UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE – UFCSPA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA

Francine Hehn de Oliveira

Alterações neurodegenerativas no tronco encefálico e bulbo olfatório em indivíduos acima de 50 anos.

Porto Alegre
2013

Francine Hehn de Oliveira

Alterações neurodegenerativas no tronco encefálico e bulbo olfatório em indivíduos acima de 50 anos.

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre como requisito para a obtenção do grau de Mestre

Orientadora: Dra. Arlete Hilbig
Coorientadora: Dra. Liana Lisboa Fernandez

Porto Alegre
2013

Hehn de Oliveira, Francine
Alterações neurodegenerativas no tronco encefálico e bulbo olfatório em indivíduos acima de 50 anos / Francine Hehn de Oliveira. -- 2013.
83 f. : il., tab. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) -- Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Programa de Pós-Graduação em Patologia, 2013.

Orientador(a): Arlete Hilbig ; coorientador(a): Liana Lisboa Fernandez.

1. Doenças Neurodegenerativas. 2. Doença de Alzheimer. 3. Doença de Parkinson. 4. Tronco cerebral. 5. proteína tau. I. Título.

Dedicatória

Esta dissertação é dedicada à Lisiane Hehn, a minha doce Tita (*in memorian)* que não pôde, por razões alheias a nossa vontade, estar aqui neste momento tão importante da minha vida. Deixo aqui minha eterna gratidão pela tua inspiração diária, pelo exemplo de trajetória acadêmica que foste, e por todo o apoio que tu sempre me destes. Amo-te incondicionalmente e sei que tu continuas na torcida pelo meu sucesso, aonde tu estiveres.

Agradecimentos

Em primeiro lugar gostaria de agradecer ao Ser Superior que eu acredito, ao meu Deus, que me dá forças todos os dias para sair de casa e lutar como se fosse o último.

Agradeço às minhas orientadora e coorientadora, Arlete Hilbig e Liana Fernandez. Obrigada pela paciência de vocês, pela compreensão nas minhas idas e vindas, viagens, vontades de desistir e intercorrências da vida que me fizeram, muitas vezes, deixar este trabalho de lado. Obrigada por aceitarem comigo o desafio de terminar este trabalho em tão pouco tempo. Obrigada por se completarem tanto, tu Arlete por veres a vida tão como ela é, por ser realista, direta e me colocar na linha quando foi necessário; tu Liana, por seres tão “Pollyana”, tão doce e compreensiva. Vocês fazem uma dupla perfeita e eu tenho um orgulho imenso de ter trabalhado com vocês.

À Dra. Lígia Coutinho, minha mestre, por toda a inspiração nesses anos, por me devolver a paixão pela patologia, por acreditar em mim sempre, por me mostrar que eu posso fazer tudo aquilo que eu desejar. Não tenho palavras para agradecer toda a ajuda que recebi dela.

Aos meus pais Paulo e Gislaine, a minha irmã Daiane e aos meus queridos avós Adelino e Marlene, por me proporcionarem chegar até aqui, por me apoiarem e estarem sempre ao meu lado, dando todo o suporte necessário, financeiro e psicológico. Sem vocês nada disso teria sido possível e nenhum sonho teria se transformado em realidade. Amos vocês de uma forma incondicional.

Ao meu querido noivo Guilherme, incansável companheiro de todas as horas, boas e ruins, sempre cheio de palavras de apoio e carinho, e com certeza, de quem eu mais tirei horas de convívio para terminar este trabalho. Minha eterna gratidão e respeito pela pessoa maravilhosa que tu és. Te amo pra sempre!

À minha grande amiga e mestre, Liane Golbspan, por todos os ensinamentos desde que eu ingressei na carreira da patologia. Obrigada por ter sido tantas vezes minha mãe, minha conselheira, minha amiga e por me ensinar, que antes de qualquer coisa, o respeito pelo paciente deve ser a coisa mais importante em nosso trabalho. Tu tens a minha eterna admiração e gratidão.

Às minhas amigas superpoderosas, Juliana Castanho e Raquel Rivero. Não tenho palavras para agradecer todo o apoio de vocês, as trocas de escala, as palavras de consolo e simplesmente, pela amizade incrível que vocês tem por mim, vibrando a cada vitória conquistada. Vocês não imaginam o bem que a amizade de vocês fez para a minha vida.

Ao meu amigo e colega Pedro, pelas várias trocas de turnos de congelação para que eu pudesse comparecer às minhas aulas e por sempre acreditar tanto no meu sucesso.

À Dra. Lúcia Kliemann, por acreditar que eu poderia terminar este trabalho em tempo hábil, muito mais do que eu acreditei. Tu és em grande exemplo de superação.

E como não poderia ser, por último mas de longe menos importante, aos meu queridos bolsistas de iniciação científica, Edson Rodrigues Neto e Mariana Kumaira Fonseca, por batalharem comigo o dia-a-dia da coleta dos encéfalos, as angústias do DML e por todas as risadas e aprendizados que

este trabalho árduo nos proporcionou. O meu sincero muito obrigado, com a certeza de que este trabalho não teria êxito sem a preciosa ajuda de vocês.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas utilizadas

AT8: anticorpo anti tau

CCL: Comprometimento Cognitivo Leve

CL: Corpos de Lewy

DA: Doença de Alzheimer

DAIP: Doença de Alzheimer de Início Precoce

DFT: Demência Frontotemporal

DN: Doença Neurodegenerativa

DNs: Doenças Neurodegenerativas

DP: Doença de Parkinson

ENFs: Emaranhados Neurofibrilares

NIA-AA: National Institute on Aging and Alzheimer Association

NL: Neuritos de Lewy

NTs: Neuritos

pENFs: pré-Emaranhados Neurofibrilares

PET: Positron Emission Tomography

PL: Patologia de Lewy

PPA: Proteína Precursora Amiloide

Resumo da Dissertação

Introdução:
Com o aumento da expectativa de vida no Brasil e no mundo, crescem as preocupações com as doenças mais prevalentes entre os idosos, dentre elas as doenças neurodegenerativas como a doença de Alzheimer (DA) e a doença de Parkinson (DP). Sabe-se que os depósitos proteicos relacionados com o desenvolvimento destas doenças podem preceder a fase sintomática em anos. A proteína tau é de particular interesse, uma vez que parece ser encontrada no tronco encefálico e bulbo olfatório muito antes de atingir o córtex límbico, quando ocorrem os primeiros sintomas.
Objetivos:
Este estudo tem como objetivo principal a criação de um protocolo local e de um banco de encéfalos humanos para o estudo de doenças neurodegenerativas, além da detecção de alterações precoces relacionadas às doenças neurodegenerativas no tronco encefálico e no bulbo olfatório de indivíduos com 50 anos ou mais.
Material e Métodos:
Trata-se de uma amostra coletada por conveniência e sob consentimento informado. Informações clínicas dos doadores foram obtidas junto aos familiares por meio de questionário para rastreamento de declínio cognitivo (IQCODE) e um segundo questionário, personalizado, para avaliar alterações motoras. Os encéfalos foram fixados em solução de formalina a 10% por 4 semanas, avaliados macroscopicamente e cortados conforme protocolo internacional, amostrando todas as áreas encefálicas incluindo as regiões em estudo. Os cortes foram corados pela coloração de Hematoxilina-eosina e imunocorados para os anticorpos anti-beta-amiloide, anti-tau e anti-alfa-sinucleína.
Resultados:
A média de idade entre os doadores foi de 72,07 anos (±15,79). Os indivíduos demenciados correspondem a 57% da amostra e a média do IQCODE destes é de 3,72, enquanto para os não-demenciados, é de 2,74, havendo diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos para esta variável. Dos 14 encéfalos coletados neste estudo, a proteína tau foi encontrada, no tronco, em 10 (71,42%). Dos 7 indivíduos que tiveram diagnóstico final de DA, todos apresentavam depósitos de tau em alguma região do tronco encefálico.
Conclusão:
Existem poucos dados publicados sobre os depósitos proteicos no tronco encefálico e bulbo olfatório de pacientes com diagnóstico de DA, uma vez que as manifestações clínicas ocorrem quando a proteína tau, em associação com a proteína β-amiloide, deposita-se no hipocampo e no córtex entorrinal. Nossos dados estão de acordo com a literatura mais recente, que tem confirmado a presença de proteína tau no tronco encefálico e bulbo olfatório nos estágios mais precoces da DA.

Palavras-chave:
Doenças neurodegenerativas – Alzheimer – Parkinson

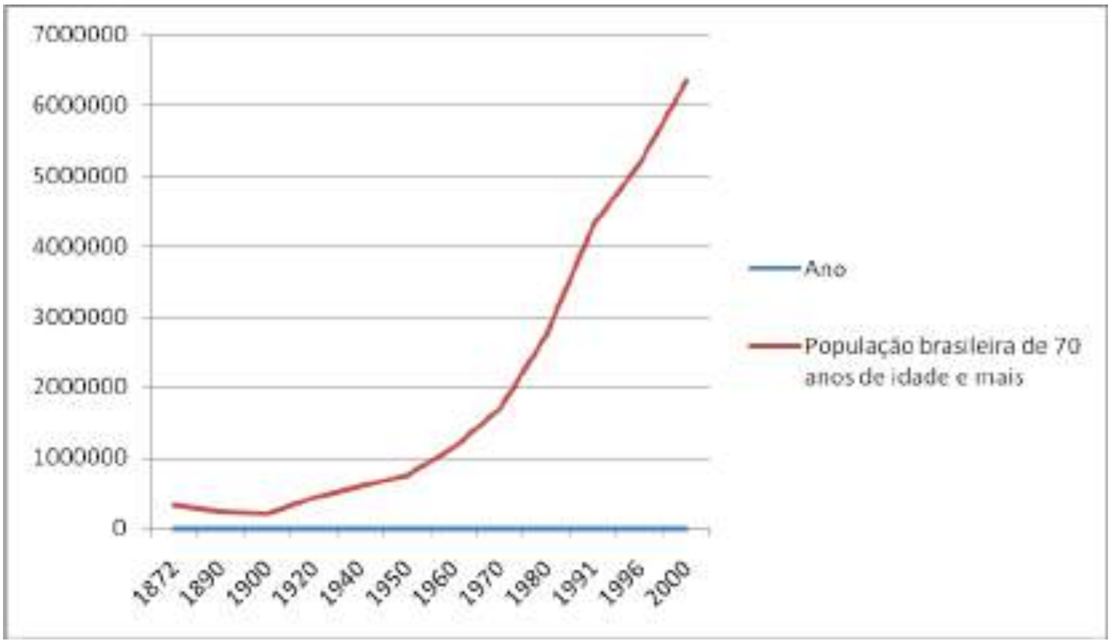
1. Introdução

1.1. O perfil demográfico no Brasil e o envelhecimento populacional

O envelhecimento da população brasileira pode ser medido pela proporção de pessoas de 60 anos ou mais no total da população. Esta aumentou de 4% em 1940 para 11% em 2010. Espera-se que este grupo etário, que era formado por 20,6 milhões de pessoas em 2010, venha a ser constituído por 57 milhões em 2040 (Camarano et al., 2013). O Brasil destaca-se por apresentar uma das maiores taxas de crescimento desta população. A questão da terceira idade emerge como problema para investigação e planejamento de políticas públicas, em razão do inevitável crescimento de demanda ao sistema de saúde (Carvalho e Garcia, 2003;Tavares e Anjos, 1999).

Pode-se afirmar que até os anos 60 a população brasileira apresentou-se como quase-estável, com distribuição etária praticamente constante. Era uma população extremamente jovem, com cerca de 52% abaixo de 20 anos, e menos de 3% acima dos 65 anos (Gráfico 1) (Carvalho e Garcia, 2003).

Gráfico 1: População brasileira de 70 anos e mais entre os anos de 1872 e 2000.



Fonte: Recenseamento do Brasil 1872-1920. Rio de Janeiro: Diretoria Geral de Estatística, [1872] - 1930; Censo demográfico 1940-2000. Rio de Janeiro: IBGE, 1950 -2001; Contagem da população 1996. Rio de Janeiro: IBGE, 1997. v. 1: Resultados relativos a sexo da população e situação da unidade domiciliar. Dados extraídos de: Estatísticas do Século XX. Diversas tabelas. Rio de Janeiro: IBGE, 2007.

1.2. O envelhecimento populacional e as novas patologias

A transição epidemiológica observada no Brasil é, em síntese, decorrente de importantes mudanças como a queda na taxa de mortalidade, a mudança no padrão de morbidade com redução das doenças transmissíveis e o aumento das não-transmissíveis, bem como o deslocamento da morbimortalidade para os grupos etários mais velhos (Mascarenhas et al., 2008; Zago, 2004).

Na idade muito avançada, aumenta a incidência de doenças neurodegenerativas (DNs), dentre as quais as que se denominam genericamente de demências (*de*: partícula privativa; *mência*: do latim *mens*, mente. Literalmente, “perda da mente”). As demências recebem esse nome porque comprometem de forma significativa a memória e outras funções cognitivas com intensidade suficiente para produzir perda funcional e, em fases mais avançadas, a realização de atividades da vida diária e/ou o reconhecimento de pessoas e lugares do entorno habitual (o próprio filho, a própria casa) (Prado et al., 2007).

1.2.1. Doença de Alzheimer (DA)

A mais importante das demências é a DA (Prado et al., 2007; Nussbaum e Ellis, 2003). Esta se caracteriza por uma perda intensa da capacidade cognitiva, com diminuição de memória declarativa ou episódica (isto é, memória de eventos) e dificuldades de linguagem, bem como sintomas comportamentais como apatia, depressão e agitação/agressividade, estas últimas principalmente na fase inicial da DA. Frequentemente, a DA não é detectada durante os primeiros anos de seu percurso, quando se apresentam os primeiros sintomas de dificuldades de memória (Prado et al., 2007).

Seu diagnóstico definitivo é, ainda hoje, dependente do exame histopatológico do cérebro pós-morte, feito através da identificação da perda seletiva de neurônios em determinadas áreas, bem como da detecção, por técnicas de imunoperoxidase, de depósitos de proteínas tau hiperfosforilada e beta-amiloide. Em vida, o diagnóstico de DA provável é realizado por exclusão de outras formas de demências e da aplicação de testes neuropsicológicos especialmente desenhados para avaliar a capacidade cognitiva dos pacientes. Some-se à dificuldade de diagnóstico precoce da doença o fato de que ainda não existem tratamentos efetivos capazes de curar ou impedir o curso da DA, nem tampouco métodos preventivos comprovadamente eficazes (Prado et al., 2007).

Muitos outros quadros patológicos também comprometem a cognição, mas as síndromes cognitivas resultantes, às vezes, mostram-se potencialmente reversíveis, como a depressão severa, o alcoolismo, o hipotireoidismo ou a hidrocefalia. Em muitas ocasiões, o comprometimento vascular secundário à aterosclerose pode constituir um fator determinante ou agravante das disfunções cognitivas dos idosos e/ou das demências (Prado et al., 2007).

A prevalência das demências em geral e da DA em particular aumenta de forma significativa com a idade. A proporção da população que apresenta alterações cognitivas decorrentes da DA ou de outras DNs em países desenvolvidos parece ser de 30-40% na faixa etária acima de 80 anos (Gráfico 2). Os custos para a saúde pública do cuidado de pacientes nessa situação não foram ainda rigorosamente estimados no Brasil, mas nos EUA, que possuem 4,5 milhões de doentes, calcula-se um custo total de 174 mil dólares por paciente. Estima-se também, que os custos diretos e indiretos para a economia americana decorrentes do cuidado com pacientes com a DA possam chegar a 100 bilhões de dólares por ano, um valor equivalente ao PIB de muitos países médios. Um estudo epidemiológico brasileiro na cidade de Catanduva (SP), em que foram avaliados 1.656 indivíduos com idade acima de 64 anos, demência foi diagnosticada em 118 idosos, correspondendo a uma prevalência de 7,1%. Na faixa etária de 85 anos ou mais, foi diagnosticada demência em 38,9% dos indivíduos. A DA foi a principal causa de demência, responsável por 55,1% dos casos. A prevalência de demência aumentou com a idade e foi maior nas mulheres, além de correlacionar-se inversamente com a escolaridade (3,5% entre pessoas com escolaridade igual ou superior a 8 anos e 12,2% entre os analfabetos). Embora os dados epidemiológicos disponíveis a respeito da demência no Brasil ainda sejam muito escassos, estima-se que tenhamos atingido cerca de 800 mil idosos (> 64 anos) com esse diagnóstico em 2005, dos quais 450 mil com DA (Prado et al., 2007).

Gráfico 2: Estimativas mundiais da prevalência da DA em homens e mulheres

Fonte: *Nussbaum e Ellis, NEJM, 2003.*

Atualmente existem evidências que a fase neurodegenerativa da DA inicia-se por volta de 10 anos antes dos sintomas de déficit cognitivo, entendendo a DA como um *continuum* desde estágios neurodegenerativos precoces assintomáticos até demência. O NIA-AA postula três estágios da doença: o pré-clínico, quando há somente padrões anormais em biomarcadores (como o amilóide-$ß_{42}$ no líquor, aumento da retenção de marcador amilóide no *PET-scan* ou, mais tarde, evidência de degeneração ou lesão neuronal) sem déficit cognitivo; o CCL devido à DA, quando surgem os primeiros déficits cognitivos mas sem alterações importantes na funcionalidade do indivíduo e outros biomarcadores e exames podem elevar a probabilidade diagnóstica, e por fim a fase demencial da DA. (Mac'Khann et al., 2011). A fase demencial da DA pode ser divida em três fases: leve, moderada e grave, de acordo com o nível de comprometimento cognitivo e o grau de dependência do indivíduo. Na fase leve da doença, o paciente mostra queda significativa no desempenho de tarefas da vida diária, mas ainda é capaz de executar as atividades básicas do dia a dia, mantendo-se independente. Na fase moderada, o comprometimento intelectual é maior e o paciente passa a necessitar de assistência para realizar tanto as atividades instrumentais como as atividades básicas do dia a dia. Na fase grave da DA, o paciente geralmente fica acamado, necessitando de assistência integral. Nessa fase, o paciente pode apresentar dificuldades de deglutição, além de outros sinais neurológicos (por exemplo: mioclonias e crises convulsivas), incontinência urinária e fecal (Bottino e Almeida, 1995).

