Ana Tereza Di Lorenzo Alho

Caracterização da substância negra humana durante o envelhecimento

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

Programa: Fisiopatologia Experimental

Orientadora: Profa. Dra. Lea Tenenholz
Grinberg

SÃO PAULO

2011

Ana Tereza Di Lorenzo Alho

Caracterização da substância negra humana durante o envelhecimento

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

Programa: Fisiopatologia Experimental

Orientadora: Profa. Dra. Lea Tenenholz
Grinberg

SÃO PAULO

2011

Ana Tereza Di Lorenzo Alho

Caracterização da substância negra humana durante o envelhecimento

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

Programa: Fisiopatologia Experimental

Orientadora: Profa. Dra. Lea Tenenholz
Grinberg

SÃO PAULO

2011

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Alho, Ana Tereza Di Lorenzo

Caracterização da substância negra humana durante o envelhecimento / Ana
Tereza Di Lorenzo Alho. -- São Paulo, 2011.

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

Orientadora: Lea Tenenholz Grinberg.

Descritores: 1.Substância negra 2.Tronco encefálico 3.Envelhecimento
4.Reconstrução tridimensional 5.Doença de Parkinson

USP/FM/DBD-173/11

Dedicatória

Dedico, em primeiro lugar, às famílias que em hora de luto e dor, são solidárias e colaboram com a doação de órgãos, seja para pesquisa, seja para salvar diretamente a vida de outras pessoas. O progresso científico, também, depende muito de solidariedade e compreensão.

À minha família.

Meu pai, Joaquim Alho Filho, que me ensinou o amor pelo conhecimento, pela ciência, pela vida. Incentivou, corrigiu quando necessário, elogiou e criticou para formar toda a base sólida que tenho hoje.

Minha mãe, Maria Cristina, que está ao meu lado, em todas as horas. Apoiou, conversou e acalmou quando foi necessário.

Devo à vocês tudo o que sou hoje! Que suportaram a ausência de dois filhos, em benefício da ciência!

Aos meus irmãos, Tiana e Eduardo. Brigamos, brincamos, trabalhamos, discutimos! Como bons irmãos... 'Tiquinha', sempre me apoiando e cuidando de mim, e 'Dauzinho', que esteve comigo quando eu mais precisei.

À minha sobrinha, Maria Eduarda, que nos últimos três anos é a alegria da casa e tira qualquer peso, mesmo nas horas mais difíceis!

À minha avó, Severina Colabelli Alho, hoje com 95 anos e um exemplo de luta e força a ser seguido por todas as mulheres.

Agradecimentos especiais

À minha orientadora Prof.^a Dr^a Lea Tenenholz Grinberg por acreditar em mim desde a faculdade, me incentivar, apoiar e ensinar. Não apenas profissionalmente, mas também pessoalmente. Mesmo longe fisicamente, sempre próxima e presente!

Ao Prof. Dr. Helmut Heinsen da Universidade de Würzburg, que continuamente apoiou, ensinou e co-orientou, até em momentos pessoalmente difíceis. Com certeza minha estadia na Alemanha não teria sido tão proveitosa sem o professor e mestre com toda essa dedicação, paciência e conhecimento.

Agradecimentos

Agradeço à todos os que contribuíram direta ou indiretamente para a conclusão desse trabalho, que não seria possível sem toda ajuda que tive.

Ao Prof. Dr. Wilson Jacob Filho, que está sempre me orientando e ajudando.

Ao Prof. Dr. Carlos Augusto Pasqualucci, com toda sua paciência e sabedoria me ajudou muito na conclusão desse trabalho. Sem seu apoio, teria sido muito mais difícil.

Ao Prof. Dr. Edson Amaro Junior, tornando possível a “bolsa-sanduíche” na Alemanha, uma incrível experiência profissional e pessoal.

À Dra. Renata Leite, Prof. Dr. José Marcelo Farfel e Prof. Dra. Renata Ferretti que estiveram presentes auxiliando e ensinando durante os 6 anos que trabalhamos juntos no Laboratório de Fisiopatologia no Envelhecimento.

À Prof^a. Dr^a Claudia Suemoto, que além de dar apoio durante os anos de GEROLAB, também contribuiu diretamente para a finalização desse trabalho. Sua ajuda na parte estatística foi fundamental e indispensável!

À Prof^a. Dr^a. Elia Garcia Caldini que pacientemente ajudou-me diversas vezes durante os 4 anos de pós-graduação.

À todos os membros do laboratório de Fisiopatologia no Envelhecimento (GEROLAB), os quais estão sempre presentes na minha vida! Especialmente aos amigos: Glaucia, Lívia, Edilaine, Kátia e Rafael. Sem vocês, não seria o que sou hoje. Discussões, conversas, trabalhos. Mas não só isso, companheirismo, apoio e amizade! Devo parte deste trabalho à vocês.

Aos vários, também amigos de GEROLAB que já passaram, mas foram extremamente importantes na minha formação.

Às técnicas do laboratório da Universidade de Würzburg: Frau Broschk e Frau Bahrke, que tanto me ensinaram e ajudaram no tempo que estive lá.

À Keila Maria Silva, que auxiliou nos cortes histológicos dos casos para imunoistoquímica e apoia continuamente!

À Marta Crocci, querida 'Martinha', sempre presente e pronta a ajudar...

À minha tia Regina e meus primos Luiz Felipe e Luiz Otávio. Minha segunda-mãe e meus irmãos! Parte constante da minha vida.

À Marlene, que dedica toda sua vida à minha avó. 'Lene', o anjo da guarda da Dna. Severina e da Maria Eduarda! Mas não só por elas, também pelo companheirismo e presença nos últimos 3 anos da minha vida!

Ao meu cunhado Nefton, que me deu a sobrinha mais linda do mundo!

À Peteca, que esteve ao meu lado até aos sábados à noite de trabalho. Sua companhia é fundamental...

Aos meus grandes amigos (não saberia escolher apenas alguns para agradecer): Alê, Camila, Gabi, Deda, Lilian, Heidy, Carol Gotti, André, Uekita, Fernando, Tocha e Maria Carolina. Presentes até quanto eu estava a 10.000km de distância. Seja nos momentos de gargalhadas até perder o ar e de desespero! Além da contribuição da Alê no abstract do trabalho. E da participação dos outros todos em suportar o mau humor no final da tese!!

Aos novos e não menos importantes amigos "da Alemanha": Maja, Ghessa, Simon, Greta, Jun e Yanjie. Companheiros de alemão sofrido, cervejas e viagens. A falta de vocês é imensa!

À Tânia, da Fisiopatologia Experimental, que teve paciência me ajudou a resolver os inúmeros obstáculos que apareceram durante os quatro anos de pós-graduação.

Seria difícil listar todos os nomes que contribuíram para minha formação profissional e pessoal nos últimos 27 anos, mas gostaria de agradecer aos que colaboraram para a elaboração desse projeto, assim como da minha formação pessoal durante os últimos quatro anos. Sou um pouco de cada um de vocês!

Apoio Financeiro

CAPES – Bolsa de doutorado e bolsa de doutorado sanduíche de um ano na Universidade de Würzburg na Alemanha pelo programa PROBRAL

LISTA DE ABREVIATURAS.....	
LISTA DE TABELAS	
LISTA DE FIGURAS.....	
RESUMO.....	
ABSTRACT.....	
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. ENVELHECIMENTO POPULACIONAL	2
1.2. O ENVELHECIMENTO CEREBRAL	4
1.3. A DOENÇA DE PARKINSON	6
1.3. A SUBSTÂNCIA NEGRA(SN)	12
1.3.1. <i>A descoberta da substância negra no mesencéfalo</i>	12
1.3.2. <i>Morfologia da substância negra</i>	15
1.3.3. <i>Tipos neuronais na substância negra</i>	16
1.3.4. <i>Bioquímica da substância negra</i>	20
1.4. MAPAS CITOARQUITETÔNICOS DO ENCÉFALO HUMANO	23
1.5. SUBSTÂNCIA NEGRA E ENVELHECIMENTO.....	24
1.6. MODELOS ANIMAIS	26
1.7. BANCO DE ENCÉFALOS HUMANOS DA FMUSP	27
2. OBJETIVOS.....	30
3. MÉTODOS	32
3.1. CASUÍSTICA.....	32
3.1.2. <i>Procedimentos do BEHGEEC</i>	35
3.2. CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	37
3.2.1. <i>Processamento dos encéfalos</i>	37
3.2.2. <i>Contagem estereológica</i>	41
3.2.3. <i>Reconstrução 3D com o auxílio de computador</i>	45
3.2.4. <i>Caracterização imunoistoquímica</i>	46
3.2.4. <i>Análise estatística</i>	49
4. RESULTADOS.....	51

4.1. IMUNOISTOQUÍMICA	51
4.2. ESTEREOLOGIA.....	55
4.3. RECONSTRUÇÃO TRIDIMENSIONAL.....	70
5. DISCUSSÃO	88
5.1. CONTAGEM ESTEREOLÓGICA.....	89
5.2. IMUNOISTOQUÍMICA	96
5.2.1. <i>Anti tirosina-hidroxilase</i>	96
5.2.2. <i>Anti proteína tau hiperfosforilada</i>	97
5.2.3. <i>Anti calbindina D_{28k}</i>	98
5.2.4. <i>Anti α-sinucleína</i>	99
5.3 RECONSTRUÇÃO TRIDIMENSIONAL.....	101
5.4. LIMITAÇÕES DO ESTUDO	105
5.5. PASSOS FUTUROS.....	107
6. CONCLUSÕES	109
7. ANEXO I.....	111
8. ANEXO II.....	125
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	129

Lista de abreviaturas

DP – Doença de Parkinson
SN – Substância negra
SNC – Sistema Nervoso Central

CL – Corpúsculos de Lewy

NL – Neuritos de Lewy

TH – Tirosina Hidroxilase

α -sin - α -sinucleína

3D – tridimensional

BEHGEEC – Banco de Encéfalos Humanos do Grupo de Estudos em Envelhecimento Cerebral

FMUSP – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

SVOC – Serviço de Verificação de Óbitos da Capital

PEC – Projeto Envelhecimento Cerebral

GEEC – Grupo de Estudos em Envelhecimento Cerebral

CAPPesq – Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa

F – Feminino

M – Masculino

CDR – Clinical Dementia Rating

μ m – micrômetros

N – número total de células

Σ Q – soma de nucléolos contados

t – espessura média

h – altura da grade

asd – área de fração de amostragem

ssf – ponto de fração de amostragem

TH – tirosina hidroxilase

Calb D28k – Calbindina D28k

SABC – sistema de detecção ABC para imunistoquímica

DAB – diaminobenzidina

D – direito

E – esquerdo

Lista de tabelas

Tab. 01: Tipos de neurônios da substância negra.....	20
Tab.02: Divisão dos casos para caracterização da substância negra durante o envelhecimento.....	32
Tab. 03: Métodos Imunoistoquímicos utilizados.....	47
Tab.04: Descrição das colorações imunoistoquímicas.....	52
Tab.05: Mediana e valores máximo e mínimo da idade, número de neurônios, volume e densidade dos hemisférios direito e esquerdo, ambos os lados.....	57
Tab. 06: Número de neurônios, volume da estrutura e densidade neuronal de todos os casos analisados.....	58
Tab.07: Correlação entre número de neurônios, volume e densidade neuronal entre os hemisférios direito e esquerdo.....	59
Tab.08: Análise da correlação entre idade e variáveis neuronais.....	62
Tab 09: Resumo dos artigos analisados e comparados para caracterização da SN humana durante o envelhecimento.....	91

Lista de figuras

Fig.01: Estadiamento para a doença de Parkinson.....	9
Fig.02: Núcleos envolvidos nos estágios iniciais da doença de Parkinson...	10
Fig.03: Marcação da região da substância negra com o anticorpo anti α -sinucleína.....	11
Fig.04: Corte transversal da região do mesencéfalo.....	13
Fig. 05: Neurônios tipo I.....	17
Fig.06: Neurônios tipo II.....	18
Fig. 07: Neurônios tipo III.....	19
Fig.08: Síntese de dopamina.....	21
Fig.09: Fatia do tronco encefálico corado com galocianina.....	24
Fig. 10: Vistas anterior e posterior do tronco encefálico.....	38
Fig.11: Procedimento do corte histológico em fatias grossas.....	39
Fig.12: Lâmina corada com coloração de Nissl.....	40
Fig. 13: Microscópio com câmera acoplada e corte da região da substância negra.....	42
Fig.14: Programa Image J [®] , com a grade de $100\mu\text{m}^2$	43
Fig.15: Região imunocorada com o anticorpo anti-tirosina hidroxilase.....	53
Fig.16: Região imunocorada com o anticorpo PHF-1, anti proteína TAU hiperfosforilada.....	54
Fig.17: Gênero dos casos analisados.....	55
Fig.18: Número de neurônios à direita e esquerda, por caso.....	60
Fig.19: Volume dos lados direito e esquerdo, por caso.....	60
Fig.20: Densidade celular dos lados direito e esquerdo, por caso.....	61
Fig. 21: Número total de neurônios e idade.....	63

Fig.22: Volume total da SN e idade.....	64
Fig.23: Densidade total média e idade.....	65
Fig.24: Número total de neurônios em mulheres e idade.....	66
Fig.25: Volume total da SN em mulheres e idade.....	67
Fig.26: Número total de neurônios em homens e idade.....	68
Fig.27: Volume total da SN em homens e idade.....	69
Fig.28: Contorno do tronco encefálico com a SN.....	71
Fig.29: Reconstrução tridimensional da SN do caso 1.....	72
Fig.30: Reconstrução tridimensional do caso 2.....	73
Fig. 31: Reconstrução tridimensional do caso 3.....	74
Fig.32: Reconstrução tridimensional do caso 4.....	75
Fig.33: Reconstrução tridimensional do caso 5.....	76
Fig. 34: Reconstrução tridimensional do caso 6.....	77
Fig. 35: Reconstrução tridimensional do caso 7.....	78
Fig. 36: Reconstrução tridimensional do caso 8.....	79
Fig. 37: Reconstrução tridimensional do caso 9.....	80
Fig.38: Reconstrução tridimensional do caso 10.....	81
Fig.39: Reconstrução tridimensional do caso 11.....	82
Fig.40: Reconstrução tridimensional do caso 12.....	83
Fig.41: Reconstrução tridimensional do caso 13.....	84
Fig.42: Reconstrução tridimensional do caso 14.....	85
Fig. 43: Reconstrução tridimensional do caso 15.....	86

RESUMO

Alho, A.T.D.L. *Caracterização da substância negra humana durante o envelhecimento*. [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; Maio de 2011.

INTRODUÇÃO: A presença e extensão da perda neuronal no encéfalo dos idosos ainda é controversa. A substância negra (SN) é uma região localizada no mesencéfalo e caracterizada macroscopicamente pela coloração escura, devido à presença neuromelanina. O envelhecimento da SN ainda é um mistério, mas existem grandes quantidades de estudos relativos às modificações sofridas por essa região com o passar dos anos. Alguns estudos detectaram perda neuronal na SN durante o envelhecimento, enquanto outros afirmam que não há alteração significativa durante esse processo. **OBJETIVO:** Caracterizar as alterações que ocorrem na SN durante o envelhecimento humano, em indivíduos sem sintomas da doença de Parkinson, do ponto de vista citoarquitetônico em 3D. **CASUÍSTICA E METODOLOGIA:** O presente projeto faz parte do Projeto Envelhecimento Cerebral (PEC) do Grupo de Estudos em Envelhecimento Cerebral (GEEC) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP). Foram utilizados 18 casos, classificados em quatro faixas etárias. Quinze casos foram analisados estereologicamente e reconstruídos tridimensionalmente. Para estes, foram determinados número de neurônios, volume da SN e densidade neuronal e submetidos a testes estatísticos não paramétricos. Três casos foram imunocorados com quatro diferentes anticorpos: anti tirosina-hidroxilase (TH), anti proteína tau hiperfosforilada, anti proteína alfa-sinucleína e anti calbindina D28k (Calb) e analisados qualitativamente. **RESULTADOS:** As lâminas imunocoradas com anticorpo anti α -sinucleína e anti-tau, foram negativas. As lâminas imunocoradas com anticorpo anti- TH e anti-Calb D28k foram positivas. Dos quinze casos analisados estereologicamente, Para o número de neurônios, encontrou-se: mediana de 504.575 células, valor mínimo de 348.662 células e valor máximo de 672.172 células. Para o volume, encontrou-se mediana de 190,8mm³; valor mínimo de 134,1 mm³ e valor máximo de 267,3mm³. Para a densidade total média, encontrou-se a mediana de 2.517,4 cel/mm³, valor mínimo de 1.603,1 cel/mm³ e valor máximo de 5.015,7 cel/mm³. Realizou-se o teste de correlação de Spearman para as três variáveis neuronais, correlacionando hemisfério direito e esquerdo, encontrou-se uma correlação moderada para número de neurônios e volume, e correlação forte para densidade. Com o mesmo teste, realizou-se análise das variáveis neuronais em função da idade, e não houve alteração estatisticamente significativa. Apenas uma tendência à diminuição no volume total da SN em relação à idade. Também verificou-se a relação entre as variáveis neuronais, por gênero em função da idade e não houve alteração estatisticamente significativa. Nas reconstruções tridimensionais, verificou-se uma grande variabilidade interpessoal entre as 15 SN reconstruídas. **DISCUSSÃO:** Diversos estudos estereológicos foram feitos, mas poucos deles com análise estereológica sem viés e a maior parte deles demonstra diminuição no número de neurônios, discordando dos achados atuais. A reconstrução tridimensional também não descreve alterações decorrentes do envelhecimento, mas aparentemente modificações interpessoais. **CONCLUSÃO:** As características da substância negra se mantêm ao longo dos anos, porém, ainda devem ser muito mais estudadas.

Descritores: substância negra, tronco encefálico, envelhecimento, reconstrução tridimensional, doença de Parkinson

ABSTRACT

Alho, A.T.D.L. *Caracterização da substância negra humana durante o envelhecimento*. [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; Maio de 2011.

INTRODUCTION: Some aspects about macro and micro brain changes are suffering modifications along the years. The presence and extension of neuronal loss in elderly is still a big and polemic issue. The SUBSTANTIA NIGRA (SN) is located at the midbrain and characterized by the dark color due to the pigmented neurons, which contain neuromelanin. The SN's aging is still a mystery, nevertheless, there are great researches related to these changes suffered in this region by the years. Some of the researches noticed that neuronal loss in SN during the aging, while others claim that there are no significant modifications through this process. **OBJECTIVE:** Describing SN changes during the human aging in individuals with no Parkinson's disease symptoms, from the 3D cytoarchitectonic point of view. **METHODS:** This project is part of the Brain Aging Project of Brain Aging Study Group, in University of São Paulo Medical School. Eighteen cases had been analyzed and classified into four ages groups. Fifteen cases had been analyzed with stereological methods and 3D reconstructed. During the stereological analysis, were determined the neuronal number, SN volume, neuronal density and submitted to nonparametric statistics test. Three cases had been immunostained with 4 different antibodies anti tyrosine-hydroxylase (TH), anti hyperphosphorylated tau (anti-tau), anti alpha-synuclein (alpha-syn) e anti calbindin D28k (Calb) and qualitatively analyzed. **RESULTS:** The immunostained slices with the anti alpha-syn and anti-tau antibodies were negative. The immunostained slices with anti TH and anti calb D28K antibodies were positive. From the 15 cases stereologically analyzed, 53,3% were female and 46,7% male. Had been analyzed neuron numbers, SN volume and neuronal density. For the neuron numbers were found median of 504.575 cells, minimum value of 348.662 cells and maximum value of 672.172 cells. For the volume were found median of 190,8mm³; minimum value of 134,1mm³ and maximum value of 267,3mm³. For the total density, was found median of 2.517,4 cel/mm³, minimum value of 1603,1 cel/mm³, maximum value of 5015,7 cel/mm³. The Spearman's correlation test had been done to the three neuronal variables correlating the right and left hemispheres and was a moderated correlation between neuron numbers and neuron volume and strong correlation to density. Using the same test, the rate neuron by the age analysis had been concluded and there was no significant change. There was noticed just one trend to the reduction in the SN total volume related to aging. It was also checked the relation between the neurons variety by gender considering aging and there was no significant changes. In the 3D reconstruction, was possible to notice a great interpersonal variability between the 15 SN rebuilt. **DISCUSSION:** Many stereological researches had been done, however, a few of them used the unbiased stereological analysis and most of them show a reduction in the neuron number, disagreeing from the current conclusions. The 3D reconstruction also don't describe changes as aging result, but apparently interpersonal changes. **CONCLUSION:** The Substantia Nigra maintain the same characteristics along the years, however, it must be much more explored.

