

MARIA DANTAS COSTA LIMA GODOY

**Acometimento do epitélio olfatório pela doença de
Alzheimer: um estudo de correlação clínico-patológica**

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

Programa de Otorrinolaringologia
Orientador: Prof. Dr. Richard Louis Voegels

SÃO PAULO
2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Godoy, Maria Dantas Costa Lima

Acometimento do epitélio olfatório pela doença de Alzheimer : um estudo de
correlação clínico-patológica / Maria Dantas Costa Lima Godoy. -- São Paulo, 2015.
Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Programa de Otorrinolaringologia.
Orientador: Richard Louis Voegels.

Descritores: 1.Doença de Alzheimer 2.Envelhecimento 3.Imuno-histoquímica
4.Mucosa olfatória 5.Olfato 6.Transtornos do olfato

USP/FM/DBD-165/15

“É graça divina começar bem.
Graça maior é persistir na caminhada certa.
Mas a graça das graças é não desistir nunca.”

Dom Hélder Câmara

Dedico ...

*A **Deus**, por me iluminar e me proteger nesta trajetória e na vida;*

*A meus pais, **Murilo e Célia**, exemplos de bondade, retidão, desprendimento...
as melhores pessoas e os melhores médicos que já conheci e tenho a honra de
conviver;*

*Ao **Luis Filipe**, meu amor, e ao nosso amado filho **Luís** que está a caminho,
pela alegria que trazem à minha vida;*

*À minha irmã **Ana Isabel**, amiga e companheira sempre. Não consigo imaginar a
minha vida sem você por perto, flor!;*

*Às minhas queridas avós **Gilda e Doneza**, pelo exemplo de vida, força, apoio e
incentivo;*

*Ao **Guilherme**, meu amado afilhado, por fazer nascer em mim e retribuir um amor
infinito!*

AGRADECIMENTOS

Agradeço ...

Ao **Prof. Dr. Richard Louis Voegels**, Diretor de Rinologia do Departamento de Otorrinolaringologia do Hospital das Clínicas da FMUSP e orientador desta tese, pelo acolhimento, apoio e incentivo diários. Sou muito feliz por ter você como exemplo de líder e por me receber como parte do Grupo de Rinologia.

Ao **Prof. Dr. Ricardo Ferreira Bento**, Professor Titular da Disciplina de Otorrinolaringologia da FMUSP, pela oportunidade de ingressar nesta instituição e realizar este sonho.

Ao **Prof. Dr. Luiz Ubirajara Sennes**, Professor Associado do Departamento de Otorrinolaringologia da FMUSP e Coordenador da Pós-graduação em Otorrinolaringologia, pelo incentivo nas atividades acadêmicas e pelas preciosas orientações.

Ao **Dr. Rui Imamura**, exemplo de médico e pesquisador, pela paciência nos seus ensinamentos, com seriedade e humildade marcantes.

Ao **Dr. Fábio de Rezende Pinna**, grande incentivador deste projeto e de tantos outros, pelo espírito desbravador e visionário. É uma grande alegria chamá-lo de amigo!

Ao **Prof. Dr José Marcelo Farfel** pela colaboração e assistência fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos Professores Doutores **Carlos Augusto Pasqualucci, Paulo Saldiva, Ricardo Nitrini, Wilson Jacob Filho, Lea Grinberg** e às doutoras **Claudia Suemoto, Renata Leite, Renata Ferreti-Rebustini**, por toda a ajuda, compreensão e apoio.

Aos membros participantes da minha banca de qualificação, **Prof. Dr. Luiz Ubirajara Sennes, Dr. José Marcelo Farfel, Dr. Rui Imamura e Dr. Fábio de Rezende Pinna** pelas correções e sugestões que possibilitaram o aprimoramento desta tese.

Ao **Dr. Thiago Freire Pinto Bezerra**, amigo e colaborador deste e de vários outros projetos.

Ao **Dr. Marco Aurélio Fornazieri**, à **Dra. Luisa Medeiros** e ao **Dr. Miguel Tepedino**, grandes e queridos amigos, companheiros fiéis, do *fellowship* e da vida.

Aos Doutores **Tatiana Abdo, Bruno Pinna, Renata Pilan, Francine Pádua, Adja Oliveira, Ricardo Guimarães, Ana Paula Bezerra, Giovana Moretti, Renata Lopes Mori, Daniel Dutra e Fabrizio Romano**, por tantos momentos felizes durante todos esses anos.

Ao **Grupo de Rinologia, Assistentes, Fellowships, Pós-graduandos e Residentes, atuais e egressos**, pela acolhida e receptividade desde a minha chegada a São Paulo, por caminharmos e crescermos juntos a cada dia!

Ao **Prof. Dr. Sílvio Caldas Neto** e a todos os professores, médicos, preceptores e amigos da Disciplina de Otorrinolaringologia da UFPE, tão importantes na minha formação profissional desde os tempos da residência médica.

Aos meus amigos de residência, **Juliana Gusmão, Bruno Borges, Juliana Moreira Magalhães, Marcos Castro, Breno Carvalho, Eduardo Arcoverde, Tandra Souza, Rafael da Hora**, pelo companheirismo nessa jornada.

A todos os assistentes, residentes e ex-residentes do **IAMSPE**, pelo apoio e carinho diários. É uma grande alegria trabalhar e conviver com vocês!

Aos alunos, pós-graduandos e colaboradores do **Laboratório de Estudos em Envelhecimento – GEROLAB**, pelo empenho e dedicação, que se tornaram queridos amigos. Agradeço, de todo o coração, a cada um de vocês, em especial a **Gláucia, Mariana, Luzia, Ricardo, Roberta, Inês, Camila, Lívia, Edilaine, Kátia**,

Daniela, Juliana e Ana Tereza. Sem a ajuda e o incentivo incomensuráveis em todos esses anos, este trabalho não teria sido possível.

Às funcionárias **Marta Crocci e Keila Maria Silva**, pela simpatia, sinceridade e suporte técnico.

À **Marilede, Luci, Márcia e Kátia**, pela paciência, auxílio e orientações, sempre com alegria.

Aos médicos, funcionários e técnicos do Serviço de Verificação de Óbitos da Capital (SVOC) pela colaboração com este projeto de pesquisa.

Às famílias dos indivíduos participantes deste estudo que, num momento de perda tão difícil, encontram forças e desprendimento para colaborar com o desenvolvimento da ciência.

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para a conclusão deste projeto.

Às minhas queridas amigas-irmãs **Daniela, Christiane, Regina, Ana Priscila e Mariana**, e a todos os meus **amigos**, pelas risadas e paciência, por compreenderem minhas angústias e me fazerem lembrar sempre do que realmente importa.

À minha querida família, meus pais **Murilo e Célia**, minha irmã **Ana Isabel**, tia **Marieta**, vovó **Doneza, Leninha**, vovó **Gilda**, minha madrinha **Stella**, minhas primas **Gilda, Letícia e Manuela**, meu querido afilhado **Guilherme**, meus sogros **Ana e Jorge**, meus **tios, primos e cunhados**, e especialmente ao meu marido **Luis Filipe** e nosso já tão amado filho **Luís**, por todo o amor, cuidado, carinho e compreensão. Vocês são a melhor parte da minha vida e foram essenciais na realização deste sonho.

SUMÁRIO

Lista de siglas

Lista de abreviaturas

Lista de símbolos

Lista de figuras

Lista de tabelas

Resumo

Abstract

1 INTRODUÇÃO	01
2 OBJETIVOS	11
3 REVISÃO DA LITERATURA	13
3.1 Importância da doença de Alzheimer	14
3.2 Hiposmia na doença de Alzheimer	14
3.3 Acometimento do Sistema Nervoso Central e do bulbo olfatório na doença de Alzheimer	16
3.4 Diagnóstico clínico da doença de Alzheimer	17
3.5 Diagnóstico anatomopatológico da doença de Alzheimer	18
3.6 Biomarcadores no diagnóstico da doença de Alzheimer	19
3.7 Avaliação cognitiva	20
3.8 Banco de Encéfalos Humanos do Grupo de Estudos em Envelhecimento Cerebral	22
3.9 Caracterização, análise histológica e distribuição do epitélio olfatório	22
3.10 Coleta do epitélio olfatório e acometimento na doença de Alzheimer	25
4 CASUÍSTICA E MÉTODOS	27
4.1 Casuística	28
4.2 Critérios de inclusão.....	28
4.3 Critérios de exclusão.....	29
4.4 Diagnóstico clínico	30
4.5 Avaliação cognitiva.....	31

4.6 Diagnóstico neuropatológico.....	33
4.7 Caracterização das placas de amiloide.....	35
4.8 Caracterização dos emaranhados neurofibrilares	37
4.9 Coleta, processamento e imunistoquímica do epitélio olfatório	39
4.10 Microscopia e quantificação das proteínas tau e β -amiloide no epitélio olfatório	43
4.11 Análise estatística	44
4.11.1 Organização do banco de dados e softwares utilizados	45
5 RESULTADOS	46
5.1 População do estudo	47
5.2 Sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo dos marcadores 10D5 e PHF-1 no epitélio olfatório	49
5.3 Comparação da quantidade de marcações de acordo com o diagnóstico ...	50
5.4 Comparação da quantidade de marcações por região do epitélio olfatório	51
6 DISCUSSÃO	53
6.1 Coleta e processamento do epitélio olfatório	55
6.2 Imunistoquímica no epitélio olfatório	55
6.3 Caracterização do epitélio olfatório	56
6.4 Determinação da melhor área anatômica nasal para análise do epitélio olfatório	57
6.5 Presença de proteínas tau e β -amiloide no epitélio olfatório	58
6.6 Quantificação das proteínas tau e β -amiloide no epitélio olfatório	59
6.7 Limitações do estudo	60
7 CONCLUSÃO	61
8 ANEXOS	63
Anexo A - Critérios clínicos principais para o diagnóstico de demência (de qualquer etiologia)	64
Anexo B - Doença de Alzheimer: critérios clínicos centrais	66
Anexo C - Diagnóstico de comprometimento cognitivo leve (CCL) por causa da DA	69
Anexo D - Diagnóstico de doença de Alzheimer pré-clínica para fins de pesquisa clínica	72

Anexo E - Entrevista clínica 73

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 88

APÊNDICES

Apêndice 1 – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa

Apêndice 2 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

LISTA DE SIGLAS

ABIPEME	Associação Brasileira de Institutos de Pesquisa de Mercado
ADRDA	<i>Alzheimer's Disease and Related Disorders Association</i>
BEHGEEC	Banco de Encéfalos Humanos do Grupo de Estudos em Envelhecimento Cerebral
CAPPesq	Comissão de ética para Análise de Projetos de Pesquisa
CERAD	<i>Consortium do Establish a Registry for Alzheimer's Disease</i>
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
ICAD	<i>International Conference of Alzheimer's Disease</i>
NINCDS	<i>National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke</i>
SVOC	Serviço de Verificação de Óbitos da Capital

LISTA DE ABREVIATURAS

BEHGEEC	Banco de Encéfalos Humanos do Grupo de Estudos em Envelhecimento Cerebral
CERAD	<i>Consortium do Establish a Registry for Alzheimer's Disease</i>
CCL	Comprometimento Cognitivo Leve
CDR	Escore Clínico de Demência – <i>Clinical Dementia Rating</i>
CM	Concha Média
CS	Concha Superior
DA	Doença de Alzheimer
DP	Desvio Padrão
DSM- IV	<i>Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (4th Edition)</i>
ENF	Emaranhados Neurofibrilares
EOG	Eletroolfatograma
EO	Epitélio Olfatório
HE	Hematoxilina-eosina
IC	Intervalo de Confiança
IQCODE	<i>Informant Questionnaire on Cognitive Decline in the Elderly</i>
LRC	Líquido Cefalorraquidiano
MEEM	Mini Exame do Estado Mental
OMP	<i>Olfactory Marker Protein</i> (Proteína Marcadora Olfatória)
pH	Potencial de hidrogênio
PN	Placas Neuríticas
RNM	Ressonância Nuclear Magnética
SNC	Sistema Nervoso Central
SP	Septo nasal
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	grau Celsius
mm	milímetro
p	valor-p
r	coeficiente de correlação de Pearson ou de Spearman
x	vezes
%	porcento
=	igual a
±	mais ou menos
<	menor que
>	maior que
≥	maior ou igual a
β	beta
μm	micrometro