Aproximadamente 80 anos depois de Alois Alzheimer descrever placas amiloides e emaranhados neurofibrilares (ENFs) no cérebro de um paciente com demência, os componentes histológicos destes achados foram finalmente isolados. Um Aβ-peptídeo, produto da clivagem da proteína precursora amilóide (PPA), acabou por ser o elemento central da bioquímica das placas, enquanto a proteína tau hiperfosforilada, uma proteína de ligação de microtúbulos, estava no centro destes emaranhados (Small e Duff, 2008).

As placas senis são lesões extracelulares complexas que são associadas com o processo de degeneração neuronal, ativam a microglia entrelaçada com os depósitos centrais e são circundadas por astrócitos reativos. Estes depósitos são encontrados em todo o neocórtex e hipocampo de pacientes com DA (Eckman e Eckman, 2007).

Na classificação publicada por Braak e Braak em 1991 para a distribuição da proteína β-amiloide, apenas o córtex cerebral é levado em conta: no estágio A, os depósitos ocorrem nas porções basais do córtex; no estágio B, todas as áreas do isocórtex estão involvidas, enquanto o hipocampo e as áreas corticais primárias estão comprometidas de forma discreta; no estágio C, os depósitos podem ser vistos em todas as áreas do isocórtex incluindo as áreas primárias sensoriais e motoras. Já de acordo com Thal e cols., o acometimento das estruturas do tronco cerebral é considerado e as fases que explicam os depósitos de β-amiloide são divididas em cinco. O isocórtex está envolvido na fase 1, o hipocampo e o córtex entorrinal na fase 2, o estriado e o núcleo diencefálico na fase 3, vários núcleos do tronco cerebral na fase 4 e, finalmente, o cerebelo e núcleos adicionais do tronco encefálico na fase 5 (Thal et al., 2002).

Notavelmente, as mutações em dois genes codificando a PPA e a proteína tau hiperfosforilada, foram encontradas como causa da doença demencial. Mutações na PPA, que aceleram a produção de Aβ, foram encontradas em alguns casos, sendo esta a base de uma forma monogênica da doença, relacionada ao início precoce da doença de Alzheimer (DAIP) (Goate et al., 1991). Embora extremamente rara, a DAIP recapitula o perfil histológico de placas e emaranhados, sendo este fenótipo clínico da doença caracterizado por uma disfunção do hipocampo predominante e disfunção de outros sítios neocorticais. Em contraste, as mutações no gene que codifica a proteína tau, apesar de presentes quando ocorre a hiperfosforilação desta, não levam à DA (Hutton et al., 1998). Pelo contrário, estas mutações resultam em um tipo diferente de demência, a demência frontotemporal (DFT) que, como o próprio nome indica, é caracterizada por uma disfunção frontal predominante. Além disso, a DFT é histologicamente diferente da DA, sendo a primeira caracterizada por emaranhados que ocorrerem inicialmente em sítios extra-hipocampais e, o mais importante, o cérebro não apresenta placas senis (Levy-Lahad et al., 1995).

A formação anormalmente alterada de proteína tau microtúbulo-associada em determinados tipos de células nervosas humanas é crucial para a patogênese da DA (Braak e Del Tredici, 2012; Mandelkow et al., 2007; Alonso et al., 2008; Iqbal et al., 2009). As lesões induzidas pela proteína tau estão presentes desde o início até a fase final da doença e não regridem (Braak e Del Tredici, 2012; Braak e Del Tredici, 2011). A fase mais precoce da doença é de especial interesse porque apenas a tau anormal está envolvida neste ponto, em contraste com a fase final (Braak e Del Tredici, 2011; Braak e Del Tredici, 2012; Pimplikar, 2009).

Por razões ainda desconhecidas, projeções celulares particularmente vulneráveis do cérebro começam a produzir uma proteína tau anormalmente fosforilada que não se liga ao microtúbulo e permanece livre, em altas concentrações, no citosol. Sob tais condições, a tau anormal tende a formar agregados não biodegradáveis. Não se sabe porque os mecanismos de depuração celular não desagregam ou eliminam este material. Os agregados acumulam-se dentro dos neurônios, inicialmente como inclusões não fibrilares, visíveis sob microscopia ótica e chamadas de pré-emaranhados neurofibrilares (pENFs). Este pré-emaranhado pode (mas não sempre) evoluir para fibrilas rígidas nos processos dendríticos, chamadas de neuritos (NTs) e emaranhados nos corpos celulares, chamados de emaranhados neurofibrilares (ENFs). Ambos os tipos de proteína tau anormal coram fortemente em reações de imuno-histoquímica com o anticorpo AT8 (Braak e Del Tredici, 2012; Bancher et al., 1989; Braak et al., 1994).

O processo da doença intraneuronal progride de uma maneira topograficamente sistemática e pode exigir um período bastante prolongado, quase uma vida inteira, para alcançar sua extensão. (Braak e Del Tredici, 2011; Arnold et al., 1991; Braak e Braak, 1991; Braak e Braak, 1997; Braak e Del Tredici, 2012). Fases tardias da doença causam sintomas reconhecíveis e se correlacionam com o quadro clínico da DA (Braak e Del Tedici, 2012; Nelson et al., 2007; Dolan et al., 2010; Sabbagh et al., 2010).

A presença de emaranhados neurofibrilares (ENFs) é graduada em estágios de I a VI. Os estágios I e II, correspondentes à fase prodrômica, começam na adolescência e aumentam de forma constante até a quinta e sexta décadas de vida e as lesões causadas pela proteína tau estão localizadas principalmente dentro da região entorrinal do lobo temporal (Braak e Del Tredici, 2012; Braak e Del Tredici, 2011; Braak et al., 2006). As fases III e IV começam a ocorrer entre os 31 e 40 anos e vão aumentando em frequência. Na fase III, a patologia está restrita a algumas poucas regiões na porção medial do lobo temporal e alguns pacientes já são diagnosticados com declínio cognitivo leve. No estágio IV, há um aumento dos depósitos nas mesma regiões acometidas na fase III e pode haver discreto envolvimento de áreas neocorticais (Braak et al., 2012; Markesbery et al., 2006; Albert et al., 2011). Os estágios V e VI representam o estágio final da DA. Nestes estágios, virtualmente todas as regiões corticais estão acometidas e a diferença entre os estágios V e VI está no grau de depósitos de tau, sendo que no estágio V o acometimento é menos extenso (Braak e Del Tredici, 2012; Braak e Braak, 1991; Braak et al., 2006).

Configuração anormal e agregação proteicas são características comuns entre a DA e as doenças priônicas. Embora a transmissão entre indivíduos ou entre espécies seja rara na doença priônica, algumas evidências recentes sugerem que um prionoide possa desenvolver algum papel na patogênese da DA. Investigações experimentais recentes apontam para a hipótese de que os agregados de proteína tau podem se mover de uma célula para outra (Braak et al., 2011; Clavaguera et al., 2009; Frost e Diamond, 2009). Permanecem questões não resolvidas tanto em relação à teoria da cascata amiloide quanto à atualmente presumida hierarquia da vulnerabilidade entre os vários tipos de células nervosas que são acometidas nos diferentes estágios do processo patológico associado à DA. Por outro lado, levando-se em conta as recentes descobertas de pENFs em cérebros de pacientes muito jovens, a hipótese ainda controversa de transferência neurônio-neurônio e a propagação através de semeadura oferecem uma explicação mais objetiva tanto para o padrão de distribuição previsível das lesões intraneuronais pela tau no cérebro, bem como para a taxa extremamente lenta de progressão da doença, que caracterizam, neuropatologicamente, a DA (Braak e Del Tredici, 2011; Brundin et al., 2010; Goedert et al., 2010).

1.2.2. Doença de Parkinson (DP)

A doença de Parkinson (DP) é a segunda desordem neurodegenerativa mais comum, depois da DA. É caracterizada clinicamente pelo parkinsonismo (tremor de repouso, bradicinesia, rigidez e instabilidade postural) e patologicamente pela perda dos neurônios na substância nigra, além da associação com a presença de depósitos da proteína alfa-sinucleína (corpos de Lewy). A DP tem uma prevalência aproximada de 0.5 a 1% entre indivíduos de 65 a 69 anos, atingindo 1 a 3% entre indivíduos com 80 anos ou mais (Nussbaum e Ellis, 2003). Semelhante às outras DNs, o principal fator de risco é a idade, embora 10% das pessoas com a doença têm menos de 45 anos. A incidência parece diminuir na nonagésima década de vida, o que pode ser em consequência do sub-diagnóstico nesta faixa etária ou por um declínio real, semelhante ao que ocorre em outras DNs como a doença do neurônio motor (Bossy-Wetzel et al., 2004).

O diagnóstico é feito clinicamente, embora outras doenças com sintomas proeminentes e sinais de parkinsonismo encontrados em situações pós-encefalite, parkinsonismo droga-induzido e parkinsonismo arterioesclerótico, possam ser confundidas com DP até que o diagnóstico seja confirmado em estudos de necrópsia (Nussbaum e Ellis, 2003).

Um componente genético foi durante muito tempo considerado como improvável, pois a maioria dos pacientes apresenta a forma esporádica da doença e estudos iniciais em gêmeos mostraram taxas igualmente baixas de ocorrência entre monozigóticos e dizigóticos. A visão de que a genética está envolvida em algumas formas da DP foi reforçada pela observação de que os gêmeos monozigóticos que apresentavam os sintomas antes dos 50 anos tinham uma taxa muito elevada de concordância, taxa muito maior do que a observada entre gêmeos dizigóticos com início precoce da doença. Um risco aumentado de ocorrência da DP foi observado em parentes de primeiro grau de pacientes afetados pela doença, particularmente quando os resultados da tomografia por emissão de pósitrons realizada em familiares assintomáticos foram considerados, adicionando evidências da existência de um componente genético da doença (Nussbaum e Ellis, 2003).

A DP esporádica é a doença por corpos de Lewy mais frequente (Del Tredici, 2012) e progressiva do sistema nervoso que se manifesta clinicamente depois que a patologia já alcançou estágios avançados. Um pré-requisito para o diagnóstico pós-morte das fases pré-clínica e clínica do processo patológico é a perda seletiva de neurônios em determinados locais, além da evidência de corpos de inclusão específicos, denominados de corpos de Lewy (CL). Esses corpos contêm uma fosfoproteína chamada de alfa-sinucleína, que se encontra sob um aspecto alongado e pouco estruturado em solução, mas que se agrega em filamentos insolúveis ao nível destes corpos, sendo provável que esta agregação conduza à morte celular (Moore et al., 2005; Del Tredici e Braak, 2012).

Na DP esporádica, apenas alguns tipos específicos de células nervosas estão propensas a desenvolver lesões (Braak et al., 2003).

Danos a sub-núcleos específicos da substância nigra pars compacta, com obliteração grave das suas projeções neuronais neuromelanina-carreadas, frequentemente são considerados o marco mais importante da DP (Braak et al., 2003).

Os fatores patogênicos intrínsecos e extrínsecos subjacentes a esta proteinopatia não são totalmente entendidos, mas a falência dos mecanismos celulares fisiológicos de limpeza (Del Tredici e Braak, 2012) provavelmente resultam na formação das lesões que a caracterizam, como os neuritos pálidos, os neuritos de Lewy (NL) dentro dos axônios e dendritos, e corpos pálidos e CL dentro do corpo celular neuronal (Del Tredici e Braak, 2012; Dale et al., 1992; Irizarry et al., 1998; Kuusisto et al., 2003), sendo que os NL ocorrem antes dos CL na maioria dos sítios envolvidos (Del Tredici e Braak, 2012; Braak e Del Tredici, 2009).

A patologia de Lewy (PL) é encontrada em necrópsias de indivíduos sem manifestações clínicas de sintomas motores da DP (PL incidental) ocorrendo dentro de todas as subdivisões do sistema nervoso (Pimplikar, 2009; Del Tredici e Braak, 2012; Ross et al., 2006; Bloch et al., 2006). No entanto, a PL não obrigatoriamente acompanha a idade avançada e podemos encontrar NL e CL incidentais em indivíduos neurologicamente assintomáticos, sendo esses marcadores prodrômicos da DP e utilizados pra descrever a fase pré-clínica (pré-motora) da doença (Del Tredici e Braak, 2012; Halliday et al., 2011; Lang, 2011; Adler et al., 2010).

Os estágios da DP variam de I a VI, acometendo o núcleo motor dorsal do nervo vago (estágio I), progredindo caudorostralmente ao longo do neuroeixo durante os estágios II a VI através das porções basais do tronco cerebral inferior bem como o mesencéfalo e prosencéfalo, até atingir o córtex cerebral. Nos estágios I e II, há envolvimento apenas do bulbo e do tegmento da ponte; nos estágios III e IV, há envolvimento adicional do mesencéfalo e do mesocórtex temporal e, nos estágios finais V e VI, somam-se os depósitos de α-sinucleína no neocórtex (Braak et al., 2003).

A PL está geralmente presente no núcleo olfatório anterior do trato olfatório (Pimplikar, 2009; Del Tredici e Braak, 2012; Hubbard e Esiri, 2007) a partir do estágio I em diante (Del Tredici e Braak, 2012; Braak et al., 2003). A existência de casos envolvendo apenas o bulbo olfatório não elimina a possibilidade de que um patógeno do nariz possa alcançar o lúmen intestinal e induzir o enovelamento e agregação incorretos da alfa-sinucleína nos plexos neuronais intramurais antes de entrar no sistema nervoso central através de um transporte axonal retrógrado e transmissão transsináptica ao longo dos sistemas nervosos simpático e parassimpático (Del Tredici e Braak, 2012; Goedert et al., 2010). O envolvimento do núcleo olfatório anterior inclui perda de células mitrais e a presença de PL, especialmente dentro da camada plexiforme interna (Del Tredici e Braak, 2012; Jellinger, 2009). Embora o envolvimento das vias olfatórias ainda necessite de muitos esclarecimentos, é amplamente reconhecido que o teste para hiposmia na presença de outros sintomas não motores é uma ferramenta diagnóstica preditiva muito útil (Del Tredici e Braak, 2012; Ross et al., 2008).

Assim como a patologia tau-associada na DA, acredita-se que as lesões causadas pela α-sinucleína se espalhem de maneira progressiva e sua propagação se relacione com o estadiamento dos sintomas clínicos. Alguns estudos mostraram que neurônios embrionários transplantados no estriado de um indivíduo com DP desenvolveram patologia de Lewy-like, sugerindo que a α-sinucleína patológica possa ser transmitida de neurônios doentes para neurônios saudáveis (Masuda-Suzukake et al., 2013).

1.3 As doenças neurodegenerativas e o tronco encefálico

1.3.1 O tronco cerebral nos estágios precoces da DP

Muitos sintomas não motores foram descritos em paciente com DP, mas esses eram considerados, em sua maioria, como não associados às lesões cerebrais pela DP. Esse cenário mudou dramaticamente a partir de 2003, quando Braak et al. propuseram um esquema cronológico para a propagação dos corpos de Lewy durante o curso da doença e demonstraram que vários núcleos do tronco cerebral estão envolvidos pela doença antes da substância nigra. Atualmente, aceita-se que a substância nigra seja afetada apenas no estágio III da progressão da DP e que os primeiros sintomas motores são geralmente detectados no estágio IV, momento este em que a maioria da substância nigra já está degenerada. Após estes achados foi possível correlacionar muitos dos sintomas não motores e não específicos, como disfunções autonômicas, depressão e distúrbios do sono, às alterações histopatológicas ocorrendo no tronco cerebral.

Estes achados mudaram dramaticamente a visão sobre a DP, caracterizando-a como uma doença multissistêmica com sintomas motores e não motores. No entanto, as vias exatas que ligam a ordem cronológica dos acontecimentos e os centros topograficamente afetados com as regiões corticais, precisam ser desvendadas (Grinberg et al., 2011).

1.3.2 O tronco cerebral nos estágios precoces da DA

Como os corpos de Lewy na DP, a patologia tau-associada na DA também segue uma progressão anatômica característica, não-randômica. Essa progressão estereotipada demonstrada em detalhes pelos estudos de Braak e

Braak de 1991 é a base para o estadiamento da DA utilizado atualmente. No entanto, esse sistema é confinado às áreas alocorticais e neocorticais e, portanto, não trata das alterações que ocorrem no tronco cerebral. Nas últimas duas décadas, estudos confirmaram o envolvimento do tronco cerebral na DA, mas esse envolvimento tem sido considerado, principalmente, como secundário às alterações supratentorais. Em 2009, um estudo utilizando cérebros pós-morte com envelhecimento normal, demonstrou que o núcleo dorsal da rafe apresentava ENFs antes da região transentorrinal (estágio I da classificação de Braak). Neste estudo com 118 casos, 100% dos 80 indivíduos que tinham a região transentorrinal afetada por ENFs, também apresentavam essa alteração no núcleo dorsal da rafe. Além disso, 22% dos 38 indivíduos que não apresentavam ENFs na região cortical (Estágio 0 de Braak), apresentavam essa alteração no núcleo dorsal da rafe. Esses achados sugerem fortemente que as áreas do tronco cerebral sejam afetadas pela DA antes das regiões supratentoriais. Esse acometimento precoce do núcleo dorsal da rafe poderia explicar os sintomas depressivos relatados por muitos pacientes com DA, anos antes das alterações cognitivas, pois este núcleo produz grande parte da serotonina cerebral (Grinberg et al., 2011).

1.4 As doenças neurodegenerativas e o bulbo olfatório

Dados recentes na literatura têm confirmado que disfunções olfatórias (hiposmia e anosmia) são uma característica muito comum em numerosas DNs, estudadas em detalhe, principalmente, nas doenças de Alzheimer e Parkinson. Em muitos casos, o déficit olfatório é um evento precoce dessas doenças. No caso da DP, pode preceder os sintomas clínicos típicos por muitos anos, portanto reforçando que a patologia olfatória ocorre em estágios precoces da doença e, consequentemente, a diminuição ou perda do olfato pode ser considerada um marcador prematuro de um grande número de DNs (Mundiñano et al., 2011).