Descriptors: substantia nigra, aging, 3D reconstruction Parkinson's disease, tronco encefálico

1.Introdução

1. Introdução

1.1. *Envelhecimento populacional*

O rápido processo de envelhecimento populacional tem ocorrido nos países em desenvolvimento. Isto deve-se ao progressivo declínio das taxas de mortalidade e fecundidade, além da melhoria nas condições sanitárias e da qualidade de vida das populações (Ramos *et al.*, 1987). Em 1950 a expectativa de vida ao nascer, no Brasil, era de 43,2 anos (Ramos *et al.*, 1987). Estima-se que nos próximos 50 anos a expectativa de vida ao nascer no país apresente aproximadamente 81,3 anos e 23,3% da população seja idosa (IBGE, 2006). Esse fenômeno também ocorreu nos países desenvolvidos, porém de forma mais lenta e gradual (Moreira, 1998). Em todo o mundo, a proporção de pessoas com 60 anos ou mais cresce rapidamente. Espera-se crescimento de 223% entre 1970 e 2025 de indivíduos idosos, isto é, acima de 60 anos (OMS, 2005).

O **envelhecimento** é processo comum a todos os animais, mas ainda existem muitos pontos a serem esclarecidos quanto à dinâmica e à natureza deste processo (Papáleo-Netto, 2006). O mesmo pode ser definido como processo que diminui a reserva fisiológica global, e traz aumento exponencial de vulnerabilidade à doenças (Miller, 2003). Por isso, ao mesmo tempo em que há aumento na expectativa de vida, existe também, aumento proporcional na incidência das enfermidades relacionadas ao envelhecimento (Kalache *et al.*, 1987).

Comfort (1979) definiu o processo de **envelhecimento** como a redução da capacidade de manutenção da homeostase, em condições de sobrecarga funcional. A **senescência** é definida como o conjunto de modificações orgânicas decorrentes do processo natural de envelhecimento, implicando na perda progressiva da capacidade de adaptação do organismo quando submetido à sobrecarga. Neste caso, não acarreta qualquer prejuízo à autonomia e à independência do sujeito. A **senilidade** é definida pelo conjunto das alterações decorrentes de doença, que acompanham o indivíduo ao longo do processo de envelhecimento, com prejuízo à autonomia e independência próprias (Comfort, 1979).

A longevidade populacional pode ser considerada um grande avanço científico, pois demonstra o aumento na qualidade de vida e melhoramento dos tratamentos às doenças.

Apesar do fenômeno “envelhecimento” ser mundial, há grande heterogeneidade entre os que envelhecem. Vários estudos buscam explicações para as diferenças entre o processo natural de envelhecimento e o envelhecimento permeado de incapacidades (Suemoto, 2010).

Dentre essa heterogeneidade no envelhecimento, cada região do encéfalo sofre alterações diferenciadas. Algumas regiões perdem mais neurônios. Acredita-se que a região mais afetada pela perda neuronal é o córtex do hipocampo, responsável pela memória de fatos recentes (Jacob-Filho & Gorzoni, 2008).

Dentre as enfermidades cujo fator de risco é o envelhecimento, as doenças neurodegenerativas são das mais prevalentes e incapacitantes. No passado, quando a expectativa de vida não atingia os limites atuais, enfermidades como a Doença de Alzheimer (DA) ou Doença de Parkinson (DP) não constituíam grande agravo à saúde pública (Berchtold *et al.*, 1998).

Nos últimos anos, têm havido grande esforço, na área científica, para melhor descrever e caracterizar entidades patológicas que envolvem neurodegeneração. Diversos estudos, muitos deles realizados em nosso meio (Grinberg, 2006; Farfel, 2008; Ferretti, 2008; Leite, 2009; Grinberg *et al.*; 2009; Suemoto, 2010), vêm sendo feitos ou mantidos para tentar revelar como ocorrem processos degenerativos sofridos pelas células do Sistema Nervoso Central (SNC) (Grinberg, 2006). Entretanto, a maioria desses estudos depara-se com a falta de valores de normalidade para efeitos comparativos ou de grupo controle.

1.2. O envelhecimento cerebral

Estudos de envelhecimento cerebral vem sendo realizados desde o século XIX, porém, ainda há certo grau de incerteza sobre quais as mudanças ocorridas neste processo (Esiri, 2007).

Peso, volume e número total de células do cérebro, atinge seu máximo durante o início da adolescência e é notada apenas pequena diminuição

durante as cinco ou seis décadas da vida adulta (Cabello *et al.*, 2002). Depois dos 50 anos, a queda do peso encefálico é de aproximadamente 2 a 3% por década durante as quatro décadas seguintes. A perda de neurônios foi reportada em estudos com o neocórtex, hipocampo, amígdala, neurônios motores da medula espinal corpo estriado, entre outros (Cabello *et al.*, 2002).

As definições elaboradas a respeito do que seria aceitável durante o envelhecimento cerebral vêm mudando ao longo do tempo. Uma das maiores controvérsias ocorre sobre, presença, ausência e a extensão da perda neuronal (Esiri, 2007).

Estudos morfométricos bidimensionais realizados nos anos 1950, analisaram perda neuronal durante o envelhecimento. Os resultados variam de 10 a 60%, dependendo do estudo e da população examinada (Esiri, 2007). No entanto, outros trabalhos não encontraram nenhuma perda neuronal em certas áreas como o núcleo do nervo cranial, córtex cerebral e hipocampo (Esiri, 2007; Esiri, 1994; Brody, 1955; Henderson *et al.*, 1980; Ball, 1977; Hall *et al.*, 1975)..

Estudos estereológicos utilizando técnicas não enviesadas e realizados recentemente (Benes & Lange, 2001; West, 1999), detectaram apenas que, a perda neuronal pode ser branda ou até indetectável (Hof & Morrison, 2004; West *et al.*, 1994).

1.3. A doença de Parkinson

A doença de Parkinson (DP) constitui a principal causa de parkinsonismo nos idosos e corresponde entre 40 a 75% dos transtornos do movimento em humanos. Esta doença (DP) é um dos tipos mais frequentes destes transtornos em indivíduos com mais de sessenta anos de idade (Meara & Koller, 2000).

A perda de neurônios dopaminérgicos da substância negra (SN) na DP é associada com rigidez postural anormal, tremor, redução no movimento voluntário e abundância de movimentos involuntários. A DP caracteriza-se por manifestar hipomimia, postura curvada, rigidez e tremor intenso, entre outros sintomas (Robbins *et al.*, 1996).

Sabe-se já, que o início dos sintomas motores ocorre quando há grande perda de neurônios dopaminérgicos da substância negra (SN), localizada na parte mais ventral do segmento mesencefálico (Rieder *et al.*, 2002). As regiões inicialmente afetadas pela DP fazem parte do tronco encefálico, o qual está localizado entre a medula espinal e o diencéfalo. Essa região possui núcleos bem definidos, feixes de fibras nervosas descendentes e ascendentes, além da formação reticular, formada pelos núcleos da rafe, locus coeruleus, substância cinzenta periaquedutal e área tegmental ventral (Halliday *et al.*, 1995; Behbehani *et al.*, 1990).

Nos últimos anos, observações clínicas têm apontado que manifestações não-motoras também são prevalentes na DP. Além disso,

muitos desses casos aparecem antes dos sintomas motores (Grinberg *et al.*, 2009).

As manifestações não-motoras da DP incluem vasta gama de sintomas, incluindo depressão, demência, transtornos do sono, constipação, hipertensão ortostática, distúrbios sensoriais e disfunção olfatória. As causas são multifatoriais e não podem ser explicadas por lesões únicas. Essas lesões estão ligadas à danos de núcleos específicos do tronco encefálico (Grinberg *et al.*, 2009).

Braak e colegas descreveram em 2003 um esquema evolutivo das alterações patológicas na DP. De acordo com esse esquema, a DP é doença degenerativa progressiva, que atinge seletivamente e de forma estereotipada determinadas áreas encefálicas. Estudos evidenciaram que a DP se inicia no encéfalo com perda neuronal e acúmulo de corpúsculos de Lewy (CL) e neuritos de Lewy (NL) na região do bulbo olfatório e do núcleo motor dorsal do nervo vago (Braak *et al.*, 2003). Estudos clinicopatológicos recentes mostram que pelo menos 80% dos casos seguem o esquema proposto por Braak e que os corpúsculos de Lewy são detectados na maioria dos núcleos vulneráveis do tronco encefálico em mais de 90% dos casos de DP, durante o curso da doença (Grinberg *et al.*, 2009).

O processo descrito dar-se-ia em seis estágios neuropatológicos, cada um marcado por desenvolvimento contínuo de inclusões distintas de corpúsculos de Lewy e neuritos de Lewy, além dos outros processos celulares e agregações granulares no corpo dos neurônios envolvidos (Braak *et al.*

2003). O aparecimento das inclusões segue curso ascendente no tronco encefálico.

Estágio 1: As lesões precoces aparecem no bulbo olfatório, núcleo olfatório anterior e núcleo motor dorsal do nervo vago. Na parte inferior do tronco encefálico, o núcleo dorsal motor do nervo vago é o ponto de partida. (Del Tredici *et al.*, 2002; Braak *et al.* 2003).

Estágio 2: As lesões avançam do núcleo dorsal do nervo vago para os núcleos caudais da rafe (núcleo da rafe magno, núcleo da rafe pálido e núcleo da rafe obscuro), o núcleo gigantocelular da formação reticular e para o complexo lócus coeruleus-subcoeruleus. Juntos, esses núcleos formam o “sistema de ganho” (the gain setting system), envolvido em diversos processos fisiológicos, como modificação algica e controle do sono (Braak *et al.*, 2003; Braak *et al.*, 2003; Greenfield & Bosanquet, 1953; Bethlem & Den Hartog Jager, 1960; Halliday *et al.*, 1990; Braak *et al.*, 2004).

Estágio 3: O tegmento mesencefálico é atingido pelas lesões, assim como a porção basal do prosencéfalo. A destruição maciça dos neurônios não atinge somente a *pars compacta* da substância negra, mas também partes da amígdala (Braak *et al.*, 1994; Bohus *et al.*, 1996).

Estágio 4: Além do grave acometimento da substância negra (SN), o processo patológico alcança no encéfalo, atingindo pela primeira vez uma porção específica do córtex cerebral, o mesocórtex temporal, estendendo-se até a área CA2 do hipocampo. Como em jogo de dominó, regiões corticais

sucessivas são atingidas e há aumento substancial dos corpúsculos e neuritos de Lewy (Braak *et al.*, 2003).

Estágios 5 e 6: No final desses estágios, o processo patológico manifesta-se em grande extensão topográfica, até o neocortex. No estágio 5, os corpúsculos de Lewy, aparecem nas áreas de associação sensorial e pré-frontal, regiões pré-motoras e, finalmente, em alguns casos, em regiões sensoriais e motoras primárias. As células piramidais neocorticais que contêm os CL's são relativamente pequenas e ficam nas camadas V e VI destes córtices (Wakabayashi *et al.*, 1995; Braak *et al.*, 2003).

Fig.01: Estadiamento para a doença de Parkinson proposto por Braak e colegas (estágios 1 a 6), demonstrando as regiões atingidas pelas lesões com corpúsculos e neuritos de Lewy, as quais se iniciam na medula oblonga (núcleo dorsal do nervo vago – dorsal IX e X) e bulbo olfatório (em preto) e seguem pelo tronco encefálico até atingir o córtex cerebral (na direção das flechas) (Extraído e modificado de: Braak *et al.*, 2003).

Neuropatologicamente, a doença de Parkinson é caracterizada por perda neuronal e acúmulo de corpúsculos e neuritos de Lewy (CL's e NL's) nas áreas vulneráveis. Corpúsculos de Lewy são inclusões protéicas intracelulares, eosinofílicas, arredondadas ou alongadas, que em geral, apresentam núcleo denso, circundado por borda mais pálida, compostos por filamentos finos, densamente envolvidos no núcleo, mas frouxos na borda (Yu *et al.*, 2004; Wakabayashi *et al.*, 2007; Robbins *et al.*, 1996). Os CL's são formados por mistura heterogênea de diversas substâncias, incluindo a proteína α -sinucleína modificada, sendo uma proteína de 140 aminoácidos com grande expressão no sistema nervoso central (Wakabayashi *et al.*, 2007).

Fig.02: Núcleos envolvidos nos estágios iniciais da doença de Parkinson, reconstruídos pelo software Amira (Cedido por Lea T. Grinberg, 2008).

Neurônios pigmentados, aparentemente e morfologicamente normais, algumas vezes apresentam marcações lesionais e difusas no seu citoplasma (Fujiwara *et al.*, 2002).

Fig.03: Marcação imunoistoquímica da região da substância negra com o anticorpo anti α -sinucleína (EQV-1). Aumento 200x. As setas vermelhas indicam os aglomerados de proteína alfa-sinucleína, formando os corpúsculos de Lewy (Arquivo pessoal, 2007).

1.3. A substância negra(SN)

A substância negra (SN) localiza-se no mesencéfalo, entre o tegmento e a base do mesencéfalo, próximo dos pedúnculos cerebrais (Braak & Braak, 1986; Machado, 1998). A mesma pode ser visualizada em qualquer corte transversal do mesencéfalo. É heteromórfica e caracterizada macroscopicamente por coloração escura devido à presença de neurônios pigmentados que apresentam neuromelanina (van Domburg & ten Donkelaar, 1991).

1.3.1. A descoberta da substância negra no mesencéfalo

Em 1792, Soemmerring relatou a presença de substância escura, com as mesmas características do que hoje é chamada de substância negra ou *substantia nigra* (Soemmerring, 1792; *apud* van Domburg & ten Donkelaar, 1991).

Alguns detalhes neuropatológicos do mesencéfalo foram descritos por Lewy, aproximadamente 110 anos depois (Lewy, 1912; Lewy, 1913, Lewy, 1923) e por Foix e Nicolesco em 1925, tendo contribuído muito para aumentar o conhecimento sobre a citoarquitetura da SN (Lewy, 1912; Lewy, 1913, Lewy, 1923; Foix e Nicolesco, 1925; *apud* van Domburg & ten Donkelaar, 1991).

Fig.04: Corte transversal da região do mesencéfalo. A seta preta indica a SN, notando-se claramente os neuromelanócitos, com agrupamentos celulares que determinam a *pars compacta* e a *pars diffusa* da substância negra (Arquivo pessoal, 2008).

O médico russo Konstantin Tretiakoff foi quem primeiro descreveu, algo que na época (1919) denominou-se “Black stuff” (substância negra), correlacionando esse estudo à doença de Parkinson. Inspirou-se parcialmente

no relato de Blocq e Marinesco, em 1894, sobre homem de 38 anos morto com sintomas de Parkinsonismo unilateral, onde encontraram tuberculoma do tamanho de uma noz. Neste caso o tuberculoma atingia seletivamente a substância negra (Blocq e Marinesco, 1984; Lees *et al.*, 2008).

A tese de doutorado de Tretiakoff (1919) envolveu o estudo da SN de 54 encéfalos, onde foram relatadas a presença de corpos de Lewy. Estes corpos foram descritos por Friedrich Lewy sete anos antes. A sua vez, Lewy descreveu inclusões proteicas presentes no núcleo dorsal do nervo vago (Tretiakoff, 1919 *apud* Lees *et al.*, 2008).

Curiosamente, Tretiakoff trabalhou durante aproximadamente quatro anos no Hospital do Juquery, em Franco da Rocha – região metropolitana de São Paulo e também contribuiu para a pesquisa no Brasil (Lees *et al.*, 2008). Em 1921, Antonio Carlos Pacheco e Silva, psiquiatra do Hospital do Juquery foi enviado para estudar neuropatologia em Paris, e quando retornou ao Brasil, trouxe o neurologista e psiquiatra russo para chefiar o departamento de neuropatologia do H. Juquery. Tretiakoff, além de chefiar o departamento de neuropatologia do Hospital do Juquery, analisava não só material patológico, mas também examinava pacientes pessoalmente e discutia medicina geral, psiquiatria e neuropatologia. Em conjunto com A.C. Pacheco e Silva e outros colegas brasileiros, publicou as “Memórias do Hospital (para doenças mentais) do Juquery” (Andrade *et al.*, 2009). Foram realizados ainda por Tretiakoff estudos sobre doença mental grave em pacientes com, neurocisticercose (Tretiakoff & Pacheco e Silva, 1924 *apud* Andrade *et al.*, 2009), sobre placas encontradas no encéfalo em diversas doenças mentais, a origem dessas

placas (Tretiakoff, 1924 *apud* Andrade *et al.*, 2009) e sobre lesões vasculares na psicose maníaco depressiva (Tretiakoff & Marcondes Vieira, 1924 *apud* Andrade *et al.*, 2009).

1.3.2. Morfologia da substância negra

A SN apresenta neurônios pigmentados, contendo neuromelanina e sintetiza principalmente dopamina como seu neurotransmissor. A subdivisão anatômica do complexo nigral no encéfalo humano tem sido baseada no estudo das marcações das células dopaminérgicas (Damier *et al.*, 1999). Esta estrutura possui grande complexidade de conexões. As interconexões com o corpo estriado apresentam grande importância, pois são tanto aferentes (fibras estriatonigrais) como eferentes (fibras nigroestriatais dopaminérgicas (Machado, 1998).

A via nigroestriatal desempenha função fundamental no sistema de vias sinápticas reguladoras, excitatórias e inibitórias que servem para modular a retroalimentação à partir do tálamo para o córtex motor (Robbins *et al.*, 1996).

As subdivisões da SN foram publicadas pela primeira vez nos estudos de Bauer (1909) e Sano (1910). Os mesmos a dividiram em três diferentes regiões da SN: a *pars compacta*, *pars reticulata* e *pars lateralis*.

A maior parte do núcleo negro é constituída pela *pars compacta*, onde encontram-se depósitos de neuromelanina. A *pars diffusa* está situada no

subnúcleo posterior da *pars compacta* e é composta por células nervosas difusamente distribuídas, as quais não formam agrupamentos. A borda dorsal da *pars diffusa* é mal demarcada, pois, as células nessa localização se entremeam com células da formação perirubral (Braak & Braak, 1986). A *pars reticulata* é a porção inferolateral do complexo nigral e é formada de finos dendritos provenientes dos neurônios da *pars compacta* (Schwyn & Fox, 1974). Essa última região (*pars reticulata*) é formada por células nervosas com diferentes tamanhos e formas. Em geral, não possuem grânulos de neuromelanina (Braak & Braak, 1986).