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Exemplos de: (A) placas neuríticas, compostos de proteína β -amiloide, corada por 10D5, vista por microscopia de campo claro (aumento de 400x); (B) emaranhados neurofibrilares, compostos de proteína tau, corada do PHF-1, vista por microscopia de campo claro (aumento de 400x). Fonte: Grupo de Estudos em Envelhecimento Cerebral, FMUSP.....	04
Figura 2	Dinâmica dos biomarcadores na cascata patológica da DA.....	06
Figura 3	Método semiquantitativo de classificação empregado pelo (1) CERAD A, (2) CERAD B, (3) CERAD C	37
Figura 4	Corte transversal da cavidade nasal em área correspondente ao epitélio olfatório	39
Figura 5	Tecido olfatório retirado em bloco	40
Figura 6	Imagem de lâmina de imunistoquímica com PHF-1 na concha superior (marcação da proteína tau)	52
Figura 7	Imagem de lâmina de imunistoquímica com 10D5 na concha superior (marcação da proteína β -amiloide)	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Métodos imunohistoquímicos utilizados no estudo	35
Tabela 2	Áreas imunocoradas e respectivos anticorpos	35
Tabela 3	Critério neuropatológicos para diagnóstico da doença de Alzheimer	38
Tabela 4	Estatística descritiva das variáveis: gênero, raça, idade, escolaridade e das classificações clínicas e neuropatológicas de demência (IQCODE, CDR, CERAD, Braak e Braak)	48
Tabela 5	Sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP) e valor preditivo negativo (VPN), em valores percentuais, para os marcadores 10D5 e PHF-1 por local, para o diagnóstico de demência por meio das classificações CDR, CERAD, Braak e Braak e IQCODE	49
Tabela 6	Porcentagem de acometimentos para os marcadores 10D5 e PHF-1 nos tecidos de pacientes agrupados de acordo com o diagnóstico clínico	51
Tabela 7	Porcentagem de acometimento conforme os marcadores 10D5 e PHF-1 dos tecidos de pacientes agrupados de acordo com o diagnóstico patológico	51

RESUMO

Godoy MDCL. Acometimento do epitélio olfatório pela Doença de Alzheimer: um estudo de correlação clínico-patológica [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2015.

A doença de Alzheimer (DA) é caracterizada por declínio cognitivo e funcional progressivo e constitui-se como a forma mais prevalente de demência. O diagnóstico da DA é realizado atualmente, exclusivamente por meio de critérios clínicos. No entanto, a manifestação clínica da DA é precedida por um longo período assintomático, com depósito silencioso das proteínas tau e β -amiloide no tecido cerebral. Evidências recentes demonstram que a mucosa olfatória, estrutura periférica e facilmente acessível também está acometida na DA, podendo representar um bom método de diagnóstico preciso e precoce desta moléstia. Os objetivos desse estudo consistem em correlacionar a prevalência das proteínas tau e β -amiloide no epitélio olfatório (EO) com os estágios clínicos e neuropatológicos da doença e determinar a sensibilidade e especificidade dos achados no EO para o diagnóstico da DA em seus diferentes estágios de evolução. Para tal fim, é proposto estudo *post-mortem*, com avaliação de 92 tecidos cerebrais de indivíduos com idade igual ou superior a 50 anos, provenientes do Banco de Encéfalos Humanos do Grupo de Estudos em Envelhecimento Cerebral da Universidade de São Paulo, com coleta dos blocos de mucosa olfatória no momento da autópsia. A avaliação cognitiva foi realizada por meio de entrevista com informante de convívio próximo com o falecido, aplicando as escalas CDR e IQCODE. A avaliação neuropatológica do encéfalo e do EO foi realizada por meio de técnicas de imunistoquímica. Os casos foram classificados mediante critério neuropatológico do CERAD e do estadiamento de Braak e Braak para DA. A presença de proteína tau e β -amiloide no EO foi correlacionada com os parâmetros clínicos e neuropatológicos obtidos. A análise imunistoquímica do EO da concha superior permitiu identificar as proteínas tau e β -amiloide com sensibilidade alta, quando comparada com o diagnóstico neuropatológico (>80%) e clínico (>90%). Desta forma, a análise imunistoquímica para as proteínas tau e β -amiloide do epitélio olfatório pode representar um possível biomarcador para diagnóstico da DA.

Palavras-chave: 1.Doença de Alzheimer 2.Envelhecimento 3.Imunistoquímica 4.Mucosa olfatória 5.Olfato 6.Transtornos do Olfato

ABSTRACT

Godoy MDCL. Olfactory epithelium involvement in Alzheimer's disease: a clinicalpathological study [thesis]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2015.

Alzheimer's disease (AD) is characterized by a progressive functional and cognitive decline and is considered the most prevalent type of dementia. AD is diagnosed exclusively on the basis of clinical criteria. However, clinical symptoms of AD are preceded by a long asymptomatic period, with silent deposition of tau and amyloid proteins in brain tissue. Recent studies demonstrate the same findings in the olfactory epithelium, a readily accessible structure which could contribute to the precise and early diagnosis of AD. The objectives of the current study were to correlate the prevalence of tau and amyloid proteins distributed in several areas of the olfactory epithelium with clinical and neuropathological criteria used for the diagnosis of AD and to determine the sensitivity and specificity of the olfactory epithelium involvement for the diagnosis of AD. Ninety-two individuals, belonging to the Brazilian Brain Bank of the Aging Brain Study Group from University of São Paulo, whose blocks of olfactory mucosa were collected during autopsy, were tested. Cognitive data were gathered through an interview with a knowledgeable informant, using the CDR (Clinical Dementia Rating Scale) and the IQCODE (Informant Questionnaire on Cognitive Decline in the Elderly) scales. Neuropathological examination was carried out on the basis of accepted criteria, using immunohistochemistry. Neuropathological classification of AD was performed in accordance with the CERAD criteria and Braak & Braak staging. The presence of tau and amyloid protein deposits in the olfactory epithelium was compared with clinical and neuropathological parameters. Immunostaining of olfactory epithelium from the superior turbinate was able to identify tau protein and amyloid- β with high sensitivity when compared with neuropathological scales (>80%) and clinical classification of CDR (>90%). Thus, immunohistochemistry for tau and amyloid proteins of the olfactory epithelium may represent a potential biomarker for early diagnosis of AD.

Descriptors: 1.Alzheimer Disease 2.Aging 3.Immunohistochemistry 4.Olfactory Mucosa 5.Olfaction 6.Olfaction Disorders

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, por causa da queda das taxas de natalidade e mortalidade, a humanidade enfrenta o processo de envelhecimento populacional. Este fenômeno ocorreu inicialmente em países desenvolvidos e mais recentemente, de maneira mais acelerada, em países em desenvolvimento. (Veras et al., 1987)

No Brasil, a taxa de expectativa de vida, que no ano de 1950 era de 43,2 anos, crescerá para aproximadamente 81,3 anos em 2050 (IBGE, 2010). Ao comparar o crescimento das diferentes faixas da população, em um intervalo de 25 anos, pôde-se verificar um crescimento de 126,3% dos idosos, enquanto o aumento da população total foi de 55,3%. Assim, observa-se um crescimento mais acelerado da população idosa em relação aos demais grupos etários (Camarano, 1999; Nasri, 2008). Caso essa progressão se mantenha, a partir de 2030 o total de idosos ultrapassará o de jovens entre 15 e 29 anos (Camarano, 2010), com inúmeras consequências sociais, econômicas e previdenciárias.

Associada ao aumento da expectativa de vida ocorre elevação considerável da prevalência de doenças crônicas relacionadas com o envelhecimento, entre elas as doenças neurodegenerativas (Kalache et al., 1987).

A demência é definida como ocorrência de declínio cognitivo em múltiplos domínios, envolvendo necessariamente prejuízo da memória. Este declínio deve ser suficiente para causar dano ao desempenho social ou ocupacional (Duyckaerts, Dickson, 2011).

Entre as síndromes demenciais, a mais prevalente universalmente é a doença de Alzheimer (DA). De acordo com *World Alzheimer Report* de 2014 (Prince et al., 2014), a demência representa um custo de 604 bilhões de dólares em todo o mundo. Em 2010, estimou-se que em todo o planeta havia 35,6 milhões de pessoas que viviam com DA e outras demências. A projeção para 2030 é de 65,7 milhões e para 2050 de 115,4 milhões.

A DA é clinicamente caracterizada por perda lenta e progressiva da memória e outras funções cognitivas. Histopatologicamente se distingue pela presença de placas neuríticas (PN), compostos extracelulares que contém proteína β -amiloide (Figura 1A), e de emaranhados neurofibrilares (ENF), compostos intracelulares, constituídos predominantemente de proteína tau (Figura 1B) (Duyckaerts, Dickson, 2011).

A DA é prevalente, progressiva e incapacitante, com elevado impacto físico e psicológico para o indivíduo que dela padece e para seus familiares (Herrera et al., 2002). As modalidades terapêuticas farmacológicas e não farmacológicas para a DA são limitadas, porém apresentam maior eficácia sobre a evolução da doença quando administradas em fases iniciais. Por esta razão, é fundamental que o portador de DA receba o diagnóstico de maneira precisa e precoce.

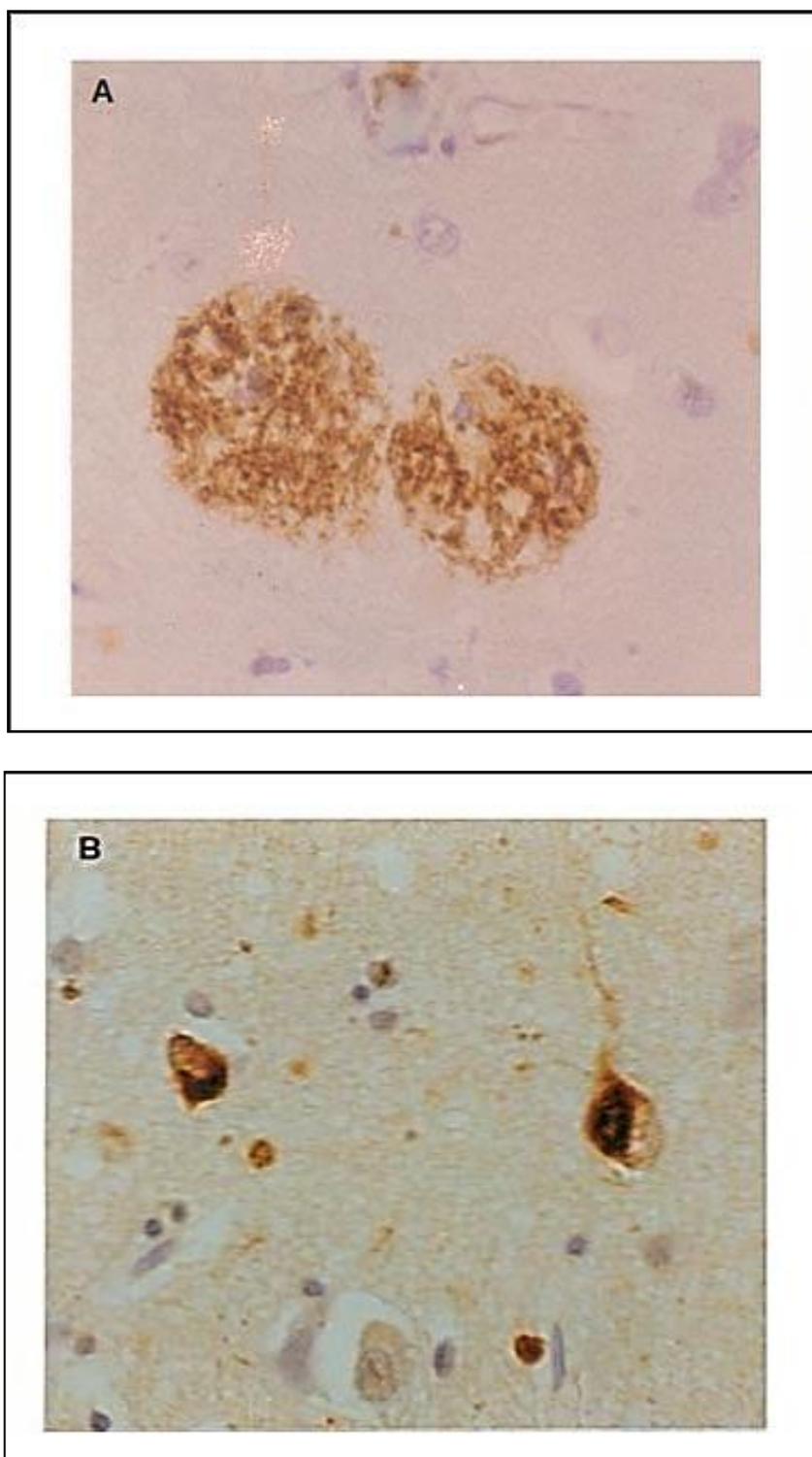


Figura 1: Exemplos de: (A) placas neuríticas, compostos de proteína β -amiloide, corada por 10D5, vista por microscopia de campo claro (aumento de 400x); (B) emaranhados neurofibrilares, compostos de proteína tau, corada do PHF-1, vista por microscopia de campo claro (aumento de 400x). Fonte: Grupo de Estudos em Envelhecimento Cerebral, FMUSP.