Os mecanismos subjacentes à disfunção olfatória nas DNs não são totalmente compreendidos. O acúmulo de agregados proteicos em vários níveis do sistema olfatório, a degeneração de neurônios intrínsecos do bulbo olfatório e o aumento da transmissão inibitória criada pelo aumento do número de neurônios dopaminérgicos podem estar relacionados à diminuição do olfato em pacientes com DNs (Mundiñano et al., 2011).

1.5 Referências Bibliográficas

Adler CH, Connor DJ, Hentz JG, Sabbagh MN, Caviness JN, Shill HA, et al. Incidental Lewy body disease: clinical comparison to a control cohort. Mov Disord. 2010 Apr 15;25(1):642-646.

Albert MS, DeKosky ST, Dickson D, Dubois B, Feldman HH, Fox NC, et al. The diagnosis of mild cognitive impairment due to Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. Alzheimer's & dementia : the journal of the Alzheimer's Association. 2011 May;7(3):270-279.

Alonso AC, Li B, Grundke-Iqbal I, Iqbal K. Mechanism of tau-induced neurodegeneration in Alzheimer disease and related tauopathies. Current Alzheimer research. 2008 Aug;5(4):375-384.

Arnold SE, Hyman BT, Flory J, Damasio AR, Van Hoesen GW. The topographical and neuroanatomical distribution of neurofibrillary tangles and neuritic plaques in the cerebral cortex of patients with Alzheimer's disease. Cerebral cortex. 1991 Jan-Feb;1(1):103-116.

Bancher C, Brunner C, Lassmann H, Budka H, Jellinger K, Wiche G, et al. Accumulation of abnormally phosphorylated tau precedes the formation of neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. Brain research. 1989 Jan 16;477(2):90-99.

Bloch A, Probst A, Bissig H, Adams H, Tolnay M. Alpha-synuclein pathology of the spinal and peripheral autonomic nervous system in neurologically unimpaired elderly subjects. Neuropathol Appl Neurobiol. 2006 Jun;32(3):284-295.

Bossy-Wetzel E, Schwarzenbacher R, Lipton SA. Molecular pathways to neurodegeneration. Nature medicine. 2004 Jul;10 Suppl:S2-9.

Bottino C, Almeida O. Demências: quadro clínico e critérios diagnósticos. In: Almeida O, Nitrini R, editors. Demências. São Paulo: Fundo Editorial Byk; 1995. p. 13-29.

Braak H, Braak E. Neuropathological stageing of Alzheimer-related changes. Acta Neuropathol. 1991;82(4):239-259.

Braak E, Braak H, Mandelkow EM. A sequence of cytoskeleton changes related to the formation of neurofibrillary tangles and neuropil threads. Acta Neuropathol. 1994;87(6):554-567.

Braak H, Braak E. Frequency of stages of Alzheimer-related lesions in different age categories. Neurobiol Aging. 1997 Jul-Aug;18(4):351-357.

Braak H, Del Tredici K, Rub U, de Vos RA, Jansen Steur EN, Braak E. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. Neurobiol Aging. 2003 Mar-Apr;24(2):197-211.

Braak H, Alafuzoff I, Arzberger T, Kretzschmar H, Del Tredici K. Staging of Alzheimer disease-associated neurofibrillary pathology using paraffin sections and immunocytochemistry. Acta Neuropathol. 2006 Oct;112(4):389-404.

Braak H, Del Tredici K. Neuroanatomy and pathology of sporadic Parkinson's disease. Advances in anatomy, embryology, and cell biology. 2009;201:1-119.

Braak H, Del Tredici K. Alzheimer's pathogenesis: is there neuron-to-neuron propagation? Acta Neuropathol. 2011 May;121(5):589-595.

Braak H, Del Tredici K. Alzheimer's disease: pathogenesis and prevention. Alzheimer's & dementia : the journal of the Alzheimer's Association. 2012 May;8(3):227-233.

Brundin P, Melki R, Kopito R. Prion-like transmission of protein aggregates in neurodegenerative diseases. Nature reviews Molecular cell biology. 2010 Apr;11(4):301-307.

Camarano A, Kanso S, Fernandes D. Envelhecimento Populacional, perda de capacidade laborativa e políticas públicas. Boletim Mercado de Trabalho - Conjuntura e Análise (ipea). 2013;54:21-29.

Carvalho J, Garcia A. O envelhecimento da população brasileira: um enfoque demográfico. Cadernos de Saúde Pública/Ministério da Educação. 2003;19(3):725-733.

Clavaguera F, Bolmont T, Crowther RA, Abramowski D, Frank S, Probst A, et al. Transmission and spreading of tauopathy in transgenic mouse brain. Nature cell biology. 2009 Jul;11(7):909-913. PubMed PMID: 19503072.

Dale GE, Probst A, Luthert P, Martin J, Anderton BH, Leigh PN. Relationships between Lewy bodies and pale bodies in Parkinson's disease. Acta Neuropathol. 1992;83(5):525-529.

Del Tredici K, Braak H. Lewy pathology and neurodegeneration in premotor Parkinson's disease. Mov Disord. 2012 Apr 15;27(5):597-607.

Dolan D, Troncoso J, Resnick SM, Crain BJ, Zonderman AB, O'Brien RJ. Age, Alzheimer's disease and dementia in the Baltimore Longitudinal Study of Ageing. Brain. 2010 Aug;133(Pt 8):2225-2231.

Eckman CB, Eckman EA. An update on the amyloid hypothesis. Neurol Clin. 2007 Aug;25(3):669-82.

Frost B, Diamond MI. The expanding realm of prion phenomena in neurodegenerative disease. Prion. 2009 Apr-Jun;3(2):74-77.

Grinberg LT, Rueb U, Heinsen H. Brainstem: neglected locus in neurodegenerative diseases. Frontiers in neurology. 2011; 2:42.

Goate A, Chartier-Harlin MC, Mullan M, Brown J, Crawford F, Fidani L, et al. Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. Nature. 1991 Feb 21;349(6311):704-706.

Goedert M, Clavaguera F, Tolnay M. The propagation of prion-like protein inclusions in neurodegenerative diseases. Trends in neurosciences. 2010 Jul;33(7):317-325.

Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Quinlan M, Tung YC, Zaidi MS, Wisniewski HM. Microtubule-associated protein tau. A component of Alzheimer paired helical filaments. The Journal of biological chemistry. 1986 May 5;261(13):6084-6089.

Halliday G, Lees A, Stern M. Milestones in Parkinson's disease--clinical and pathologic features. Mov Disord. 2011 May;26(6):1015-1021.

Hubbard PS, Esiri MM, Reading M, McShane R, Nagy Z. Alpha-synuclein pathology in the olfactory pathways of dementia patients. J Anat. 2007 Jul;211(1):117-124.

Hutton M, Lendon CL, Rizzu P, Baker M, Froelich S, Houlden H, et al. Association of missense and 5'-splice-site mutations in tau with the inherited dementia FTDP-17. Nature. 1998 Jun 18;393(6686):702-705.

Iqbal K, Liu F, Gong CX, Alonso Adel C, Grundke-Iqbal I. Mechanisms of tau-induced neurodegeneration. Acta Neuropathol. 2009 Jul;118(1):53-69.

Irizarry MC, Growdon W, Gomez-Isla T, Newell K, George JM, Clayton DF, et al. Nigral and cortical Lewy bodies and dystrophic nigral neurites in Parkinson's disease and cortical Lewy body disease contain alpha-synuclein immunoreactivity. J Neuropathol Exp Neurol. 1998 Apr;57(4):334-337.

Jellinger KA. Olfactory bulb alpha-synucleinopathy has high specificity and sensitivity for Lewy body disorders. Acta Neuropathol. 2009 Feb;117(2):215-216; author reply 217-218.

Kuusisto E, Parkkinen L, Alafuzoff I. Morphogenesis of Lewy bodies: dissimilar incorporation of alpha-synuclein, ubiquitin, and p62. J Neuropathol Exp Neurol. 2003 Dec;62(12):1241-1253.

Lang AE. A critical appraisal of the premotor symptoms of Parkinson's disease: potential usefulness in early diagnosis and design of neuroprotective trials. Mov Disord. 2011 Apr;26(5):775-783.

Levy-Lahad E, Wasco W, Poorkaj P, Romano DM, Oshima J, Pettingell WH, et al. Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus. Science. 1995 Aug 18;269(5226):973-977.

Mandelkow E, von Bergen M, Biernat J, Mandelkow EM. Structural principles of tau and the paired helical filaments of Alzheimer's disease. Brain pathology. 2007 Jan;17(1):83-90.

Markesbery WR, Schmitt FA, Kryscio RJ, Davis DG, Smith CD, Wekstein DR. Neuropathologic substrate of mild cognitive impairment. Arch Neurol. 2006 Jan;63(1):38-46.

Mascarenhas, C., D. Neto, L. Sampaio, Prevalência e padrão de distribuição de patologias ortopédicas e neurológicas em idosos no Hospital Geral Prado Valadares. Revista Baiana de Saúde Pública, 2008. 32(1): p. 43-50.

Masuda-Suzukake M, Nonaka T, Hosokawa M, Oikawa T, Arai T, Akiyama H, et al. Prion-like spreading of pathological alpha-synuclein in brain. Brain. 2013 Apr;136(Pt 4):1128-38.

McKhann GM, Knopman DS, Chertkow H, Hyman BT, Jack CR, Jr., Kawas CH, et al. The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. Alzheimer's & dementia: the journal of the Alzheimer's Association. 2011 May;7(3):263-269.

Mundinano IC, Caballero MC, Ordonez C, Hernandez M, DiCaudo C, Marcilla I, et al. Increased dopaminergic cells and protein aggregates in the olfactory bulb of patients with neurodegenerative disorders. Acta Neuropathol. 2011 Jul;122(1):61-74.

Moore DJ, West AB, Dawson VL, Dawson TM. Molecular pathophysiology of Parkinson's disease. Annual review of neuroscience. 2005;28:57-87.

Nelson PT, Jicha GA, Schmitt FA, Liu H, Davis DG, Mendiondo MS, et al. Clinicopathologic correlations in a large Alzheimer disease center autopsy cohort: neuritic plaques and neurofibrillary tangles "do count" when staging disease severity. J Neuropathol Exp Neurol. 2007 Dec;66(12):1136-1146.

Nussbaum RL, Ellis CE. Alzheimer's disease and Parkinson's disease. The New England journal of medicine. 2003 Apr 3;348(14):1356-1364.

Pimplikar SW. Reassessing the amyloid cascade hypothesis of Alzheimer's disease. The international journal of biochemistry & cell biology. 2009 Jun;41(6):1261-1268.

Prado M, Caramelli P, Ferreira S, Cammarota M, Izquierdo I. Envelhecimento e memória: foco na doença de Alzheimer. Revista USP. 2007;75:42-49.

Ross GW, Abbott RD, Petrovitch H, Tanner CM, Davis DG, Nelson J, et al. Association of olfactory dysfunction with incidental Lewy bodies. Mov Disord. 2006 Dec;21(12):2062-2067.

Ross GW, Petrovitch H, Abbott RD, Tanner CM, Popper J, Masaki K, et al. Association of olfactory dysfunction with risk for future Parkinson's disease. Annals of neurology. 2008 Feb;63(2):167-173.

Sabbagh MN, Cooper K, DeLange J, Stoehr JD, Thind K, Lahti T, et al. Functional, global and cognitive decline correlates to accumulation of Alzheimer's pathology in MCI and AD. Current Alzheimer research. 2010 Jun;7(4):280-286.

Small SA, Duff K. Linking Abeta and tau in late-onset Alzheimer's disease: a dual pathway hypothesis. Neuron. 2008 Nov 26;60(4):534-542.

Tavares E, Anjos L. Perfil antropométrico da população idosa brasileira. Resultados da Pesquisa Nacional sobre Saúde e Nutrição. Cadernos de Saúde Pública/Ministério da Saúde. 1999;15(4):759-768.

Thal, D.R., et al., Phases of A beta-deposition in the human brain and its relevance for the development of AD. Neurology, 2002. 58(12): p. 1791-800.

Zago M. A pesquisa clínica no Brasil. Ciência & Saúde Coletiva. 2004;9(2):363-374.

2. Objetivos

2.1. Objetivos Gerais:

Implementar uma metodologia para obtenção e investigação de tecido encefálico humano em nosso meio, dando início a um Banco de Cérebro para estudo de doenças neurodegenerativas.

2.2. Objetivos Específicos:

2.2.1. Verificar a presença de alterações cognitivas e sintomas parkinsonianos em uma amostra de pacientes acima de 55 anos.

2.2.2. Verificar a presença e distribuição de depósitos de α-sinucleína em tronco encefálico (bulbo, ponte e mesencéfalo) e áreas olfativas (bulbo olfatório).

2.2.3. Verificar a presença e distribuição de depósitos de proteína tau hiperfosforilada em tronco encefálico (bulbo, ponte e mesencéfalo) e áreas olfativas (bulbo olfatório).

2.2.4. Verificar a presença e distribuição de depósitos de proteína β-amiloide em tronco encefálico (bulbo, ponte e mesencéfalo) e áreas olfativas (bulbo olfatório).

2.2.5. Correlacionar os depósitos das proteínas α-sinucleína, tau hiperfosforilada e β-amiloide com informações clínicas obtidas pós-morte, através de questionários para avaliação de declínio cognitivo (ANEXO 2) e alterações motoras (ANEXO 3)

3.1 Primeiro Artigo Científico Redigido em Inglês

Alterações neurodegenerativas no tronco cerebral e bulbo olfatório em indivíduos acima de 50 anos: um estudo descritivo

Francine Hehn de Oliveira

Edson Rodrigues Neto

Mariana Kumaira Fonseca

Liana Lisboa Fernandez

Arlete Hilbig

Enviado para publicação na Revista "Arquivos de Neuro-Psiquiatria"

Neurodegenerative changes in the brainstem and olfactory bulb in people over 50 years old: a descriptive study

Alterações neurodegenerativas no tronco cerebral e bulbo olfatório em indivíduos acima de 50 anos: um estudo descritivo

Francine Hehn de Oliveira[1], *Edson Rodrigues Neto*[2], *Mariana Kumaira Fonseca*[2], André Silvestre Reitz da Costa[2] Marcio Aloisio Bezerra Cavalcanti Rockenbach[2] Renata Renata dos Santos Padilha [2] *Liana Lisboa Fernandez*[3], *Arlete Hilbig*[3]

ABSTRACT

With the increase in the life expectation in Brazil and around the world, the concerns with the most prevalent diseases in elderly people grow, and among these diseases are the neurodegenerative diseases, such as Alzheimer (AD) and Parkinson (PD). It is known that the protein deposits related to the development of these diseases can anticipate in years the symptomatic phase. The tau protein is particularly interesting, once it seems to be found in the brainstem and olfactory bulb long before reaching the limbic cortex, when the first symptoms occur. Out of the 14 brains collected in this study, the tau protein was found in the brainstem of 10 (71.42%). Out of the 7 individuals who had final diagnosis of AD, all presented tau deposits in some region of the brainstem. Our data agree with the most recent literature, which has confirmed the presence of tau protein in the brainstem and olfactory bulb in the earliest stages of AD.

Keywords:
Neurodegenerative Diseases, Alzheimer, Parkinson, tau protein, brainstem.

RESUMO

Com o aumento da expectativa de vida no Brasil e no mundo, crescem as preocupações com as doenças mais prevalentes entre os idosos, dentre elas as doenças neurodegenerativas (DN) como a Doença de Alzheimer (DA) e a Doença de Parkinson (DP. Sabe-se que os depósitos proteicos relacionados com o desenvolvimento destas doenças podem preceder a fase sintomática em anos. A proteína tau é de particular interesse, uma vez que parece ser encontrada no tronco encefálico e bulbo olfatório muito antes de atingir o córtex límbico, quando ocorrem os primeiros sintomas. Dos 14 encéfalos coletados neste estudo, a proteína tau foi encontrada, no tronco encefálico, em 10 (71,42%). Dos 7 indivíduos que tiveram diagnóstico final de DA, todos apresentavam depósitos de tau em alguma região do tronco encefálico. Nossos dados estão de acordo com a literatura mais recente, que tem confirmado a presença de proteína tau no tronco encefálico e bulbo olfatório nos estágios mais precoces da DA.

Palavras-chave:
Doenças neurodegenerativas, Alzheimer, Parkinson, proteína tau, tronco cerebral.

[1] Neuropathologist, Post-graduate student – Post-graduation Program in Pathology, UFCSPA;
[2] Medical Students, UFCSPA;
[3] Neurologist, Associate Professor of UFCSPA;
Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (*Federal University of Health Sciences of Porto Alegre*) – UFCSPA – POA – Brazil
Mail: Francine Hehn de Oliveira; Laboratório de Patologia da UFCSPA; Rua Sarmento Leite, 245 – Anexo II; 90050-170; Porto Alegre RS – Brasil; E-mail: franhehn@gmail.com

This study was submitted to the Postgraduate Program in Pathology of the Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre as a requirement for the Master's Degree and was carried out at the Department of Forensic Medicine of Porto Alegre and at Laboratory of Pathology of the UFCSPA.

INTRODUCTION

The elderly population in Brazil has increased significantly in the last decades, and has reached a prevalence of 11% in 2010. With the growth of this population, common diseases for this age-group emerge, and new investments are necessary for public health [1, 2].

In aged population, there is an increase in frequency of neurodegenerative diseases (NDs) [3], which, from the pathologic point of view, are characterized by neuronal loss in specific regions associated to the presence of intra or extracellular protein deposits. The pathologic changes increase in intensity and frequency with the evolution of the disease, and reach different brain regions in a stereotyped manner [4].

The most prevalent neurodegenerative disease (ND) is the Alzheimer's Disease (AD) [3, 4], characterized by a progressive loss cognitive capacity with impairment of memory and linguistic difficulty. AD frequently is not detected during the early years [3], and its clinic diagnosis is always based on probability. The definitive diagnosis depends on the anatomopathological exam of the post-mortem brain, carried out through the identification of selective neuronal loss in specific areas and the detection, by imunoperoxidase reaction, of intracellular deposits of hyperphosphorylated tau protein and extracellular deposits of β-amyloid protein [3, 5-7].