1.3.3. Tipos neuronais na substância negra

Três tipos diferentes de neurônios podem ser distinguidos na substância negra humana. Essa classificação é baseada na forma, grau de pigmentação, tipos de processos celulares e tamanho da célula:

- Os neurônios do **tipo I**, em sua maioria, são encontrados na *pars compacta*, têm tamanho de médio para grande (aproximadamente 50 μ), com 2 a 6 finos e esparsos dendritos. Corpúsculos de Nissl na porção periférica, se estendem para a região proximal dos dendritos. Um pólo do corpo celular do neurônio tipo I contém grande número de grânulos de neuromelanina. Algumas “espinhas” dendríticas podem ser encontradas ao longo dos dendritos maduros destes neurônios (Braak & Braak, 1986; van Domburg & ten Donkelaar, 1991).

Fig. 05: Neurônios tipo I, apresentam grânulos de neuromelanina, tamanho grande, núcleo esférico e escuro (Arquivo pessoal, 2010).

Os neurônios **tipo II** apresentam-se variáveis em tamanho e forma, sendo semelhantes ao tipo I, com extensa e esparsa ramificação dendrítica. Sendo encontrados principalmente na *pars reticulata* e na *pars diffusa*, porém ocorrem em pequeno número na *pars compacta*. O núcleo é esférico e relativamente escuro, localizado na região central da célula, contêm nucléolos muito proeminentes e intensivamente corados. Esse tipo de neurônio não apresenta depósitos de neuromelanina. Os dendritos destes neurônios não se

estendem para fora do complexo nigral. São geralmente bipolares e alongados, porém, podem ser encontrados neurônios multipolares. O número de dendritos primários depende da forma do corpo celular e o diâmetro dessa célula é de aproximadamente 34μ . O axônio é originado diretamente do corpo celular ou de um dendrito (Braak & Braak, 1986; van Domburg & ten Donkelaar, 1991).

Fig.06: Neurônios tipo II, de tamanho médio, com inclusões de neuromelanina, núcleo esférico e escuro (Arquivo pessoal, 2010).

Os neurônios **tipo III** são geralmente pequenos, com diâmetro do corpo celular de aproximadamente 16μ . O corpo celular é pobre em material basofílico. O núcleo é escuro, contendo nucléolos excêntricos e distintos. Alguns finos dendritos se originam “abruptamente” da superfície da célula e irradiam em várias direções. Os dendritos não têm “espinhas”, mas dão origem

a alguns prolongamentos. Essas células possuem grânulos de lipofucsina, os quais são menores que os grânulos de neuromelanina dos neurônios do tipo I e dos grânulos de lipofucsina dos neurônios tipo II. Apenas neurônios da *pars diffusa* se interconectam com a formação perirubral (Braak & Braak, 1986; van Domburg & ten Donkelaar, 1991).

Fig. 07: Neurônios tipo III, pequenos, sem grânulos de neuromelanina, com núcleo de coloração escura e com nucléolos excêntricos (Arquivo pessoal, 2010).

Tab. 01: Tipos de neurônios da substância negra (segundo Braak & Braak, 1986)

Tipo	Tamanho	Dendritos	Grânulos	Espinhas	Localização	Núcleo
I	médio / grande 50µm	2 a 6	Neuromelanina	Sim	<i>pars compacta</i>	esférico, escuro e centralizado
II	médio 34µm	bipolares e alongados	Lipofucsina	Sim	<i>pars diffusa</i> e <i>pars reticulata</i>	esférico, escuro e centralizado
III	pequenos 16µm	finos, grande quantidade	Não	Não	<i>pars diffusa</i>	escuro, núcleolos excêntricos

1.3.4 Bioquímica da substância negra

O neurotransmissor dopamina atua no metabolismo de todo sistema nervoso e sua diminuição é relacionada com o início dos sintomas motores da DP. Seu precursor, a DOPA (3-4 dihidroxifenilalanina) é originado na substância tirosina – figura 08 - (também precursora da noradrenalina) e está presente nos neuromelanócitos. Acredita-se que a dopamina atue como transmissor inibitório para os gânglios da base, mas em algumas outras áreas do cérebro é possivelmente excitatória (Guyton & Hall, 1997).

Fig.08: Síntese de dopamina. 1- Hidroxilação da tirosina em dopa 2- Descarboxilação da dopa em dopamina 3- Dopamina é transportada para dentro das vesículas (Guyton & Hall, 1997)

A neuromelanina apresenta-se como um pigmento formado pelas peroxidações de gorduras poliinsaturadas, associadas ao envelhecimento. Localizada em número limitado de formas celulares, nos humanos, está presente no *locus coeruleus* desde o nascimento e apenas 18 meses depois é encontrado como substância negra (Mann & Yates, 1974). Sendo este pigmento, também, produto do metabolismo das catecolaminas, gerado provavelmente pela auto-oxidação. Através da transformação da fenilalanina em tirosina é transportada para os neurônios secretores de catecolamina, onde série de reações convertem a tirosina em dopamina, norepinefrina e epinefrina. Os neuromelanócitos são as células que possuem neuromelanina e conferem cor escura à substância negra (van Domburg & ten Donkelaar, 1991).

A síntese da neuromelanina resulta do excesso de catecolaminas citosólicas, que não se acumulam nas vesículas sinápticas. A transformação da tirosina em DOPA ocorre graças à ação de uma enzima que limita a biossíntese das catecolaminas, a tirosina hidroxilase (TH) – figura 2. Como não há marcador imunoistoquímico para a dopamina, utiliza-se a TH como marcador indireto (Mori, 2006).

Alterações patológicas da substância negra como nas doenças de Parkinson e Alzheimer estão relacionadas à hiperfosforilação ou falha no metabolismo de duas proteínas: α -sinucleína e tau, respectivamente (Fujiwara *et al.*, 2002).

De acordo com Damier *et al.* (1999), a calbindina D_{28k} é uma proteína presente nas fibras aferentes estriatonigrais e mostram os neurófilos da SN. Reações imunoistoquímicas anti calbidina podem detectar prolongamentos dopamina negativos. Apesar de a DP apresentar como característica volumosa degeneração dos neurônios dopaminérgicos, a vulnerabilidade desses neurônios é heterogênea entre os diferentes grupos celulares dopaminérgicos na SN. Para determinar o padrão de perda celular e mapear a distribuição das células é necessário que exista uma marcação independente dos processos degenerativos que subdividem a SN. Foram encontradas intensas marcações com calbindina associadas aos neurófilos da região ventral do cérebro. Da totalidade dos neurônios dopaminérgicos da *pars compacta* na SN, 60% estão

localizados na área rica em calbindina, chamada, neste caso, de “matriz nigral” e 40% estão juntas na região pobre em calbindina, denominada “nigrossomos”.

1.4. Mapas citoarquitetônicos do encéfalo humano

Mapas citoarquitetônicos do córtex cerebral humano têm sido publicados nos últimos cem anos, os quais mostram-se mais objetivos e menos observador-dependentes. Técnicas recentes, como métodos imunoistoquímicos, além dos estudos de imagem, aplicando sistemas tridimensionais, adicionam informações importantes e abrem boas perspectivas para pesquisas nessa área (Zilles *et al.*, 2002).

Em secções horizontais simples do tronco encefálico, grande parte dos núcleos são inconspícuos, dificultando que sejam delineados em cortes convencionais de parafina com 10 a 20µm de espessura. Além disso, a topografia, assim como, tamanho e a extensão dos núcleos ali localizados, são ilustrados utilizando-se reconstruções 3D de secções histológicas seriais do tronco encefálico humano (Grinberg *et al.*, 2008).

Fig.09: Fatia do tronco encefálico corado com galocianina. Corte grossos com espessura de 400 μ m permitem a delimitação dos núcleos de forma precisa. As setas apontam a substância negra (Cedido por Helmut Heinsen, 2008).

1.5. Substância Negra e envelhecimento

O envelhecimento da substância negra ainda é um mistério para a ciência. Estudos relativos às modificações sofridas por essa região, com o passar dos anos, são extremamente controversos.

Como em todas as regiões do encéfalo, alguns estudos detectaram a perda de neurônios na substância negra durante o seu envelhecimento

(Fearnley & Lees, 1991; Ma *et al.*, 1999; Mann *et al.*, 1984; McGeer *et al.*, 1977; Thiessen *et al.*, 1990; Tooyama *et al.*, 1994; Cabello *et al.*, 2002)

Entretanto, dos estudos acima citados, apenas dois utilizaram métodos estereológicos não-enviesados. Ma *et al.*, em 1999 analisaram a *pars compacta* de 26 indivíduos e encontraram queda no número de neurônios dessa região, da ordem de 9,8% por década (Ma *et al.*, 1999).

Cabello *et al.*, em 2002, analisaram, com métodos não-enviesados, a média estimada de neurônios melanina-positivos e melanina-negativos em toda a SN de 28 indivíduos entre 20 e 90 anos. Encontraram queda estatisticamente significativas entre os neurônios melanina-positivos em função da idade, porém não encontraram diferença no volume total da SN em função desta mesma idade. Já os neurônios melanina-negativos, não apresentaram nenhuma diminuição em função da idade (Cabello *et al.*, 2002).

Por outro lado, Kubis e colegas utilizaram coloração imunoistoquímica para tirosina hidroxilase em 21 controles humanos e não encontraram perda significativa nos neurônios positivos para tirosina-hidroxilase nos indivíduos idosos (Kubis *et al.*, 2000).

Todos os estudos analisados, entretanto, concordam que ainda há muito a ser elucidado entre os mecanismos do envelhecimento na SN.

1.6. Modelos animais

O desenvolvimento da ciência esteve dependente, durante muito tempo, da utilização de modelos animais. Pesquisas médicas e veterinárias dependem, muitas vezes, do uso destes modelos para comprovação de suas teses, auxílio diagnóstico para doenças e garantir a saúde das espécies. Muitos pesquisadores de grande importância, inclusive no contexto do Prêmio Nobel de Fisiologia e Medicina, utilizaram modelos animais em seus estudos (Seelig, 2007; Noro, 1999).

Os modelos animais das doenças humanas associadas ao envelhecimento, têm sido fundamentais para o estudo da fisiopatologia da DP, na verdade apenas imitam, de forma limitada, as interações patogênicas complexas ocorridas nos humanos. Nem mesmo primatas superiores apresentam neuromelanócitos, portanto, também não acontece (espontaneamente) DP idiopática. Estes modelos utilizam técnicas transgênicas ou uso de drogas, neste caso, a doença provocada não é progressiva, torna-se artificial. Neste sentido, é desejável e, mesmo necessário, que estudos mais detalhados sejam feitos com o tecido cerebral humano. Sabe-se que biopsias cerebrais não são procedimentos comumente realizados, pois, podem causar danos aos pacientes além de exigirem cuidados e técnicas especiais. No sentido de facilitar esse tipo de estudo, têm sido utilizados tecidos cerebrais humanos *post mortem*, coletados por bancos de encéfalos como os do Grupo de Estudos em Envelhecimento Cerebral da

Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (BEHGEEC-FMUSP) (Cruz-Sanchez & Tolosa, 1993; Grinberg *et al.*, 2007).

1.7. Banco de Encéfalos Humanos da FMUSP

O BEHGEEC-FMUSP foi criado em 2004 com o objetivo de coletar e armazenar tecidos encefálicos humanos *post mortem*, contando e graças à colaboração do Serviço de Verificação de Óbitos da Capital (SVOC) de São Paulo além da generosidade dos familiares dos pacientes falecidos e levados para este Serviço, isso tem sido possível com grande sucesso. Mais de 1800 encéfalos de indivíduos com mais de 50 anos de idade foram coletados nos últimos sete anos. Grande parte destes encéfalos, de sujeitos sem nenhuma alteração neurológica, tornam diferenciado o BEHGEEC-FMUSP dos outros bancos de encéfalo do mundo, possibilitando o estudo mais aprofundado do envelhecimento humano não-patológico (Grinberg *et al.*, 2007).

O envelhecimento humano está sendo constantemente estudado, porém ainda existe grande dificuldade em delinear-se diferenças no processo natural de envelhecimento do envelhecimento patológico. Isto ocorre também com a região encefálica, incluindo-se a região da substância negra. Diversos estudos estão sendo feitos nesse sentido, porém, sem qualquer conclusão objetiva.

Acredita-se que haja alteração nas características da substância negra durante o processo de envelhecimento humano. Torna-se importante conhecer e descrever o comportamento e as características desta região durante a senescência para que haja base normativa e seja possível comparar características específicas do processo de envelhecimento natural e o envelhecimento patológico ocorrido na SN.

2.Objetivos

2. Objetivos

Caracterizar as alterações que ocorrem na substância negra durante o envelhecimento humano em indivíduos sem sintomas de doença de Parkinson, do ponto de vista citoarquitetônico e tridimensional:

- Determinar se há alteração no número de neurônios, volume da estrutura e densidade celular na substância negra durante o envelhecimento.
- Analisar se há alteração no formato tridimensional da estrutura SN em função da idade.

3. Métodos

3. Métodos

3.1. Casuística

Este projeto faz parte do Projeto Envelhecimento Cerebral (PEC), do Grupo de Estudos em Envelhecimento Cerebral (GEEC) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FM-USP). O GEEC é constituído por grupo multidisciplinar de pesquisadores médicos, enfermeiros, fisioterapeutas, biomédicos e biólogos, que coletam e estudam encéfalos de idosos cognitivamente normais e portadores de doenças neurodegenerativas (Grinberg *et al.*, 2007).

Foram utilizados 18 casos divididos em quatro faixas etárias. Quinze casos foram estudados com métodos estereológicos e três casos com métodos imunoistoquímicos, como descrito na tabela 2. Todos os casos são procedentes do Banco de Encéfalos Humanos do Grupo de Estudos em Envelhecimento Cerebral (BEHGEEC).

Desde 2004, o BEHGEEC coleta casos provenientes do Serviço de Verificação de Óbitos da Capital da Universidade de São Paulo (SVOC-USP). O SVOC-USP é responsável por esclarecer causas de óbito decorrentes de morte natural e realiza cerca de 13.000 autópsias por ano, de indivíduos que faleceram na região metropolitana de São Paulo. Uma entrevista semi-

estruturada foi utilizada para avaliar o estado clínico e funcional do sujeito. As entrevistas foram aplicadas em um informante habilitado (Ferretti *et al.*, 2010).

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq), da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP) e a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa aprovaram o protocolo de número 1166/09 da presente pesquisa, apresentado ao programa de pós-graduação em Fisiopatologia Experimental.

Tab.02: Divisão dos casos para caracterização da substância negra durante o envelhecimento (total = 18 casos) (F= feminino; M= masculino)

Faixa Etária	Denominação	Casos	Método
50 – 59 anos	Pré – idoso	3 F	Estereologia
		2 M	
		1 F	Imunoistoquímica
60 – 69 anos	Idoso I	1F	Estereologia
		2M	
		1F	Imunoistoquímica
70 – 79 anos	Idoso II	2F	Estereologia
		2M	
Acima de 80 anos	Muito idoso	2F	Estereologia
		1M	
		1M	Imunoistoquímica

Foram utilizados os seguintes critérios de inclusão para o presente estudo:

- 1) O indivíduo deve pertencer à casuística do BEHGEEC, isto é,
 - a. Ter idade maior ou igual a 50 anos,
 - b. Ter sido obtido consentimento livre e esclarecido por escrito dos familiares, através do termo pré-estabelecido.
 - c. A causa de morte não pode ter sido cerebral primária, ou seja, não pode ter havido acidente vascular cerebral, traumatismo craniano, meningite, tumores etc.
 - d. Não devem ter passado por situações que pudessem causar lesões cerebrais isquêmicas secundárias, como por exemplo, encefalopatia anóxica de longa duração. Não podem ser portadores de co-morbidades que possam prejudicar a função cognitiva.
 - e. Ser obrigatório existir um cuidador primário ou responsável capaz de fornecer as informações.
- 2) O indivíduo deve apresentar perfil cognitivo sem alterações, que corresponde ao CDR (Clinical Dementia Rating) = 0 (Morris, 1993) e não apresentar sinais clínicos da DP (Tanner *et al.*, 1990).
- 3) Apresentar o mesencéfalo intacto.

3.1.2. Procedimentos do BEHGEEC

A coleta de casos para o BEHGEEC foi realizada no Serviço de Verificação de Óbitos da Capital de São Paulo (SVOC). A equipe do BEHGEEC, fez a triagem e recrutou familiares dos sujeitos para participar da pesquisa. A equipe de enfermagem convidou a família ou o responsável a participar do estudo e quando aceitaram, foram encaminhadas para uma sala reservada localizada também nas dependências do SVOC. Realizou-se a entrevista e os familiares consentiram ou não com a doação do material para a pesquisa. Somente assinou-se o termo de consentimento para liberação da doação depois de nova triagem e análise final dos dados

Se todos os critérios foram preenchidos, o material foi finalmente utilizado para o estudo.

No BEHGEEC, treinou-se equipe de enfermagem para reconhecimento de possíveis fatores que pudessem interferir na resposta dos informantes. Enfermeiros gerontólogos podem ser capacitados, de forma confiável, para identificar e estagiar em pacientes com demência por meio do uso do Questionário para Avaliação Clínica da Demência (CDR) (McCulla *et al.*, 1989; Morris, 1993). Realizou-se a entrevista oralmente, onde os entrevistadores analisaram também se o entrevistado estava em condições físicas e emocionais para a participação no estudo. Ao notar algum tipo de alteração comportamental no informante, o enfermeiro estava apto a excluir esta entrevista. O informante devia conviver intensamente com o paciente há pelo

menos 10 anos. Se o informante tivesse convivido com o paciente menos de 10 anos ou esporadicamente, a entrevista (e o caso), também foi descartada.

A entrevista 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.

A entrevista completa pode ser consultada no anexo I.

Após a confirmação de todos os critérios de inclusão, a equipe de coleta entra na sala de autópsia e aguarda a liberação do material pelos técnicos do SVOC. Após a liberação do material, os procedimentos de fixação foram realizados como descrito abaixo.

Como descrito anteriormente, a seleção de casos é feita de acordo com os protocolos e critérios do BEHGEEC-FMUSP (Grinberg *et al.*, 2007), porém o processamento é realizado de acordo com o projeto em questão, descrito, também, abaixo. Os protocolos estão aprovados pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq).

3.2. Casuística e métodos

3.2.1. Processamento dos encéfalos

Durante a coleta, o tronco cerebral foi removido de forma a mantê-lo intacto. Toda a estrutura foi fixada por imersão em paraformol 4%, não tamponado, por no mínimo 3 semanas. Para a estereologia, os casos foram enviados para o laboratório de pesquisa em morfologia cerebral da clínica de Psiquiatria da Universidade de Würzburg, na Alemanha, coordenado pelo Prof. Dr. Helmut Heinsen. No laboratório da Alemanha, os casos foram processados e o bloco foi embebido em celoidina (nitrocelulose) e seccionado em micrótomo de deslizamento de grande porte, em cortes seriados de 350 µm de espessura. Os cortes são realizados desde a junção bulbomedular até o mesencéfalo, acima dos colículos superiores (Braak & Braak, 1991).

Fig. 10: 1 Vista anterior do tronco encefálico e cerebelo: 1a-Corpos mamilares - região do corte para manutenção do mesencéfalo intacto; 1b-Ponte; 1c-Bulbo. 1d-Cerebelo. 2 Vista superior do tronco encefálico e cerebelo: 2a-Colículos superiores e inferiores; 2b-Cerebelo; 2c-Mesencéfalo (cedida por Helmut Heinsen, 2009).