Atualmente, o diagnóstico da DA é realizado exclusivamente por meio de critérios clínicos, postulados pelo *National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke* (NINCDS) em conjunto com o *Alzheimer's Disease and Related Disorders Association* (ADRDA; McKhann et al., 1984), modificados por McKhann et al., em 2011. Destarte, o diagnóstico de DA é feito em duas etapas: na primeira é dado o diagnóstico da síndrome demencial (Anexo A); e, depois o diagnóstico da DA que pode ser classificada como: possível, provável ou definida (Anexo B).

Essa modalidade de análise traz consigo limitações graves e pode gerar um diagnóstico impreciso e tardio, uma vez que os protocolos clínicos utilizados para DA têm-se mostrado discrepantes, quando confrontados com o diagnóstico anatomopatológico (Klatka et al., 1996; Lim et al., 1999).

Um diagnóstico essencialmente clínico da DA pode ocasionar deficiência na sensibilidade e especificidade. A queda na sensibilidade é observada ao excluir os verdadeiros portadores de DA que apresentam manifestações atípicas e não atendem aos critérios clínicos atualmente aceitos. São vários os relatos na literatura de portadores de lesões cerebrais disseminadas da DA, que iniciaram sua manifestação clínica com sintomas comportamentais, alterações de linguagem ou até manifestações motoras complexas, sem apresentarem distúrbios precoces de memória (Jagust et al., 1990; Levine et al., 1993).

A perda de especificidade acontece no diagnóstico equivocado da DA em indivíduos portadores de outras doenças. Por exemplo, pacientes com demência

vascular ou demência por corpúsculo de Lewy (DCL) podem preencher os critérios clínicos (McKhann et al., 1984; McKeith, 2006).

Estudos recentes sobre correlação clinicopatológica têm mostrado a existência de indivíduos livres de demência, que apresentam PN e ENF com concentração e distribuição semelhantes aos indivíduos portadores de demência, e preenchem os critérios neuropatológicos propostos para a DA. Estes indivíduos são denominados portadores de DA, em estágio pré-clínico ou pré-sintomático (Schmitt et al., 2000). Atualmente, há evidências de que os achados neuropatológicos de DA precedem, em muitos anos, os sintomas cognitivos (Morris, 2005; Jack Jr et al., 2010; Sperling et al., 2011) (Figura 2). O uso exclusivo de critérios clínicos não permite o diagnóstico da doença na fase pré-sintomática, de modo que anos de intervenção potencial precoce sejam perdidos quanto à evolução da doença.

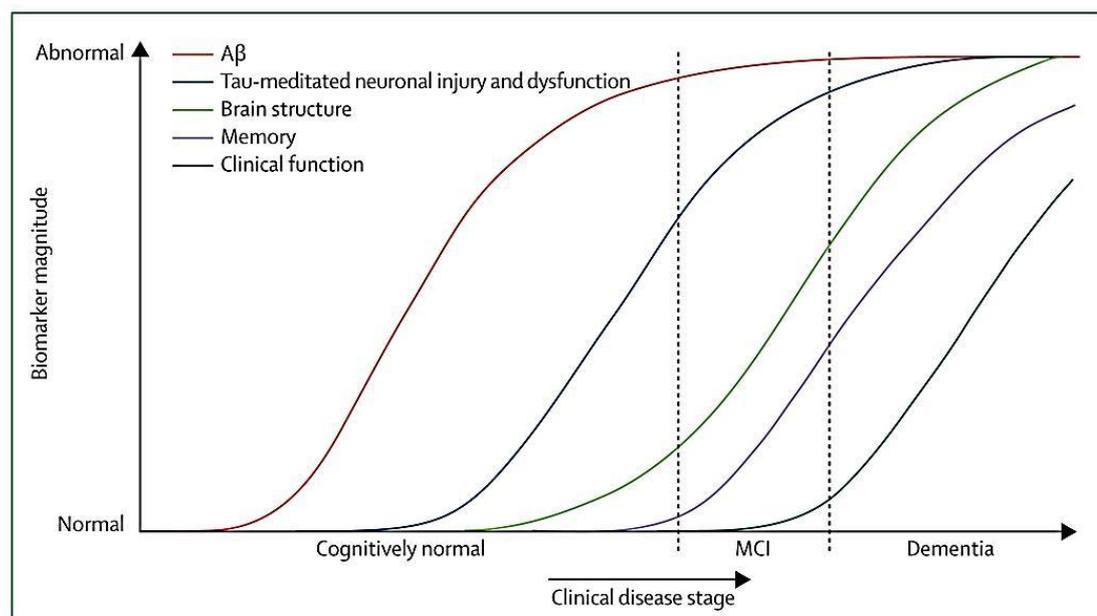


Figura 2: Dinâmica dos biomarcadores na cascata patológica da DA. Fonte: Jack Jr et al. (2010).

Ao buscar ferramentas para aprimorar o diagnóstico da DA, vários pesquisadores têm concentrado seus esforços na busca de biomarcadores capazes de diagnosticar a doença, ainda em fases anteriores ao surgimento da demência, com taxas altas de sensibilidade e especificidade. Em 2010, na *International Conference of Alzheimer's Disease (ICAD)*, um consórcio de pesquisadores designado pelo *National Institute of Health* e pela *Alzheimer's Association* dos Estados Unidos da América propôs a criação de critérios novos para o diagnóstico da DA, ao associar parâmetros clínicos de comprometimento cognitivo precoce e biomarcadores. Entre os mesmos destacam-se: métodos de imagem como a Ressonância Nuclear Magnética (RNM) com medida de volume do hipocampo, a Tomografia por Emissão de Pósitrons com traçadores específicos e métodos laboratoriais como a dosagem de proteína tau e A β 42 no liquor. Estes métodos já haviam sido propostos por Dubois et al., em 2007, como instrumentos auxiliares potenciais no diagnóstico da DA.

Apesar de apresentarem correlação apropriada aos achados neuropatológicos típicos da DA, em indivíduos portadores de demência, a sensibilidade e a especificidade destes biomarcadores é significativamente reduzida em indivíduos em estágios pré-sintomáticos ou naqueles que apresentam comprometimento cognitivo leve (CCL), como referiu Petersen et al., em 1999, e que foi modificado por Albert et al., em 2011, nos quais os sintomas cognitivos estão presentes, mas não são suficientes para que se possa definir a demência (Anexo C). Além disso, os biomarcadores mais citados na literatura são métodos caros e de difícil acesso para toda a população idosa suscetível à DA, principalmente nos países em desenvolvimento nos quais os recursos para a saúde são escassos e a DA tende a se tornar mais prevalente do que em países desenvolvidos.

Novos critérios foram propostos por grupos de autores de quatro artigos publicados em 2011 (Albert et al., 2011; Jack Jr et al., 2011; McKhann et al., 2011; Sperling et al., 2011), porém ainda não estão validados para aplicação clínica, apenas para fins de pesquisa. (Anexos B, C e D)

Estudos recentes têm demonstrado a presença de PN e ENF, dois achados neuropatológicos principais e típicos da DA, no bulbo e trato olfatórios (Jellinger, Atems, 2005; Fujishiro et al., 2008). Estas estruturas não são contempladas quer pelo critério do CERAD (*Consortium do Establish a Registry for Alzheimer's Disease*, 1991, apud Mirra et al., 1991), quer pelo estadiamento de Braak e Braak (1991), que são, atualmente, os dois métodos mais utilizados para o diagnóstico anatomopatológico da DA. No entanto, há correlação positiva entre a prevalência destes achados no bulbo olfatório e a distribuição e gravidade das lesões descritas em outras regiões do encéfalo, analisadas conforme o critério do CERAD e o estadiamento de Braak e Braak. Alguns estudiosos mostraram que o comprometimento do bulbo olfatório ocorre em fases precoces da evolução neuropatológica da DA (Kovács et al., 2001; Tsuboi et al., 2003; Jellinger et al., 2005).

Os primeiros relatos de disfunção olfatória em pacientes com DA datam da década de 70 (Waldton, 1974). Estudos posteriores confirmaram essas observações iniciais (Doty et al., 1984; Albers et al., 2006). Além disso, foi observado que a disfunção olfatória pode preceder o desenvolvimento dos sintomas clínicos e auxiliar no diagnóstico diferencial de doenças com características clínicas semelhantes (Doty, 2003). Os autores descrevem que essa sequência temporal, associada à natureza não invasiva e de custo baixo, faz da avaliação olfatória uma candidata excelente como

biomarcador para a detecção precoce da DA, inclusive em indivíduos assintomáticos. Mais estudos em humanos são necessários para caracterizar a sequência temporal dos défices funcionais, o que facilitará o desenvolvimento de testes olfatórios mais sensíveis e específicos.

A base da perda olfatória na DA é pouco compreendida, mas, em parte, pode ser explicada porque as regiões cerebrais correspondentes ao córtex olfatório primário são áreas cerebrais com concentração mais alta de ENF e PN na DA. (Bailey, Johnson, 2010)

Em estudo *post-mortem*, realizado em 59 indivíduos, incluído no Projeto Envelhecimento Cerebral da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP), foi demonstrada prevalência elevada de ENF no bulbo olfatório de indivíduos idosos, em níveis extremamente precoces da evolução neuropatológica da DA (Santos et al., 2010). É possível perceber que ENF estão presentes no bulbo olfatório a partir do estágio II de Braak e Braak, quando a doença neuropatológica ainda é inicial e restrita às áreas entorrinais e hipocampais. Além disso, este mesmo estudo permitiu demonstrar que a presença de ENF no bulbo olfatório de indivíduos idosos ocorreu em fases sintomáticas de demência, mas também em fases assintomáticas com prevalência elevada.

Em estudo recente, Arnold et al. (2010) demonstraram que a presença de PN e ENF não se restringia às estruturas neurais do bulbo olfatório. Tais achados também poderiam ser encontrados no próprio epitélio olfatório (EO), em 74% dos indivíduos portadores de DA. Neste estudo, no entanto, os autores não investigaram

correlações do acometimento do EO com parâmetros clínicos utilizados no diagnóstico da DA, nem determinaram qual a melhor área do EO a ser analisada.

O estudo de Arnold et al. (2010) lança luz sobre a possibilidade de utilização do EO como instrumento de diagnóstico precoce e preciso da DA. A mucosa olfatória é uma estrutura acessível por meio de procedimentos pouco invasivos e de custo reduzido, e quando acometida pode constituir evidência direta da presença de lesões da DA, ao contrário dos outros biomarcadores como métodos de imagem ou laboratoriais, que apenas produzem evidências indiretas da doença.

Questões fundamentais acerca da presença das proteínas tau e β -amiloide no EO, no entanto, ainda não foram respondidas, entre elas: qual a correlação clinicopatológica; qual a relação destes achados com os critérios de diagnóstico aceitos atualmente para a DA e em que estágio de evolução da doença clínica e neuropatológica estes achados são mais prevalentes; e, qual a sensibilidade e especificidade destes marcadores.

2 OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

Correlacionar a prevalência das proteínas tau e β -amiloide no epitélio olfatório com os parâmetros clínicos e neuropatológicos aceitos para o diagnóstico da doença de Alzheimer.