There are current evidences that the pathologic process of AD initiates around 10 years before the cognitive deficit, being understood as a *continuum*, from early asymptomatic neurodegenerative stages until dementia. The altered formation of microtubule-associated protein tau in certain types of human nerve cells can be associated to the pathogenesis of the AD [7-9]. The deposition of this protein is present from the beginning until the late stages of the disease, and do not reverse [7, 10]. The aggregates accumulate inside the neurons, initially as non-fibrillar inclusions, visible on optical microscopy and called pretangles (pNFTs). These pNFTs can evolve to rigid fibrils in the dendritic processes, called neurites (NTs) and to mazes in the cell bodies, called tangles (NFTs) [7, 11, 12]. The process of the intraneuronal disease progresses in a topographically systematic manner, and can require a very long period, almost a whole life, to reach all its extension [7, 10, 13-15]. According to the study of Braak *et al*. [13], the presence of tau deposits is classified in stages, from I to VI, and occurs in the following way: stages I and II present changes virtually confined to only one layer of the transentorhinal region; stages III and IV are characterized by a severe commitment of the transentorhinal and entorhinal regions; finally, stages V and VI are characterized by a severe involvement of the isocortex. Late phases of the disease cause recognizable symptoms and are correlated to the clinical of the AD [7, 16-18], however, studies on this phase are laden with difficulties, due to the large number of altered nerve cells. In the early phases of the disease, the circumstances are clearer and individuals without clinical symptoms can present pathologic changes associated to the AD, such as the presence of abnormally phosphorylated tau protein in some nerve cells or even in one sole neuron [19].

Besides the tau protein deposits, it is known that β-amyloid deposits in the form of senile or neuritic plaques are hallmarks in the pathogenesis of the AD. The classical senile plaques are complex extracellular injuries associated to the neuronal degeneration process [20]. The neuritic plaques are usually restricted to the gray matter and preferably localized in layers II and III of the cortex. According to Braak and Braak's classification [21], the β-amyloid deposits are not random, and start in the basal cortex (stage A); then, they involve all the isocortex and, in a discreet manner, the hippocampus and the primary cortex (stage B); finally, they are found in all isocortex areas, including the primary sensory and motor areas [13].

Parkinson Disease (PD) is the second most common ND, after AD. It is pathologically characterized by loss of neurons in the substantia nigra associated to intracellular deposits of α-synuclein proteins (Lewy bodies). The PD has an approximated prevalence of 0.5 to 1% among individuals aged 65 to 69, and reaches 1 to 3% among individuals aged 80 or more [4]. The sporadic PD (90% of the cases) is the most frequent Lewy bodies' disease. It is progressive and manifests clinically after the pathologic stages are already advanced. The anatomopathological diagnosis, both in preclinical and clinical phases, is accomplished through the identification of the selective neuronal loss in determined locations and the presence of Lewy bodies [22, 23]. Damages to specific subnucleus of the pars compacta substantia nigra are frequently considered the most important hallmark of PD [24]. The Lewy pathology can be found in necropsy of individuals without clinical manifestations of motor symptoms of PD (incidental Lewy Pathology) [5, 23, 25, 26]. Currently, Braak's classification [24] is used to the pathologic staging of the disease, and ranges from I to VI. In stages I and II, only the medulla oblongata and the posterior pons are involved; in stages III and IV, there is additional involvement of the midbrain and temporal mesocortex, and, in the late stages V and VI, α-synuclein deposits are founded in the neocortex [24].

The present study is the initial phase of a human brain bank for the study of neurodegenerative diseases in our environment. The authors' aim is to organize a protocol for acquisition, collection and study of human brains from individuals with and without a history of ND, investigating first the presence of pathological changes related to these diseases in the brainstem (midbrain, pons and medulla oblongata) and olfactory bulb (OB).

METHODS

This is a descriptive study, in which the sample was collected by convenience and under the informed consent signed by first-degree relatives. Fourteen brains were collected from individuals aged 50 years or over that underwent death verification in the Forensic Department (FD) of Porto Alegre. Individuals who were victims of violent death, those whose relatives did not sign the informed consent and those who had some acute neurological event as the cause of death were excluded from the sample.

The donors' clinical information was obtained after death with next of kin, through a questionnaire to monitor cognitive decline (IQCODE) and a customized form to evaluate the motor and sensory changes. For the IQCODE, the cut-off point for the dementia was the score of 3.27, as suggested by Sanchez and colleagues [27]; the individuals which scored under 3.27 were considered non-demented. After the removal, the brains were fixed in formalin solution at 10% for four weeks, weighted, sectioned, and macroscopically evaluated, in accordance to the international protocol (Figure 1). After the macroscopic examination, besides the specific areas for this study, described in the paragraph below, the following areas were sampled for histopathological evaluation, stained with Hematoxylin-Eosin (HE) and immunohistochemical (IHC): frontal, parietal, temporal and occipital cortex, hippocampus, amygdala, basal ganglia and cerebellum.

For this paper, specific regions of particular interest for the researchers were selected: midbrain (substantia nigra at the level of the emergence of the oculomotor nerve), pons (at the level of the locus ceruleus), medulla oblongata (at the level of the dorsal raphe nucleus) and olfactory bulb. These regions were also evaluated by the routine HE staining and by IHC technique.

The immunohistochemical technique was performed in compliance with the routine protocols of Laboratory of Pathology of the Institution. After deparaffined, samples were immersed in hydrogen peroxide 3% and methanol 10% for 15 minutes, to inhibit the endogenous peroxidase activity. Then, they were boiled in citrate 10mM, pH6.0 and/or treated with formic acid 1% to recover the antigen. After being washed with PBS, they were incubated with common horse serum for 1 hour and then, with primary antibody at $4^{o}C$ in wet chamber overnight. The following primary antibodies were used: anti-Aβ (human monoclonal mouse antibody, DAKOCYTOMATION, clone 6F/3D, code M0872), 1:60 dilution, previously treated for 3 minutes in formic acid 1%; anti-phosphorylated Tau (monoclonal mouse antibody, INNOGENETICS, clone AT-8, code 90206), 1:500 dilution, previously treated for 10 minutes in citrate; and anti-alpha-synuclein (mouse monoclonal antibody, NOVOCASTRA, clone KM51, code ASYN-L), 1:200 dilution, previously treated for 4 minutes in formic acid 1% and for 20 minutes in citrate. After overnight, the slides were washed three times in PBS, remained in DAKO secondary polymer for 40 minutes, followed by the tertiary joint horseradish peroxidase for 30 minutes and, finally, in DAB. All the slides were counterstained with Hematoxylin for 10 seconds. All the reactions were made with negative and positive controls.

The slides of the selected regions were studied by optical microscopy for the histopathological diagnosis, aiming the identification of possible changes in the morphological and anatomical structures, with 100-times enlargement. The presence of protein inclusions in IHC against specific antibodies was semi-quantitatively classified as follows: absent, 1+ (1 to 4 positive cells/10 HPF), 2+ (5 to 9 positive cells/10 HPF) and 3+ (more than 10 positive cells/10 HPF).

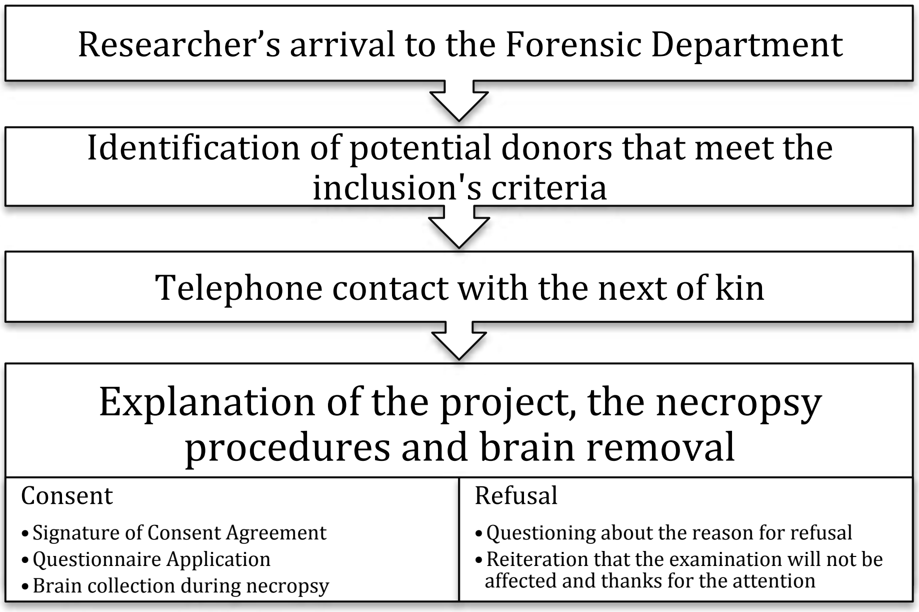
The data collected from each case was compared with the corresponding values of the IQCODE, with the evaluation form for motor changes and with clinical information.

The study was approved by the ethics committees in both involved institutions (CEP – UFCSPA and CEP – DML Porto Alegre).

To correlate IQCODE data and cognitive state, we performed Fisher test. The others variables are exposed in a descriptive way.

Data are presented in a descriptive way and to compare the mean age between demented and non-demeted patients, Fisher test was performed.

COLLECTION FLOWCHART



RESULTS

Sample Description:

The donors analysis shows that their average age was 72.07 years old (±15.79), and, when categorized in individuals demented (D) and non-demented (ND) by the values obtained through the IQCODE, this average was 72.87 years old and 71.16 years old, respectively; there was no statistically significant difference between the groups for the age variable. While the demented individuals corresponded to 57% of the sample, and their average IQCODE was 3.72, the non-demented individuals average was 2.74, and there was a statistically significant difference between the two groups for this variable ($p=0.016$, Fisher test). The sample was constituted by 50% of women in each group. Regarding the questionnaire applied for the motor changes, only one patient presented light tremor and rigidity. The detailed sample description is in table 1.

Macroscopic Findings (Table 2):

Six out of the 14 analyzed brains presented macroscopic changes, and the presence of mild frontal atrophy with expansion of the frontal horn of the lateral ventricles was the most frequent finding, in three cases. Moreover, one brain (number 10) presented a temporal atrophy with volumetric reduction of the hippocampus. In this case, the IQCODE was 4.77, compatible with dementia, and tau and β-amyloid proteins were also found. One brain (number 3) was from a patient with clinic diagnosis of multiple system atrophy (MSA). In this case, the findings were: severe cerebellar atrophy, predominantly in the white matter, putamen atrophy with discreet brownish discoloring, pons basis and cerebellar peduncle atrophy, and slight paleness of the substantia nigra (Figure 2). Besides these, other two brains presented alterations: in the case number 7, six metastatic tumors were found, from a known uterine cervix carcinoma, and in the case number 14, an old parietal-occipital 1.0 cm infarction, besides a frontal lacuna, near the right-side ventricle. It is also convenient to highlight that individual n°9 had a diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis (ALS), without macroscopic changes.

Microscopic Findings (Table 2):

Hematoxylin-Eosin (HE):

In brain number 1, we found an old 0.3 cm infarction in the pons, besides areas with increase of perivascular spaces, compatible with an atherosclerotic vascular disease. In the case with clinic diagnosis of MSA (brain number 3), the microscopy confirmed the atrophic areas already described in the macroscopic exam, besides neuronal loss. In this case, we also found areas of demyelination mainly in pons and cerebellar white matter.

Another common finding, observed in 11 out of 14 brains, was the presence of variable amount of corpora amylacea, ranging from rare in some cases to numerous in others, predominantly localized in the subpial and periventricular regions. This observation does not seem to have a relation with the patient’s age or with the presence of protein deposits associated to the NDs, as they were present both in younger and older patients, as well as in patients with and without protein deposits.

In 11 out of 14 cases the olfactory bulb was evaluated, and no histological alteration was identified in any case.

Immunohistochemical Findings:

Histopathological diagnosis and classification for Alzheimer Disease according to the Braak stages [13]

Besides the protein evaluation in the four areas proposed for the accomplishment of this study, we evaluated the same proteins in areas previously described by Braak *et al*., such as hippocampus and entorhinal, frontal, parietal, and occipital cortex, to establish an anatomopathological diagnosis.

Out of 10 patients who presented tau protein deposits in some localization of the brainstem, 3 met criteria for stage 5/6 of Braak's Classification for AD, always in association with β-amyloid protein deposits. These three were also considered demented patients, according to the IQCODE evaluation. Besides these, 3 patients were classified as stage 3/4, and other 2 as stage 1/2.

Out of the 8 patients staged according to Braak's classification, 7 presented IQCODE ≥ 3.27. In the case in which IQCODE < 3.27 (number 7), the individual was classified as an Alzheimer-type pathology holder, stage 3/4, without clinical correlation.

Other 3 cases presented only tau protein deposits in cortical neurons, without beta-amyloid. In all these cases, the IQCODE was < 3.27 (numbers 1, 2 and 13).

Beta-amyloid Protein (Tables 2 and 3):

Only one out of 14 brains presented rare beta-amyloid deposits in brainstem, in the form of diffuse and senile plaques (Figure 3), localized in midbrain. Besides this one, other two cases presented beta-amyloid deposits in the brainstem vessels, characterizing amyloid angiopathy.

Phosphorylated Tau Protein (Tables 2 and 3):

The data on distribution and quantity of tau protein deposits is detailed in Table 2. Ten out of 14 brains presented some tau deposit in one of the four evaluated areas. In these positive cases, the most common protein deposits were pretangles (pNFT) (Figure 4a) and dystrophic neurites (DN) (Figure 4b), and less frequently, tangles (NFT) (Figure 4c) and granules (Figure 4d). Among the anatomical locations where deposits occurred more densely in brainstem, it is possible to highlight: substantia nigra (n=10) and periaqueductal gray matter (n=4) in midbrain; locus ceruleus (n=6) and the reticular formation (n=4) in pons; and dorsal raphe nucleus (n=4) and hypoglossal nucleus (n=3) in medulla oblongata. From cases in which the olfactory bulb was available for analysis (n=11), three presented diffused and strong tau protein deposits, mainly in the external plexiform layer (Figure 5).

Alpha-synuclein Protein (Tables 2 and 3):

Deposits of α-synuclein were found only in one case, in the individual with clinical diagnosis of probable MSA, and these showed a distribution compatible with the disease, confirming it. In this case, α-synuclein deposits in the form of cytoplasmic glial inclusions (CGIs) (Figure 6a) and perinuclear neuronal inclusions (PNIs) (Figure 6b) were identified. These findings were mainly observed in the white matter of cerebellum (Figure 6c) in great quantity, in the medulla oblongata, pons and midbrain, in the form of CGIs. Many CGIs and PNIs were also identified in the putamen and few in the cortex.

DISCUSSION

There are few published data about the protein deposits in the brainstem and olfactory bulb of patients with AD diagnosis, since the clinical manifestations occur when tau protein, associated with β-amyloid, forms deposits in the hippocampus and in the entorhinal cortex [14, 28].

Although the IQCODE does not define the etiology of dementia, it has demonstrated to be a good tracking instrument for cognitive changes and had a good correlation with the anatomopathological findings. According to the publication of the transcultural validation study of the questionnaire for Portuguese, Sanchez *et al*. concluded that this tool is an excellent resource to track demential syndrome in community studies [27].

We categorized patients in two groups: non-demented (NoD) and demented (D). When compared, the groups did not present statistically significant differences regarding gender and age. As the most frequent dementia is AD, which presents a higher prevalence in females, it was expected to find, in the demented group, a higher number of women [13, 29]. However, in our study, we found the same number of men and women, which can be explained by the small number of samples. Another aspect to be highlighted is that the majority of our sample (57%) was classified, according to the IQCODE, in the demented group, probably because families who suffer difficulties of this disease are more open to donation.

Although we found a significant number of individuals (n=11) with some kind of protein deposits in at least one of brainstem segments or olfactory bulb, if compared demented to non-demented cases, our data did not show statistically significant differences regarding deposits. This data was expected, in fact, as dementia may be related to the protein deposits in limbic and neocortical areas, and not in the brainstem or olfactory bulb. Researches have currently attempted to find early ND clinical signs, and these changes could result from protein deposits in the brainstem and olfactory bulb, since, according to more recent studies, these segments would be committed long before the cortical areas [30]. No association was found between the protein deposits in the brainstem and the clinical changes informed by the next of kin through IQCODE and the motor alteration questionnaire.

Some authors [31, 32] have demonstrated that the dorsal raphe nucleus (DRN) presents NFTs before the transentorhinal region. According to Grinberg et al. [31], in all cases in which the transentorhinal region presented NFTs, these were also found in the DRN. Moreover, 22% of the individuals who did not present NFTs in the cortical regions (Braak 0) exhibited NFTs in the DRN, suggesting that the brainstem is affected by the AD before the supratentorial region [31]. Our findings are in agreement with this data, as out of the 8 cases in which we found Alzheimer pathology, seven (87.5%) also presented tau protein deposits in some brainstem segment or in the olfactory bulb. In 10% of the cases (1/10) in which we found tau deposits in the brainstem, this protein was not found in cortical areas, what could be related to AD in early stage.

It has been well documented that the olfactory dysfunction (hyposmia or anosmia) is a very common characteristic in various NDs, particularly in patients with AD and PD [33]. In many cases, the olfactory deficit is an early event of these diseases, and can precede the typical clinical manifestations in many years. Deposits of α-synuclein, tau and β-amyloid proteins are present in many ND patients' OB and olfactory epithelium [25], and have suggested that the OB can be the first neuronal structure in which the deposits appear during the NDs [33]. We found NFTs and NTs in the OBs in three out of the 11 individuals whose OBs were available for analysis (cases 10, 12 and 14). Our data are identical to the ones found in the literature, regarding the prevalence of NFTs. Mundiñano et al (2011) shows the presence of NFTs in 42.9% of the OBs from patients with confirmed diagnosis of AD, exactly the same percentage that we found [33].