A embebição em celoidina foi realizada no tecido desidratado progressivamente em etanol (de 50 a 99,5%). Após a desidratação, o tronco encefálico foi colocado em caixa de plástico transparente com celodina 8% (180g de celoidina comercial dissolvida em uma mistura de 750 ml de etanol 100% e 750 ml dietil éter). A caixa foi colocada em dessecador com bomba à vácuo (600 mb) por 48 horas. Desta forma, a celoidina concentrou-se em 16% e o excesso dos vapores de etanol e dietileter foram despejados sem formar bolhas de gás. Depois disso, a caixa de plástico foi colocada em aquário de 30 litros, junto a uma placa de petri com clorofórmio. O aquário foi coberto com uma tampa de vidro. A celoidina tornou-se endurecida pelos vapores do clorofórmio. O bloco de celoidina ficou opaco durante o procedimento de endurecimento, e descolou das paredes da caixa de plástico em aproximadamente 15 dias. O endurecimento final do bloco de celoidina

realizou-se em etanol 70% por 2 dias. Os blocos de celoidina foram cortados e colados (com celoidina 8%) na bandeja do micrótomo. Sobre a bandeja do micrótomo e a base do bloco colada com celoidina, foi colocado etanol 70% para endurecimento, durante 4 horas. Os blocos de celoidina foram seccionados seriadamente em micrótomo de deslizamento (Polycut, Cambridge Instruments, UK) com espessura de 350 μm . Durante o corte, a lâmina do micrótomo e o bloco foram umedecidos com etanol 70%. As fatias foram coletadas e armazenadas em potes com álcool 70% (Heinsen *et al.*, 2000).

Fig.11: 1: Micrótomo preparado para o corte. Note a câmera fotográfica fixada em altura constante. 2 e 3: Bloco colado à bandeja do micrótomo, preparado para o corte. 4: Corte das fatias de 350 μm . 5: Coleta das fatias cortadas, mantidas úmidas em álcool 70%, separadas por papel filtro numerado para manter a ordem das fatias (Arquivo pessoal, 2009).

As fatias foram coradas com galocianina (coloração de Nissl), desidratadas e montadas com resina sintética (Permout®[®], Toulene Solution SP15-500, Fischer Scientific) como descrito em Heinsen and Heinsen, 1991.

Fig.12: Lâmina corada com coloração de Nissl, da região do mesencéfalo com a substância negra aparente na região central, com a grade de 1mm² (Arquivo pessoal, 2011)

Para as reações imunoistoquímicas, os três casos tiveram a SN separadas, embebidas em parafina e cortadas em série em micrótomo de rotação, na espessura de 8µm. Foram separadas seis regiões da SN – duas

fatias da região rostral, duas fatias da região média e duas fatias da região caudal da SN (em relação ao tronco encefálico).

3.2.2. Contagem estereológica

Para o estudo citoarquitetônico da SN, foram utilizadas as fatias coradas com galocianina (Nissl).

Na SN, uma grade transparente de 1mm foi colada sob a área de interesse de forma aleatória em cada lâmina (sempre do lado oposto à lamínula), com fita adesiva, e a superfície foi fotografada para controle da região a ser contada. Essa região foi focalizada no microscópio com objetiva de menor aumento (4x), e as áreas onde se cruzaram as células do núcleo e a grade foram marcadas na fotografia para posterior conferência. Todos os pontos de cruzamento, em todas as fatias em que o núcleo aparece, foram fotografados em 11 escalas de profundidade no microscópio (entre 20 μ m e 0 μ m), em aumento de 400x (objetiva 40:1.0 x 10) (Heinsen *et al.*, 1999).

Fig. 13: 1:Microscópio com câmera acoplada, conectado ao computador para armazenamento das fotografias 2 e 3: Corte da região da substância negra, com todos os pontos de cruzamento marcados (Arquivo pessoal, 2010).

As seqüências de 11 fotografias de cada ponto de cruzamento foram carregadas no programa Image J[®](National Institutes of Mental Health , EUA). Colocou-se uma nova grade com quadrados de $100\mu\text{m}^2$, e utilizou-se apenas o quadrado central da grade para contagem. Determinou-se linhas proibidas, sendo duas linhas do quadrado central, nas quais os núcleos encontrados sobre as mesmas, não serão contabilizados. Com a função “contador de

células” do image J[®], contou-se os nucléolos que aparecem nessa região. Os nucléolos surgidos na primeira fotografia foram sucessivamente descartados. À partir da segunda fotografia, todos nucléolos novos que apareceram foram contados. O contador de células do Image J[®] possibilitou a obtenção do número final de nucléolos de cada sequência de imagens. Uma tabela no ‘Excel’ foi feita para tabulação desses dados, posteriormente utilizados no cálculo total do número de células dos tipos I e II, volume da estrutura e densidade celular da região.

Fig.14: Programa Image J[®], com a grade de 100 μ m² e em vermelho a região central onde os nucléolos são contados e a função contador de células à direita (Arquivo pessoal, 2011).

O número total de neurônios foi calculado com a seguinte equação:

$$N = \sum Q \times \frac{t}{h} \times \frac{1}{asf} \times \frac{1}{ssf} \quad (1)$$

Onde N é o número total de células, $\sum Q$ é a soma de nucléolos contados, t é a espessura média determinada com micrométrico no microscópio, h é a altura do grade, asf é a chamada “área de fração de amostragem”, ou seja, a grade ocular dividida pela área do quadrado da grade transparente e o ssf é o chamado “ponto de fração de amostragem” – ou seja, quantas fatias do núcleo a ser contado foram analisadas (1 se foram analisadas todas). O volume dos núcleos foi estimado multiplicando-se a espessura média do número de disectors (pontos contados) por um quadrado da grade transparente. A densidade neuronal foi calculada dividindo-se o número total de neurônios pelo volume total (Heinsen *et al.*, 1999).

3.2.3. Reconstrução 3D com o auxílio de computador

Durante o corte histológico, as fatias foram fotografadas por câmera digital fixada a altura constante e essas fotos foram utilizadas para identificação dos núcleos da SN com lupa estereológica. As bordas de cada núcleo foram desenhadas manualmente na foto correspondente a cada corte, com o auxílio de uma placa gráfica e foram reconstruídas pelo programa AMIRA 5.2 (Mercury Systems Inc. – Chelmsford, Massachusetts), de acordo com o protocolo descrito em Teipel *et al.* (2005).

Reconstruções em 3D por este método já foram publicadas extensamente (Heinsen *et al.*, 2006; Grinberg & Heinsen, 2007; Teipel *et al.*, 2005).

3.2.4. Caracterização imunoistoquímica

Os estudos imunoistoquímicos foram realizados pelo método bio-ativo de imunoperoxidase. O Anexo II descreve detalhadamente os protocolos.

Todos os protocolos de imunoistoquímica foram aprimorados no BEHGEEC (Alho *et al.*, 2006; Grisoli *et al.*, 2006), sendo que as técnicas de recuperação antigênica, realizadas em panela à vapor, com citrato em pH 6.0 utilizadas, possibilitam uma ótima visualização da proteína marcada.

Foram utilizados os seguintes anticorpos primários: anti-proteína tirosina hidroxilase (TH) (Sigma, St Louis, EUA); anti-calbindina D_{28k} (Swant, Bellinzona - Suíça); PHF-1, antiproteína tau hiperfosforilada (cedido pelo Prof. Dr. P. Davies, Nova Iorque); e MDV-2, anti-proteína α -sinucleína (cedido pelo Prof. Dr. K. Ueda, Tokio), descritos na tabela 2. Dois desses anticorpos são produzidos em coelho (α -sinucleína e calbindina D_{28k}) e dois produzidos em camundongo (PHF-1 e TH). Utilizaram-se controles positivos para α -sinucleína e proteína tau-hiperfosforilada.

Tab. 03: Métodos Imunoistoquímicos utilizados

Anticorpo	Animal produzido	Procedência	Diluição	Recuperação antigênica	Sistema de detecção	Cromógeno
Anti-Tirosina hidroxilase	Camundongo	Sigma. St Louis, EUA	1:500	Panela a vapor, citrato pH 6.0	SABC ²	DAB ²
Anti-Calbindina D _{28k}	Coelho	Swant, Bellinzona (Switzerland)	1:500	Panela a vapor, citrato pH 6.0	SABC ²	DAB ²
Anti-TAU (PHF-1)	Camundongo	Peter Davies	1:1000	Panela a vapor, citrato pH 6.0	SABC ¹	DAB ²
Anti-α-sinucleína (EQV-1)	Coelho	Prof.Dr. Kenji Ueda	1:100	Panela a vapor, citrato pH 6.0	SABC ¹	DAB ²

¹ **SABC** = Streptavidina-Biotina Complexo

² **DAB** = Diaminobenzidina

Os três casos submetidos ao exame imunoistoquímico foram embebidos em parafina e cortados de forma seriada em fatias de 8µm. As fatias histológicas foram dispostas em bandejas para a separação das fatias alvo para imunoistoquímica. Foram utilizadas seis fatias de cada caso, para cada um dos quatro anticorpos. As fatias foram dispostas em lâminas, passaram

pelo processo de retirada da parafina, rehidratação, bloqueio da peroxidase endógena, recuperação antigênica em panela à vapor com citrato pH 6.0, bloqueio de ligações inespecíficas com leite 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 1 hora à temperatura ambiente, marcação com o cromógeno diaminobenzidina e para finalizar, coloração do tecido com hematoxilina de Harris. Depois disso, as lâminas foram montadas com resina sintética.

As lâminas submetidas ao exame imunoistoquímico foram analisadas qualitativamente com ênfase na distribuição topográfica da positividade .

3.2.4. *Análise estatística*

Foram realizados testes não-paramétricos para descrever a amostra, de distribuição normal. Realizou-se a análise descritiva das variáveis quantitativas, utilizando-se como medida central a mediana e como medida de dispersão os valores máximo e mínimo.

Foram analisados: idade, número de neurônios, volume da SN e densidade neuronal (dos lados direito e esquerdo e da somatória de ambos). Foi utilizado o teste de correlação de Spearman para medir a correlação entre número de neurônios, volume e densidade neuronal entre os hemisférios direito e esquerdo, assim como, entre idades e variáveis neuronais. Para associação entre gênero e variáveis neuronais, utilizou-se o teste de Mann-Whitney. O p valor de referência foi menor que 0,05.

4. Resultados

4. Resultados

4.1. Imunoistoquímica

Foram analisados qualitativamente três casos imunocorados com quatro diferentes anticorpos, como descrito na tabela 04.

Para a marcação imunoistoquímica com anticorpo anti-tirosina-hidroxilase, notou-se que há marcação em todas as regiões analisadas, nos três casos. Encontrou-se marcação em forma de fibras, algumas mais longas e outras mais curtas. Na região rostral da SN (considerada como região 1), encontrou-se feixes mais curtos na região ao redor das células com neuromelanina. Nas regiões centrais da SN, visualizou-se grande número de feixes longos, muitos envolvendo os neuromelanócitos, e um maior número de fibras. Em algumas regiões, (região 1 e 3 do caso 3), avistou-se os feixes distribuídos como “teias de aranha”, mesclando feixes curtos e longos. A maior parte das fibras encontradas nas regiões caudais da SN, estavam localizadas nas partes mais laterais do corte, sendo a região onde estão dispostos os neuromelanócitos habitualmente, neste caso havia menos quantidade de fibras (Fig. 15). Encontrou-se, também, grande quantidade de feixes de tirosina-hidroxilase nas 6 regiões analisadas (rostral 1, rostral 2, média 1, média 2, caudal 1, caudal 2) nos três casos imunocorados.

Tab.04: Descrição das colorações imunoistoquímicas em três mesencéfalos de casos sem sintomas da doença de Parkinson, com quatro tipos de anticorpos.

Anticorpo	Região *	Caso 1 56 anos feminino	Caso 2 69 anos feminino	Caso 3 88 anos Masculino
Anti - TH	1	+	+	+++
	2	++	+	++
	3	++	++	+++
	4	+++	+++	+
	5	+++	++	+
	6	+	+	++
PHF-1	1	-	-	-
	2	-	-	-
	3	-	-	-
	4	-	-	-
	5	-	-	-
	6	-	-	-
Anti-Calb D _{28K}	1	+	+	+
	2	+	+	+
	3	+	+	+
	4	+	+	+
	5	+	+	+
	6	+	+	+
MDV-2	1	-	-	-
	2	-	-	-
	3	-	-	-
	4	-	-	-
	5	-	-	-
	6	-	-	-

*regiões 1 e 2 → parte rostral da SN; regiões 3 e 4 → parte média da SN; regiões 5 e 6 → parte caudal da SN.

+ → quanto maior a quantidade de sinais positivos, maior é a presença de marcadores imunoistoquímicos naquela região.

Fig.15: Região imunocorada com o anticorpo anti-tirosina hidroxilase, em objetiva de menor aumento (4x). Nota-se a presença de feixes longos e curtos, e dos neuromelanócitos.

Para os anticorpos anti-proteína tau hiperfosforilada (PHF-1 e anti α -sinucleína (MDV-2), todos os casos e regiões foram negativos. Não foram encontrados acúmulos de proteína tau hiperfosforilada em nenhum dos casos (emaranhados neurofibrilares, neuritos ou inclusões gliais). Também não foram encontrados corpúsculos ou neuritos de Lewy em nenhum dos casos analisados.

Para o anticorpo anti-Calbindina D_{28k}, encontrou-se uma fraca marcação em forma de feixes. Os feixes foram encontrados ao redor da região onde se apresentam os neuromelanócitos (Fig. 16). As regiões marcadas positivamente com anti-calbindina D_{28k} foram as mesmas marcadas positivamente para tirosina-hidroxilase.

Fig. 16: Região imunocorada com o anticorpo anti Calbindina D_{28K}, com objetiva de menor aumento (4x). Nota-se a presença de feixes ao redor da região onde estão presentes os neuromelanócitos.

4.2. Estereologia

Para análise estereológica da substância negra, determinou-se a utilização de uma grade de 1mm^2 para possibilitar a contagem de disectors suficiente para possibilitar o cálculo do número de neurônios, volume da estrutura e densidade neuronal. Fotografou-se aproximadamente 6.000 imagens em cada caso.

Foram analisados estereologicamente 15 casos, sendo 8 mulheres (53,3%) e 7 homens (46,7%) (Fig.17).

Fig.17: Gráfico de porcentagem do gênero dos casos analisados.

Após testes estatísticos de distribuição, verificou-se que todas as variáveis (número de neurônios, volume da estrutura e densidade) distribuem-se de forma normal. Porém, testes não-paramétricos são os mais adequados para analisar amostra com poucos casos. A mediana da idade encontrada foi de 66 anos, sendo o valor mínimo de 50 anos e o valor máximo de 91 anos. No hemisfério direito da SN, encontrou-se mediana de 244.009 neurônios tipo I e II, sendo o valor mínimo de 155.918 células e o valor máximo de 370.194 células; a mediana do volume encontrada foi de 91 mm³, com o valor mínimo de 66,9 mm³ e o máximo de 136,5 mm³; a mediana da densidade celular encontrada foi de 2.714,2 cel/mm³, sendo o valor mínimo de 1434,5 cel/mm³ e o máximo de 5.537,7 cel/mm³. No hemisfério esquerdo da SN, a mediana no número total de neurônios do tipo I e II foi de 231.909 células, sendo que o valor mínimo encontrado foi de 155.645 e o valor máximo de 413.660 células, a mediana do volume encontrada foi de 93,8 mm³, sendo que o valor mínimo foi de 67,2mm³ e o valor máximo de 130,9mm³. A mediana da densidade de neurônios do tipo I e II foi de 2.474,5 cel/mm³, o valor mínimo de 1.771,7 cel/mm³ e o máximo de 5.112 cel/mm³. A mediana do número total de neurônios do tipo I e II encontrada foi de 504.575 células, sendo o valor mínimo de 348.662 células e o valor máximo de 672.172 células. A mediana do volume total encontrada foi de 190,8mm³, sendo o valor mínimo de 134,1mm³ e o valor máximo de 267,4mm³. A mediana da densidade total média encontrada foi de 2.517,4 cel/mm³, sendo o valor mínimo de 1.603,1 cel/mm³ e o valor máximo de 5.015,7 cel/mm³. Todos esses dados encontram-se agrupados na tabela nº

05. Os valores encontrados em todos os casos estão agrupados na tabela nº 06.

Tab.05: Mediana e valores máximo e mínimo da idade, número de neurônios, volume e densidade dos hemisférios direito e esquerdo, ambos os lados

Variável		Mediana	Mínimo	Máximo
Idade (anos)		66	50	91
Hemisfério Direito	Nº de neurônios (cel)	244.009	155.918	370.194
	Volume (mm³)	91	66,9	136,5
	Densidade (cel/mm³)	2.714,2	1.434,5	5.537,7
Hemisfério Esquerdo	Nº de neurônios (cel)	231.909	155.645	413.660
	Volume (mm³)	93,8	67,2	130,9
	Densidade (cel/mm³)	2.474,5	1.771,7	5.112
Total	Nº de neurônios (cel)	504.575	348.662	672.172
	Volume (mm³)	190,8	134,1	267,4
	Densidade (cel/mm³)	2.517,4	1.603,1	5.015,7

Tab. 06: Número de neurônios, volume e densidade das células da substância negra (SN) de indivíduos sem sintomas motores da doença de Parkinson

*os primeiros valores correspondem ao lado direito

Caso	Idade	Gênero	Número de neurônios (cel)	Volume (mm ³)	Densidade (cel/mm ³)	Número total de neurônios	Volume total (mm ³)	Média densidade (cel/mm ³)
1	50	F	289.380	88,8	3258,78	586.531	189,60	3.103,36
			297.151	100,8	2947,93			
2	55	F	213.061	96,6	2205,59	428.621	194,95	2.198,68
			215.560	98,35	2191,76			
3	57	F	259.118	90,44	2865,07	540.424	201,40	2.700,14
			281.306	110,96	2535,2			
4	50	M	200.839	116,28	1727,19	383.340	210,12	1.836,00
			182.501	93,84	1944,81			
5	52	M	274.201	107,1	2560,24	504.575	200,20	2.517,36
			230.374	93,1	2474,47			
6	60	F	214.053	127,6	1677,52	432.908	230,00	1.907,39
			218.855	102,4	2137,25			
7	65	M	370.194	66,85	5537,68	672.172	134,05	5.015,70
			301.978	67,2	4493,72			
8	66	M	195.804	136,5	1434,46	427.713	267,40	1.603,06
			231.909	130,9	1771,65			
9	74	F	182.863	81,2	2252	348.662	162,05	2.151,35
			165.799	80,85	2050,7			
10	78	F	282.828	94,5	2992,89	568.137	174,30	3.284,10
			285.309	79,8	3575,3			
11	71	M	244.009	89,25	2733,99	555.678	195,65	2.831,61
			311.669	106,4	2929,22			
12	77	M	268.431	69,02	3889,18	424.076	138,04	3.072,13
			155.645	69,02	2255,07			
13	82	F	237.762	70,72	3362,02	651.422	151,64	4.236,99
			413.660	80,92	5111,96			
14	91	F	155.918	91	1713,38	360.126	187,95	1.909,85
			204.208	96,95	2106,32			
15	83	M	274.684	101,2	2714,26	541.639	190,80	2.846,84
			266.955	89,6	2979,41			

Após a realização da análise univariada com o teste de correlação de Spearman, verificou-se que há uma correlação significativa moderada entre número de neurônios e volume da SN entre os hemisférios D e E ($p=0,04$ em ambos) e uma correlação forte de densidade, encontrado $p<0,001$ (p valor considerado foi menor que 0,05) – tabela 07.

Tab.07: Correlação entre número de neurônios, volume e densidade neuronal entre os hemisférios direito e esquerdo (teste de correlação de Spearman)

Variável	Rho	p
Nº de neurônios	0,55	0,04
Volume	0,55	0,04
Densidade	0,82	<0,001

Nos gráficos 18, 19 e 20, nota-se a pequena diferença do número de neurônios do tipo I e II, volume da estrutura e densidade neuronal entre os hemisférios direito e esquerdo da SN na maioria dos casos.