Fornecer dados sobre a sensibilidade e especificidade da presença das proteínas tau e β -amiloide no epitélio olfatório como ferramenta diagnóstica na doença de Alzheimer.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Importância da doença de Alzheimer

Ballard et al. (2011) fizeram uma revisão sobre as evidências novas na epidemiologia, patogênese, diagnóstico e tratamento da DA, além de discutirem possíveis formas de reduzir a chance de desenvolver a doença. Destacam que se estima haver 24 milhões de indivíduos portadores de demência em todo o mundo, a maioria decorrente da DA. Destarte, os autores enfatizam que a DA é um problema de saúde pública e deve ser tratada como prioridade nas pesquisas científicas.

3.2 Hiposmia na doença de Alzheimer

Surpreendentemente, a maioria dos pacientes com DA não tem conhecimento de seu déficit olfativo, antes da aplicação de um teste olfatório.

Doty (2003) percebeu que há evidências de que a hiposmia pode preceder os sintomas clássicos de DA vários anos antes, e isto reflete o denominado período pré-clínico. De acordo com Doty a disfunção olfatória pode ser encontrada em indivíduos em risco para a DA, incluindo seus familiares, e em indivíduos com CCL, que eventualmente irão desenvolver a DA.

Peters et al. (2003) avaliaram a função olfatória em 14 pacientes com DA, oito com CCL e oito saudáveis, mediante comparação por meio de testes psicofísicos e potenciais olfatórios evocados. Os resultados confirmam achados pregressos de disfunção olfatória em pacientes com DA e DA pré-clínica. Os autores sugerem que a

alteração olfatória não é apenas decorrente da alteração da memória e de categorização semântica. Os défices olfativos são acompanhados por diminuição da resposta eletrofisiológica secundária ao estímulo olfatório, provavelmente associada à alteração neuropatológica específica, em regiões mediais do lobo temporal incluindo o córtex olfatório primário.

Seiberling e Conley (2004) afirmam que na DA o défice cognitivo não é responsável pela alteração na identificação do olfato. Dessa forma, ainda não se sabe o quanto o défice de memória pode prejudicar a identificação de odores.

Doty (2008, 2009) observou alteração considerável na capacidade para detectar, lembrar e reconhecer odores em pessoas idosas, além de ser uma característica fundamental em várias doenças neurodegenerativas e síndromes demenciais, incluindo a DA. Tal défice está presente de 85% a 90% dos pacientes em fase inicial e está associada à diminuição da ativação das estruturas centrais de processamento do olfato (observada em RNM funcional). Além disso, foi relatado défice olfatório em indivíduos cognitivamente saudáveis, portadores do alelo e4 da apolipoproteína E (APOE-e4), o fator de risco genético principal para a DA.

Sohrabi et al. (2012) examinaram a capacidade de a disfunção olfatória permitir prever o declínio cognitivo em uma amostra da população. Os pesquisadores selecionaram um grupo de 308 indivíduos, entre 46 e 86 anos, que foram acompanhados durante três anos, e então divididos quanto à presença de alterações cognitivas mediante testes neuropsicológicos. A função olfatória avaliada por meio do teste Sniffin' Sticks indicou que, ao contrário das evidências prévias, a discriminação olfatória, mas não a identificação, permite prever o declínio cognitivo subsequente. Os resultados alcançados pelos autores confirmam estudos prévios que reportam associação entre

cognição e olfato, e indicam que a perda da capacidade de discriminação olfatória pode permitir prever o declínio da função cognitiva. Em razão dos achados, os autores sugerem a avaliação olfatória para a triagem em indivíduos com risco alto de demência.

3.3 Acometimento do sistema nervoso central e do bulbo olfatório na doença de Alzheimer

Attems e Jellinger (2006) realizaram um estudo *post-mortem* com 130 indivíduos com idade superior a 60 anos, nos quais foi feita avaliação neuropatológica com imunoistoquímica do encéfalo, bulbo e trato olfatório. Todos os indivíduos portadores de DA definida (estágios Braak 5 e 6; n=40) apresentaram grande quantidade de ENF e neuritos distróficos no sistema olfatório, com depósito de β -amiloide em 32,5% do sistema olfatório. Os casos Braak 4 (n=27) apresentaram ENF em 85,2% do sistema olfatório e PN em 1,1%. Todos os casos com estágios Braak 0 e 1 foram negativos. Os autores concluem que o escore de ENF no sistema olfatório evidenciou grande correlação com estágio de Braak no encéfalo, enquanto ambos os escores apresentaram significativa, porém baixa correlação com a idade. Esses resultados confirmam estudos anteriores, que demonstraram ENF abundantes no sistema olfatório em casos definidos de DA e em quase um terço dos idosos sem demência com estágio Braak 2. Igualmente, os autores encontraram correlação importante entre os escores de ENF no sistema olfatório e no encéfalo.

3.4 Diagnóstico clínico da doença de Alzheimer

Areza-Fegyveres e Nitrini (2011) descrevem que o diagnóstico da DA se baseia em critérios de NINCDS-ADRDA, adaptados à realidade brasileira (McKhann, 1984). Na prática, o diagnóstico ambulatorial da DA é realizado mediante a reunião de um conjunto de informações sobre a história clínica, exame clínico geral e neurológico, exames de sangue e de neuroimagem. Os autores citam que assim é determinando um diagnóstico de DA possível ou provável e que para o diagnóstico de certeza é necessário o exame anatomopatológico.

Takada e Nitrini (2011) complementam Areza-Fegyveres e Nitrini (2011) de que, a partir dos critérios do NINCS-ADRDA, o diagnóstico da DA permite que a doença seja classificada como: provável, possível ou definida. O diagnóstico da DA definida baseia-se em evidências histopatológicas e o da DA provável em quadro demencial de início insidioso e progressivo, contanto que não haja outras doenças cerebrais ou sistêmicas que possam justificar os défices cognitivos. Os autores definem um declínio cognitivo como DA possível, quando há variações no início, apresentação ou curso clínico da doença, ou ainda, quando existe uma doença sistêmica ou cerebral, suficiente para produzir demência, porém não considerada a causa da disfunção cognitiva.

Ittner e Götz (2011) descrevem novos achados sobre a associação entre a proteína tau e a proteína β -amiloide na patogênese da DA. Os autores destacam que as duas proteínas são as evidências patológicas características da DA, e que na época do estudo foram ressaltadas possíveis interações e efeitos sinérgicos na neuropatologia da doença.

Budson e Solomon (2012) resumem quatro artigos publicados em 2011 pelo periódico *Alzheimers Dement* (Albert et al., 2011; Jack Jr et al., 2011; McKhann et al., 2011; Sperling et al., 2011), que descrevem critérios novos para identificação da DA e CCL. Esses critérios também incluem o termo DA pré-clínica, mas apenas para fins de pesquisa. A nova classificação enfatiza que o processo fisiopatológico da DA se inicia anos ou talvez décadas antes do início dos sintomas clínicos, e que os biomarcadores podem detectar o depósito de β -amiloide e os efeitos da neuro-degeneração no cérebro. Esses critérios são recomendações fundamentadas em consensos e, como citam os autores, é necessária uma validação futura.

3.5 Diagnóstico anatomopatológico da doença de Alzheimer

Braak e Braak (1991) publicaram um estadiamento anatomopatológico sobre o depósito de proteína tau na DA sobre a forma de ENF. Os autores sugerem que este depósito ocorre de forma sequencial, acometendo inicialmente o córtex hipocampal e parahipocampal, progredindo para a amígdala, córtex associativo e, em seguida, para o córtex primário.

Em 1991, o *Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease* (CERAD; apud Mirra et al., 1991) também desenvolveu um protocolo neuropatológico para avaliação *post-mortem* de indivíduos com demência e indivíduos controle. Este protocolo fornece termos neuropatológicos como DA definida, DA provável, DA possível e cérebro normal, de acordo com a frequência de acúmulo de PN, compostos de proteína β -amiloide, para indicar níveis de certeza diagnóstica e reduzir interpretações subjetivas.

Grinberg (2011) descreve a neuropatologia das demências e ressalta que, apesar dos critérios neuropatológicos serem considerados “padrão-ouro” no diagnóstico definitivo dessas doenças, a maioria se baseia na combinação entre o quadro clínico e os achados neuropatológicos. A autora descreve que a DA é caracterizada por alterações histológicas típicas, porém não específicas da doença. As principais estão relacionadas com depósitos de duas proteínas: β -amiloide, que ocorre em forma de placas neuríticas; e, a proteína tau, que se acumula em depósitos intracitoplasmáticos denominados emaranhados neurofibrilares.

3.6 Biomarcadores no diagnóstico da doença de Alzheimer

De acordo com o *The Ronald and Nancy Reagan Research Institute of the Alzheimer's Association and the National Institute of Aging Working Group* (1998), o marcador biológico ideal deve permitir detectar uma característica fundamental da fisiopatologia envolvida na doença DA, que difere dessa doença e de outras condições, com valores preditivos positivos e negativos aceitáveis. Ademais, deve ser confiável, não invasivo, de baixo custo e de execução simples.

Frey et al. (2005) definem que um marcador biológico é um parâmetro, mensurado quantitativamente e serve para indicar “saúde” ou “doença”. Este marcador pode identificar a existência ou ausência de uma dada doença ou confirmar o risco de um indivíduo desenvolvê-la.

Takada e Nitrini (2011) consideram que, inicialmente o diagnóstico da DA baseava-se, antes de tudo, em determinadas características clínicas e exclusão de outras possíveis causas para os sintomas, e que cada vez mais se tenta encontrar adjuvantes

marcadores biológicos que confirmem a doença ou, ao menos, aumentem a possibilidade de um diagnóstico correto. No entanto, os autores concluem que, por causa da ausência de biomarcadores que definam com certeza o diagnóstico da DA sem um estudo anatomopatológico, o diagnóstico da doença ainda se baseia em probabilidades.

Areza-Fegyveres e Nitrini (2011) descrevem vários biomarcadores propostos para o diagnóstico da DA (RNM, PET, SPECT, LCR), porém reforçam que muitos estudos ainda são necessários para caracterizar, com maior precisão, a zona de transição entre o envelhecimento saudável e as primeiras manifestações da doença. Os autores sugerem que a possibilidade de combinar os fatores de risco de várias modalidades (genéticos, alterações no LCR, testes neuropsicológicos e estudos de neuroimagem) poderá maximizar os fatores de risco individuais e predizer quais serão os indivíduos que poderão desenvolver a doença.

3.7 Avaliação cognitiva

Folstein et al. (1975) descrevem um mini-exame do estado mental (MEEM). Trata-se de uma escala amplamente utilizada, por ser um teste breve, de rastreio cognitivo e de aplicação simples e prática.

Hughes et al. (1982) descrevem o Escore Clínico de Demência (*Clinical Dementia Rating Scale* - CDR) para avaliação cognitiva. É uma escala que avalia o nível de comprometimento cognitivo do indivíduo em graus que variam entre a normalidade (sem comprometimento cognitivo) e o comprometimento cognitivo grave.

Burke et al. (1988) avaliaram a confiabilidade do CDR da Universidade de Washington, um instrumento concebido com o propósito de analisar a história natural da DA. Os autores mostram ser o CDR confiável sob as condições por eles estudadas.

Jorm e Jacomb, em 1989, referem sobre o *Informant Questionnaire on Cognitive Decline in the Elderly* (IQCODE), um questionário preparado a partir de dados obtidos de um informante sobre as mudanças na função cognitiva cotidiana de uma pessoa idosa. Em 1991, os autores compararam o IQCODE com o MEEM. O IQCODE mostrou ser confiável, quando as informações eram fornecidas por pessoas que convivem com o paciente com DA, mesmo quando existe algum nível de comprometimento cognitivo.

Ravid et al. (1992) descrevem algumas precauções para a seleção adequada e armazenagem de tecidos humanos na caracterização de um Banco de Encéfalos Humanos. Estado agônico e acidose cerebral afetam a estabilidade de compostos do cérebro, e algumas estruturas cerebrais são irreversivelmente danificadas dentro de minutos após a morte. Os autores sugerem a mensuração do pH do LCR como um indicador do estado agonal como critério de controle, a fim de evitar amostragens inadequadas no Banco de Encéfalos.

Bustamante et al. (2003) investigaram se a combinação de uma escala de avaliação funcional com um teste cognitivo poderia melhorar a precisão do diagnóstico de demência. Os autores concluíram que a combinação de um teste cognitivo com escalas funcionais, pode melhorar a detecção de casos leves ou moderados de demência, mesmo em amostras de população heterogênea como a brasileira, em relação ao nível socioeconômico e educacional.