We found no case of sporadic PD. In relation to α-synuclein deposits, only the case that had clinical diagnosis of MSA presented this protein in all segments of the brainstem, as well as in the olfactory bulb. Alpha-synuclein is the main component of CGIs in the MSA [34].

Besides Braak and Braak's classification [13] for the β-amyloid protein distribution in AD, a more recent classification has been proposed, considering the involvement of brainstem regions, which are not taken into account in the previous classification. According to Thal *et al.*, there are five phases of β-amyloid deposits. In phase 1, the isocortex is involved; in 2, the hippocampus and the entorhinal cortex; in 3, the striatum and the diencephalic nucleus; in 4, various brainstem nuclei; and, finally, in phase 5, the cerebellum and the additional brainstem nuclei [21]. We found only one case with beta-amyloid deposit in the brainstem, more specifically in the midbrain, and this individual had stage 5/6 AD according to Braak's classification.

This study has interesting findings regarding brainstem and olfactory bulb protein deposition in people with or without dementia, but consists of a very small sample precluding better interpretation of results.

ACKNOWLEDGEMENT

This research was performed with the financial support of the Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS - *Rio Grande do Sul Research Support Foundation*). The authors would like to thank the support from the Department of Forensic Medicine of the General Institute of Medical Forensic Analyses of Rio Grande do Sul and also the staff of the pathology laboratory.

REFERENCES

1. Carvalho, J. and A. Garcia, *O envelhecimento da população brasileira: um enfoque demográfico.* Cadernos de Saúde Pública/Ministério da Educação, 2003. **19**(3): p. 725-733.
2. Tavares, E. and L. Anjos, *Perfil antropométrico da população idosa brasileira. Resultados da Pesquisa Nacional sobre Saúde e Nutrição.* Cadernos de Saúde Pública/Ministério da Saúde, 1999. **15**(4): p. 759-768.
3. Prado, M., et al., *Envelhecimento e memória: foco na doença de Alzheimer.* Revista USP, 2007. **75**: p. 42-49.
4. Nussbaum, R.L. and C.E. Ellis, *Alzheimer's disease and Parkinson's disease.* N Engl J Med, 2003. **348**(14): p. 1356-64.
5. Braak, H., et al., *Gastric alpha-synuclein immunoreactive inclusions in Meissner's and Auerbach's plexuses in cases staged for Parkinson's disease-related brain pathology.* Neurosci Lett, 2006. **396**(1): p. 67-72.
6. Braak, H. and E. Braak, *Demonstration of amyloid deposits and neurofibrillary changes in whole brain sections.* Brain Pathol, 1991. **1**(3): p. 213-6.
7. Braak, H. and K. Del Tredici, *Alzheimer's disease: pathogenesis and prevention.* Alzheimers Dement, 2012. **8**(3): p. 227-33.
8. Mandelkow, E., et al., *Structural principles of tau and the paired helical filaments of Alzheimer's disease.* Brain Pathol, 2007. **17**(1): p. 83-90.
9. Alonso, A.C., et al., *Mechanism of tau-induced neurodegeneration in Alzheimer disease and related tauopathies.* Curr Alzheimer Res, 2008. **5**(4): p. 375-84.
10. Braak, H. and K. Del Tredici, *Alzheimer's pathogenesis: is there neuron-to-neuron propagation?* Acta Neuropathol, 2011. **121**(5): p. 589-95.
11. Bancher, C., et al., *Accumulation of abnormally phosphorylated tau precedes the formation of neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease.* Brain Res, 1989. **477**(1-2): p. 90-9.
12. Braak, E., H. Braak, and E.M. Mandelkow, *A sequence of cytoskeleton changes related to the formation of neurofibrillary tangles and neuropil threads.* Acta Neuropathol, 1994. **87**(6): p. 554-67.
13. Braak, H. and E. Braak, *Neuropathological stageing of Alzheimer-related changes.* Acta Neuropathol, 1991. **82**(4): p. 239-59.
14. Braak, H. and E. Braak, *Frequency of stages of Alzheimer-related lesions in different age categories.* Neurobiol Aging, 1997. **18**(4): p. 351-7.
15. Arnold, S.E., et al., *The topographical and neuroanatomical distribution of neurofibrillary tangles and neuritic plaques in the cerebral cortex of patients with Alzheimer's disease.* Cereb Cortex, 1991. **1**(1): p. 103-16.
16. Nelson, P.T., et al., *Clinicopathologic correlations in a large Alzheimer disease center autopsy cohort: neuritic plaques and neurofibrillary tangles "do count" when staging disease severity.* J Neuropathol Exp Neurol, 2007. **66**(12): p. 1136-46.
17. Sabbagh, M.N., et al., *Functional, global and cognitive decline correlates to accumulation of Alzheimer's pathology in MCI and AD.* Curr Alzheimer Res, 2010. **7**(4): p. 280-6.
18. Dolan, D., et al., *Age, Alzheimer's disease and dementia in the Baltimore Longitudinal Study of Ageing.* Brain, 2010. **133**(Pt 8): p. 2225-31.
19. Braak, H. and K. Del Tredici, *The pathological process underlying Alzheimer's disease in individuals under thirty.* Acta Neuropathol, 2011. **121**(2): p. 171-81.
20. Eckman, C.B. and E.A. Eckman, *An update on the amyloid hypothesis.* Neurol Clin, 2007. **25**(3): p. 669-82, vi.

21. Duyckaerts, C. and D. Dickson, *Neuropathology of Alzheimer's Disease and its variants*, in *Neurodegeneration: the molecular pathology of dementia and movement disorders*, D. Dickson and R. Weller, Editors. 2011, Wiley-Blackwell. p. 62-91.
22. Moore, D.J., et al., *Molecular pathophysiology of Parkinson's disease.* Annu Rev Neurosci, 2005. **28**: p. 57-87.
23. Del Tredici, K. and H. Braak, *Lewy pathology and neurodegeneration in premotor Parkinson's disease.* Mov Disord, 2012. **27**(5): p. 597-607.
24. Braak, H., et al., *Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease.* Neurobiology of aging, 2003. **24**(2): p. 197-211.
25. Bloch, A., et al., *Alpha-synuclein pathology of the spinal and peripheral autonomic nervous system in neurologically unimpaired elderly subjects.* Neuropathol Appl Neurobiol, 2006. **32**(3): p. 284-95.
26. Ross, G.W., et al., *Association of olfactory dysfunction with incidental Lewy bodies.* Mov Disord, 2006. **21**(12): p. 2062-7.
27. Sanchez, M.A. and R.A. Lourenco, *[Informant Questionnaire on Cognitive Decline in the Elderly (IQCODE): cross-cultural adaptation for use in Brazil].* Cad Saude Publica, 2009. **25**(7): p. 1455-65.
28. Braak, H. and K. Del Tredici, *Neuroanatomy and pathology of sporadic Parkinson's disease.* Adv Anat Embryol Cell Biol, 2009. **201**: p. 1-119.
29. McKhann, G.M., et al., *The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease.* Alzheimers Dement, 2011. **7**(3): p. 263-9.
30. Grinberg, L.T., U. Rueb, and H. Heinsen, *Brainstem: neglected locus in neurodegenerative diseases.* Front Neurol, 2011. **2**: p. 42.
31. Grinberg, L.T., et al., *The dorsal raphe nucleus shows phospho-tau neurofibrillary changes before the transentorhinal region in Alzheimer's disease. A precocious onset?* Neuropathol Appl Neurobiol, 2009. **35**(4): p. 406-16.
32. Rub, U., et al., *The evolution of Alzheimer's disease-related cytoskeletal pathology in the human raphe nuclei.* Neuropathol Appl Neurobiol, 2000. **26**(6): p. 553-67.
33. Mundinano, I.C., et al., *Increased dopaminergic cells and protein aggregates in the olfactory bulb of patients with neurodegenerative disorders.* Acta Neuropathol, 2011. **122**(1): p. 61-74.
34. Duda, J.E., et al., *Immunohistochemical and biochemical studies demonstrate a distinct profile of alpha-synuclein permutations in multiple system atrophy.* J Neuropathol Exp Neurol, 2000. **59**(9): p. 830-41.

Table 1: Clinical data of patients

	Demented (D)	**Non Demented (ND)**
n (%)	8 (57,14)	6 (42,86)
Age (years)	72,87	71,16
Gender		
Female	4 (50%)	3 (50%)
IQCODE Mean (SD)	3,72 (0,6)	2,74 (0,7)

Table 2. Description of sample

Case	Age of Death	Gender	IQCODE	Cause of Death	Microscopic Findings	β-amyloid		Tau				α-synuclein				Final Pathological Diagnostic
						DP	SP	NTs	pNFTs	NFTs	Gr	LB	NTs	PNIs	CGIs	
1	91	F	1,32	Pneumonia												Tauopathy
M						-	-	2+	1+	-	2+	-	-	-	-	
P						-	-	2+	-	1+	1+	-	-	-	-	
MO						-	-	1+	1+	-	1+	-	-	-	-	
OB						NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	
2	79	M	3,15	Cardiac												Tauopathy
M				Tamponade		-	-	1+	1+	1+	-	-	-	-	-	
P						-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
MO						-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
OB						-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
3	59	F	**4,52**	Septic shock	Cerebellar											MSA
M					atrophy	-	-	-	-	-	-	-	-	3+	3+	
P					BG atrophy	-	-	-	-	-	-	-	-	3+	3+	
MO						-	-	-	-	-	-	-	-	3+	3+	
OB						-	-	-	-	-	-	-	-	3+	3+	
4	56	M	3,00	Undetermined												NORMAL
M						-	-	1+	-	1+	1+	-	-	-	-	
P						-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
MO						-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
OB						NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	
5	93	F	**3,33**	Myocardial	Frontal											Alzheimer
M				Infarction	atrophy	-	-	3+	1+	3+	1+	-	-	-	-	Pathology
P					Increase TH	-	-	2+	1+	3+	-	-	-	-	-	Braak III/IV
MO						-	-	1+	1+	1+	-	-	-	-	-	
OB						NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	
6	68	F	**3,27**	Undetermined												Alzheimer
M						-	-	1+	-	-	-	-	-	-	-	Pathology
P						-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Braak I/II
MO						-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
OB						-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
7	89	F	3,00	Multiorgan	Metastatic											Alzheimer
M				Failure	carcinoma of	-	-	1+	-	-	-	-	-	-	-	Pathology
P					the cervix	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Braak III/IV
MO						-	-	1+	-	-	-	-	-	-	-	

OB						-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
8	49	M	3,00	Undetermined												Isolate β-amyloid deposit
M						-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
P						-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
MO						-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
OB						-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
9	54	M	**3,86**	Pneumonia												Alzheimer Pathology Braak I/II
M						-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
P						-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
MO						-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
OB						-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
10	95	M	**4,77**	Acute Pulmonar edema	Frontal and Temporal atrophy											Alzheimer Pathology Braak V/VI
M						1+	1+	3+	3+	3+	2+	-	-	-	-	
P						-	-	2+	2+	3+	1+	-	-	-	-	
MO						-	-	2+	1+	2+	2+	-	-	-	-	
OB						-	-	3+	1+	1+	-	-	-	-	-	
11	62	M	**3,38**	Liver Cirrhosis	Frontal atrophy Increase of LV											Alzheimer Pathology Braak III/IV
M						-	-	2+	1+	2+	1+	-	-	-	-	
P						-	-	2+	2+	1+	1+	-	-	-	-	
MO						-	-	1+	-	-	-	-	-	-	-	
OB						-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
12	81	F	**3,36**	Undetermined												Alzheimer Pathology Braak V/VI
M						-	-	2+	1+	2+	1+	-	-	-	-	
P						-	-	1+	-	1+	-	-	-	-	-	
MO						-	-	-	-	1+	-	-	-	-	-	
OB						-	-	2+	1+	1+	1+	-	-	-	-	
13	62	F	3,00	Undetermined												Tauopathy
M						-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
P						-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
MO						-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
OB						-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
14	71	M	**3,28**	Cardiac Tamponade	Parieto-occipital infarction											Alzheimer Pathology Braak V/VI
M						-	-	2+	1+	1+	-	-	-	-	-	
P						-	-	2+	1+	2+	-	-	-	-	-	
MO						-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
OB						-	-	3+	3+	1+	-	-	-	-	-	

DP: diffuse plaque; SP: senile plaque NTs: neurites; pNFTs: pre-tangles; NFT: tangles; Gr: granules; LB: Lewy Bodies; PNIs: Perineuronal Nuclear Inclusions; CGIs: Cytoplasmic Glial Inclusions; M: Midbrain; P: Pons; MO: medulla oblongata, OB: olfactory bulb; BG: basal ganglia; NA: not available; MSA: multiple system atrophy; TH: temporal horn; LV: lateral ventricle.

Table 3. Brainstem location of protein deposits

Case	Beta-amyloid	Tau	Alfa-synuclein
Midbrain	1/14	10/14	1/14
Substantia Nigra	1/14	10/14	1/14
Periaqueductal gray matter	0	4/14	1/14
Pons	0	6/14	1/14
Locus ceruleus		6/14	1/14
Reticular formation		4/14	1/14
Medulla Oblongata	0	5/14	1/14
Dorsal raphe nucleus		4/14	1/14
Hypoglossal nucleus		3/14	1/14
Olfactory Bulb	0	3/11	1/11

Total number of brainstem segments: 14 Total number of Olfactory bulbs: 11

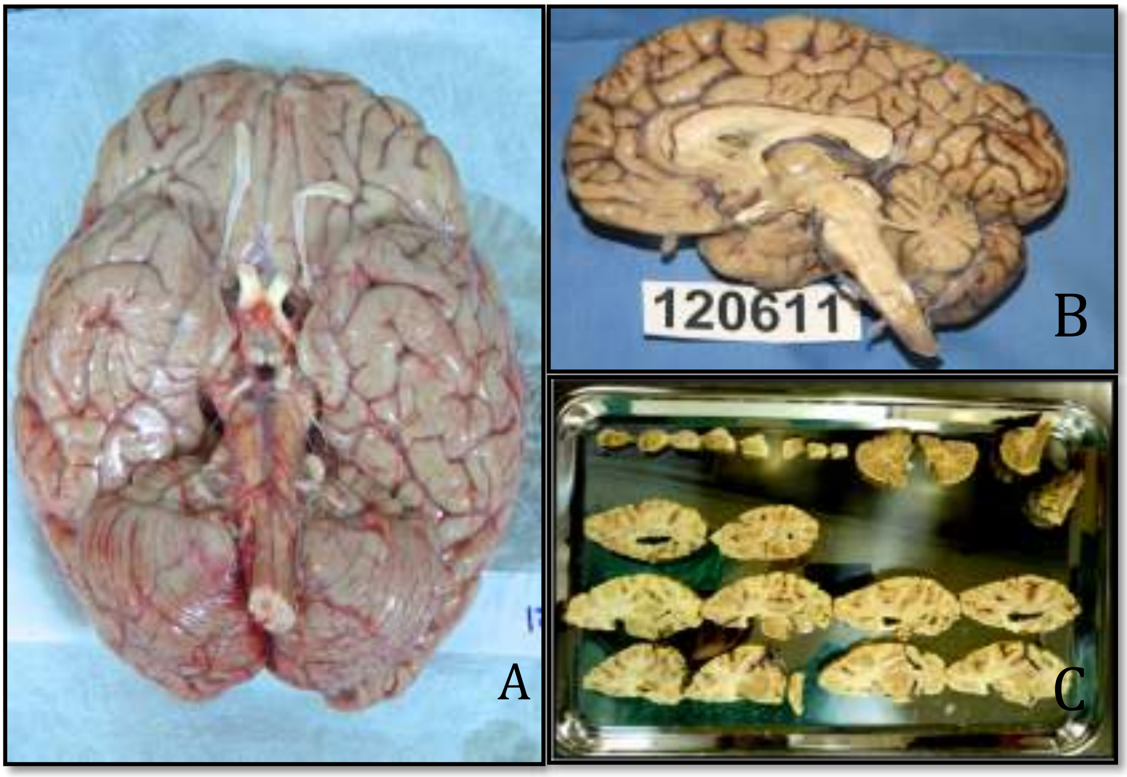


Figure 1: Case 3 - Basal view of the brain after removal (A); sagital section of the brain after four weeks of in formalin10% (B); standardized sections after fixation in formalin (C).

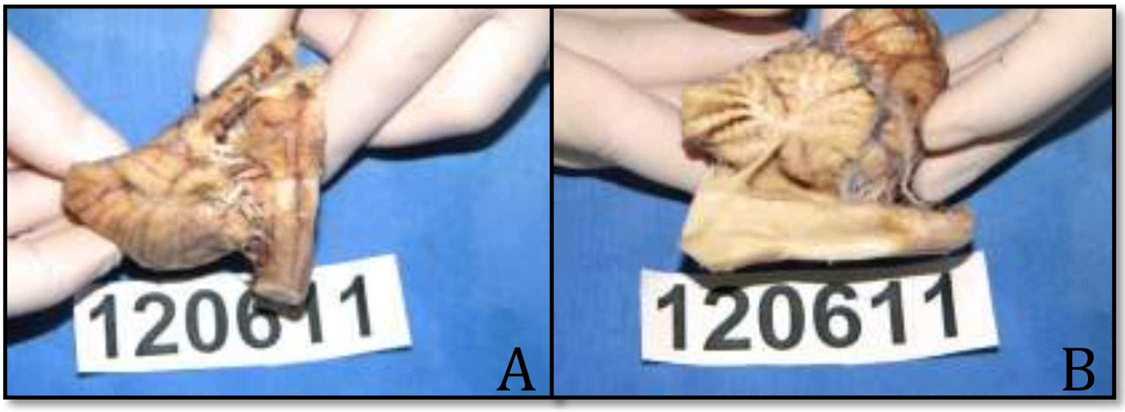


Figure 2: Case 3 - Anterior view of the brainstem showing pons basis atrophy (A); sagital section also shows pons basis atrophy and severe atrophy of the cerebellum (B).