Fig.18: Gráfico da correlação do número de neurônios entre os hemisférios direito e esquerdo, por caso.

Fig.19: Gráfico da correlação do volume da estrutura entre os hemisférios direito e esquerdo, por caso.

Fig.20: Gráfico da correlação da densidade entre os hemisférios direito e esquerdo, por caso.

Na análise da correlação entre idade e as variáveis neuronais (volume, número de neurônios e densidade), não houve correlação estatisticamente significativa, porém, houve uma tendência de correlação entre volume total da SN e idade ($p=0,06$) (tabela 08).

Tab.08: Análise da correlação entre idade e variáveis neuronais (teste de correlação de Spearman)

Variável	Rho	p
No de neurônios (D)	-0,14	0,63
Volume (D)	-0,27	0,34
Densidade (D)	0,12	0,68
No de neurônios (E)	0,05	0,85
Volume (E)	-0,37	0,18
Densidade (E)	0,23	0,41
No de neurônios	-0,03	0,93
Volume	-0,49	0,06
Densidade	0,16	0,56

Como demonstra o gráfico 21, não há tendência de diminuição e nem de aumento no número de neurônios da SN com o aumento da idade, quando calculado para ambos os gêneros. A linha de regressão linear mantém a altura de aproximadamente 500.000 neurônios totais na SN.

Fig. 21: Gráfico de correlação entre número total de neurônios da substância negra e idade.

No gráfico 22, nota-se a tendência de diminuição no volume total da SN quando calculado para ambos os gêneros, com o aumento da idade, existe queda que vai de aproximadamente 210 mm³ aos 50 anos, caindo até aproximadamente 160mm³ aos 90 anos, porém sem significância estatística.

Fig.22: Gráfico de correlação entre volume total da substância negra e idade

No gráfico 23, nota-se tendência ao aumento da densidade total média, quando calculado para ambos os gêneros, porém sem significância estatística, subindo de aproximadamente 2.500 cel/mm³ aos 50 anos para aproximadamente 3.000 cel/mm³ aos 90 anos.

Fig.23: Gráfico de correlação entre densidade total média de neurônios e idade.

Para o gênero feminino, não há correlação estatisticamente significativa, mas há tendência de queda no número total de neurônios, de aproximadamente 510.000 células aos 50 anos, para aproximadamente 480.000 células aos 90 anos, como descrito no gráfico 24.

Fig.24: Gráfico de correlação entre número total de neurônios da substância negra em mulheres e idade.

No gráfico 25, nota-se a pequena tendência à diminuição do volume total da SN em mulheres, de aproximadamente 200mm³ aos 50 anos para 160mm³ aos 90 anos.

Fig.25: Gráfico de correlação entre volume total da substância negra em mulheres e idade.

Em homens, nota-se a tendência ao aumento no número total de neurônios, de aproximadamente 470.000 células aos 50 anos para 540.000 células aos 90 anos (gráfico 26).

Fig.26: Gráfico de correlação entre número total de neurônios da substância negra em homens e idade

Para o volume total da SN no gênero masculino, nota-se no gráfico XX uma tendência à diminuição do volume, de aproximadamente 210 mm³ aos 50 anos, para 170 mm³ aos 90 anos (gráfico 27).

Fig.27: Gráfico de correlação entre volume total da substância negra em homens e idade

4.3. Reconstrução tridimensional

Para a reconstrução tridimensional, as fotos tiradas em altura constante foram importadas para o programa AMIRA e o contorno na região da SN desenhado manualmente, com o auxílio de uma placa gráfica conectada ao computador. Os desenhos manuais são tratados pelo programa AMIRA e este mostra como seria o núcleo desenhado em cada fatia, tridimensionalmente. Na fig.28, pode-se notar a localização da SN no tronco encefálico, pois além do desenho do núcleo também o fora todo o contorno do tronco. A SN está localizada na parte ventral do mesencéfalo.

Fig.28: Contorno do tronco encefálico com a substância negra na parte frontal do mesencéfalo (preto e branco). Vê-se o bulbo, a ponte, o mesencéfalo, o nervo ocular e o *locus coeruleus* na parte posterior da ponte.

Na maioria dos casos, pode-se notar que a SN dispõe-se como um “prato” de células em cada hemisfério, com orifício maior na parte central superior de cada lado. Além de outros orifícios menores, dando a impressão de “peneira”.

No caso 1, foi realizada a reconstrução detalhada da SN, mostrando a *pars difusa*, a *pars compacta* e uma região que foi chamada de “indefinida”. Nota-se que a *pars compacta* (preto) (149,126 mm³) tem aproximadamente o mesmo tamanho da *pars difusa* (branco) (157,427 mm³). A região indefinida localiza-se internamente, entre os dois hemisférios da SN. No caso 1 também foi desenhado o *locus coeruleus*, para uma melhor noção de localização da SN.

Fig.29: Reconstrução tridimensional da substância negra do caso 1, detalhada: em preto, a região da *pars compacta*, em branco, a região da *pars difusa* e em azul a região aqui denominada de “indefinida”. Em cinza, o *locus coeruleus*. A – Vista anterior; B – Vista posterior.

No caso 2, vê-se um grande orifício central no lado esquerdo além de alguns outros orifícios bem menores, no lado direito vê-se dois orifícios centrais médios e diversos pequenos orifícios espalhados pela área negra. Encontram-se também agrupamentos satélites ao redor do agrupamento principal.

Fig.30: Reconstrução 3D do caso 2, dois “pratos” de células com orifícios na região central e pequenos agrupamentos satélites ao redor do agrupamento principal. A – Vista posterior, região dorsal da substância negra B- Vista superior, região rostral da substância negra. D- hemisfério direito E- hemisfério esquerdo.

No caso 3, nota-se apenas um grande orifício central em cada hemisfério da SN. Os orifícios tem formato da letra C e do lado esquerdo há uma ilha de células caudal à massa central.

Fig. 31: Reconstrução 3D do caso 3, os dois “pratos” de células com um orifício central em cada hemisfério da substância negra. Note o agrupamento satélite, caudal à massa central, na figura superior. A – Vista posterior (região dorsal) B – Vista superior (região rostral). D – hemisfério direito E – hemisfério esquerdo.

No caso 4, encontramos um orifício central maior, também em formato da letra C em ambos os hemisférios, e dois orifícios menores espalhados pela região toda.

Fig.32: Reconstrução tridimensional do caso 4, com um grande orifício em formato de letra C no centro de cada hemisfério da substância negra, e apenas dois orifícios menores na região mais densa da SN. A – Vista posterior (região dorsal) B- Vista superior (região rostral) D – Hemisfério direito E- Hemisfério esquerdo

No caso 5, nota-se uma pequena diferença de constituição nos dois hemisférios da SN. Do lado direito (na figura inferior, lado esquerdo), apresentam-se dois orifícios em forma de vibrião e mais dois orifícios redondos. Já no lado esquerdo, encontram-se diversos orifícios por toda a região da SN, porém dois orifícios maiores na região central rostral da SN.

Fig.33: Reconstrução tridimensional do caso 5, com diferenças de constituição entre os hemisférios direito e esquerdo. O hemisfério direito, com quatro orifícios (dois círculos e dois em forma de vibrião). O hemisfério esquerdo com diversos orifícios pequenos e dois maiores na região central-superior. A – Vista posterior (região dorsal) B- Vista superior (região rostral) D- Hemisfério direito E- Hemisfério esquerdo.

No caso 6, há apenas pequenos orifícios espalhados na região da SN, porém há 3 grandes ranhuras na parte interna (em direção à divisão entre os hemisférios direito e esquerdo), em ambos os hemisférios. Vê-se também pequenos pontos de SN na região externa, ao redor do hemisfério esquerdo da SN.

Fig. 34: Reconstrução tridimensional do caso 6, com pequenos orifícios em ambos os hemisférios, e 3 grandes ranhuras que se iniciam na parte entre os dois hemisférios da SN. A – vista dorsal (região posterior do lado esquerdo, e lateral do lado direito) B- Vista superior (região rostral) D- Hemisfério direito E- Hemisfério esquerdo.

No caso 7, encontra-se um grande orifício em cada hemisfério da SN, e outros diversos pequenos orifícios. As bordas da estrutura são irregulares.

Fig. 35: Reconstrução tridimensional do caso 7, com um grande orifício em cada hemisfério, e diversos pequenos orifícios ao redor deste grande. As bordas da estrutura são irregulares. A – Vista posterior (região dorsal) B- Vista superior (região rostral) D- Hemisfério direito E- Hemisfério esquerdo

O caso 8 possui diversos orifícios em ambos os hemisférios, sendo 3 de tamanho um pouco maior em relação à maioria. Algumas ranhuras laterais e o núcleo com borda também irregular.

Fig. 36: Reconstrução tridimensional do caso 8, onde encontram-se diversos orifícios. Em ambos os hemisférios, três orifícios com o tamanho relativamente maior do que os outros, além de ranhuras laterais e as bordas dos dois hemisférios extremamente irregulares. A – Vista posterior (região dorsal) B- Vista superior (região rostral) D- Hemisfério direito E- Hemisfério esquerdo.

No caso 9, ambos os hemisférios são mais regulares, com apenas dois orifícios em cada . Um orifício de tamanho maior, e outro menor.

Fig. 37: Reconstrução tridimensional do caso 9, com apenas dois orifícios em cada hemisfério. A – Vista posterior (região dorsal) B- Vista superior (região rostral) D- Hemisfério direito E- Hemisfério esquerdo.

No caso 10, nota-se um grande orifício no hemisfério direito, e também uma grande ranhura no hemisfério esquerdo. Além disso, a borda superior dos dois hemisférios é irregular, e em ambos encontram-se pequenos orifícios na região central.

Fig.38: Reconstrução tridimensional do caso 10, com grandes orifícios (lado esquerdo encontra-se uma ranhura). Ao redor desses grandes orifícios, diversos pequenos orifícios centrais, e a parte superior do núcleo com bordas irregulares. A – Vista posterior (região dorsal) B- Vista superior (região rostral) D- Hemisfério direito E- Hemisfério esquerdo.

No caso 11, nota-se uma superfície regular se comparada aos outros casos, com orifícios de tamanho médio na parte centro-superior e poucos pequenos orifícios ao redor dessa região.

Fig.39: Reconstrução tridimensional do caso 11, com borda relativamente regular. Orifícios centro-superiores de tamanho médio em ambos os hemisférios. A – Vista posterior (região dorsal) B- Vista superior (região rostral) D- Hemisfério direito E- Hemisfério esquerdo.

No caso 12, encontram-se grandes orifícios centrais, principalmente do lado esquerdo. No lado direito, encontra-se um grande orifício e orifícios médios.

Fig.40: Reconstrução tridimensional do caso 12, com grandes orifícios e ranhuras no hemisfério esquerdo. No hemisfério direito, encontram-se dois orifícios médios e um orifício grande. A – Vista posterior (região dorsal) B- Vista superior (região rostral) D- Hemisfério direito E- Hemisfério esquerdo.

No caso 13, encontram-se ranhuras nos dois hemisférios, porém apenas poucos pequenos orifícios na parte mais densa da SN. Encontra-se também uma ilha de células com neuromelanina no hemisfério direito rostral.

Fig.41: Reconstrução tridimensional do caso 13, com grandes ranhuras em ambos os hemisférios, uma ilha de neuromelanócitos na parte rostral direita e apenas dois orifícios pequenos em cada parte mais densa da substância negra. A – Vista posterior (região dorsal) B- Vista superior (região rostral) D- Hemisfério direito E- Hemisfério esquerdo.

No caso 14, nota-se um grande orifício no centro do hemisfério esquerdo, e diversos pequenos orifícios no centro do hemisfério direito.

Fig.42: Reconstrução tridimensional do caso 14, onde nota-se um grande orifício central no hemisfério esquerdo, e dois pequenos orifícios ao redor dele. No hemisfério direito, encontram-se diversos pequenos orifícios centrais. A – Vista posterior (região dorsal) B- Vista superior (região rostral) D- Hemisfério direito E- Hemisfério esquerdo.

No caso 15, nota-se dois grandes orifícios no centro dos dois hemisférios. No hemisfério direito, nota-se também três orifícios menores ao redor dos dois grandes, e no hemisfério esquerdo encontra-se uma ilha de neuromelanócitos na região superior.

Fig. 43: Reconstrução tridimensional do caso 15, com dois grandes orifícios no centro de cada hemisfério, sendo que no hemisfério direito pode-se encontrar mais três pequenos orifícios ao redor dos maiores. No hemisfério esquerdo, encontra-se uma ilha de neuromelanina na região superior do núcleo. A – Vista posterior (região dorsal) B- Vista superior (região rostral) D- Hemisfério direito E- Hemisfério esquerdo.

5. Discussão

5. Discussão

Nesse estudo, procurou-se caracterizar a substância negra humana durante o processo de envelhecimento, utilizando-se técnicas neuroanatômicas modernas aliadas aos recursos computacionais. Notou-se que há estabilidade do número de neurônios ao longo das décadas, mas uma tendência à diminuição do volume da estrutura.

Durante a análise estereológica, não se verificou alteração estatisticamente significativa no número absoluto de neurônios, volume da estrutura e densidade neuronal da substância negra em função do aumento da idade. Não houve alteração estatisticamente significativa, porém, viu-se tendência à diminuição no volume da SN em relação ao aumento da idade. Notou-se, também relação estatisticamente significativa entre os hemisférios direito e esquerdo de cada caso. Observou-se que apesar do número de neurônios, volume e densidade de cada hemisfério da SN ser diferente, há uma correlação entre os dois valores. A análise das variáveis neuronais em função do aumento da idade, também foi realizada para os diferentes gêneros, e não houve significância estatística.

Na reconstrução tridimensional, as diferenças entre os quinze indivíduos ficaram bem aparentes. Porém, todos os casos apresentam semelhanças, como na presença de bordas irregulares e orifícios na parte interna de cada hemisfério.

5.1. Contagem Estereológica

Em função da importância do tema, diversos estudos se propuseram a descrever detalhadamente a morfologia normal da substância negra no encéfalo humano (Bauer, 1909; Hassler, 1937; Olszewski & Baxter, 1982). Entretanto, há muitas discrepâncias na literatura sobre as subdivisões desse núcleo e sobre as diferenças entre os tipos neuronais (Braak & Braak, 1986; McRitchie *et al.*, 1995; Fearnley & Lees, 1991; van Domburg & ten Donkelaar, 1991; Ma *et al.*, 1999; Cabello *et al.*, 2002; Stark & Pakkenberg, 2004). Essa falta de consenso dificulta a caracterização das alterações sofridas pela SN ao longo da vida.

Nesse estudo, utilizou-se das definições propostas por Braak & Braak e por Olszewski & Baxter (Braak & Braak, 1986; Olszewski and Baxter, 1982). Essa escolha foi baseada na similaridade entre os achados citoarquitetônicos e imunoistoquímicos por nós realizados, com as descrições citadas. Os estudos citados possuem a descrição do núcleo e das células da região mais semelhantes ao encontrado no presente estudo.

Os casos foram submetidos à análise estereológica pela técnica do disector, realizadas em cortes seriados do tronco encefálico. Essa técnica é consagrada para determinação do número de neurônios, volume da região e densidade dos neurônios (Schmitz & Hof, 2005). Para essas estimativas, são utilizados sistemas-teste com área e número de pontos conhecidos e

posteriormente computados. Utilizamos um sistema teste em forma de grade, com 1 mm^2 .

Consideramos ponto forte desse estudo a utilização de três planos de corte (sagital, frontal e horizontal) para as devidas contagens. Muitos estudos utilizam apenas o corte transversal, dificultando a análise de determinados grupos celulares e assim podendo não representar adequadamente a perda de neurônios (Mc Ritchie *et al.*, 1995).

No estudo atual, foi idealizado caracterizar a SN utilizando-se dos métodos considerados não enviesados, com uso de material visando evitar limitações encontradas em estudos prévios. Para isso, foram utilizadas fatias histológicas grossas, ideais para estudos estereológicos e citoarquitetônicos (Heinsen *et al.*, 2000; Heinsen *et al.*, 2004).

O número total de células, volume da SN e densidade neuronal estão dentro dos padrões descritos na literatura, com valores entre 348.666 e 672.172 neurônios totais, volume entre $134,1$ e $267,4\text{ mm}^3$ e densidade entre $1.603,1$ e $5.015,7\text{ cel/mm}^3$.

Analisando-se o conjunto dos resultados discriminados por faixa etária, encontrou-se tendência a diminuição do volume do núcleo ao longo da idade, mas não foi encontrado decréscimo estatisticamente significativo no número de neurônios e densidade celular.

Diversos estudos histológicos reportaram a redução do volume e número de neurônios da SN, tanto em primatas (Pakkenberg *et al.*, 1995)

quanto em humanos (Ma *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 2000; Cabello *et al.*, 2002; Chu *et al.*, 2002).

A grande maioria dos trabalhos na literatura não detectou alterações no volume total da SN, no entanto, detectou queda no número de neurônios durante o envelhecimento.

Tab 09: Resumo dos artigos analisados e comparados para caracterização da SN humana durante o envelhecimento.						
	Sujeitos	Idades	Tipo de estudo	Número de neurônios	Volume	Densidade
McGeer <i>et al.</i> 1977	28		Estereológico com viés	perda de 7% por década	Não analisada	Não analisada
Mann <i>et al.</i> 1984	67	entre 11 e 97 anos	Estereológico com viés	perda de 35%	Não analisada	Não analisada
Tooyama <i>et al.</i> 1994	11	entre 15 e 82 anos	Contagem densidade celular	diminuição lenta	Não analisada	diminuição lenta
Pakkenberg <i>et al.</i> 1991	7	entre 71 e 95 anos	Estereológico não enviesado	Entre 300.000 e 700.000 neurônios pigmentados	S/ alteração significativa	redução
Fearnley & Lees 1991	36	entre 21 e 91 anos	Estereológico com viés	perda de 4,7% por década	Não analisada	Não analisada
Muthane <i>et al.</i> 1998	84	entre 5 e 80 anos	Estereológico com viés	não notaram perda significativa	Não analisada	Não analisada
Ma <i>et al.</i> 1999	26	entre 17 e 90 anos	Estereológico não enviesado	perda de 9,8% por década	S/ correlação significativa	redução de 7,4% por década
Kubis <i>et al.</i> 2000	21	entre 44 e 110 anos	Imunoistoquímico	não notaram perda significativa	Não analisada	Não analisada
Cabello <i>et al.</i> 2002	28	entre 19 e 92 anos	Estereológico não enviesado	de 400.000 para 250.000	aumento densidade neuronal	Não analisada

McGeer *et al.* (1977) detectaram perda neuronal de 7% das células da SN por década, de 28 indivíduos normais em função do envelhecimento. Mann *et al.* (1984) estudaram 67 controles, entre 11 e 97 anos, ao nível da origem do terceiro nervo e reportaram uma perda neuronal de aproximadamente 35%. Tooyama *et al.* (1994) encontrou diminuição lenta nos neurônios pigmentados

da SN em 11 controles, entre 15 e 82 anos. Porém, nenhum dos estudos desse grupo fez uso de técnicas estereológicas não enviesadas.

Fearnley & Lees (1991) estudaram 36 casos controles entre 21 e 91 anos e encontraram uma queda no número de neurônios em função da idade de 33%. Muthane *et al.*, em 1998 realizaram um estudo na Índia comparando resultados da população de seu país com os resultados de Fearnley & Lees (1991) do Reino Unido e de McGeer *et al.*(1977). O estudo de Muthane *et al.*(1998) não encontrou diferença significativa no número de neurônios em função da idade, resultado diferente do encontrado por Fearnley and Lees (1991), utilizando a metodologia semelhante. Ambos os estudos analisaram apenas a região caudal da SN, perto da região emergente do nervo oculomotor. Especula-se que a diferença encontrada nos resultados entre o presente estudo e os estudos acima descritos se deva ao fato dos estudos mais antigos não terem usado métodos não enviesados, pois analisaram apenas parte da estrutura.