3.8 Banco de Encéfalos Humanos do Grupo de Estudos em Envelhecimento Cerebral

Grinberg et al. (2007) descrevem os métodos utilizados e os primeiros resultados obtidos no Banco de Encéfalos Humanos do Grupo de Estudo em Envelhecimento Cerebral da FMUSP (BEHGEEC-FMUSP). O BEHGEEC foi criado em setembro de 2003 e é composto por especialistas de diferentes áreas da FMUSP. Este Banco tem como objetivo coletar uma quantidade considerável de cérebros de idosos dementados e não dementados, inclusive com um amplo espectro de patologias relacionadas aos processos de envelhecimento do cérebro. Além disso, busca fornecer material de qualidade para uma rede de pesquisas multidisciplinares para desvendar vários aspectos do envelhecimento cerebral e doenças neurodegenerativas relacionadas.

3.9 Caracterização, análise histológica e distribuição do epitélio olfatório

Lanza et al. (1993) avaliaram o epitélio olfatório como marcador precoce do desenvolvimento da DA e da doença de Parkinson a partir de biópsias *in vivo* sob anestesia tópica. Os autores analisaram 37 fragmentos por microscopia óptica/eletrônica e 13 fragmentos por imunistoquímica com anticorpo monoclonal contra moléculas de adesão de neurônios (N-CAM). A taxa de sucesso de detecção na mucosa olfatória em biópsias por via endoscópica é de uma biópsia a cada 1,4 contra uma em cada quatro, descritas em literatura prévia para biópsias feitas sem uso de endoscópios.

Féron et al. (1998) avaliaram a distribuição do epitélio olfatório por meio de biópsias em 33 pacientes, durante a realização de septoplastias e turbinectomia, em seis pontos estabelecidos na concha superior (CS), septo nasal e concha média. A

identificação da mucosa olfatória foi feita por microscopia eletrônica e imunohistoquímica. Os autores constataram que a região posterior do septo nasal e a concha superior apresentam probabilidades maiores, 30% a 70%, de encontrar a mucosa olfatória por meio de biópsia, dependendo de sua localização, embora, a mucosa olfatória também tenha sido encontrada em áreas mais anteriores do septo e na concha média.

Leopold et al. (2000) observaram uma distribuição mais anterior do epitélio olfatório, presente não só na concha superior, septo e placa cribiforme, como também na concha média. Foram realizadas biópsias em áreas positivas com eletroolfatograma (EOG) e imunohistoquímica com *olfactory marker protein* (OMP), isto é, a proteína marcadora olfatória. A EOG sugere a presença de neuroepitélio olfatório na concha média (CM) e a avaliação das biópsias com OMP foi positiva para epitélio olfatório. Dessa forma, a distribuição do epitélio na cavidade nasal foi revista e indicada uma localização mais anterior ao que era suposto antes.

Lee et al. (2000) avaliaram o epitélio olfatório em 15 indivíduos com anosmia e em seis pacientes controles sem anosmia, após cirurgia endoscópica funcional dos seios paranasais. Foram retirados fragmentos de mucosa olfatória do septo e da concha superior. Nas análises histológicas foram usadas hematoxilina-eosina (HE) e imunohistoquímica para proteína-5, associada ao microtúbulo (MAP - 5). Nos pacientes controles, o índice de identificação do epitélio olfatório foi de 61%, ao passo que, entre os com anosmia, a taxa de sucesso caiu para 27%. Essa diferença pode ser atribuída à irregularidade na distribuição do epitélio olfatório na mucosa nasal e à metaplasia do epitélio olfatório em epitélio respiratório, fenômeno comum no processo de envelhecimento.

Kern, em 2000, avaliou alterações histológicas na mucosa olfatória de 30 pacientes com rinossinusite crônica, a partir de fragmentos de mucosa retirados do septo nasal no momento da sinusectomia endoscópica. Nas amostras foi aplicada coloração com hematoxilina-eosina (HE) e, em alguns casos, a imunistoquímica com OMP. O autor descreve critérios para a diferenciação adequada entre mucosa olfatória e a mucosa respiratória por meio da HE, que incluem a presença de feixes nervosos na lâmina própria, ausência de células caliciformes, presença de epitélio pseudoestratificado, membrana basal fina, distribuição irregular dos cílios e predomínio celular na lâmina própria.

Kim et al. (2003) estudaram o epitélio olfatório a partir da dissecação de 10 cadáveres adultos, com retirada da concha média e da concha superior. A coloração com HE foi utilizada nas amostras e identificados feixes nervosos provenientes da mucosa olfatória com orientação para a placa cribiforme. Os autores consideram a coloração com HE um método suficiente para identificação de feixes nervosos.

Seiberling e Conley, em 2004, realizaram uma revisão sobre a função do olfato e o envelhecimento. Os autores observaram que a análise histológica do epitélio olfatório nos pacientes portadores de DA mostra desorganização epitelial, com degeneração neuronal, perda dos cílios nas proximidades dos botões olfatórios e poucas fibras axonais.

Escada et al. (2009), em revisão da literatura, referem sobre o conhecimento da composição e distribuição do epitélio olfatório na cavidade nasal e suas aplicações, inclusive como marcador precoce para doenças neurodegenerativas e como fonte de células-tronco.

3.10 Coleta do epitélio olfatório e acometimento da doença de Alzheimer

Nakashima et al. (1984) estudaram a distribuição do epitélio olfatório e respiratório em fetos e adultos mediante retirada em bloco de toda a placa cribiforme, concha superior e concha média. Os autores observaram que, nos fetos, o epitélio olfatório estende-se de forma contínua da região da placa cribiforme até a concha superior. Entretanto, nos adultos, no decorrer dos anos, essa distribuição torna-se heterogênea com substituição gradativa do epitélio olfatório por epitélio respiratório.

Paik et al. (1992) removeram toda a área olfatória em bloco de 12 cadáveres para estudar a distribuição do epitélio olfatório. Nos indivíduos com menos de 60 anos, o epitélio olfatório foi encontrado em 61% das amostras, e nos de acima de 60 anos, em 33% das amostras. Os autores referem que, concordando com estudos prévios, ocorre uma substituição progressiva do epitélio olfatório por epitélio respiratório em função da idade.

Arnold et al. (2010) analisaram a expressão de β -amiloide, proteína tau, alfa-sinucleína e TDP-43 em 187 peças de epitélio olfatório coletados em bloco ao longo de 20 anos durante as autópsias. Foram analisados 79 indivíduos portadores de DA, 63 de outras doenças neurodegenerativas e 45 normais do ponto de vista neuropatológico. Os autores encontraram β -amiloide no EO em 71% dos casos de DA, 22% em casos normais e 14% em indivíduos portadores de outras doenças. A proteína tau foi encontrada em 55% dos casos de DA, 34% em indivíduos normais e 39% em indivíduos com doenças neurodegenerativas. Os autores concluem que as alterações patológicas no epitélio olfatório são encontradas na maioria dos casos de DA, com correlação com as alterações patológicas no cérebro. Arnold et al. referem que mais pesquisas são necessárias para avaliar a utilização do epitélio olfatório como biomarcador da DA.

Pinna et al. (2013) descrevem a distribuição do epitélio olfatório na CS e CM em cadáveres quando é feita a retirada integral dessas estruturas e posterior análise histológica por coloração com HE e imunistoquímica. Nas lâminas coradas com HE, a distribuição do epitélio olfatório foi classificada em uma escala de cinco graus, de 0 a 4, e a análise foi realizada por três patologistas de forma cega. Na CS, o epitélio olfatório esteve presente em 82,9% das amostras e, na CM 17,1%. No processo de imunistoquímica, a positividade só foi obtida com a proteína S-100, em um total de 15 fragmentos. De acordo com o cálculo da razão de prevalência, a chance de encontrar epitélio olfatório é 4,9 vezes maior na CS do que na CM (IC95%: 3,3; 7,4). Os autores concluem, portanto, que, ao biopsiar o epitélio olfatório, deve-se buscar alcançar a porção posterior da fossa nasal, pois esta apresenta concentração maior de epitélio olfatório.

4 CASUÍSTICA E MÉTODOS

4 CASUÍSTICA E MÉTODOS

Para a realização do presente estudo, foi obtida a aprovação da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa – CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (Protocolo de Pesquisa nº - 177/11, 12 de maio de 2011; Apêndice 1).

4.1 Casuística

Foram selecionados 92 indivíduos, com idade ≥ 50 anos, incluídos no Banco de Encéfalos Humanos do Grupo de Estudo em Envelhecimento da FMUSP, com coleta dos blocos de mucosa olfatória no momento da autópsia.

4.2 Critérios de inclusão

Foram considerados critérios de inclusão:

- Indivíduos com idade ≥ 50 anos;
- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Apêndice 2) assinado por pessoa de convívio próximo;
- Preenchimento do protocolo clínico com informações relacionadas à história pregressa, antecedentes pessoais, cognição e funcionalidade do indivíduo, obtidas de maneira completa com familiar de convívio próximo com o indivíduo estudado.

4.3 Critérios de exclusão

Os critérios de exclusão compreenderam:

- Indivíduos com lesões cerebrais macroscópicas detectáveis: acidente vascular encefálico de origem isquêmica ou hemorrágica, traumatismo craniano; meningite ou tumores, porque, nestas situações, é necessário fazer um exame cerebral imediato para o preenchimento do atestado de óbito;
- Indivíduos portadores de comorbidades que possam, potencialmente, prejudicar a homeostase cerebral, no período anterior ao óbito. Este critério inclui aqueles portadores de doenças crônicas em fase avançada, como insuficiência cardíaca congestiva severa ou insuficiência renal com uremia;
- Inexistência do cuidador primário ou familiar responsável, em condições para fornecer informações adequadas e confiáveis relacionadas à história pregressa, antecedentes pessoais e funcionalidade do indivíduo. Discrepâncias evidentes das informações contidas em dois instrumentos ou escalas;
- Indivíduos com indicação de acidose cerebral causada por estado agonal severo (pH do líquido cefalorraquidiano LCR <6,5) que pode interferir nas propriedades bioquímicas e moleculares do cérebro (Ravid et al., 1992);
- Indivíduos com pólipos nasais, secreção purulenta ou outra condição que indique doença nasossinusal.

4.4 Diagnóstico clínico

No momento da chegada dos familiares ao Serviço de Verificação de Óbitos da Capital (SVOC), um informante de convívio frequente com o falecido, ou seja, mais que uma vez por semana, foi eleito para fornecer os dados clínicos, mediante aplicação de um protocolo estruturado de entrevista para o diagnóstico clínico. (Anexo E)

Em todos os casos, antes da aplicação da entrevista, o informante conheceu o estudo e foi estimulado a ler o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e, ao concordar, assinar o mesmo.

A entrevista foi conduzida por uma equipe extensamente treinada de gerontólogos, para a aplicação das escalas utilizadas. Durante a entrevista, o examinador julgou se as informações fornecidas eram suficientes para classificar o indivíduo, assim como a sua confiabilidade.

Os informantes foram entrevistados em salas privativas e as informações obtidas foram mantidas em caráter sigiloso. Sempre que possível, mais que uma pessoa foi entrevistada para a confirmação dos dados.

Por meio de entrevista estruturada, foram coletados dados demográficos como idade, gênero, grau de escolaridade, etnia, além daqueles referentes à história pregressa de saúde do paciente, hábitos e vícios, história detalhada de possível antecedente de tabagismo e etilismo, bem como seus antecedentes familiares e pessoais, enfocando o período anterior à morte.

As avaliações cognitivas foram feitas mediante aplicação de escalas específicas e previamente validadas. De modo a garantir maior sensibilidade e especificidade no diagnóstico de cada domínio, sempre que possível, os instrumentos foram combinados.

4.5 Avaliação cognitiva

Para a avaliação cognitiva foi usada a escala IQCODE – *Informant Questionnaire on Cognitive Decline in the Elderly* - versão retrospectiva (Jorm, Jacomb, 1989) (Anexo E). Esta escala avalia as alterações cognitivas apresentadas pelo indivíduo ao longo de dez anos, em comparação com o período de três meses anteriores ao óbito. Trata-se de uma escala amplamente utilizada em pesquisas que permitem avaliar alterações cognitivas, por demência ou *delirium*. Em estudos de validação, com sensibilidade e especificidade altas, foi mostrada a comparação do IQCODE com o MEEM (Jorm et al., 1991; Bustamante et al., 2003). O IQCODE é um instrumento apropriado para ser aplicado ao informante e, por tal motivo, se alinha perfeitamente com o desenho da presente pesquisa. Foi utilizada a versão completa com 26 itens.