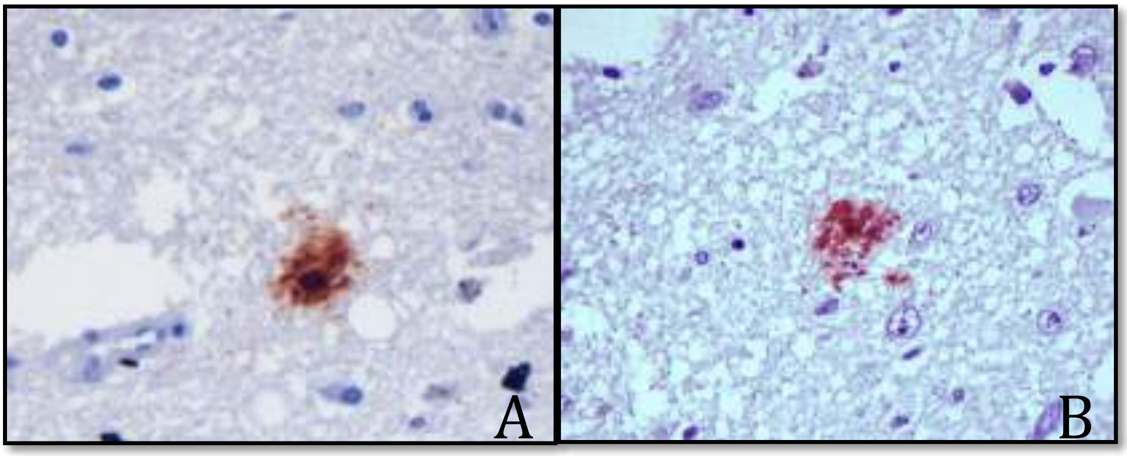


Figure 3: Case 10 - senile plaques of β-amyloid deposit in the midbrain (A and B)
(β-amyloid, 600X).

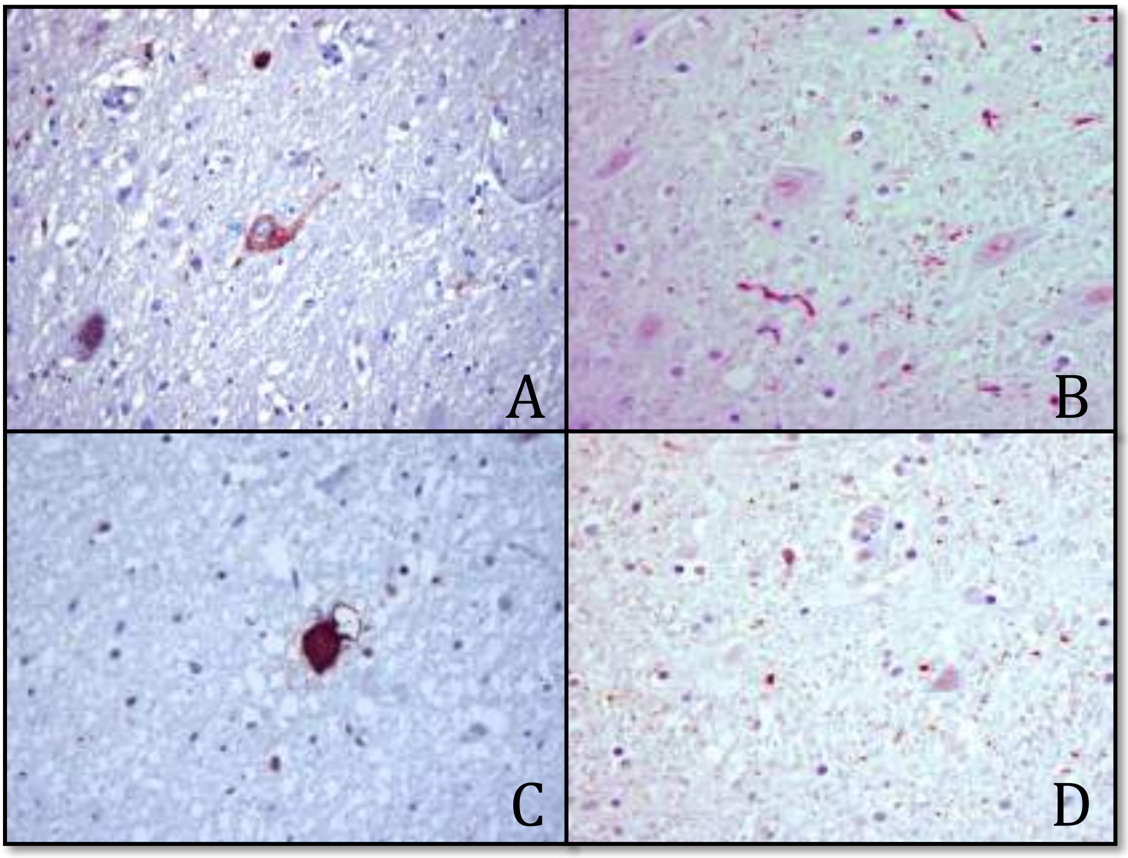


Figure 4: Cases 5 and 10 - pretangles in the medulla oblongata (A); dystrophic neurites in the midbrain (B); tangle in the pons (C) and granules in the pons (C) (Tau, 400X)

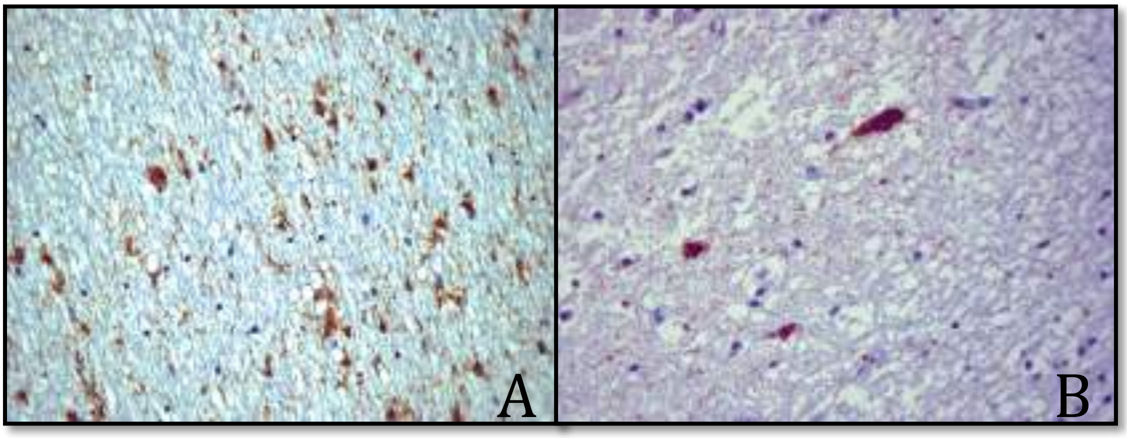


Figure 5: Case 14 - Pretangles and dystrophic neurites (A) and tangles (B) in the olfactory bulb (Tau, 400X)

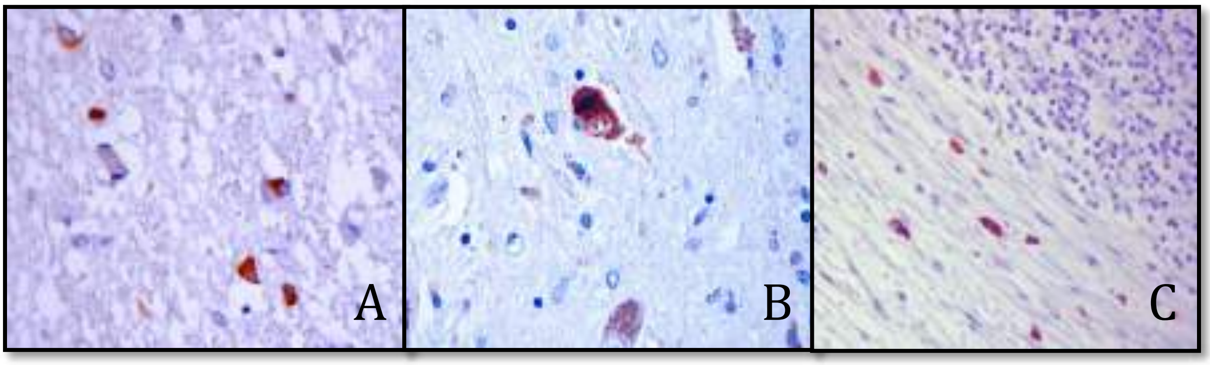


Figure 6: Case 3 - Cytoplasmic glial inclusions in the pons (A); perinuclear neuronal inclusion in the midbrain (B) and cytoplasmic glial inclusions in the cerebellum white matter (C) (α-synuclein, 600X)

3.2 Segundo Artigo Científico Redigido em Inglês

Avaliação da atitude dos pacientes e familiares frente a doação de cérebros para fins de investigação científica

Edson Rodrigues Neto

Mariana Kumaira Fonseca

Francine Hehn de Oliveira

Larissa Garcia

Liana Lisboa Fernandez

Arlete Hilbig

Enviado para publicação na Revista "Cell Tissue Bank"

ASSESSING FAMILIES AND PATIENTS' ATTITUDES TOWARDS BRAIN DONATION FOR RESEARCH PURPOSES

FONSECA, M. K.; [1] *RODRIGUES-NETO, E.;* [1] *FERNANDEZ, L. L.;* [2] *OLIVEIRA, F. H.;* [3] *GARCIA, L. P;* [4] *HILBIG, A.;* [5]

1. *Medical Students at Federal University of Health Sciences of Porto Alegre (Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre). Scholarship students of Undergraduate Research Program of the Research Support Foundation of Rio Grande do Sul (Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul - FAPERGS).*
2. *Neurologist. PhD in Cellular and Molecular Biology at the Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul (Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul). Adjunct Professor at the Federal University of Health Sciences of Porto Alegre.*
3. *Pathologist. Expert in Neuropathology from the Neuropathology Institute of the Zurich University Hospital. Master's Degree student in Pathology at the Federal University of Health Sciences of Porto Alegre.*
4. *Physician from the Federal University of Health Sciences of Porto Alegre.*
5. *Neurologist. PhD in Clinic Medicine at the Federal University of Rio Grande do Sul (Universidade Federal do Rio Grande do Sul). Associate Professor for the Federal University of Health Sciences of Porto Alegre.*

ABSTRACT:

Introduction: The neuropathological examination of postmortem human brain tissue is an essential resource for the definitive diagnosis and research on neurodegenerative diseases. Due to the growing need of donated brains to supply the Brain Banks, the understanding of the factors associated with the consent for the donation in our context is an important aspect of the process of brain donation. **Methods:** The verbal answers and the donation consent rate were evaluated in three groups: 30 relatives of patients who underwent verification of death, 14 patients assisted at a neurology ambulatory, and 18 dementia and PD patients' relatives. **Results:** The donation consent rates were of 46.6%, 92.8% and 88.8%, respectively. The main reasons for refusal were the disagreement with the autopsy, philosophical and religious issues, objections from other family members, and the consideration of the wishes of the deceased. The consent was specially motivated by the interest in the advances of scientific knowledge, altruistic reasons and the personal experiences with the disease. **Conclusion:** Factors as the emotional fragility at the moment of death, the beliefs, family matters, and the lack of knowledge are key elements in the donation process. Future goals include the establishment of a brain donor program with the support of academic institutions, hospitals, scientists, community, patient's associations and autopsy assistants. Approaching patients and relatives in specialized ambulatories during assistance is probably the most efficient mean of obtaining brains for research.

Keywords: brain donation, research participation, neurodegenerative diseases.

INTRODUCTION

In the last decades, Brain Banks have been established worldwide in an attempt to provide human brain tissue in both quantity and quality for conducting neuropathological research. These are institutions specialized in collecting, storing, preserving and assessing brains in special laboratories, always seeking for adequate and detailed clinical, demographic and functional characterization of the donor[1].

The neuropathological examination of postmortem human brain tissue is an essential resource for the definitive diagnosis and for research on neurodegenerative diseases. By means of comparative studies between diseased and non-diseased brains, it is possible to establish a clinical-pathological correlation of processes related to normal aging and those with conditions affecting the central nervous system[2]. These data enables the investigation of genetic and environmental factors that underlie the progression of the disease, as well as that of the molecular events leading to the onset of characteristic neuropathological hallmarks – thereby contributing for a better understanding of the etiopathogenesis of the neurodegenerative diseases.

In this context, the increasing demand for human brains to supply the banks emerges as one of the main challenges for researchers. On the other hand, the basic condition to meet this need is mainly based on the society's trust, support and collaboration with the scientific research and with the donation processes. Whereas there is a solid understanding of the factors that influence the consent for organ donation and transplantation, few researchers have gone further and tried to identify the principles that motivate brain donation for scientific purposes around the world. Besides that, most of these studies are confined to countries that house the main Brain Banks, such as the United Kingdom, United States and Australia.

The lack of Brazilian or even Latin studies about brain donation for research does not allow, so far, a precise description of the motivating factors which influence this decision in our context – and this represents a gap for the understanding of how the Brazilian's culture, beliefs and knowledge affect this process. The aim of this paper was to verify and compare the consent rates to brain donation in different situations: among relatives of patients underwent verification of death, among the patients of a reference outpatient clinic in neurodegenerative diseases, and, finally, among patients' relatives from this clinic.

METHODS

The population studied in this paper is composed by relatives of subjects underwent verification of death, patients of a model clinic in neurodegenerative diseases, and these patients' relatives. To verify and compare the consent rate for brain donation, the sample of the study was divided in two groups.

Group 1 is composed by relatives of subjects aged 50 years old or more underwent verification of death in the Forensic Department (FD) of the General Examination Institute of Rio Grande do Sul. This phase is part of a project that proposes a methodology to obtain and investigate human brain tissue, thus starting the Brain Bank for the study of neurodegenerative diseases of the Federal University of Health Sciences of Porto Alegre – UFCSPA. Divided in shifts along the week, the researchers were responsible for the identification of potential donors in the FD and for the contact with their relatives, either personally or by telephone. The approach was standardized and trained: after an explanation about the project objectives, the execution mode, the normal necropsy procedures and the removal of the brain, the relative was invited to take part in the research. The donation was authorized trough the signature of a informed consent by the responsible person. Then, a validated questionnaire was answered by the next of kin to investigate possible cognitive alterations (IQCODE) and motor alterations that the donor could have presented during his/her life, as well as the family history and disease history (Figure 1).

Group 2 is formed by a sample of patients with diagnosis of dementia and/or parkinsonism (subgroup 2A) and their relatives (subgroup 2B), approached as part of an observational study at the Movement Disorders and Dementia outpatient Clinic of the Neurology Service at the Irmandade Santa Casa de Misericórdia of Porto Alegre (ISCMPA). Before the signature of the informed consent, a mini mental status examination was applied to detect cognitive impairment which would spoil the adequate comprehension of the questionnaire. In the cases which dementia was verified, the participant was excluded from the sample. The data were collected during routine medical examination, by means of standard questionnaire containing information on demographic and socioeconomic variables, as well as the patient’s diagnosis, his/her opinion and the relative’s opinion about brain donation for research purposes (Figure 2).

The comparison between the consent rates in both groups was made in a descriptive way. The projects were approved by the Committees of Ethics in Research of the Federal University of Health Sciences of Porto Alegre, of the Forensic Department and of the Santa Casa de Misericórdia of Porto Alegre.

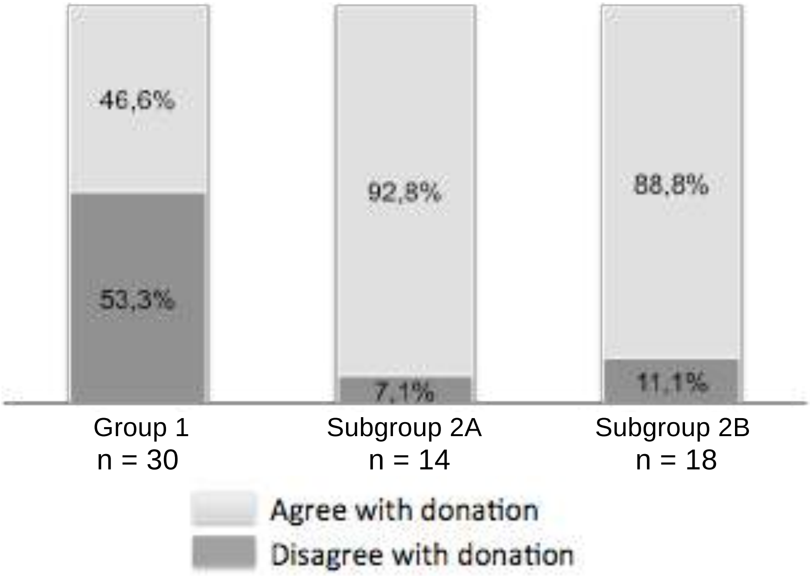
Researcher's arrival to the DML	
Identification of potential donors that meet inclusion's criteria	
Telephone contact with the next of kin	
Explanation of the project, the necropsy procedures and brain removal	
Consent	Refusal
Signature of Consent Agreement	Questioning about the reason for refusal
Questionnaire Application	Reiteration that the examination will not be affected and thanks for the attention
Brain collection during necropsy	

Figure 1. Flow chart of the approach of relatives at the Forensic Department (Group 1).