Apesar da importância dos trabalhos acima citados, especialmente o de McGeer *et al.* (1977), a metodologia utilizada foi demonstrada como sendo sujeita a viéses importantes

Por outro lado, Pakkenberg *et al.*, em 1991 utilizando técnicas estereológicas não enviesadas , descreveram 7 casos controles entre 71 e 95 anos e encontraram entre 300.000 e 700.000 neurônios pigmentados. O estudo, como o presente, também mostrou redução não significativa no volume e na densidade celular.

. Apesar de terem utilizados métodos de contagem adequados, Pakkenberg *et al.*, assumem que os números mostrados no trabalho apenas dão idéias de magnitude do número de células presentes na região, pois há inúmeras alterações que ocorrem *post mortem*, incluindo desde mudanças na dimensão do tecido durante a fixação, desidratação, inclusão em parafina e corte. Por isso, os valores citados pelo artigo apenas estimam, mas não representam valores reais (Pakkenberg *et al.*, 1991). Tendo em vista essas limitações encontradas em pesquisas anteriores, no presente estudo, foram utilizadas técnicas de fixação, inclusão e corte específicos para diminuir ao máximo o viés causado pelas alterações descritas.

Em 1999, Ma *et al.* realizaram um estudo utilizando estereologia não-enviesada para contagem do número de neurônios nigrais durante o envelhecimento. Foram analisadas a *pars compacta* da SN de 26 casos controles, entre 17 e 90 anos. Os casos tiveram apenas a metade direita fixada e os blocos foram seccionados em fatias de 11µm. Contou-se uma fatia a cada 40. A média do volume encontrado, foi de 172.8 +/- 34.1 mm³ e a queda no número de células foi de 300.000 aos 17 anos para 110.000 aos 90 anos (apenas um hemisfério). Ao analisar o gráfico apresentado no artigo, nota-se que aos 50 anos, os indivíduos apresentavam aproximadamente 180.000 células. Os resultados sugerem uma queda de 9,8% no número de neurônios pigmentados na *pars compacta* da SN durante o envelhecimento (Ma *et al.*, 1999). Uma das diferenças do presente estudo e do acima descrito é a região analisada. Ma e colegas analisaram apenas a *pars compacta* da SN, enquanto analisa-se além da *pars compacta*, a *pars reticulata*. Aqui, foram contados

todos os neurônios com grânulos, dos tipos I e II presentes no campo de visão. É possível que no presente trabalho não tenha sido encontrada a redução no número de neurônios graças ao estudo de casos à partir dos 50 anos de idade.

Ao estudarem 28 indivíduos masculinos entre 19 e 92 anos, Cabello *et al.*(2002) verificaram uma queda de aproximadamente 400.000 células aos 19 anos para 250.000 células aos 92 anos. Foi utilizado o método do dissector óptico e metade dos casos tiveram o hemisfério esquerdo contado e a outra metade o lado direito. Os casos foram embebidos em ágar e cortadas em secções de 1mm. Dessas secções de 1mm, a cada três fatias, uma foi cortada em secções de 40µm. A cada 20 dessas secções, uma foi corada com Hematoxilina-Eosina e contada (Cabello *et al.*, 2002). O estudo de Cabello e colegas foi o mais semelhante ao presente estudo, em termos metodológicos. Porém, a espessura das secções pode trazer grande diferença nos resultados finais, pois quanto mais espessa a lâmina histológica, mais precisa é a demarcação das bordas da estrutura.

Kubis *et al.* que analisaram a presença de neurônios TH- positivos com técnicas imunoistoquímicas em 21 indivíduos entre 44 e 110 anos, não notaram perda significativas nos neurônios dopaminérgicos (Kubis *et al.*, 2000).

Apesar da grande maioria dos estudos apontarem queda no número de neurônios da SN durante o envelhecimento, a grande maioria deles não utilizou técnicas estereológicas não enviesada, prejudicando a interpretação dos resultados. No presente, cada estrutura de SN apresentou aproximadamente 30 fatias no plano horizontal e 60 fatias no plano sagital. Em cada caso, cerca

de 250 pontos, com 11 escalas de profundidade cada, foram fotografados e contados. Todos os outros estudos descritos contaram aproximadamente uma a cada 20 ou 40 fatias, de no máximo 11 μm .

Alguns autores (Braendgaard & Gundersen, 1986; Pakkenberg *et al.*, 1991) acreditam que apenas estudos que tenham estimado o número total de neurônios baseados tanto na densidade quanto no volume encontrado do tecido processado, podem realmente desenhar alguma conclusão concreta. O presente estudo estimou o número total de neurônios pigmentados baseado na densidade e no volume da SN. Assim, têm-se o valor exato das lâminas do tecido além desse método causar mínimas alterações ocorridas durante os procedimentos de processamento histológico desta forma, impedindo influenciar nos resultados.

Métodos estereológicos exigem que a amostragem seja randomizada de forma uniforme e aleatória, para que a contagem dos disectors (número de pontos) forneça estimativa de densidades numéricas obtidas através de métodos baseados em princípios imparciais e precisos,. Visando comparar resultados (Cabello *et al.*, 2002)

Em resumo, os resultados contrastantes dos estudos da SN podem ser atribuídos à grande número de variáveis, como diferenças no protocolo de processamento e coloração, técnicas diferentes de identificação celular (neuromelanina ou imunoistoquímica) e diferenças na delineação da região da SN. Essas diferenças só serão minimizadas se aplicado um critério extremamente rigoroso de análise, para possibilitar mais conclusões objetivas

em relação ao envelhecimento da SN (Gundersen *et al.*, 1988). Os números de células só podem ser comparados se dados como números totais, não como densidade celular. Diferentes regiões da SN possuem diferentes densidades. Além disso, o envelhecimento ocorre de forma heterogênea nas diferentes populações de neurônios da SN.

5.2. Imunoistoquímica

Nesse trabalho o estudo imunoistoquímico teve como objetivo caracterizar as possíveis alterações bioquímicas da SN e utilizar esses resultados para melhor compreender a citoarquitetura da mesma, além de tentar confirmar dados de literatura e escolher a definição citoarquitetônica e ser utilizada nas contagens estereológicas e reconstruções da SN.

Os três casos imunocorados com quatro anticorpos apresentaram a distribuição de proteínas semelhante ao descrito na literatura (Mori, 2006; Mendez *et al.*, 2005; Volkow *et al.*, 1995; Arranz *et al.*, 1996; Goedert, 2003; Damier *et al.*, 1999).

5.2.1. Anti tirosina-hidroxilase

A tirosina hidroxilase é precursora da dopamina e está presente nos neuromelanócitos com funcionamento regular. Por isso, na região da SN espera-se encontrar grande quantidade de fibras coradas com anticorpo anti

tirosina-hidroxilase, como se observa na figura XX dos resultados. A TH é utilizada como marcador imunoistoquímico para a dopamina, após sofrer hidroxilação e descarboxilação transforma-se em dopamina. Não há marcador imunoistoquímico para a dopamina, então utiliza-se a TH (Mori, 2006).

Segundo Mendez *et al.*, 2005, os neurônios com tirosina-hidroxilase se agregam na periferia dos depósitos de neuromelanina e apresentam processos que se estendem em direção ao corpo estriado. Os neuritos de TH dentro e ao redor dos depósitos ficam em formato arborizado e inervam o putamen. No presente estudo, encontramos grande quantidade de feixes de neuromelanina nas 6 regiões analisadas (superior 1, superior 2, média 1, média 2, inferior 1, inferior 2) nos três casos imunocorados. Pode-se observar feixes longos e curtos, muitas vezes dispostos como “teias de aranha” e também grande quantidade de marcação anti-TH ao redor dos neuromelanócitos.

Volkow *et al.*, em 1996 sugeriu que há declínio nos níveis de dopamina em função da idade, descrito em humanos. Mas ainda não se sabe a relação deste declínio com a diminuição da função motora, cognitiva e modificações morfológicas das regiões dopaminérgicas (Arranz *et al.*, 1996)

5.2.2. Anti proteína tau hiperfosforilada

A proteína tau tem a função de ligar os microtúbulos e promover a construção do citoesqueleto, que são formados por repetições de

heterodímeros de beta-tubulina. A proteína tau estabiliza os heterodímeros lábeis para manutenção do citosqueleto (Grinberg, 2006; Goedert, 2003). Em determinadas situações, a proteína tau pode estar alterada e a principal forma é a hiperfosforilação anormal que precede a construção dos filamentos e forma os chamados emaranhados neurofibrilares. Essa alteração impede a interação da tau com os microtúbulos. A hiperfosforilação da proteína tau é comum nas tauopatias, dentre elas a doença de Alzheimer e a degeneração frontotemporal (Grinberg, 2006; Goedert, 2003). O anticorpo PHF-1 marca possíveis alterações da proteína tau, que formam emaranhados neurofibrilares e podem ser encontradas também no tronco encefálico. Nos três casos analisados, nenhum apresentou acúmulo de proteína tau hiperfosforilada na região da SN.

5.2.3. *Anti calbindina D_{28k}*

A Calbindina é expressa em neurônios dopaminérgicos de projeção para a região límbica do núcleo accumbens e não está presente em células projetadas ao putâmen motor dorsolateral (Mendez *et al.*, 2005; Gerfen *et al.*, 1985, Haber *et al.*, 1995; Liang *et al.*, 1996; Hontanilla *et al.*, 1997; Nemoto *et al.*, 1999). Neurônios dopaminérgicos calbindina-positivos são relativamente esparsos em indivíduos com DP (Mendez *et al.*, 2005; Yamada *et al.*, 1990; Fearnley and Lees, 1991; German *et al.*, 1992; Gibb, 1992; Damier *et al.*, 1999).

Segundo Damier *et al.*, 1999, a coloração com anticorpo anti-calbindina é intensa em toda a área ventral do mesencéfalo e parece estar associada com os neurofilos ao invés de com os corpos celulares da SN. Os neurofilos calbindina-positivos estão presentes em toda a *pars reticulata* e na maioria da *pars compacta*, as principais regiões que também apresentam neurônios TH-positivos. Alguns neurônios TH-positivos aparecem sob as regiões ricas em calbindina e os autores nomearam essa região como “*pars dorsalis* da substancia negra”. A coloração de calbindina no presente estudo foi positiva em todas as regiões da SN, mas não foi notada grande diferença entre cada região da SN. Todas as marcações calbindina-positivas estavam localizadas ao redor da região da SN onde estão localizados os neuromelanócitos. A calbindina D_{28k} é utilizada para realizar marcações na região da SN, independentes da produção de dopamina, já que a vulnerabilidade dos neurônios dopaminérgicos é heterogênea entre seus diferentes grupos celulares (Damier *et al.*, 1999). Pode-se notar marcação positiva de calbindina nos três mesencéfalos analisados, porém, não manifestou-se a diferenciação por região. Em todas as lâminas analisadas, a distribuição da calbindina foi esparsa, de coloração clara, também em forma de feixes.

5.2.4. Anti α -sinucleína

A α -sinucleína é o maior componente dos corpúsculos de Lewy, na doença de Parkinson e na demência por corpúsculos de Lewy (Neumann *et al.*,

2006), Sabe-se que a α -sinucleína é o maior componente dos corpúsculos de Lewy tanto na DP esporádica quanto na DP hereditária (Spillantini *et al.*, 1997; Baba *et al.*, 1998). A imunoreatividade também está presente em inclusões citoplasmáticas neuronais e gliais encontradas na atrofia múltipla sistêmica (Wakabayashi *et al.*, 1998; Arima *et al.*, 1998). Antes do desenvolvimento das técnicas imunoistoquímicas para demonstração desta proteína como componente dos corpúsculos de Lewy, assumia-se que os corpúsculos causavam a morte neuronal. Porém, estudos recentes indicam que a presença destes corpúsculos pode representar um mecanismo citoprotetor na DP (Fahn & Sulzer, 2004; Harrower *et al.*, 2005; Wakabayashi *et al.*, 2007). Os três casos apresentaram marcação anti α -sinucleína negativas, ou seja, não apresentavam corpúsculos nem neuritos de Lewy.

A distribuição das proteínas analisadas nos três casos estudados foram compatíveis com indivíduos saudáveis: TH, representando a dopamina positivo; PHF-1, anti proteína tau hiperfosforilada negativo; calbindina D_{28k}, positivo e α -sinucleína, para marcação de corpúsculos de Lewy, negativa.

Os achados do presente estudo, em relação à distribuição histoquímica das proteínas, comprovam que a técnica de preservação e preparação das peças está dentro do esperado para a SN e confirmam as descrições topográficas feita por Braak e Olsekevsky (Braak & Braak, 1986; Olszewski and Baxter, 1982).

5.3 Reconstrução tridimensional

Durante a reconstrução tridimensional, notou-se grande variabilidade de tamanho e forma da SN entre os indivíduos.

Entretanto, encontraram-se pontos de concordância evidentes. Percebe-se que a SN apresenta região de menor densidade celular na parte interna de cada hemisfério, porém, com conformação bem diferente em cada um dos indivíduos. As bordas são irregulares e no centro de cada hemisfério pode haver um ou diversos orifícios, semelhante a uma peneira.

Nossos resultados concordam com o descrito na literatura.

Mc Ritchie *et al.*, 1995 especularam poder haver diferença entre os agrupamentos celulares, sobre a extensão rostro-caudal, tanto entre diferentes indivíduos quanto entre os dois lados de um mesmo indivíduo. Os estudos anatômicos mostram claramente diferenças rostrocaudais nos grupos celulares, assim como há certo consenso em relação à maioria das subdivisões celulares (McRitchie *et al.*, 1995).

Braak & Braak em 1986 descreveram a presença de diversos subnúcleos na SN. McRitchie *et al.*, 1995 revelaram oito colunas de células, em duas camadas, porém confirmaram, também, que o arranjo de colunas da SN só pode ser visto em reconstruções tridimensionais. McRitchie e colegas determinaram cada agrupamento celular de acordo com a maior ou menor densidade da área (McRitchie *et al.*, 1995). Durante a reconstrução tridimensional nesse estudo, notou-se esse arranjo em forma de colunas, assim

como de diversos subnúcleos. Braak & Braak determinaram apenas *pars compacta*, *pars diffusa* e *pars lateralis*, além dos tipos neuronais (Braak & Braak, 1986). Os orifícios nas regiões centrais da SN podem delimitar as colunas descritas anteriormente. Pode-se notar claramente a presença da *pars compacta*, uma região com grande densidade neuronal, em todos os casos. Assim como foi possível determinar uma região de menor densidade neuronal, onde as células são menores e mais claras. Notou-se, também a dificuldade em delinear o limite entre a chamada *pars compacta* e a chamada *pars diffusa*. Em alguns indivíduos observou-se mais claramente essa divisão, enquanto em outros, essa diferença é sutil.

Apresentam-se duas regiões em que a distribuição neuronal é constante, enquanto entre essas duas regiões, foram notadas diversas colunas formadas de neurônios compactados, intercalados com neurônios mais dispersos.

A *pars diffusa* aparentemente tem sua pigmentação um pouco mais clara, com células menores e distribuição menos densa. Observou-se alguns grupos celulares mais densos, espalhados entre as células da *pars diffusa*. Na literatura, são descritos como agrupamentos celulares da *pars compacta* na região da *pars diffusa* (McRitchie *et al.*, 1995). Esses agrupamentos celulares estão claramente presentes na parte caudal. Pode-se definir pontos de células da *pars compacta* nessa área.

Na parte rostral e mediana, nota-se a *pars compacta* mais homogênea. A concentração de células da *pars compacta* na parte superior é pequena, ficando mais densa em direção à parte mediana até a parte inferior, onde

começam a formar os agrupamentos celulares e em seguida, diminuir a quantidade de células compactadas até terminar em um pequeno ponto (grupo) de algumas células.

Observou-se também, ao final da linha da SN, na parte interior do tronco, outro grupo de neurônios, menores, mas também pigmentados. São células em forma de vibrião e no meio dessa região estão em grande quantidade, diminuindo em direção à borda, misturando-se ao final da SN e da formação perirubral. O limite desta região não fica claro apenas com a coloração de galoccianina ou, na lâmina tratada e sem coloração. Porém, pode-se notar claramente a diferença de tamanho entre as células dessa área e as células da SN. Durante a reconstrução de um dos casos, o qual foi dividido entre subnúcleos da SN e o LC, pode-se notar esta região que chamamos de “indefinida”.

Segundo McRitchie *et al.*, 1995, a *pars compacta* da SN contém quatro maiores grupos neuronais, os quais foram denominadas *pars lateralis*, *pars medialis* e as camadas dorsal e ventral. A área da SN ocupada por esses agrupamentos celulares são menores dorsalmente e menores ao nível intermediário ventral. A análise das secções, em série, revelaram que os agrupamentos estão arranjados em grupos longitudinais, alguns ocupando toda a extensão rostrocaudal da SN (McRitchie *et al.*, 1995). Torna-se necessária análise mais detalhada de cada fatia reconstruída afim de possibilitar a distinção entre cada subnúcleo da SN.

A análise tridimensional, do presente estudo, possibilitou apenas a visualização da *pars compacta* e *pars diffusa*, mas após análise mais detalhada provavelmente será possível a definição tridimensional de cada um dos subnúcleos da SN.

Ao analisar todas as reconstruções tridimensionais, não se nota alterações de formato em função do aumento da idade, mas vê-se grande diferença entre cada indivíduo e algumas diferenças inter-hemisféricas.

5.4. Limitações do estudo

a) Uso de celoidina para inclusão do tronco encefálico:

A celoidina (nitrocelulose) é material controlado pelo exército do Brasil. Por isso, o processamento dos casos após a fixação foi realizado em laboratório na Alemanha, onde o uso científico da celoidina é permitido. O envio de material biológico humano para o exterior, também, é controlado e requer que o estudo preencha diversos critérios, tendo reduzido o tempo hábil para processamento e análise do material. Neste caso a celoidina é essencial para que os cortes do tronco encefálico sejam grossos, característica importantíssima do estudo.

b) Baixo número de casos

A metodologia extremamente trabalhosa e a necessidade de envio de material biológico ao exterior, limitou o número de casos a serem estudados em curto período de tempo

c) Coloração dos casos

Notou-se alguma variação na coloração das lâminas. As quais podem ter ocorrido por diversos fatores, entre eles o intervalo post mortem e o tempo da fixação além de alteração da marca do produto utilizado para coloração.

d) Ausência de exame neuropatológico nos casos analisados.

A doença de Parkinson se inicia no tronco encefalálico. Todos os cortes desta região foram utilizados para contagem estereológica, por isso a imunoistoquímica não pode ser realizada nos mesmos casos de contagem estereológica. A ausência do exame neuropatológico do tronco, nos casos utilizados pode alterar o status da análise individual. Este pode não ter alterações físicas aparentes, porém, pode ter o encéfalo alterado com corpúsculos ou neuritos de Lewy, apresentando ainda uma DP sem sintomas diagnosticados. Entretanto, não foram visualizados corpúsculos de Lewy em nenhum dos casos analisados.

5.5. Passos futuros

O presente estudo demonstra que a técnica escolhida é adequada para o estudo proposto. Planeja-se como próximo passo, o aumento da casuística, que conseqüentemente irá aumentar o poder da amostra. Ao mesmo tempo, o *locus coeruleus* será analisado pela mesma técnica.