O MEEM (Folstein et al., 1975), um teste de rastreio cognitivo conciso, embora seja uma escala amplamente utilizada, tem sua utilidade impossibilitada no presente estudo porque exige respostas objetivas que não poderiam ser fornecidas pelos informantes.

O CDR têm se tornado o “padrão-ouro” para a avaliação global de pacientes portadores de demência tipo Alzheimer, mas também está indicado para a avaliação de outros tipos de demência (Morris, 1993). Permite aferir seis domínios: memória, orientação, julgamento e resolução de problemas, assuntos comunitários, casa e hobbies, autocuidado. Desse modo, a escala cobre a intersecção entre a funcionalidade e os aspectos cognitivos.

O CDR permite que se classifique a atividade cognitiva em cinco níveis:

- CDR 0 – Normal;
- CDR 0,5 – Questionável;
- CDR 1 – Demência leve;
- CDR 2 – Demência moderada; e,
- CDR 3 – Demência avançada.

A escala, descrita nos questionários do Anexo E conta com uma entrevista semiestruturada que foi aplicada antes do preenchimento dos itens, de modo a conferir ao investigador subsídios para o estadiamento correto do indivíduo nos diferentes níveis CDR (Burke et al., 1988).

O CDR, embora não seja uma escala originalmente desenvolvida para empregar apenas para o informante e sim para ambos - informante e paciente, seus autores foram consultados e concordaram a respeito dessa forma de aplicação.

É importante apontar que a dependência funcional na escala CDR é decorrente dos défices cognitivos. Por isso, a dependência relacionada com as alterações funcionais de etiologia não cognitiva não foi pontuada na presente análise.

Tanto o IQCODE quanto o CDR pontuam a cognição, mas diferem entre si quanto à temporalidade dos défices. O IQCODE pontua o declínio longitudinal, enquanto o CDR a perda cognitiva no momento da aplicação.

O método de pesquisa clínica do BEHGEEC de avaliação cognitiva retrospectiva por informantes foi validado (Ferretti et al., 2010) e utilizado em estudos prévios (Farfel et al., 2013; Suemoto et al., 2011). A literatura mostra que a associação de instrumentos para a avaliação da cognição eleva a sensibilidade e a especificidade do diagnóstico clínico da cognição (Bustamante et al., 2003).

O diagnóstico final foi estabelecido após análise conjunta por gerontologistas e neurologistas. O diagnóstico de demência foi considerado para aqueles com IQCODE $\geq 3,4$ e CDR ≥ 1 (Bustamante et al., 2003; Jorm, 2004; Nunes, 2007).

4.6 Diagnóstico neuropatológico

O exame neuropatológico *post-mortem*, em cérebros humanos no BEHGEEC, foi realizado acordo com os critérios e recomendações aceitas internacionalmente (Grinberg et al., 2007). A autópsia foi realizada em intervalo menor que 20 horas do óbito. Após a remoção da calota craniana, o encéfalo foi dividido em hemisférios direito e esquerdo. O hemisfério esquerdo foi fixado em paraformaldeído a 10%, por 14 a 21 dias, e, então, seccionado para representação das áreas seguintes:

- giros frontais médio e inferior;
- giros temporais médio e anterior;
- giros parietais superior e inferior;

- área visual – lobo occipital;
- giro do cíngulo anterior;
- hipocampo no nível dos corpos mamilares (córtex entorrinal);
- amígdala;
- gânglios da base incluindo o núcleo basal de Meynert;
- tálamo;
- mesencéfalo com substância negra;
- ponte;
- bulbo; e,
- cerebelo.

Amostras destas regiões foram fixadas em parafina, laminadas com espessura de 6 μ m e coradas com HE.

As secções selecionadas foram imunocoradas com anticorpos específicos contra β -amiloide (10D5, 1:10.000, Elan Pharmaceuticals) e contra proteína tau (PHF-1, diluição 1:1.000, Peter Davies), de acordo com as Tabelas 1 e 2. Sempre que necessário para um diagnóstico apropriado, amostras de outras regiões foram representadas e receberam tratamento imunohistoquímico. O diagnóstico neuropatológico foi realizado por neuropatologista experiente, cego a todos os dados clínicos obtidos.

Tabela 1. Métodos imunistoquímicos utilizados no presente estudo

Proteína	Anticorpo	Diluição	Sistema de detecção	Cromógeno
Amiloide (Signet)	10D5	1:10.000	Avidina-biotina	DAB
Tau (Peter Davies)	PHF-1	1:1.000	Avidina-biotina	DAB

10D5 = anticorpos específicos contra β -amiloide; PHF-1 = anticorpos contra proteína tau; DAB = Diaminobenzidina 3,3'

Tabela 2. Áreas imunocoradas e respectivos anticorpos

Área	Anticorpo	
	10D5	PHF-1
Giro frontal superior e médio		
Giro frontal anterior e médio		
Giro parietal superior e inferior		
Córtex visual		
Giro do cíngulo anterior		
Hipocampo		
Amígdala		
Gânglios da base		
Mesencéfalo		
Ponte		
Bulbo		
Cerebelo		

10D5 = anticorpos específicos contra β -amiloide; PHF-1 = anticorpos contra proteína tau

4.7 Caracterização das placas de amiloide

Dois tipos de placas foram identificados e contados: placas difusas (PD), definidas como depósitos de substância amiloide que não contêm neuritos distróficos tau positivos, na imunistoquímica para β -amiloide; placas neuríticas (PN), definidas

como depósitos amiloides que contêm neuritos distróficos, vistos em ambas as colorações anti-amiloide e anti-tau. Foram consideradas como placas neuríticas o subtipo denominado placas core, que apresentaram material agrofílico compacto central e depósitos de neuropilos vistos na coloração para amiloide (Price, Morris, 1999). A quantidade de placas foi caracterizada por critério semiquantitativo proposto pelo CERAD (Mirra et al., 1991), Figura 3. O CERAD leva em consideração apenas a contagem de placas neuríticas distribuídas por várias das regiões do córtex cerebral e classifica-as em quatro estágios:

- CERAD 0 - ausência de placas neuríticas no córtex cerebral;
- CERAD A - leve (1-5 placas neuríticas por campo; aumento 100x);
- CERAD B - moderada (6-15 placas neuríticas por campo; aumento 100x);
- e,
- CERAD C - frequente (>15 placas neuríticas por campo; aumento 100x).

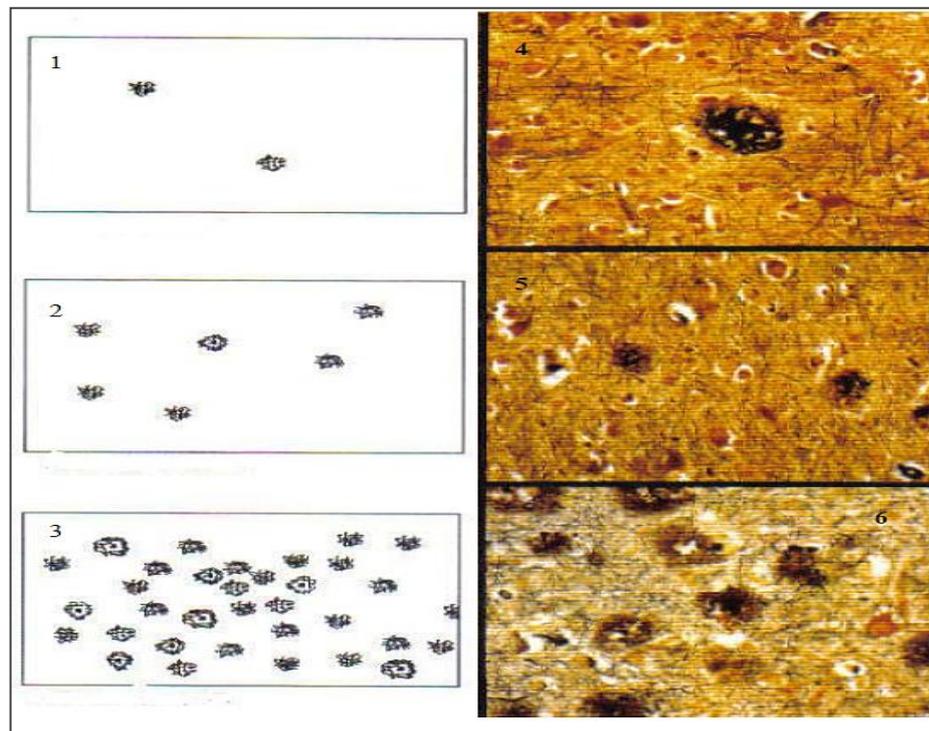


Figura 3. Método semiquantitativo de classificação empregado pelo (1) CERAD A, (2) CERAD B, (3) CERAD C. Fonte: Mirra et al. (1991)

4.8 Caracterização dos emaranhados neurofibrilares

Os ENF foram identificados por imunistoquímica anti-tau como massas em forma de chama ou globóide de fibrilas intracelulares. A distribuição dos achados foi classificada segundo os critérios propostos por Braak e Braak (1991), em seis estágios diferentes:

Estágio I - representa quantidade reduzida de ENF confinados no córtex transentorrinal;

Estágio II - moderado ou maior quantidade de ENF no córtex transentorrinal e poucos no hipocampo;

Estágio III - ENF frequentes no córtex transentorrinal e entorrinal e moderado no hipocampo;

Estágio IV - acometimento severo do hipocampo e discreto no isocórtex;

Estágio V - ENF frequentes no isocórtex;

Estágio VI – presença de ENF no córtex sensorial primário ou em neurônios piramidais da fásia dentata no hipocampo.

Neste estudo, os indivíduos foram classificados como positivos para DA por meio de critérios neuropatológicos baseados nas normas do *The Nancy and Ronald Reagan Research Institute* (1998), ao associar o CERAD e o estadiamento de Braak e Braak (Tabela 3).

Tabela 3: Critérios neuropatológicos para o diagnóstico da doença de Alzheimer

Critérios			Diagnóstico
Braak e Braak	CERAD	<i>The Nancy and Ronald Regan Inst.</i>	
0	0	sem DA	sem DA
I-II	A	baixa probabilidade de DA	sem DA
III-IV	B	moderada probabilidade de DA	com DA
V-VI	C	alta probabilidade de DA	com DA

DA = doença de Alzheimer;

OBS: Em casos conflitantes (ex.: Braak e Braak III-IV, CERAD A) foi adotado o critério menos grave (no exemplo, baixa probabilidade de DA).

4.9 Coleta, processamento e imunohistoquímica do epitélio olfatório

Na autópsia, foram retiradas em bloco as porções correspondentes ao epitélio olfatório seguintes: conchas médias, conchas superiores e placa cribiforme juntamente com a porção superior do septo nasal (Figuras 4 e 5). Esse bloco foi posteriormente separado nas áreas descritas acima, individualizadas em cassetes. A fixação foi realizada em formol a 10%, tamponado neutro, por um período que variou de 10 a 30 dias.