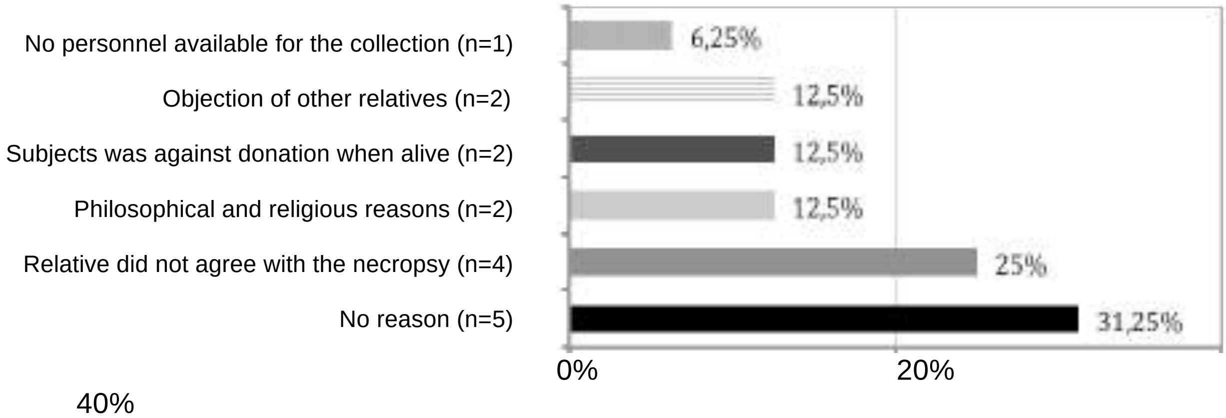
Researcher's arrival at the Clinic of Dementia and Movement Disorders of the Neurology Service of the ISCMPA/UFCSPA		
Identification of potential participants by previous analysis of medical records		
Explanation of the objectives and procedures of the research after the medical appointment		
Application of the Mini Exam of Mental status for the exclusion of dementia		
Consent	Refusal	Exclusion
Signature of the Consent Agreement	Questions on the reason for refusal	
Application of questionnaire	Reiteration that the appointment will not be affected and thanks for the attention	

Figure 2. Flow chart of the approach of patients and relatives at the Clinic of Dementia and Movement Disorders (Group 2)

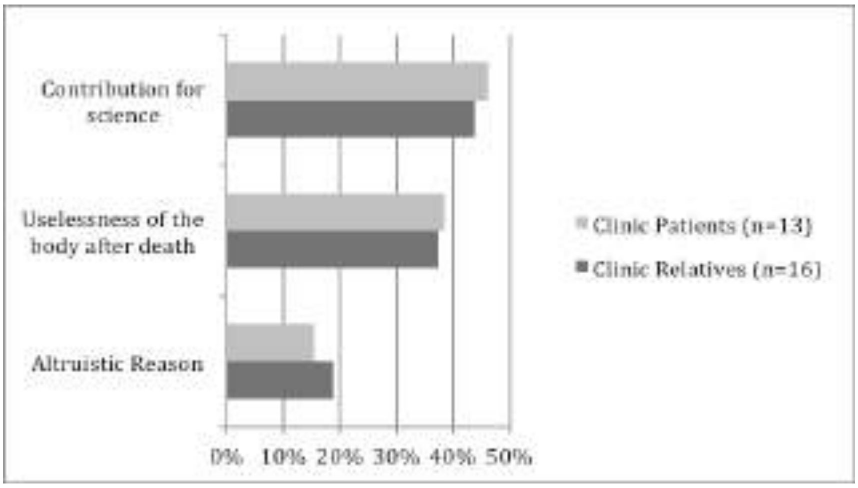
RESULTS



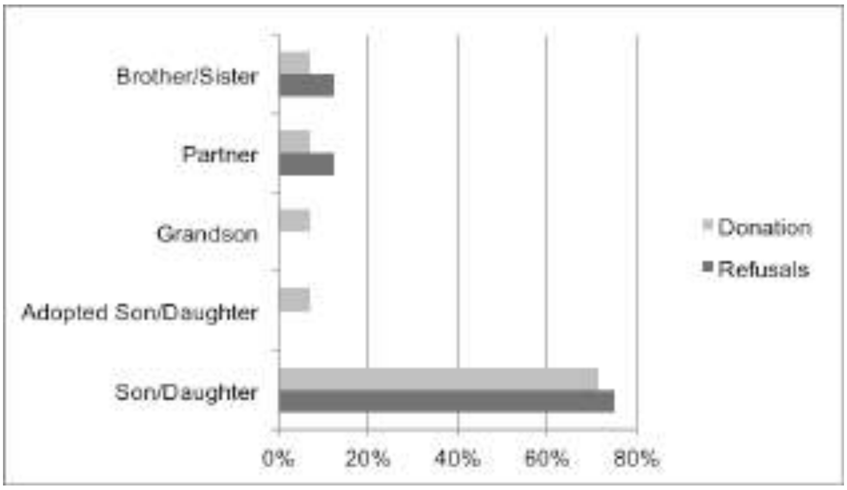
Graphic 1. Consent rate for brain donation



Graphic 2. Group 1 – Relatives at DML: Reasons for refusal to brain donation (n=16)



Graphic 3. Group 2 – Ambulatory Patients and Relatives: Reasons for the concent to brain donation



Graphic 4. Group 1: Degree of kinship (n=30)

In Group 1, 30 relatives were approached, and 16 of them (53.3%) did not consent the donation. The main reasons indicated by the interviewees were the disagreement with the necropsy procedure which the subject should undergo (25%; n=4), philosophical or religious issues (12.5%; n=2), objections from other relatives (12.5%; n=2), and the consideration for the deceased person's wish manifested when alive (12.5%; n=2). For most of the refusals (31.25%; n=5), no reason was presented [Graphic 2]. The family degree predominating between victims and relatives was first degree (parents or children), both for the donations (71.4%; n=9) and for the refusals (75%; n=12) [Graphic 4]. For a significant number of subjects that underwent verification of death, it was not possible to obtain the consent, as the body arrives at the FD without the presence of relatives, which complicates the approach.

In Group 2, a total number of 32 people were interviewed, 14 of which were patients and 18 were relatives. When questioned about the brain donation for research purposes, 71.4% (n=10) of the patients interviewed (Subgroup 2A) considered that the current knowledge about neurodegenerative diseases was insufficient for an adequate treatment, and 92.8% (n=13) considered that the brain donation for research was important. However, most of them (92.8%; n=13) have never discussed the topic with family and friends. Among the reasons for a positive intention to donate, the interest in contributing to the scientific development (46.15% n=6) and helping other people (38.46%; n=5) [Graphic 3] stand out. Only one of the interviewees would not consent with the donation, justifying this with lack of knowledge and unbelief in the direct benefit of this process.

Among the relatives participating in Subgroup 2B, 83.33% (n=15) believe that the brain donation is important to scientific research, and 16.66% (n=3) have already debated the idea with other family members. Most of them (88.8%; n=16) would donate the brain of the relative who has a neurodegenerative disease, and, among the reasons which influence this decision, are to help other people (43.75%; n=7), to contribute to the progress of the scientific knowledge (37.5%; n=5), and the uselessness of the body for themselves after death (18.75%; n=3) [Graphic 3]. Two relatives (11.11%) refused, due to the unbelief in the donation process and discomfort with the idea of removing parts of the body. The consent rates obtained in the three groups are summarized on Graphic 1.

DISCUSSION

Understanding the principles that influence the consent to brain donation is critical for the future of the research on aging and neurodegeneration, since it allows identifying the appropriate strategies for obtaining study material. However, this process is still little investigated, so relatively few studies have so far tried to identify and understand the individuals' and their relatives' motivations, feelings and decisions in relation to brain donation for scientific research. Key factors relative to the donation for organ transplants have already been defined, but the relevance of these findings remains a speculation in relation to the same process for the medical research[3-5]. Besides that, the findings in the literature are very variable and particular to each culture, and a specific evaluation in our context is necessary.

The publications about this theme present different approaches. Whereas some authors analyze the verbal responses given by the relatives on the day of the potential donors' necropsy, others concentrate in evaluating the perceptions of healthy individuals on the neurological point of view – either in population-based enquiries or among participants of donation programs. There is also a sparse literature focusing on patients with neurodegenerative diseases. The consent rates to brain donation found in different studies are summarized on Table 1.

Study	Country	Approach	Consent
AZIZI *et al.*, 2006	Australia	Family	58.3%
BEARDSALL *et al.*, 1992	United Kingdom	Family / Patient	75% / 85%
DARNELL *et al.*, 2011	United States	Individual	37%
EATOUGH *et al.*, 2012	United Kingdom	Family	-
GARRICK *et al.*, 2003	Australia	Family	62%
GARRICK *et al.*, 2009	Australia	Family	54%
KAYE, 1999	United States	Individual	68%
KUHTA *et al.*, 2011	United States	Patient	56%
LAMBE *et al.*, 2011	United States	Individual	20%
MILLAR *et al.*, 2008	Scotland	Family	18%
SCHIMITT *et al.*, 2001	United States	Individual	38.7%
SHAW, 2012	United States	Individual	31%
SOLOMON *et al.*, 1993	United Kingdom	Family	65%
STEVENS, 1998	United Kingdom	Individual	32.4%
	Brazil	Family	46.6%
FONSECA et al., 2013		Patient	92.8%

Table 1. Consent rates to brain donation

In the present study, the verbal responses and the consent rate to brain donation in three different situations were also analyzed: among relatives of dead patients submitted to verification of death at the moment of the necropsy (Group 1), among patients of a model clinic for neurodegenerative diseases (Subgroup 2A), and among these patients' relatives (Subgroup 2B). Rates of 46.6%, 92.8% and 88.8%, respectively, were verified, which demonstrates the difference between the moments of a hypothetical future donation and of a decision at the time in which de family faces death.

Many variables are involved in a family's decision for donating a relative's brain in the moment of the necropsy. Among the main reasons to give consent highlighted by the bibliography are the desire to help people who suffer with the disease, the progress of the scientific knowledge and the deceased person's wish manifested in life[5-8]. The consent rate verified at the FD is close to the ones found by various studies which evaluated the consent rate for donation on the same perspective[6,8,9]. These authors also demonstrated that, in most of the refusals, families prefer do not declare any reason to justify their decision, as was also verified in the present sample (31.25%); the families who do frequently relate discomfort with the idea of the necropsy and the donation, worries with delays in the funeral, consideration for the other relatives or with the deceased person him/herself and, mostly, the impact of the decision for other relatives[6-8].

Mostly, the decision to donate is not defined by one relative alone. Therefore, the impact of the other relatives' opinion is extremely relevant in this issue. The present study supports this statement, with 12.5% of the refusals due to the objections from other relatives as a justification. Garrik et al. (2009) showed a positive association between the proximity of kinship degree and the donation consent. However, other authors defend that the kinship relation among the relatives does not tend to affect the donation process, that is, this association is not consensual yet[7].

Many studies have pointed out that the consideration of the deceased person's wish manifested during his/her life is a decisive factor in the moment of the decision. Thus, knowing the deceased person's wish facilitates the decision taking by the family[2,6-9]. In the sample studied, 12.5% of the relatives who refused, did it because they knew the deceased person's contrary wish manifested in life. In a study carried out with relatives who allowed the brain donation, Sundqvist et al. (2010) showed that 44% did not discuss the theme with the deceased person in life, but points out higher consent rates among families who had previously debated the theme with their family members and knew their wishes. These findings highlight the importance of discussion about the theme with the family and the promotion of positive attitudes about it.

Yet, being against the necropsy procedure that the subject would undergo was a very frequent justification, summing 25% of the interviewees. In

Brazil, on the contrary of countries such as the United States, England and Australia, where the relative's authorization is not required to perform verification of death – it is for the doctor to refer the body to examination in the FD. So, many relatives experience the anguish of lacking information about the purpose and the execution of the necropsy procedure, being suspicious about the invitation to participate in the research.

Among the patients with movement disorders and/or dementia, brain donation is specially motivated by the interest in the advance of the medical knowledge[10]. In the present study, 92.8% of the patients interviewed affirm that they would accept to donate their brains for scientific research. This proportion is close to the ones found in other studies that also questioned the patients' interest in participating in this kind of study[8,10,11]. Most of the people interviewed (92.8%) consider that brain donation is important for research, and 42.85% would donate for the sake of the scientific development, suggesting that the disease in the patients' lives, their personal experiences as an ill person, and the consequent interest in its cure end up by representing a positive factor in the decision of getting involved in a tissue donation program for science.

On the other hand, even if there is an important positive association between being affected by the disease and getting involved in a donation program, some patients manifest the wish of not thinking about this theme before their death, besides the worries with the reaction of the family, possible delays in the funeral organization, fear of disfigurement of the body, and impediments due to religious issues[4,10]. At the clinic of ISCMPA, the only patient who would refuse the donation alleged lack of knowledge and unbelief in the direct benefits of the process.

In the subgroup 2B, the number of patients' relatives who would accept to take part in a donation project is very high (88.8%), when compared to the consent rate found in Group 1. Close contact with an ill person, the desire to help people who suffer with the disease and the understanding of the necessity of scientific research to relief the suffering of others and to contribute to a future cure are factors that exert a positive influence in the decision[2,8,11]. In contrast, the relatives believe it is easier to decide about their own organs than about those of some other family member[6,8], a fact that can explain the difference between the consent rates in Group 2.

In population-based inquiries or inquiries made with participants inserted in donation programs[2,8,12,13], the involvement with researches in the area is based on the strong desire of promoting scientific knowledge, and many are influenced by acquaintances who declared themselves as donors. The importance of the personal experiences with the disease, such as knowing a relative or a friend who was affected by it, also influence in the decision process. Concerns with body disfigurement and delay in the funeral, general lack of information about the procedure, lack of direct benefit with the findings of the research, religious objections, family disagreement, and discomfort with the idea of the necropsy procedure[12-15] are some of the factors that demotivate potential donors. It is important to point out that many do not understand the necessity of healthy people's brains in researches about neurodegenerative diseases[14].

Another obstacle to obtain brains is the failure of the health professionals in requiring the family's consent, either for fear of disputes, pre-existing opinions about the relatives' reactions, lack of training to approach them, or even discomfort to discuss the theme[2]. Considering that the human tissue donation process involves not only the family members, but also the active participation of an assistance team, these professionals must be encouraged to identify the ways that facilitate the approach of patients and relatives, providing adequate information about the procedures and emphasizing the need of obtaining material for research.

CONCLUSION

The results verified in the sample studies suggest that many variables are involved in the decision of agreeing with the brain donation, so that the emotional fragility in the moment, the approaching form, family issues, and the lack of information about the theme become decisive elements in this scenario. Thus, it is possible to highlight the determinant role of health professionals and the need of supplying them with education and training of standard techniques to approach people, encouraging them to identify the ways to facilitate the discussion with patients and families. Our results demonstrate that the strategy of approaching patients and relatives in life at specialized clinics is the most effective way of obtaining human brains for the research in our context. Teams must be capable of conducting the process in an ethical and comfortable way for the families who face the pain of losing a beloved one[16].

As strategies to recruit the biggest number of donors, it is also necessary to provide the population with more detailed information about brain donation, as well as stimulating the dialogue inside the families about the topic and to clarify how the research can contribute to the community and the future generations[17]. This work contributes to the understanding about brain donation for medical research in our context, by means of its specific focus on this process from different perspectives: as limitations, we indicate the few variables analyzed and the small sample obtained – which is due to the logistic difficulties in collecting the brains in the Forensic Department – besides the absence of a donation program established that would allow a more extensive interview with relatives.

ACKNOWLEDGEMENT

This research was carried out with the financial aid of the Research Support Foundation of Rio Grande do Sul – FAPERG (Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul). The authors thank the support of the Forensic Department of the General Institute of Examinations (Instituto Geral de Perícias) of Rio Grande do Sul.

REFERENCES

1. Vonsattel JPG, Amaya MP, Keller CE. Twenty-first century brain banking. Processing brains for research: the Columbia University methods. **Acta of Neuropathology**. 2008; 115: 509-532.
2. Schmitt FA, Wetherby MM, Wekstein DR, Dearth CM, Markesbery WR. Brain donation in normal aging: procedures, motivations, and donor characteristics from the Biologically Resilient Adults in Neurological Studies (BRAiNS) Project. **Gerontologist**. 2001; 41(6): 716-22.
3. Garrick T, Azizi L, Merrick J, Harper C. Brain donation for research, what do people say? **Intern Med J**. 2003; 33(9-10): 475.
4. Harris C, Kiger A, Counsell C. Attitudes to brain donation for Parkinson's research and how to ask: a qualitative study with suggested guidelines for practice. **J Adv Nurs.** 2012; Jul 24.
5. Eatough V. Shaw K, Lees A. Banking on brains: insights of brain donor relatives and friends from an experiential perspective. **Psychol Health**. 2012, 27(11): 1271-1290.
6. Azizi L, Garrick TM, Harper CG. Brain donation for research: strong support in Australia. **J Clin Neurosci**. 2006; 13(4): 449-52.
7. Millar T, Lerpiniere C, Walker R, Smith C, Bell JE. Postmortem tissue donation for research: A positive opportunity? **Br J Nurs**. 2008; 17(10): 644-9.
8. Garrick T, Sundqvist N, Dobbins T, Azizi L, Harper C. Factors that influence decisions by families to donate brain tissue for medical research. **Cell Tissue Bank**. 2009; 10(4): 309-15.
9. Solomon SA, Adams KH. Attitudes of relatives to autopsies of elderly patients. **Age Ageing**. 1993; 22(3):205-8.
10. Kuhta T, Zadikoff C, Simuni T, Martel A, Williams K, Videnovic A. Brain donation - what do patients with movement disorders know and how do they feel about it? **Parkinsonism & Related Disorders**. 2011; 17(3):204-7.
11. Beardsall L, C Barkley, and AO'Sullivan, The response of elderly community residents to request for brain donation: An interim report. International **Journal of Geriatric Psychiatry**, 1992; 7(3): p. 199-202.
12. Stevens M. Factors influencing decisions about donation of the brain for research purposes. **Age Ageing**. 1998; 27(5): 623-9.
13. Kaye JÁ, Dame A, Lehman S, Sexton G. Factors associated with brain donation among healthy elderly people. **J Gerontol A Biol Sci Med Sci**. 1999; 54(11):M560-4.
14. Darnell KR, McGuire C, Danner DD. African American participation in Alzheimer's disease research that includes brain donation. **Am J Alzheimers Dis Other Demen**. 2011; 26(6): 469-76.
15. Jefferson AL, Lambe S, Cook E, Pimontel M, Palmisano J, Chaisson C. Factors Associated With African-American and White Elders' Participation in a Brain Donation Program. **Alzheimer Dis Assoc Disord**. 2011; 25(1):11-6.
16. Dembogurski, JE; Azenha, MV; Amaral, APC et al. Dados preliminares de um modelo de programa de doação de corpos: Programa de Doação de Corpos da UFCSPA. **Rev AMRIGS**. 2011, 55 (1): 7-10
17. Lambe S, Cantwell N, Islam F, Horvath K, Jefferson AL. Perceptions, knowledge, incentives, and barriers of brain donation among African American elders enrolled in an Alzheimer's research program. **Gerontologist**. 2011; 51(1): 28-38.
18. Austrom MG, Dickinson SL, Denny SS, Matthews BR, Gao S, Lu Y. Frontotemporal dementia caregivers and researchers: partnering for brain donation. **Am J Alzheimers Dis Other Demen**. 2011; 26(6): 477-83.
19. Beard J, Ireland L, Davis N, Barr J. Tissue donation: what does it mean to families? **Prog Transplant**. 2002;12(1):42-8.
20. Glaw XM, Garrick TM, Terwee PJ, Patching JR, Blake H, Harper C. Brain donation: who and why? **Cell Tissue Bank**. 2009; 10(3): 241-6.
21. Radecki CM, Jaccard J. Psychological aspects of organ donation: a critical review and synthesis of individual and next-of-kin donation decisions. **Health Psychol**. 1997;16(2):183-95.
22. Rodrigues JR, Scott MP, Oppenheim AR. The tissue donation experience: a comparison of donor and nondonor families. **Prog Transplant**. 2003; 13(4):258-64.