- Alguns dos casos coletados apresentam imagens coletadas por ressonância magnética. Pode-se futuramente correlacionar os dados da análise tridimensional com os da imagem por ressonância. Utilizando a mesma técnica presentemente utilizada (Grinberg *et al.*, 2008).

6. Conclusões

6. Conclusões

Neste presente estudo não foi encontrada diminuição neuronal significativa na substância negra humana em função do envelhecimento, porém, encontrou-se tendência à diminuição do volume da SN de acordo com aumento das idade dos indivíduos.

Em primeiro lugar, os resultados evidenciam que os volumes de SN e esperados devem ser reajustados para as devidas faixas etárias, evitando-se assim os riscos de resultados falsamente positivos. Esse estudo certamente é um dos primeiros a ter sucesso em demonstrar a grande variabilidade de formatos que a substância negra pode assumir, decorrente da acomodação desta estrutura durante o desenvolvimento do ser humano. Esses achados tem implicações diretas sobre testes de diagnósticos realizados para estudo desta substância. Havendo possibilidade de relacionar, em estudos próximos, o número total de neuronios, volume e reconstruções tridimensionais da SN com testes de imagem estrutural ou ultrassom, seja grande passo em direção ao diagnóstico precoce de doenças relacionadas com a substância negra.

Estudos como o presente tem o potencial, não apenas de suprir a necessidade de gerar bases normativas para o estudo da substância negra e de outras estruturas de interesse durante o envelhecimento, mas também de apontar particularidades sobre a função normal das estruturas estudadas e dar origem a estudos que busquem entender as causas de variabilidade

interindividual e, conseqüentemente, vulnerabilidade ou proteção à doenças do sistema nervoso central.

7. Anexo I

ENTREVISTA CLÍNICA**NPROT****NSVO**

Data da necropsia: ____/____/____

Nome: _____ Idade: ____ DN: ____/____/____

Sexo: ____ Raça: ☐B ☐N ☐P ☐A Natural: ____ Proced: ____ Estado Civil: ☐S ☐C ☐V ☐A ☐D Filhos: ____Escolaridade: ____ anos (☐ A ☐ <4a ☐ <8a ☐ <12a ☐ >15a)Profissão: ☐do lar ☐doméstica ☐outros _____Situação: ☐ Ainda trabalhava ☐ Aposentado ____a ☐ Ap por invalidez ____a ☐ Outro _____**Informante**☐ Parentesco: _____ Freq com o pte: ☐D ☐S ☐M _____ Cuidador primário: ☐ sim ☐ não

Com quem residia: _____

Causa do Óbito: _____**Como correu o óbito:** ☐ em casa ☐ no hospital: _____**HPMA:****AP:** ☐ Nega ou desconhece qualquer antecedente patológico☐ HAS ☐ DM ☐ DAC ☐ ICC (TF_____) ☐ Arritmia ☐ MP ☐ IVP/ OAC ☐ IRC ☐ DLP☐ AVCi // h prévio? Há ____ a – ☐ sem seqüela ☐ com seqüela: ☐cognitiva ☐motora _____☐ AIDS ☐ Sífilis ☐ AO/ OP ☐ Dist Tireóide ☐ Bronquite/ Asma ☐ DPOC _____☐ Down ☐ Depressão ☐ Esquizofrenia ☐ Mania ☐ D Parkinson☐ TTOs anteriores: Clínicos: _____ Cirúrgicos: _____☐ Não fazia tratamento ou acompanhamento médico atualmente _____☐ Sd demencial diagnosticada em vida: ☐não ☐sim Há ____a Etiologia: _____☐ História compatível com Síndrome demencial: ☐não ☐simInício dos sintomas: ☐ lento ☐ súbito ☐ memória ☐ comportamento ☐ outro _____Curso: ☐ lento e progressivo ☐ rápido ☐ evolução em degraus ☐ curso flutuante**Função anterior à morte**☐ Acuidades visual e auditiva preservadas ☐ ↓acuidade visual ☐óculos ☐hipoacusia ☐prótese☐ Dentição preservada ☐uso de prótese dentária ☐ disfagia ☐ SNG/SNE☐ Sedentário ☐ Atividade física: ☐ caminhada ☐ doméstica ☐ outra _____ por ____ anos☐ Andava: ☐ sem auxílio ☐ com auxílio: ☐pessoas ☐parede/ móveis ☐equipamentos auxiliares☐ Amputações _____ ☐ Lesões cutâneas (úlceras) _____ ☐ Acamado☐ Independente ☐ Dependente ☐ Tomava decisões sozinho ☐ Não tomava decisões☐ Em que situações relacionava-se com muita gente? _____ freq _____/sem ou ____/anos

Informant questionnaire on cognitive decline in the elderly

(IQCODE – Versão retrospectiva)

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

Comparada com há 10 anos atrás, como estava a pessoa antes de sua morte:

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

Total: _____

ESCORE CLÍNICO DE DEMÊNCIA – FOLHA DE REGISTRO

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

QUESTÕES SOBRE MEMÓRIA PARA O INFORMANTE

1. Ele/ela tem algum problema com sua memória ou seu pensamento (raciocínio)? ☐ SIM ☐ NÃO
 1a - Se sim, é um problema constante? (em oposição a eventual, raro) ☐ SIM ☐ NÃO
2. Ele/ela pode se lembrar de eventos recentes? ☐ 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)			
☐ <u>Sem função significativa</u>			
(Realiza atividades simples, tais como fazer a cama, somente com muita supervisão)			
☐ <u>Funciona somente em atividades limitadas</u>			
(Com alguma supervisão, lava a louça com limpeza aceitável, coloca a mesa)			
☐ <u>Funciona independentemente em algumas atividades</u>			
(Opera equipamentos, tal como aspirador de pó, prepara refeições simples)			
☐ <u>Funciona em atividades usuais mas não no nível usual</u>			
☐ <u>Funciona normalmente em atividades usuais</u>			

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.

Episódio Maior Depressivo no Passado – SCID

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

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

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

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

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

Critério: 1 2 3 ? Quando foi isso? _____

3) Naquele período ele(a) perdeu ou ganhou peso? Ele(a) estava tentando perder peso?

SE NÃO: Como estava o apetite dele(a)? (Tinha que forçar para comer? Comia menos/mais que o habitual? Isso acontecia quase todos os dias?)

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

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

Critério: 1 2 3 ? Assinalar: Insônia _____ Hipersônia _____

5) Ele(a) estava tão inquieto(a) ou agitado(a) que não era capaz de ficar parado(a)? (Isso acontecia todos os dias?)

SE NÃO: E o contrário: falando e se movendo mais devagar do que o normal dele(a)? (Isso acontecia todos os dias?)

Critério: 1 2 3 ? Assinalar: agitação psicomotora _____ retardo psicomotor _____

6) Como estava a energia dele(a)? (Cansado(a) o tempo inteiro? Quase todos os dias?)

Critério: 1 2 3 ?

7) Como ele se sentia em relação a si mesmo? (Inútil, sem valor?) Quase todos os dias?

SE NÃO: Ele se sentia culpado por coisas que fazia ou deixava de fazer? Quase todos os dias?

Critério: 1 2 3 ? Assinalar: Sentimento de inutilidade _____ Culpa inadequada _____

8) Ele(a) tinha dificuldade para se concentrar ou pensar? (Com que tipo de coisas isso interferia?) Quase todos os dias?

SE NÃO: Era difícil para ele(a) tomar decisões sobre coisas do dia a dia? Quase todos os dias?

Critério: 1 2 3 ? Assinalar: Capacidade de pensar diminuída _____ Indecisão _____

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

Critério: 1 2 3 ? Assinalar: Pensamentos de morte recorrentes _____ Ideação suicida _____ Tentativa de suicídio _____

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

SIM () NÃO ()

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

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

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

Durou mais que 2 meses? SIM () NÃO ()

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

Quando ocorreu (eram) ? _____

CONSIDERAR:

1 – ausente ou falso

2 – subliminar (duvidoso)

3 – limiar ou verdadeiro

? – informação inadequada

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

A- Em sua casa tem?

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

TOTAL:_____

B- Qual a instrução do chefe de família?

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

TOTAL:_____

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

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

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

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

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

II - DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

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

2. PESQUISADOR: Lea Tenenholz Grinberg

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

UNIDADE DO HCFMUSP: Departamento de Patologia

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

SEM RISCO X

RISCO MÍNIMO

RISCO MÉDIO

RISCO BAIXO

RISCO MAIOR

4. DURAÇÃO DA PESQUISA : 3 anos

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

Muito obrigada por sua atenção.

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

Este estudo irá funcionar da seguinte maneira:

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

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

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

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

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

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

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

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

A responsável pela pesquisa em caso de dúvidas é,

Dra. Lea Tenemholz Grinberg

CRM-SP: 105290

Telefone: (011) 30667322

VI - CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

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

São Paulo, de de 200 .

assinatura do participante da pesquisa ou responsável legal

assinatura do pesquisador
(carimbo ou nome Legível)

8. Anexo II

Técnica de Imunohistoquímica

1º Dia

- Colocar o carrinho por 10 min na estufa à 50°C
- Deixar 15 min o carrinho no xilol, que se encontra dentro da estufa
- Passar o carrinho pela bateria:
 - Xilol
 - Álcool Absoluto
 - Álcool 95%
 - Álcool 70%
- Lavar em água corrente (torneiral) 3x;
- Lavar em PBS por 2x de 5 min ;
- Bloquear em Água Oxigenada 10 volumes (6x de 5 min) – no escuro;
- Lavar em água corrente (torneiral) 1x;
- Lavar em PBS (3x de 3 min);
- Passar em Ácido Fórmico por 5 min;
- Diluir o Citrato concentrado da geladeira 10% e coloca-lo na panela a vapor para alcançar temperatura de 95°C;
- Colocar o carrinho para digestão na panela a vapor com Citrato 10%, (que já deve estar a 95°C) por 40 min;
- Deixar esfriar por 15 min à temperatura ambiente;
- Lavar em água corrente (torneiral) 1x;
- Lavar em PBS (3x de 3 min);
- Colocar o carrinho no Leite em pó desnatado 5% por 1 hora para o bloqueio;
- Secar as lâminas e pingar o anticorpo primário diluído em leite;
- Colocar over-night na geladeira em câmara úmida.

2º Dia

- Colocar as lâminas novamente no carrinho e lavar em PBS (3x de 3min);
- Secar as lâminas e pingar Secundário Vector biotinilado (anti-mouse para PHF-1, Beta-amilóide e alfa-sinucleína – chemical; e anti-rabbit para alfa-sinucleína - japoneses),
- Manter na estufa em câmara úmida a 37°C (verificar temperatura na estufa) por 1h;
- Voltar as lâminas para o carrinho e lavar em PBS (3x de 3min);
- Secar as lâminas e pingar o Complexo Vector
- Manter na estufa em câmara úmida a 37°C por 1 hora;
- Voltar as lâminas para o carrinho e lavar em PBS (3x de 3 min);
- Revelar em DAB por 10 min;
- Lavar em água corrente (torneiral) por 5 min;
- Lavar em água destilada 1x;
- Contra-corar com Hematoxilina por 1min e 30 seg.;
- Lavar em água corrente (torneiral) por 2 min;
- Colocar em água Amoniacal por 1 min;
- Lavar em água corrente (torneiral) por 5 min;
- Lavar em água deionizada 1x;
- Passar o carrinho pela bateria
 - Álcool 70%
 - Álcool 95%
 - Álcool Absoluto
 - Xilol
- Montar.

Diluições

Mantegueira = 350 ml

Pote verde (DAB) = 250 ml

5 tabletes de DAB

250 uL de água Oxigenada

Filtrar

Citrato concentrado (solução-mãe)

42g de ácido cítrico (anidro)

2 litros de água deionizada

Acertar o pH com NaOH (2,5N) →
pH deve ser = 6.

Diluir o citrato da geladeira
(solução-mãe), em citrato 10%

Citrato 10 %

315 ml de água deionizada

35 ml de citrato

PBS (solução-mãe de 1l para 10l de PBS)

Cloreto de Sódio - 82 g

Fosfato de Sódio Monobásico –
3,5 g

Fosfato de Sódio Dibásico – 10, 5
g

1 litro de água deionizada

PBS

Diluir 1 litro de solução-mãe em 9
litros de água deionizada

Para o galão de 5 litros de PBS,
diluir 0,5 litro de solução-mãe em
4,5 litros de água deionizada

Panela a Vapor

Encher os dois compartimentos
com água torneiral

Colocar o termômetro dentro do
citrato

Esperar a temperatura de 95° C, e
após isso deixar 40 min

Kit Secundário Vector

0,5 uL para 100ul de PBS (para
uma lâmina) =

5 uL para 1000ul de PBS (para 10
lâminas)

Leite 5%

350 ml de PBS

17g de Leite em pó Molico

Kit Complexo

10 uL de cada reagente para 1000
uL de PBS (para 10 lâminas)

DAB

250 ml de Trizma ou PBS

9. Referências

Bibliográficas

- (1) Alho ATDL, Grisoli RPS, Matos HTM, Leite REP, Pasqualucci CA, Saldiva PHN et al. **Comparison and Optimization among 3 anti-alpha-synuclein antibodies of brains from the human brain bank of the Brazilian Aging Brain Study Group.** Clinics 62, s208-s 208. 2007.
- (2) Arima K, Uéda K, Sunohara N. **NACP/alpha-synuclein immunoreactivity in fibrillary components of neuronal and oligodendroglial cytoplasmic inclusions.** Acta Neuropathol 1998; 96:439-444.
- (3) Arranz B, Blennow K, Ekman R, Eriksson A, Mansson JE, Marcusson J. **Brain monoaminergic and neuropeptidergic variations in human aging.** J Neural Transm 1996; 103:101-115.
- (4) Baba M, Nakajo S, Tu PH. **Aggregation of alpha-synuclein in Lewy bodies of sporadic Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies.** Am J Pathol 1998; 152:879-884.
- (5) Ball MJ. **Neuronal loss, neurofibrillary tangles and granulovacuolar degeneration in the hippocampus with ageing and dementia. A quantitative study.** Acta Neuropathol 1977; 37:111-118.
- (6) Bauer J. **Die Substantia nigra Soemmeringii. Eine vergleichend-anatomische Studie nebst einem Beitrag zur Kenntnis des dunklen Pigmentes der Nervenzellen.** Arb Neurol Inst Wien 1909; 17:435-512.
- (7) Behbehani MM, Jiang MR, Chandler SD, Ennis M. **The effect of GABA and its antagonists on midbrain periaqueductal gray neurons in the rat.** Pain 1990; 40(2):195-204.

- (8) Berchtold NC, Cotman CW. **Evolution in the conceptualization of dementia and Alzheimer's disease: Greco-Roman period to the 1960s.** *Neurobiology of Aging* 1998; 19:173-189.
- (9) Bethlem J, Den Hartog Jager WA. **The incidence and characteristics of Lewy bodies in idiopathic paralysis agitans (Parkinson's disease).** *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1960; 23:74-80.
- (10) Blocq P, Marinesco G. **Sur un cas de tremblement parkinsonien hemiplegique symptomatique d'une tumeur du peduncule cerebrale.** Lees AJ, Selikhova M, Andrade LA, Duyckaerts C, editors. *In: The black stuff and Konstantin Nikolaevich Tretiakoff.* *Rev Neurol* 23. 1894.
- (11) Bohus B, Koolhaas JM, Luiten PG, Korte SM, Roozendaal B, Wiersma A. **The neurobiology of the central nucleus of the amygdala in relation to neuroendocrine and autonomic outflow.** *Prog Brain Res* 1996; 107:447-460.
- (12) Braak H, Braak E. **Nuclear configuration and neuronal types of the nucleus niger in the brain of the human adult.** *Hum Neurobiol* 1986; 5(2):71-82.
- (13) Braak H, Braak E. **Neuropathological staging of Alzheimer-related changes.** *Acta Neuropathol* 1991; 82(4):239-259.
- (14) Braak H, Braak E, Yilmazer D, de Vos RA, Jansen EN, Bohl J et al. **Amygdala pathology in Parkinson's disease.** *Acta Neuropathol* 1994; 88(6):493-500.
- (15) Braak H, Rub U, Gai WP, Del Tredici K. **Idiopathic Parkinson's disease: possible routes by which vulnerable neuronal types may be subject to neuroinvasion by an unknown pathogen.** *J Neural Transm* 2003; 110(5):517-536.

- (16) Braak H, Del Tredici K, Rüb U, de Vos RA, Jansen Steur EN, Braak E. **Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease.** Neurobiol Aging 2003; 24:197-211.
- (17) Braak H, Ghebremedhin E, Rub U, Bratzke H, Del Tredici K. **Stages in the development of Parkinson's disease-related pathology.** Cell Tissue Res 2004; 318(1):121-134.
- (18) Braendgaard H, Gundersen HJG. **Recent stereological developments in neuroscience.** J Neurosci Meth 1986; 18:39-78.
- (19) Brody H. **Organization of the cerebral cortex. III. A study of aging in the human cerebral cortex.** J Comp Neurol 1955; 102:511-516.
- (20) Cabello CR, Thune JJ, Pakkenberg H, Pakkenberg B. **Ageing of substantia nigra in humans: cell loss may be compensated by hypertrophy.** Neuropathol Appl Neurobiol 2002; 28(4):283-291.
- (21) Chen E-Y, Kallwitz E, Leff SE, Cochran EJ, Mufson EJ, Kordower JH et al. **Age-related decreases in GTP-Cyclohydrolase-I Immunoreactive neurons in the monkey and human substantia nigra.** The Journal of Comparative Neurology 2000; 426:534-548.
- (22) Chu Y, Kompoliti K, Cochran EJ, Mufson EJ, Kordower JH. **Age-related decreases in Nur1 immunoreactivity in the human substantia nigra.** J Comp Neurol 2002; 450(203):214.
- (23) Comfort A. **The myth of senility. Diagnosing nonspecific major illness in the elderly.** Postgrad Med. 65, 130-142. 1979.
- (24) Cruz-Sanchez FF, Tolosa E. **The need of a consensus for brain banking.** J Neural Transm Suppl 1993; 39:1-4.
- (25) Damier P, Hirsch EC, Agid Y, Graybiel AM. **The substantia nigra of the human brain. II. Patterns of loss of dopamine-containing**

- neurons in Parkinson's disease.** Brain 1999; 122 (Pt 8):1437-1448.
- (26) Damier P, Hirsch EC, Agid Y, Graybiel AM. **The substantia nigra of the human brain. I. Nigrosomes and the nigral matrix, a compartmental organization based on calbindin D(28K) immunohistochemistry.** Brain 1999; 122 (Pt 8):1421-1436.
- (27) Del Tredici K, Rub U, de Vos RA, Bohl JR, Braak H. **Where does parkinson disease pathology begin in the brain?** J Neuropathol Exp Neurol 2002; 61(5):413-426.
- (28) Esiri M. **Dementia and normal aging: neuropathology. Dementia and normal Aging.** Cambridge: Cambridge University Press, 1994: 385-436.
- (29) Esiri MM. **Ageing and the brain.** J Pathol 2007; 211(2):181-187.
- (30) Fahn S, Sulzer D. **Neurodegeneration and neuroprotection in Parkinson disease.** Neuro Rx 2004; 1:139-154.
- (31) Farfel JM, Jacob-Filho W. **Fatores relacionados à senescência e à senilidade cerebral em indivíduos muito idosos: um estudo de correlação clinicopatológica.** Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 2008.
- (32) Fearnley JM, Lees AJ. **Ageing and Parkinson's disease: substantia nigra regional selectivity.** Brain 1991; 114 (Pt 5):2283-2301.
- (33) Ferretti REL, Jacob-Filho W. **Fatores associados às alterações morfológicas crânio-encefálicas durante o envelhecimento.** Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 2008.
- (34) Ferretti REL, Damin AE, Brucki SMD, Morillo LS, Perroco TR, Campora F et al. **Post-Mortem diagnosis of dementia by**

informant interview. Dementia & Neuropsychologia 2010; 4:138-144.