Figura 4: Corte transversal da cavidade nasal em área correspondente ao epitélio olfatório. Fonte: Wolf-Heidegger (2006)

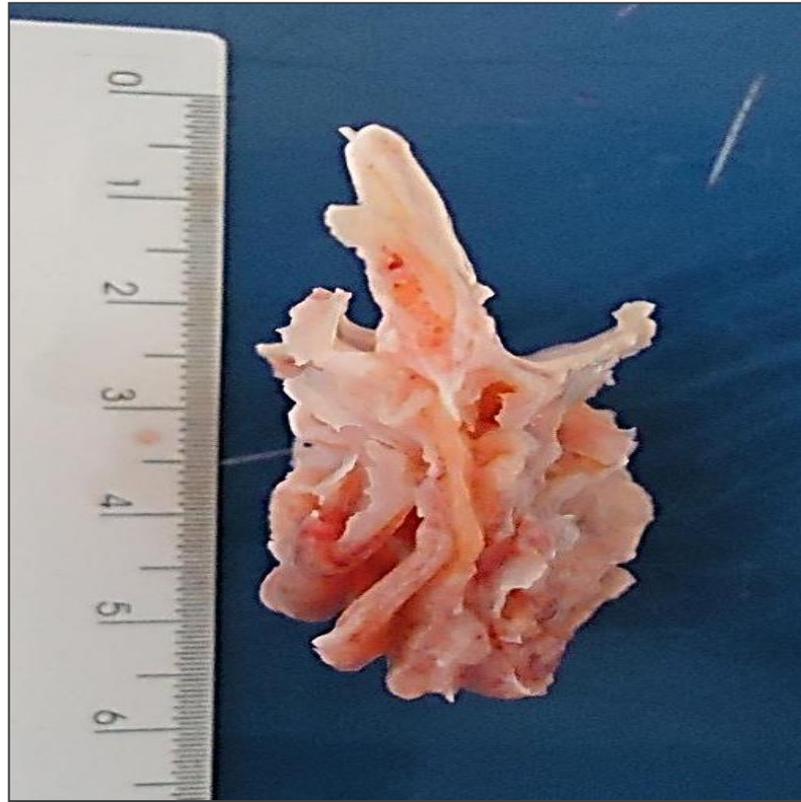


Figura 5: Tecido olfatório retirado em bloco.

Os tecidos foram descalcificados com utilização de EDTA (ácido etilendiamino tetra-acético), desidratados e embebidos em parafina. O período de descalcificação variou de 15 a 45 dias, de acordo com a estrutura e quantidade de tecido ósseo presente na peça. Em algumas peças foi necessário retirar cuidadosamente o excesso de tecido ósseo presente, especialmente em áreas como a *crista galli*, espesso esporão ósseo presente na maioria das amostras. Foi feito um teste simples para verificar a descalcificação adequada do tecido, inserindo uma agulha hipodérmica 25mm x 0,70mm (22 G 1" Pol) no tecido.

Cortes de cada área do epitélio olfatório com 6 μ m de espessura foram montados em lâminas para coloração e imunoistoquímica, seguindo os métodos citados acima, aplicados para as regiões corticais.

Antes de realizar a imunoistoquímica, foi necessário determinar a concentração adequada dos anticorpos para os cortes do epitélio olfatório. Foram realizados testes em três concentrações distintas, tendo como base a concentração utilizada nos cortes do encéfalo, uma acima para PHF-1 (1:500) e outra abaixo para 10D5 (1:15.000). Após este teste, constatou-se que a melhor concentração era a mesma utilizada para o tecido cerebral, para os dois anticorpos do estudo (10D5 e PHF-1).

Outro cuidado tomado antes de iniciar a imunoistoquímica foi realizar testes no tecido com controle positivo e negativo. No controle negativo são realizadas todas as etapas da imunoistoquímica, porém não é colocado o anticorpo. Foi observado que o controle negativo era realmente negativo, isto é, não houve marcação na lâmina na qual o anticorpo não havia sido colocado.

Após a validação da técnica da imunoistoquímica para o epitélio olfatório, as reações foram realizadas o mais próximas possível uma das outras, com um intervalo de tempo mínimo entre elas. Todas as lâminas de uma determinada parte do tecido foram imunocoradas ao mesmo tempo, utilizando sempre um fragmento de tecido cerebral sabidamente positivo para o anticorpo testado como controle positivo. Este controle foi utilizado para determinar o tempo que o cromógeno DAB deve permanecer em contato com a lâmina nesta etapa da imunoistoquímica.

O princípio da imunistoquímica envolve a utilização de um anticorpo específico contra a proteína estudada, cuja interação é identificada por um marcador. É composta por várias etapas sequenciais e bem determinadas executadas em dois dias consecutivos, para a interpretação correta das marcações. O processo tem início com a identificação das lâminas, desparafinização com xilol aquecido e hidratação do tecido com álcool em diferentes concentrações. Para o bloqueio da peroxidase endógena foi utilizado peróxido de hidrogênio em câmara escura, com três banhos consecutivos de 10 minutos cada. A recuperação antigênica foi realizada de duas formas sequenciais: a digestão proteolítica e o calor, com utilização do ácido fórmico e citrato aquecido em panela a vapor, respectivamente.

A fim de melhorar o resultado das marcações, foi realizado o bloqueio das reações inespecíficas com solução aquosa de leite em pó desnatado a 5%, antes da incubação do anticorpo primário. A etapa seguinte consistiu na incubação dos anticorpos primários, os quais foram utilizados específicos contra β -amiloide (10D5, 1:10.000, Elan Pharmaceuticals) e contra proteína tau (PHF-1, diluição 1:1.000, Peter Davies). As amostras foram mantidas em refrigerador a 4°C durante a noite, por um período de 10 a 12 horas.

No dia seguinte, as lâminas foram incubadas com o anticorpo secundário específico para o anticorpo primário (no caso de PHF-1 e 10D5, foi utilizado o anticorpo anti-mouse) e mantidas em câmara úmida a 37°C por 1 hora. Em seguida, foram incubadas com o anticorpo terciário adequado (complexo ABC para o PHF-1 e complex ABC Elite para o 10D5) e novamente colocadas em câmara úmida a 37°C na qual permaneceram por 1 hora.

A próxima etapa é da incubação das lâminas com o cromógeno DAB. Neste momento, foi realizada a validação da imunistoquímica com a amostra controle, com auxílio de microscópio ajustado na objetiva para o aumento 10x e verificada a ocorrência das marcações. Em caso de não marcação, a amostra retorna para o banho com leite, para reiniciar o processo de incubação do anticorpo primário e as etapas seguintes. Em caso positivo o processo de incubação com o DAB continua a ser feito com o restante das lâminas.

Finalmente realiza-se a contracoloração com HE, desidratação e diafanização dos tecidos para montagem das lâminas.

4.10 Microscopia e quantificação das proteínas tau e β -amiloide no epitélio olfatório

A fim de quantificar a presença das proteínas tau e β -amiloide no epitélio olfatório, foi realizada uma análise completa de cada lâmina. Assim, todos os campos das lâminas foram avaliados para contabilizar todas as áreas de epitélio olfatório. Após esta análise foi calculada a proporção entre as áreas de epitélio acometidas e a área total deste mesmo epitélio, e o resultado obtido em valor porcentual. Foi obedecida uma padronização, ao utilizar o mesmo microscópio (Zeiss Primo Star - Germany) em todas as análises, sempre com aumento, nesta etapa, de 200x, com leitura de toda a lâmina.

Os cortes foram marcados por técnicos treinados, mascarados para o diagnóstico e todas as demais informações sobre cada caso. As avaliações foram realizadas pelo mesmo pesquisador e validadas por pesquisadores principais.

Foi realizada uma comparação entre a expressão de proteína tau e β -amiloide nas regiões de epitélio olfatório (placa cribiforme e septo nasal, concha média e concha superior) e os critérios clínicos (CDR, IQCODE) e neuropatológicos (CERAD, Braak e Braak).

4.11 Análise estatística

Inicialmente efetuou-se a análise descritiva das variáveis demográficas do estudo, com estimativas das medidas de tendência central e de dispersão. Para comparação de proporções foi utilizado o Teste Exato de Fisher.

Foram calculados a sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo da positividade para os marcadores testados utilizando como referência as classificações clínicas (indivíduos sem demência: CDR=0 e IQCODE<3,4; com demência: CDR \geq 1 e IQCODE \geq 3,4) e as neuropatológicas conforme normas do *The Nancy and Ronald Regan Institute* (1998).

Após verificação de normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk, os resultados foram comparados por meio do teste não paramétrico Mann-Whitney, teste não paramétrico de Kruskal-Wallis ou teste T de Student, conforme o caso.

As variáveis quantitativas – classificação de Braak e Braak e a quantidade de lâminas positivas para 10D5 e PHF-1 - foram testadas por meio do teste não paramétrico de correlação de Spearman.

O nível de significância empregado foi de 5%.

4.11.1 Organização do banco de dados e *softwares* utilizados

Os dados foram inseridos no Excel e analisados no programa estatístico STATA versão 10.0 (StataCorp LP, College Station, Texas, USA).

5 RESULTADOS

5 RESULTADOS

Trata-se de um estudo exploratório, sem cálculo do tamanho da amostra, no qual foi coletada a maior quantidade de casos possível no período de um ano (em 2011). O processamento do material, a realização das imunistoquímicas e as análises microscópicas foram concretizados nos anos subsequentes (2012-2014).

Por ser necessária a entrevista clínica e consequente liberação do cérebro para a análise anatomopatológica dos casos com epitélio olfatório coletado, uma minoria desses casos foi incluída no estudo. Dessa forma, dos mais de 1.400 tecidos de epitélio olfatório coletados, apenas 92 foram incluídos no presente estudo.

5.1 População do estudo

As características da população estudada estão descritas na Tabela 4. Houve uma prevalência maior de indivíduos do gênero feminino (57,6%) e da raça branca (63%). A média de idade foi 70,6 anos (desvio padrão: 12,4) e de escolaridade 4,8 anos (desvio padrão: 4). Os tecidos de dez indivíduos (27,8%) apresentavam placas neuríticas frequentes no córtex cerebral e foram classificados em estágio acima de IV, segundo Braak e Braak. A classificação Braak e Braak (1991) dos indivíduos mostrou correlação importante com a idade ($r:0,77$; $p<0,001$), ao contrário da escolaridade ($r:-0,19$; $p=0,28$). Também o gênero não se associou com essa última classificação ($p=0,24$).

Tabela 4: Estatística descritiva das variáveis: gênero, raça, idade, escolaridade e das classificações clínicas e neuropatológicas de demência (IQCODE, CDR, CERAD, Braak e Braak).

Variáveis	N	Porcentagem (%)	Média	Desvio Padrão
Gênero				
Masculino	39	43,4		
Feminino	53	57,6		
Raça				
Branca	58	63		
Preta	33	35,9		
Amarela	1	1,1		
Idade (anos)			70,6	12,4
Escolaridade (anos)			4,8	4
IQCODE	92		3,3	0,7
CDR				
0	75	81,5		
0,5	2	2,2		
1	1	1,1		
3	14	15,2		
CERAD*				
0	17	47,2		
A	4	11,1		
B	5	13,9		
C	10	27,8		
Braak e Braak **				
0 (Sem ENF)	10	29,4		
Estágio I	3	8,8		
Estágio II	7	20,6		
Estágio III	4	11,8		
Estágio IV	2	5,9		
Estágio V	2	5,9		
Estágio VI	6	17,6		

N = quantidade de indivíduos analisados; IQCODE = *Informant Questionnaire on Cognitive Decline in the Elderly*; CDR = *Escore Clínico de Demência*; CERAD = *Consortium do Establish a Registry for Alzheimer's Disease*; Dados ignorados: * 56; ** 58; ENF = emaranhados neurofibrilares

5.2 Sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo dos marcadores 10D5 e PHF-1 no epitélio olfatório

A Tabela 5 mostra a sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e negativo dos marcadores 10D5 e PHF-1 na concha média, concha superior e septo dos indivíduos para o diagnóstico de demência, segundo cada uma das classificações utilizadas, clínica (CDR, IQCODE) e patológicas (CERAD, Braak e Braak).

Tabela 5: Sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP) e valor preditivo negativo (VPN), em valores percentuais para os marcadores 10D5 e PHF-1 por local analisado, para o diagnóstico de demência por meio das classificações clínicas (CDR, IQCODE) e patológicas (CERAD, Braak e Braak).

Local, marcador/ classificação	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)	VPP (%)	VPN (%)
Concha Média, 10D5				
Diagnóstico clínico	69,2	34,8	16,7	85,7
Diagnóstico patológico	90	40,9	40,9	90
Concha Superior, 10D5				
Diagnóstico clínico	91,7	21,1	19,6	92,3
Diagnóstico patológico	77,8	10,5	29,2	50
Septo Nasal, 10D5				
Diagnóstico clínico	58,3	38,3	15,9	82,1
Diagnóstico patológico	70	28,6	31,8	66,7
Concha Média, PHF-1				
Diagnóstico clínico	38,5	70,5	19,2	86,2
Diagnóstico patológico	60	72,7	50	80
Concha Superior, PHF-1				
Diagnóstico clínico	90,9	40,4	22,7	95,8
Diagnóstico patológico	77,8	38,9	38,9	77,8
Septo Nasal, PHF-1				
Diagnóstico clínico	20	54,8	6,7	80,9
Diagnóstico patológico	44,4	65	36,4	72,2

% = por cento; 10D5 = anticorpos específicos contra β -amiloide; PHF-1 = anticorpos contra proteína tau

Na classificação clínica, o marcador 10D5 na concha média mostrou ser sensível (69,2%), mas pouco específico (34,8%); na concha superior houve um aumento importante da sensibilidade (91,7%) e a diminuição da especificidade (21,1%), com VPN elevado (92,3%); por fim, no septo nasal, a sensibilidade (58,3%) e a especificidade (38,3%) foram baixas. Já o marcador PHF-1 apresentou uma grande sensibilidade (90,9%) e VPN (95,8%) quando usado nas amostras da concha superior.