23. Sanner M. Attitudes toward organ donation and transplantation. A model for understanding reactions to medical procedures after death. **Soc Sci Med**. 1994; 38(8):1141-52.
24. Shaw K et al. Successful Recruitment of Centenarians for Post-Mortem Brain Donation: Results from the Georgia Centenarian Study. **The Journal of Bioscience and Medicine**. 2012, 2(1).
25. Sundqvist N, Garrick T, Harding A. Families' reflections on the process of brain donation following coronial autopsy. **Cell Tissue Bank**. 2012; 13(1): 89-101.

4. Considerações finais

O presente estudo intitulado “ **Alterações neurodegenerativas no tronco encefálico e bulbo olfatório em indivíduos acima de 50 anos”,** aprovado pelos Comitês de Ética em Pesquisa (CEP) da UFCSPA (Parecer N° 1156/10) e do Departamento de Medicina Legal de Porto Alegre teve por objetivo iniciar a organização de um protocolo para aquisição e estudo de encéfalos humanos em um banco de cérebros. Paralelamente a este estudo, outros trabalhos estão sendo desenvolvidos com o material coletado.

A única maneira de entendermos melhor a patogênese das doenças neurodegenerativas é através do estudo de encéfalos humanos pós-morte, tanto os com envelhecimento normal quanto aqueles com doenças neurodegenerativas. Por esta razão, este trabalho tem um importância fundamental em nosso meio, uma vez que foi a primeira tentativa de instalação de um banco de cérebros para o estudo de doenças neurodegenerativas, tratando-se de uma iniciativa pioneira no Estado.

A parceria entre o nosso grupo de pesquisa e o DML de Porto Alegre instituiu-se em 2010, quando iniciamos este projeto. Desde lá, estamos reunindo esforços para encontrar alternativas para melhorar a comunicação entre os pesquisadores, funcionários do DML e familiares dos potenciais doadores. Neste trabalho, antes de qualquer aprendizado científico, tivemos a oportunidade de entender o funcionamento do sistema de verificação de óbito atual, o que nos fez perceber que muitas mudanças são necessárias para que a coleta de material biológico para pesquisa seja mais efetiva e viável.

Sabemos que muito ainda precisa ser feito para aumentar a nossa casuística, muito pequena em função das dificuldades encontradas. No futuro, este número deve ser aumentado em larga escala para produção de dados que contribuam para o desenvolvimento da pesquisa neste campo.

Apesar das dificuldades encontradas e da amostra pequena, os objetivos propostos pelos pesquisadores foram alcançados em grande parte. Nós conseguimos demonstrar a existência de depósitos proteicos relacionados às doenças neurodegenerativas, no tronco encefálico e bulbo olfatório de pacientes que ainda não desenvolveram alterações cognitivas ou demência. Alguns estudos recentes da publicados na literatura sugerem que as estruturas do tronco encefálico e do bulbo olfatório estão envolvidas em fases precoces das doenças neurodegenerativas e poderiam explicar alguns dos sintomas apresentados pelos pacientes, muitos anos antes da instalação do quadro demencial.

Este trabalho pode ainda ser um incentivo para que outros pesquisadores interessados neste campo possam agregar esforços aos nossos, aumentando o número de doações e de material para pesquisa.

5. Anexos

5.1 ANEXO 1

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

O projeto de pesquisa intitulado "**Prevalência e caracterização *pos-mortem* de alterações neurodegenerativas no tronco encefálico e bulbo olfatório de cadáveres acima de 55 anos submetidos à verificação de óbito e suas possíveis correlações com manifestações clínicas**" tem por objetivo estudar as alterações neurodegenerativas (depósitos de proteínas) presentes no cérebro de pessoas acima de 55 anos, falecidas de morte natural, causadas por problemas não cerebrais. Além disso, gostaríamos de relacionar estas alterações com algumas manifestações clínicas que os pacientes apresentassem, sendo que para isso você responderá um questionário sobre algumas possíveis alterações de marcha e de comportamento apresentadas pelo seu familiar.

Para que este estudo possa acontecer é necessária a doação do cérebro do seu familiar. Para seu conhecimento, o cérebro é retirado pelo médico legista durante a necropsia onde este é examinado como rotina. Em função disso, não se soma nenhum desconforto ou risco para o falecido, familiares ou responsáveis legais da pessoa falecida, já que o procedimento a ser realizado é o habitual e está indicado por normas técnicas/acadêmicas legais. Não será realizado nenhum procedimento a mais para este estudo. A diferença, no caso de sua concordância, é que, ao invés de ser descartado após a análise, o cérebro será utilizado para pesquisa. O material será estudado e ficará guardado, para estudos futuros, no Banco de Cérebro vinculado ao no Laboratório de Patologia da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, R. Sarmento Leite, 245, Porto Alegre – RS. Gostaríamos de enfatizar que com a sua colaboração, daqui a alguns anos poderemos estar ajudando milhares de pessoas com problemas de demência, pois a partir deste estudos, queremos entender o processo de envelhecimento do cérebro. Se o familiar ou responsável legal pela pessoa falecida tenha alguma dúvida sobre o que foi informado acima, poderá perguntar a qualquer um dos pesquisadores envolvidos neste estudo. Poderá também não querer participar deste estudo, pedindo para que o cérebro não seja utilizado por nós na pesquisa, sem que isso acarrete nenhum prejuízo na qualidade do procedimento. Também poderá abandonar esta pesquisa no momento em que bem entender, sem que isso acarrete necessidade de justificativas ou qualquer tipo de indenização.

Os autores deste estudo se comprometem a divulgar os resultados obtidos para o avanço do conhecimento científico de maneira a não expor dados pessoais completos que possam identificar as pessoas que contribuíram para esta pesquisa.

Caso eu tenha novas perguntas sobre a doação ou este estudo, posso entrar em contato com a ***Profª Arlete Hilbig (pesquisadora responsável****), e/ou com* ***Francine Hehn de Oliveira (pesquisadora aluna de mestrado)*** *no endereço R. Sarmento Leite, 245, Porto Alegre – RS, telefone 0 xx 51 33039000 ramal 8802. Para qualquer pergunta sobre os meus direitos como participante deste estudo ou se penso que fui prejudicado pela minha participação, posso chamar o coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Prof. José Geraldo V. Taborda, ou seu substituto, na R. Sarmento Leite, 245, Porto Alegre – RS/ telefone 0 xx 51 3303 8804. Declaro que recebi cópia do presente Termo de Consentimento*

____
Assinatura de familiar ou do responsável legal

____	___________________________________
Nome do familiar e grau de parentesco	Assinatura do Pesquisador
____	___________________________________
Nome do Pesquisador	Assinatura de testemunha

Data: ___/___/_____

5.2 ANEXO 2

IQCODE (Informant Questionnaire on Cognitive Decline in the Elderly)

Marque com um "x" na resposta apropriada. Se a pessoa nunca fez determinada função ou tarefa, marque "não se aplica". Se o familiar não tem certeza ou desconhece alguma informação, marque "não sabe".

Comparada há 10 anos atrás, como essa pessoa está em:	*Muito melhor*	*Melhor*	*Não muito alterado*	*Pior*	*Muito pior*	*Não se aplica*	*Não sabe*
1. Reconhecer familiares e amigos							
2. Lembrar-se do nome dos familiares amigos							
3. Lembrar-se de coisas sobre os familiares							
4. Lembrar-se de coisas que aconteceram há pouco tempo							
5. Lembrar-se de conversas dos últimos dias							
6. Esquecer o que ele(a) queria dizer no meio da conversa							
7. Lembrar-se do seu endereço e telefone							
8. Lembrar-se em que dia e mês estamos							
9. Lembrar onde as coisas são guardadas usualmente (ex. roupa, talheres, etc)							
10. Lembrar onde achar coisas que foram guardadas em lugar diferente do de que de costume (ex. óculos, dinheiro, chaves)							
11. Adaptar-se a mudanças em sua rotina diária							
12. Saber usar aparelhos domésticos que já conhece							
13. Aprender a usar um aparelho doméstico novo							
14. Aprender novas coisas em geral							
15. Lembrar-se de coisas que aconteceram quando ele (a) era jovem							
16. Lembrar-se de coisas que ele(a)aprendeu quando era jovem							
17. Entender o significado de palavras pouco comuns							
18. Entender artigos de revista e de Jornal							
19. Acompanhar uma história em um livro ou na televisão (ex. novelas, seriados, filmes)							
20. Escrever uma carta para amigos ou para negócios							
21. Conhecer fatos históricos importantes do passado							
22.Tomar decisões em questões do dia-a-dia							
23. Lidar com dinheiro para fazer compras							
24. Lidar com suas finanças, por exemplo, pensão, coisas de banco							
25. Lidar com outros problemas concretos do dia-a-dia, como por exemplo, saber quanta comida comprar, quanto tempo transcorreu entre as visitas de familiares ou amigos							
26. Compreender o que se passa a sua volta.							
Sub-Total (soma dos itens assinalados nas colunas)							
Total (multiplicar o sub-total de cada coluna pelo número indicado)	X 1=	X 2=	X 3=	X 4=	X 5=		
Total geral (soma dos resultados das 5 colunas)							

OBS: Nas colunas Não se aplica ou Não sabe, o sub-total não deve ser multiplicado por nenhum valor e, portanto, é igual ao total. Faça os cálculos com calma, depois de ter terminado a entrevista.

O cálculo do Escore final do IQCODE deve ser feito dividindo o total geral pelo número de perguntas respondidas (excluindo-se as questões assinaladas como Não se aplica ou Não sabe):

Escore IQCODE = $\dfrac{\textit{Total geral}}{\textit{Número de itens respondidos}}$

ESCORE FINAL IQCODE

5.3 ANEXO 3

QUESTIONÁRIO ADICIONAL PERSONALIZADO

Idade: _______________ Sexo: ______________

Causa mortis: ____

Doenças Associadas: ____

História familiar de doença neurodegenerativas (Demência – Alzheimer ou Parkinson)?

( ) NÃO ( ) SIM

Presença de tremores? ( ) NÃO ( ) SIM

Onde? ( ) MsSs ( ) MsIs

Quando? ( ) repouso ( ) em movimento

Dificuldades (lentificação) para realizar atividades usuais, mantendo braços ou pernas rígidos ?

( ) NÃO ( ) SIM

( ) Simétrica

( ) Assimétrica ( ) mais à direita

( ) mais à esquerda

Dificuldade de marcha? ( ) NÃO ( ) SIM

Arrastava os pés? ( ) SIM ( ) NÃO

Ficava “grudado” no chão, sem conseguir iniciar movimentos? ( ) NÃO( ) SIM

Apresentava dificuldades do sono, do tipo agitação noturna?

( ) NÃO ( ) SIM

Apresentava alguma alteração no olfato?

( ) NÃO ( ) SIM

5.4 PROTOCOLO DE CORTES HISTOLÓGICOS DO BANCO DE CÉREBRO MESTRADO FRANCINE

HEMISFÉRIO PADRÃO PARA CORTES: DIREITO

ÁREAS CORTES	Nº
CORTEX FRONTAL - F1-F2 imediatamente rostral à ponta do lobo temporal - Giro frontal superior e córtex pré-motor ao nível do pulvinar	 1 2
CORTEX TEMPORAL - T1-T2 ao nível do corpo mamilar - Ponta do lobo temporal	 3 e 4 5
CORTEX PARIETAL - Sulco intraparietal 1cm atrás do esplênio do CC	 6
CORTEX OCCIPITAL - Córtex visual	 7
CORTEX LÍMBICO - Cíngulo anterior ao nível do acumbens, 1,5cm atrás do genu do CC	 8
HIPOCAMPO - Ao nível do corpo mamilar - Ao nível do corpo geniculado lateral	 9 10
AMÍGDALA - Ao nível da comissura anterior	 11
GÂNGLIOS DA BASE - Ao nível do núcleo acumbens - Ao nível da comissura anterior - Globo pálido ao nível do corpo mamilar	 12 13 14
TÁLAMO - Ao nível do núcleo subtalâmico	 15
MESENCÉFALO - Ao nível do núcleo rubro + ao nível da decussação do pedúnculo cerebelar superior	 16
PONTE - Ao nível do *locus coeruleus* - Ponte inferior	 17 18
BULBO - Superior + Inferior	 19
CEREBELO - Vermis - Hemisfério incluindo núcleo denteado	 20 21
CORTES ADICIONAIS	
MESENCÉFALO - Ao nível do núcleo rubro + ao nível da decussação do pedúnculo cerebelar superior	 22
PONTE - Ao nível do *locus coeruleus* + ponte inferior	 23
BULBO - Superior + inferior	 24
QUANDO DISPONÍVEL: - TO distal (bulbo olfatório e trato distal – pintar parte proximal) - TO proximal (trato olfatório proximal – pintar parte proximal)	 25 26

5.5 Parecer do Comitê de Ética da UFCSPA

Parecer Consubstanciado de Projeto de Pesquisa

Titulo do Projeto: Prevalência e caracterização pos-mortem de alterações neurodegenerativas no tronco encefalico e bulbo olfativo de cadaveres acima de 55 anos submetidos a verificação de obitos e suas possiveis correlações com manifestações clinicas

Pesquisador Responsável Arlete Hilbig Parecer nº 1156/10

Data da Versão 09/06/2010	Cadastro 625/10	Data do Parecer 08/07/2010

Grupo e Área Temática Classificação utilizada pela CONEP

Objetivos do Projeto
Geral: caracterizar e quantificar, post-mortem,as alterações neurodegenetativas encontradas no tronco encefalico e bulbo olfativo de cadaveres acima de 55 anos, na tentativa de correlacionar depositos protéios com possiveis manifestações precoces das doenaças de Alzheimer e Parkinson.
Especificos: - implementar uma metodologia para obtenção e investigação de tecido encefalico humano no nosso meio, dando inicio ao projeto do banco de cerebro para estudo de doenças neurodegenerativas; - verificar a prevalencia de alterações neurologicas caracteristicas da doença de Parkinson e da doença de Alzheimer em uma amostra de pacientes acima de 55 anos; - verificar a prevalenia e distribuição de depositos de alfa sinucleina em tronco encefalaico (bulbo, ponte e mesencefalo) e areas olfativas (bulbo olfatorio); - verificar a prevalenia e distribuição de deposito de proteina tau hiperfosforilada em tronco encefalico (bulbo, ponte e mesenefalo) e areas olfativas (bulbo olfatorio);- verificar a prevalenia e distribuição de depositos de beta-amiloide em tronco encefalaico (bulbo, ponte e mesencefalo) e areas olfativas (bulbo olfatorio); - correlacionar os depositos das proteinas alfa sinucleina, tau hiperfosforilada e beta-amiloide com informações clinicas obtidas post-mortem atraves de questionarios especifico, formulado pelos autores contendo perguntas sobre disfunções motoras, doenças associadas, historia familiar para doenaça neurodegenerativas, uso de medicações, etc..

Sumário do Projeto
serão utilizados encefalos de cadaveres com idade igual ou superior a 55 anos, submetidos a verificação de obtidos no departamento de medicina legal de Porto Alegre; a amostra sera por conveniencia no periodo de julho de 2010 a dezembro de 2010 , sendo o numero desejado de 100 encefalos.

Itens Metodológicos e Éticos	Situação
Titulo	Adequado
Autores	Adequados
Local de Origem na Instituição	Adequado
Projeto elaborado por patrocinador	Não informado
Aprovação no país de origem	Não necessita
Local de Realização	Outro (citar no comentário)
Outras instituições envolvidas	Não informado
Condições para realização	Adequadas

Comentários sobre os itens de Identificação

Introdução	Adequada

Comentários sobre a Introdução

Objetivos	Adequados

Comentários sobre os Objetivos

Pacientes e Métodos	
Delineamento	Adequado
Tamanho de amostra	Total 100 Local 100
Cálculo do tamanho da amostra	Adequado

Participantes pertencentes a grupos especiais	Não
Seleção equitativa dos indivíduos participantes	Adequada
Critérios de inclusão e exclusão	Adequados
Relação risco- benefício	Não se aplica
Uso de placebo	Não utiliza
Periodo de suspensão de uso de drogas (wash out)	Não utiliza
Monitoramento da segurança e dados	Não se aplica
Avaliação dos dados	Adequada - quantitativa
Privacidade e confidencialidade	Adequada
Termo de Consentimento	Adequado
Adequação ás Normas e Diretrizes	Sim

Comentários sobre os itens de Pacientes e Métodos

Cronograma	Adequado
Data de início prevista	
Data de término prevista	
Orçamento	Adequado
Fonte de financiamento externa	Agência de fomento

Comentários sobre o Cronograma e o Orçamento

Referências Bibliográficas	Adequadas

Comentários sobre as Referências Bibliográficas

Recomendação

Aprovar

Comentários Gerais sobre o Projeto