E, Nucifora PG, Melhem ER. Diffusion MR imaging: basic principles. *Neuroimaging Clin N Am*. 2011 Feb;21(1):1–25, vii.
136. Hagmann P, Jonasson L, Maeder P, Thiran J, Wedeen VJ, Meuli R. Understanding Diffusion MR Imaging Techniques: From Scalar Imaging to Diffusion Tensor Imaging and. 2006;205–24.
137. Mukherjee P, McKinstry RC. Diffusion tensor imaging and tractography of human brain development. *Neuroimaging Clin N Am*. Saunders; 2006;16(1):19–43, vii.
138. De Figueiredo EHMSG, Borgonovi AFNG, Doring TM. Basic concepts of MR imaging, diffusion MR imaging, and diffusion tensor imaging. John Wiley Sons I, editor. *Magn Reson Imaging Clin N Am*. Elsevier Ltd; 2011;19(1):1–22.
139. Werring DJ, Clark CA, Barker GJ, Thompson AJ, Miller DH. Exploring white matter microstructure: new insights from diffusion tensor imaging. *Neurology*. AAN Enterprises, Inc.; 2009. p. 1626–32.
140. Le Bihan D, Breton E, Lallemand D, Grenier P, Cabanis E, Laval-Jeantet M. MR imaging of intravoxel incoherent motions: application to

diffusion and perfusion in neurologic disorders. Radiology. Radiological Society of North America; 1986;161(2):401–7.

141. Welsh R. Diffusion tensor imaging of the brain: review of clinical applications. 2004;339–50.
142. Habas C. Basic principles of diffusion tensor MR tractography. J Radiol. 2004;85(3):281–6.
143. Jones DK, Lythgoe D, Horsfield MA, Simmons A, Williams SC, Markus HS. Characterization of white matter damage in ischemic leukoaraiosis with diffusion tensor MRI. Stroke. 1999 Feb;30(2):393–7.
144. Miller KL, McNab JA, Jbabdi S, Douaud G. Diffusion tractography of *post-mortem* human brains: Optimization and comparison of spin echo and steady-state free precession techniques. Neuroimage. Elsevier Inc.; 2012;59(3):2284–97.
145. Salat DH. Imaging small vessel-associated white matter changes in aging. Neuroscience. 2013;
146. Lange RT, Shewchuk JR, Heran MKS, Rauscher A, Jarrett M, Brubacher JR, *et al.* To Exclude or Not To Exclude: Further Examination of the Influence of White Matter Hyperintensities in Diffusion Tensor Imaging Research. J Neurotrauma. Mary Ann Liebert, Inc. 140 Huguenot Street, 3rd Floor New Rochelle, NY 10801 USA; 2013 Nov 8;

147. Murray ME, Vemuri P, Preboske GM, Murphy MC, Schweitzer KJ, Parisi JE, *et al.* A quantitative postmortem MRI design sensitive to white matter hyperintensity differences and their relationship with underlying pathology. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2012 Dec;71(12):1113–22.
148. Gouw AA, Seewann A, Vrenken H, van der Flier WM, Rozemuller JM, Barkhof F, *et al.* Heterogeneity of white matter hyperintensities in Alzheimer's disease: *post-mortem* quantitative MRI and neuropathology. *Brain.* 2008;131(Pt 12):3286–98.
149. Helenius J, Soinne L, Perkio J, Salonen O, Kangasma A, Kaste M, *et al.* Diffusion-Weighted MR Imaging in Normal Human Brains in Various Age Groups. 2002;(February):194–9.
150. Bhagat YA, Beaulieu C. Diffusion Anisotropy in Subcortical White Matter and Cortical Gray Matter : Changes With Aging and the Role of CSF-Suppression. 2004;227:216–27.
151. Iwata NK, Kwan JY, Danielian LE, Butman J a, Tovar-Moll F, Bayat E, *et al.* White matter alterations differ in primary lateral sclerosis and amyotrophic lateral sclerosis. *Brain.* 2011 Sep;134(Pt 9):2642–55.
152. Chaddock-Heyman L, Erickson KI, Voss MW, Powers JP, Knecht AM, Pontifex MB, *et al.* White matter microstructure is associated with cognitive control in children. *Biol Psychol. Elsevier B.V.;* 2013 Sep;94(1):109–15.

153. Borich MR, Mackay a L, Vavasour IM, Rauscher a, Boyd L a. Evaluation of white matter myelin water fraction in chronic stroke. *NeuroImage Clin. The Authors*; 2013 Jan;2:569–80.
154. Arceuil HD, Crespigny A De. The effects of brain tissue decomposition on diffusion tensor imaging and tractography. *Neuroimage*. 2007;36:64–8.
155. D'Arceuil H, de Crespigny A. The effects of brain tissue decomposition on diffusion tensor imaging and tractography. *Neuroimage*. 2007 May 15;36(1):64–8.
156. Von Smolinski D, Leverkoehne I, von Samson-Himmelstjerna G, Gruber AD. Impact of formalin-fixation and paraffin-embedding on the ratio between mRNA copy numbers of differently expressed genes. *Histochem Cell Biol*. 2005 Aug;124(2):177–88.
157. Hukkanen V, Röyttä M. Autolytic changes of human white matter: An electron microscopic and electrophoretic study. *Exp Mol Pathol*. 1987 Feb;46(1):31–9.
158. Dyrby TB, Baaré WFC, Alexander DC, Jelsing J, Garde E, Søgaaard L V. An ex vivo imaging pipeline for producing high-quality and high-resolution diffusion-weighted imaging datasets. *Hum Brain Mapp*. 2011 Apr;32(4):544–63.

159. Ruder TD, Hatch GM, Siegenthaler L, Ampanozi G, Mathier S, Thali MJ, *et al.* The influence of body temperature on image contrast in *post-mortem* MRI. Eur J Radiol. Elsevier Ireland Ltd; 2011 Mar 30;
160. Sun S-W, Liang H-F, Xie M, Oyoyo U, Lee A. Fixation, not death, reduces sensitivity of DTI in detecting optic nerve damage. Neuroimage. 2009 Feb 1;44(3):611–9.
161. Sener RN. Diffusion MRI in the postmortem brain: case report. J Neuroradiol. 2004 Dec;31(5):406–8.
162. Schmidt TM, Fischer R, Acar S, Lorenzen M, Heinemann A, Wedegärtner U, *et al.* DWI of the brain: postmortal DWI of the brain in comparison with *in vivo* data. Forensic Sci Int. 2012 Jul 10;220(1-3):180–3.
163. Nakahara M, Ericson K, Bellander BM. Diffusion-weighted MR and apparent diffusion coefficient in the evaluation of severe brain injury. Acta Radiol. 2001 Jul;42(4):365–9.