- (35) Foix C, Nicolesco J. **Les noyaux gris centraux et la région mésencéphalo-sous-optique suivi d'un appendice sur l'anatomie pathologique de la maladie de Parkinson.** van Domburg PH, ten Donkelaar HJ, editors. **In: The Human Substantia Nigra and Ventral Tegmental Area.** Advancer in Anatomy Embryology and Cell Biology 121. 1925. 1991.
- (36) Fujiwara H, Hasegawa M, Dohmae N, Kawashima A, Masliah E, Goldberg MS et al. **Alpha-Synuclein is phosphorylated in synucleinopathy lesions.** Nat Cell Biol 2002; 4(2):160-164.
- (37) Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE. **Censo Demográfico 2005.** 2006.
- (38) Gerfen CR, Baimbridge KG, Miller JJ. **The neostriatal mosaic: compartmental distribution of calcium-binding protein and parvalbumin in the basal ganglia of the rat and monkey.** Proc Natl Acad Sci USA 1985; 82:8780-8784.
- (39) German DC, Manaye KF, Sonsalla PK, Brooks BA. **Midbrain dopaminergic cell loss in Parkinson's disease and MPTP-induced parkinsonism: sparing of calbindin-D28k-containing cells.** Ann NY Acad Sci 1992; 648:42-62.
- (40) Gibb WR. **Melanin, tyrosine hydroxylase, calbindin and substance P in the human midbrain and substantia nigra in relation to nigrostriatal projections and differential neuronal susceptibility in Parkinson's disease.** Brain Res 1992; 581(2):283-291.
- (41) Goedert M. **Introdution to the Tauopathies.** Neuropath Press 2003;82-85.

- (42) Greenfield JG, Bosanquet FD. **The brain stem lesions in Parkinsonism.** J Neurol Neurosurg Psychiatry 1953; 16:213-226.
- (43) Grinberg LT. **Estendendo o espectro das denerações lobares frontotemporais: revisão de uma série clinicopatológica de 833 casos de demências.** Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 2006.
- (44) Grinberg LT, Ferretti RE, Farfel JM, Leite R, Pasqualucci CA, Rosemberg S et al. **Brain bank of the Brazilian aging brain study group - a milestone reached and more than 1,600 collected brains.** Cell Tissue Bank 2007; 8(2):151-162.
- (45) **Computer-Assisted 3D Reconstructions of the Human Substantia Nigra – A Tool for Neurodegenerative Studies.** Salzburg. 8th International Meeting On AD/PD; 2007.
- (46) Grinberg LT, Amaro E Jr, Teipel S, dos Santos DD, Pasqualucci CA, Leite RE et al. **Assessment of factors that confound MRI and neuropathological correlation of human postmortem brain tissue.** Cell Tissue Bank 2008; 9(3):195-203.
- (47) Grinberg LT, Rüb U, Ferretti RE, Nitrini R, Farfel JM, Polichiso L et al. **The dorsal raphe nucleus shows phospho-tau neurofibrillary changes before the transentorhinal region in Alzheimer's disease. A precocious onset?** Neuropathol App Neurobiol 2009; 35(4):406-416.
- (48) Grinberg LT, Rueb U, Alho ATdL, Heinsen H. **Brainstem pathology and non-motor symptoms in PD.** Journal of the Neurological Sciences 2009; In Press, Corrected Proof.
- (49) **Comparison and Optimization among 3 anti-tau protein antibodies of brains from the human brain bank of the Brazilian Aging Brain Study Group.** Clinics: 2007.

- (50) Gundersen HJ, Bagger P, Bendtsen TF, Evans SM, Korbo L, Marcussen N et al. **The new stereological tools: disector, fractionator, nucleator and point sampled intercepts and their use in pathological research and diagnosis.** APMIS 1988; 96(10):857-881.
- (51) Guyton AC, Hall JE. **Tratado de Fisiologia Médica.** 9ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan , 1997.
- (52) Haber SN, Kunishio K, Mizobuchi M, Lynd-Balta E. **The orbital and medial prefrontal circuit through the primate basal ganglia.** J Neurosci 1995; 15:4851-4867.
- (53) Hall T, Miller K, Corsellis JA. **Variations in the human Purkinje cell population according to age and sex.** Neuropathol Appl Neurobiol 1975; 1:267-292.
- (54) Halliday G, Baker K, Harper C. **Serotonin and alcohol-related brain damage.** Metab Brain Dis 1995; 10(1):25-30.
- (55) Halliday GM, Li YW, Blumbergs PC, Joh TH, Cotton RG, Howe PR et al. **Neuropathology of immunohistochemically identified brainstem neurons in Parkinson's disease.** Ann Neurol 1990; 27(4):373-385.
- (56) Harrower TP, Mitchell AW, Barker RA. **Lewy bodies in Parkinson's disease: protectors or perpetrators?** Exp Neurol 2005; 195:1-6.
- (57) Hassler R. **Zur normalanatomie der substantia nigra. Versuch einer architektonischen Gliederung.** J Psychol Neurol 1937; 48:1-55.
- (58) Heinsen H, Heinsen UL. **Serial thick, frozen, galloxyanin stained sections of human central nervous system.** J Histotechnol 1991; 14:167-173.

- (59) Heinsen H, Rüb U, Bauer M, Ulmar G, Bethke B, Schüler M et al. **Nerve cell loss in the thalamic mediodorsal nucleus in Huntington's disease.** Acta Neuropathol 1999; 97:613-622.
- (60) 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.
- (61) Heinsen H, Arzberger T, Roggendorf W, Mitrovic T. **3D reconstruction of celloidin-mounted serial sections.** Acta Neuropathol 2004;374.
- (62) Heinsen H, Hampel H, Teipel SJ. **Computer-assisted 3D reconstruction of the Nucleus basalis complex, including the Nucleus subputaminalis.** Brain 2006; 129:E43.
- (63) Henderson G, Tomlinson BE, Gibson PH. **Cell counts in human cerebral cortex in normal adults throughout life using an image analysing computer.** J Neurol Sci 1980; 46:113-136.
- (64) Hof PR, Morrison JH. **The aging brain: morphomolecular senescence of cortical circuits.** Trends Neurosci 2004; 27:607-613.
- (65) Hontanilla B, Parent A, Gimenez-Amaya JM. **Parvalbumin and calbindin D-28k in the entopeduncular nucleus, subthalamic nucleus, and substantia nigra of the rat as revealed by double-immunohistochemical methods.** Synapse 1997; 25:359-367.
- (66) Jacob-Filho W, Gorzoni ML. **Geriatrics e Gerontologia.** São Paulo: Roca, 2008.

- (67) Kalache A, Veras RP, Ramos LR. **O envelhecimento da população: um desafio novo**. Saúde Pública 21, 200-210. 1987.
Ref Type: Magazine Article
- (68) Kubis N, Faucheux BA, Ransmayr G, Damier P, Duyckaerts C, Henin D et al. **Preservation of midbrain catecholaminergic neurons in very old human subjects**. Brain 2000; 123 (Pt 2):366-373.
- (69) Lees AJ, Selikhova M, Andrade LA, Duyckaerts C. **The black stuff and Konstantin Nikolaevich Tretiakoff**. Movement Disorders 2008; 23:777-783.
- (70) Leite REP, Jacob-Filho W. **Determinação de elementos traço no encéfalo de idosos em diferentes estados cognitivos**. Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 2009.
- (71) Lewy FH. **Paralysis agitans. I.Pathologische Anatomie**. van Domburg PH, ten Donkelaar HJ, editors. **In: The Human Substantia Nigra and Ventral Tegmental Area**. Advancer in Anatomy Embryology and Cell Biology 121. 1912. 1991.
Ref Type: Generic
- (72) Lewy FH. **Zur pathologischen Anatomie der Paralysis agitans**. van Domburg PH, ten Donkelaar HJ, editors. **In: The Human Substantia Nigra and Ventral Tegmental Area**. Advancer in Anatomy Embryology and Cell Biology 121. 1913. 1991.
Ref Type: Generic
- (73) Lewy FH. **Die Lehre vom Tonus und der Bewegung, zugleich systematische Untersuchung zur Klinik, Physiologie, Pathologie und Pathogenese der Paralysis agitans**. van Domburg PH, ten Donkelaar HJ, editors. **In: The Human Substantia Nigra and Ventral Tegmental Area**. Advancer in

Anatomy Embryology and Cell Biology 121. 1923. 1991.
Ref Type: Generic

- (74) Liang CL, Sinton CM, German DC. **Midbrain dopaminergic neurons in the mouse: co-localization with calbindin-D28K and calretinin.** Neuroscience 1996; 75:523-533.
- (75) Ma SY, Roytta M, Rinne JO, Collan Y, Rinne UK. **Correlation between neuromorphometry in the substantia nigra and clinical features in Parkinson's disease using disector counts.** J Neurol Sci 1997; 151(1):83-87.
- (76) Ma SY, Roytt M, Collan Y, Rinne JO. **Unbiased morphometrical measurements show loss of pigmented nigral neurones with ageing.** Neuropathol Appl Neurobiol 1999; 25(5):394-399.
- (77) Ma SY, Ciliax BJ, Stebbins G, Jaffar S, Joyce JN, Cochran EJ et al. **Dopamine transporter-immunoreactive neurons decrease with age in the human substantia nigra.** J Comp Neurol 1999; 409(1):25-37.
- (78) Machado ABM. **Neuroanatomia Funcional.** 2^a ed. São Paulo: Ed. Atheneu, 1998.
- (79) Mann DM, Yates PO. **Lipoprotein pigments--their relationship to ageing in the human nervous system. II. The melanin content of pigmented nerve cells.** Brain 1974; 97(3):489-498.
- (80) Mann DM, Yates PO, Marcyniuk B. **Monoaminergic neurotransmitter systems in presenile Alzheimer's disease and in senile dementia of Alzheimer type.** Clin Neuropathol 1984; 3:199-205.
- (81) McCulla MM, Coats M, Van Fleet N, Duchek J, Grant E, Morris JC. **Reliability of clinical nurse specialists in the staging of dementia.** Arch Neurol 1989; 46(11):1210-1211.

- (82) McGeer PL, McGeer EG, Suzuki JS. **Aging and extrapyramidal function.** Arch Neurol 1977; 34:33-35.
- (83) McRitchie DA, Halliday GM. **Calbindin D28k-containing neurons are restricted to the medial substantia nigra in humans.** Neuroscience 1995; 65(1):87-91.
- (84) McRitchie DA, Halliday GM, Cartwright H. **Quantitative analysis of the variability of the substantia nigra pigmented cell clusters in the human.** Neuroscience 1995; 68:539-551.
- (85) Meara J, Koller WC. **Parkinson's Disease and Parkinsonism in the Elderly.** Cambridge University Press. In press.
- (86) Mendez I, Sanchez-Pernaute R, Cooper O, Vinuela A, Ferrari D, Bjorklund L et al. **Cell type analysis of functional fetal dopamine cell suspension transplants in the striatum and substantia nigra of patients with Parkinson's disease.** Brain 2005; 128(Pt 7):1498-1510.
- (87) Miller RA. **The Biology of Aging and Longevity.** In: McGraw Hill, editor. Principles of Geriatric Medicine and Gerontology. Columbus, 2003: 3-15.
- (88) Associação Brasileira de Estudos Populacionais, editor. **O envelhecimento da população brasileira em nível regional.** Anais do XI Encontro Nacional de Estudos Populacionais: 1998.
- (89) Mori F, Nishie M, Kakita A, Yoshimoto M, Takahashi H, Wakabayashi K. **Relationship among alpha-synuclein accumulation, dopamine synthesis, and neurodegeneration in Parkinson disease substantia nigra.** J Neuropathol Exp Neurol 2006; 65(8):808-815.
- (90) Morris JC. **The Clinical Dementia Rating (CDR): current version and scoring rules.** Neurology 1993; 43(11):2412-2414.

- (91) Muthane U, Yasha TC, Shankar SK. **Low numbers and no loss of melanized nigral neurons with increasing age in normal human brains from India.** Ann Neurol 1998; 43(3):283-287.
- (92) Nemoto C, Hida T, Arai R. **Calretinin and calbindin-D28k in dopaminergic neurons of the rat midbrain: a triple-labeling immunohistochemical study.** Brain Res 1999; 846:129-136.
- (93) Neumann M, Sampathu DM, Kwong LK. **Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis.** Science 2006; 314:130-133.
- (94) Noro JJ. **Nobel - O prêmio e o homem: Prêmios Nobel de fisiologia e medicina.** 1999.
- (95) Olszewski J, Baxter D. **Cytoarchitecture of the human brainstem.** 2nd ed. New York: 1982.
- (96) Organização Mundial de Saúde (OMS). **Envelhecimento ativo: uma política de saúde.** 2005. Brasília, Brasil, Organização Pan-Americana de Saúde.
- (97) Pakkenberg B, Moller A, Gundersen HJ, Mouritzen DA, Pakkenberg H. **The absolute number of nerve cells in substantia nigra in normal subjects and in patients with Parkinson's disease estimated with an unbiased stereological method.** J Neurol Neurosurg Psychiatry 1991; 54(1):30-33.
- (98) Pakkenberg H, Andersen BB, Burns RS, Pakkenberg B. **A stereological study of substantia nigra in young and old rhesus.** Brain Res 1995; 693:201-206.
- (99) Papaléo-Netto M. **O estudo da velhice no século XX: histórico, definição do campo e termos básicos.** In: Guanabara Koogan, editor. Tratado de Geriatria e Gerontologia. Rio de Janeiro: 2006.

- (100) Ramos LR, Veras RP, Kalache A. **Envelhecimento populacional: Uma realidade brasileira**. Saúde Pública 21, 211-224. 1987.
- (101) Rieder CRM, Picon PD, Amaral KM, et al. **Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas da doença de Parkinson**. SAS/MS nº10. 2002. 20-1-2007.
- (102) Robbins SL, Cotran RS, Kumar V, et al. **Patologia estrutural e funcional**. 5ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996.
- (103) Sano T. **Beitrag zur vergleichenden Anatomie der Substantia nigra, des Corpus Luysii und der Zona incerta**. Handbook of physiology , 131-156. 1910.
- (104) Schwyn RC, Fox CA. **The primate substantia nigra: A Golgi and electron microscopic study**. J Hirnforsch 1974; 15:95-126.
- (105) Seelig VC. **Questões atuais relacionadas ao uso de modelos animais em pesquisa científica**. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, 2007.
- (106) Soemmerring ST. **De basi encephali et originibus nervorum cranio egredientium libri quinque**. van Domburg PH, ten Donkelaar HJ, editors. *In: The Human Substantia Nigra and Ventral Tegmental Area*. Advances in Anatomy Embryology and Cell Biology . 1792.
- (107) Spillantini MG, Schmidt ML, Lee VM, Trojanowski JQ, Jakes R, Goedert M. **Alpha-synuclein in Lewy bodies**. Nature 1997; 388:839-340.
- (108) Stark AK, Pakkenberg B. **Histological changes of the dopaminergic nigrostriatal system in aging**. Cell Tissue Res 2004; 318(1):81-92.

- (109) Suemoto CKZ. **Associação entre doença cardiovascular e demência: um estudo clinicopatológico.** Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 2010.
- (110) Teipel SJ, Flatz WH, Heinsen H, et al. **Measurement of basal forebrain atrophy in Alzheimer's disease using MRI.** Brain 2005; 128:2626-2644.
- (111) Thiessen B, Rajput AH, Desai H. **Age, environments and the number of substantia nigra neurons.** Adv Neurol 1990; 53:201-206.
- (112) Tooyama I, McGeer EG, Kawamata T, Kimura H, McGeer PL. **Retention of basic fibroblast growth factor immunoreactivity in dopaminergic neurons of the substantia nigra during normal aging in humans contrasts with loss in Parkinson's disease.** Brain Res 1994; 656:165-168.
- (113) Tretiakoff C. **Contribution a l'etude de l'anatomie pathologique du locus niger de Soemmering avec quelques deductions relatives a la pathogenie des troubles du tonus musculaire et de la maladie de Parkinson.** Lees AJ, Selikhova M, Andrade LA, Duyckaerts C, editors. *In: The black stuff and Konstantin Nikolaevich Tretiakoff.* Rev Neurol . 1919.
- (114) Tretiakoff C, Pacheco e Silva AC. **Contribution a l'étude de la cysticercose cérébrale et en particulier des lésions cérébrales toxiques à distance dans cette affection .** Andrade LAF, Selikhova M, Lees AJ, editors. *In: Konstantin N Tretiakoff in Brazil: A historical perspective and discussion of his contribution to Brazilian neuroscience.* Mem Hosp Juquery 1[2-A], 219-244. 1924. 2009.
- (115) Tretiakoff C. **Les "plaques cyto-graisseuses" dans les maladies mentales diverses et l'origine de ces plaques.** Andrade LAF,

- Selikhova M, Lees AJ, editors. *In: Konstantin N Tretiakoff in Brazil: A historical perspective and discussion of his contribution to Brazilian neuroscience*. Mem Hosp Juquery 1[2-A], 181-199. 1924. 2009.
- (116) Tretiakoff C, Marcondes Vieira F. **À propos de quelques lésions vasculaires dans la psychose maniaco-dépressive**. Andrade LAF, Selikhova M, Lees AJ, editors. *In: Konstantin N Tretiakoff in Brazil: A historical perspective and discussion of his contribution to Brazilian neuroscience*. Mem Hosp Juquery 1[2-A], 245-258. 1924. 2009.
- (117) van Domburg PH, ten Donkelaar HJ. **The human substantia nigra and ventral tegmental area. A neuroanatomical study with notes on aging and aging diseases**. Adv Anat Embryol Cell Biol 1991; 121:1-132.
- (118) Volkow ND, Ding YS, Fowler JS, Wang GJ, Logan J, Gatley SJ et al. **Dopamine transporters decrease with age**. J Nucl Med 1996; 37:554-559.
- (119) Wakabayashi K, Hansen LA, Masliah E. **Cortical Lewy body-containing neurons are pyramidal cells: laser confocal imaging of double-immunolabeled sections with anti-ubiquitin and SMI32**. Acta Neuropathol 1995; 89:404-408.
- (120) Wakabayashi K, Yoshimoto M, Tsuji S, Takahashi H. **Alpha-synuclein immunoreactivity in glial cytoplasmic inclusions in multiple system atrophy**. Neurosc Lett 1998; 249:180-182.
- (121) Wakabayashi K, Tanji K, Mori F, Takahashi H. **The Lewy body in Parkinson's disease: molecules implicated in the formation and degradation of alpha-synuclein aggregates**. Neuropathology 2007; 27(5):494-506.

- (122) West MJ, Coleman PD, Flood DG, Troncoso JC. **Differences in the pattern of hippocampal neuronal loss in normal ageing and Alzheimer's disease.** Lancet 1994; 344:769-772.
- (123) Yamada T, McGeer PL, Baimbridge KG, McGeer EG. **Relative sparing in Parkinson's disease of substantia nigra dopamine neurons containing calbindin-D28K.** Brain Res 1990; 526(2):303-307.
- (124) Yu S, Zuo X, Li Y, Zhang C, Zhou M, Zhang YA et al. **Inhibition of tyrosine hydroxylase expression in α -synuclein-transfected dopaminergic neuronal cells.** Neuroscience Letters 2004; 367:34-39.
- (125) Zilles K, Schleicher A, Palomero-Gallagher N, Amunts K. **Quantitative Analysis of cyto- and receptor architecture of the human brain - Brain Mapping: The methods.** 2002: 573-602.