Quando os pacientes foram classificados neuropatologicamente, os marcadores 10D5 nas conchas média e superior (90% e 77,8%, respectivamente) e PHF-1 na concha superior (77,8%) foram os mais sensíveis para diagnosticar a doença de Alzheimer.

5.3 Comparação da quantidade de marcações de acordo com o diagnóstico

Ao ordenar os indivíduos de acordo com os diagnósticos clínicos, houve uma tendência de aumento da quantidade de marcações com a piora do quadro clínico para o marcador 10D5 quando a amostra era da concha média, e para o PHF-1 nas conchas média e superior. Contudo, nenhum aumento dessa quantidade de marcações foi estatisticamente significativo (Tabela 6).

Tabela 6: Porcentagem de acometimentos para os marcadores 10D5 e PHF-1 nos tecidos de pacientes agrupados de acordo com o diagnóstico clínico.

Diagnós- tíco clínico	10D5 (Q±DP)%			PHF-1 (Q±DP)%		
	CM	CS	SP	CM	CS	SP
Sim	45,4 ± 43,9	57,8 ± 36,2	17,1 ± 17,8	11 ± 15,3	39,5 ± 27,8	4 ± 8,4
Não	30,6 ± 34,3	64,6 ± 40,8	34,5 ± 36	9,1 ± 18,3	26,9 ± 31,8	17,3 ± 23,5
p*	0,18	0,59	0,11	0,73	0,22	0,08

10D5 = anticorpos específicos contra β -amiloide; PHF-1 = anticorpos contra proteína tau; Q = quantidade de marcações; DP = desvio padrão; CM= concha média, CS= concha superior, SP= septo nasal; * Teste T de Student

5.4 Comparação da quantidade de marcações por região do epitélio olfatório

A Tabela 7 mostra uma tendência de aumento da quantidade de marcações com 10D5 na concha média e septo nasal, e com PHF-1 somente na concha média. Também de acordo com o diagnóstico realizado por meio da análise anatomopatológica do encéfalo, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas.

Tabela 7: Porcentagem de acometimento conforme os marcadores 10D5 e PHF-1 nos tecidos de pacientes agrupados de acordo com o diagnóstico patológico.

Diagnós- tíco patológico	10D5 (Q±DP)%			PHF-1 (Q±DP)%		
	CM	CS	SP	CM	CS	SP
Sim	37,3 ± 35,6	56,7 ± 44,2	45 ± 37,2	14 ± 15,1	18,8 ± 19,5	13,2 ± 17,9
Não	33,5 ± 38,7	77,4 ± 35,1	26,2 ± 30,1	9,5 ± 18,4	31,4 ± 36,1	14,5 ± 22,3
p*	0,8	0,19	0,18	0,5	0,34	0,87

10D5 = anticorpos específicos contra β -amiloide; PHF-1 = anticorpos contra proteína tau; Q = quantidade de marcações; DP = desvio padrão; CM= concha média, CS= concha superior, SP= septo nasal; * Teste T de Student

As Figuras 6 e 7 mostram as imagens de lâminas de imunohistoquímica com os marcadores PHF-1 e 10D5 em tecido da concha superior.

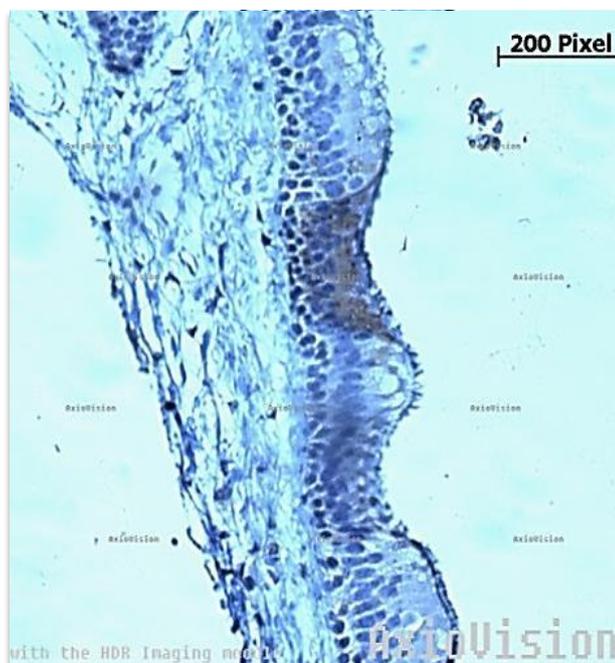


Figura 6: Imagem de lâminas de imunohistoquímica com o marcador PHF-1 na concha superior (marcação da proteína tau)

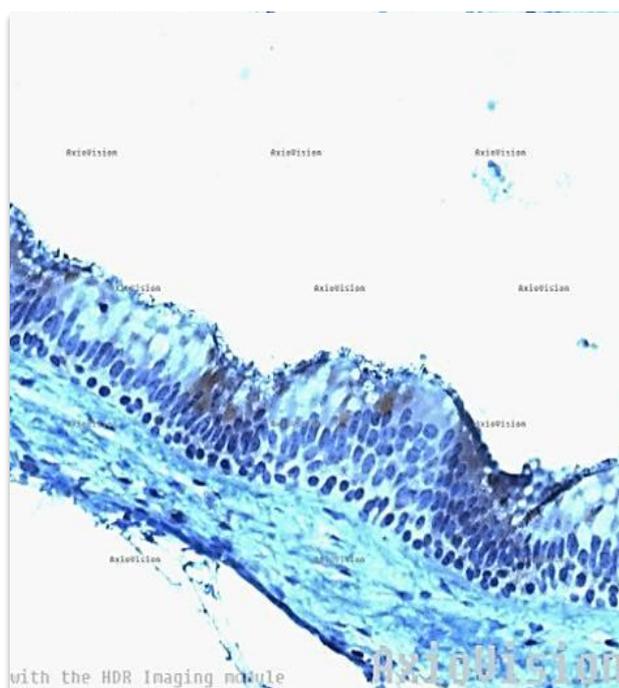


Figura 7: Imagem de lâmina de imunohistoquímica com o marcador 10D5 na concha superior (marcação da proteína β -amiloide)

6 DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

Este é um trabalho pioneiro que permite relacionar e preencher algumas lacunas existentes na literatura, entre os achados anatomopatológicos da DA no encéfalo e a mucosa olfatória por meio de parâmetros clínicos e patológicos. A análise do epitélio olfatório da concha superior permitiu identificar as proteínas tau e β -amiloide com sensibilidade alta em relação ao diagnóstico neuropatológico (>78%) e clínico (>90%), com VPN alto para o diagnóstico clínico (>92%), porém com especificidade baixa (<40%).

A manifestação neuropatológica das proteínas tau e β -amiloide no epitélio olfatório em idosos, com e sem doenças neurodegenerativas, já foi previamente descrita por Smutzer et al., em 2003, mas a frequência, extensão e especificidade da doença nestas lesões foram melhor estabelecidas mais tarde por Arnold et al., em 2010. Foi observado que as proteínas tau e β -amiloide são significativamente mais frequentes e mais abundantes em sujeitos com DA do que em indivíduos normais ou indivíduos com outras doenças neurodegenerativas.

O melhor local na cavidade nasal, para observar a presença dessas proteínas, entretanto, ainda permanecia desconhecido. Na presente pesquisa, pôde-se observar que a concha superior apresenta maior sensibilidade para que se possa encontrar as proteínas tau e β -amiloide. Essa determinação é importante, principalmente porque a característica do epitélio olfatório em adultos mostra uma dispersão nas diversas áreas de epitélio respiratório. Além disso, a quantidade de neurônios sensoriais

diminui ao longo da vida, e apresenta queda acentuada após os 65 anos (Doty et al., 1991).

O VPN elevado para o diagnóstico clínico encontrado em todas as amostras estudadas sugere que, na ausência das proteínas tau e beta-amiloide na mucosa olfatória, a chance de apresentar a doença de Alzheimer é baixa, e outro diagnóstico deve ser considerado suspeito.

6.1 Coleta e processamento do epitélio olfatório

A coleta do epitélio olfatório foi realizada conforme descrito previamente por Arnold et al., em 2010, com a retirada em bloco do septo nasal ósseo e placa cribiforme adjacente. No presente estudo, também foram retiradas as conchas médias e superiores no momento da autópsia. Essas áreas foram posteriormente separadas, em blocos isolados, para possibilitar a análise no material com os instrumentos disponíveis.

O processo de descalcificação foi feito de forma semelhante ao descrito por Arnold, também com uma adequação: o componente ósseo mais espesso com dificuldade para descalcificar, foi retirado de forma manual.

6.2 Imunoistoquímica no epitélio olfatório

O procedimento de imunoistoquímica foi realizado conforme a técnica aplicada ao tecido cerebral descrita por Grinberg et al., em 2007. Nessa etapa, foram

realizados testes para determinar a concentração adequada de anticorpos para o tecido olfatório.

Não foi encontrada na literatura descrição sobre imunistoquímica específica para o epitélio olfatório com os anticorpos já utilizados no BEHGEEC em análise neuropatológica. Dessa forma, foram realizados os testes necessários para determinar as concentrações ideais de anticorpos para o tecido estudado. Apenas após a realização desses testes, inclusive para controles positivo e negativo, foi iniciada a sequência de imunistoquímica nas amostras.

6.3 Caracterização do epitélio olfatório

Na caracterização e identificação do epitélio olfatório nas diversas áreas estudadas, foram utilizados os critérios descritos por Kern (2000). Esses critérios foram inicialmente desenvolvidos para material corado com HE. Entretanto, por ter sido possível fazer uma correspondência das estruturas visualizadas com auxílio da HE com aquelas encontradas na imunistoquímica, foi feita uma extrapolação desses critérios nas amostras estudadas.

Ao serem encontradas áreas mais finas de epitélio, com membrana basal delgada, numerosos feixes nervosos na submucosa e com cílios irregulares na superfície apical, as mesmas foram consideradas como epitélio olfatório.

6.4 Determinação da melhor área anatômica nasal para análise do epitélio olfatório

Conforme o descrito, em 2010, por Arnold et al., detectou-se a presença das proteínas tau e β -amiloide no epitélio olfatório. Adicionalmente, pode-se demonstrar que a melhor estrutura nasal para a análise deste epitélio foi o da concha superior, com sensibilidade alta (>90%) e valor preditivo negativo alto (>90%) em relação ao diagnóstico clínico, para os dois marcadores utilizados.

Esses dados estão de acordo com estudos anteriores encontrados na literatura, como os descritos por Pinna et al., em 2013, nos quais os autores concluíram que a área nasal com concentração maior de epitélio olfatório é realmente a concha superior.

Na concha média, para o marcador 10D5, a sensibilidade encontrada é alta (90%) e valor preditivo alto (90%) com relação ao diagnóstico patológico. Esse dado sugere que, na ausência deste marcador na concha média, é pouco provável que haja depósito de beta-amiloide no SNC, e a chance de se tratar de doença de Alzheimer é baixa.

O septo nasal apresentou sensibilidade e especificidade baixas, quando comparadas por meio de parâmetros clínicos e anatomopatológicos. Isto pode ser decorrente de uma concentração menor de epitélio olfatório presente nessa região (Pinna et al., 2013).

6.5 Presença de proteínas tau e β -amiloide no epitélio olfatório

A proteína β -amiloide, detectada na imunoistoquímica pelo anticorpo 10D5, apresentou sensibilidade alta (91,7%) e valor preditivo negativo alto (92,3%), quando analisada por meio do diagnóstico clínico na concha superior.

Ao realizar a análise do ponto de vista neuropatológico, o marcador 10D5 nas conchas média (90%) e superior (77,8%) foi mais sensível para diagnosticar a presença da proteína β -amiloide.

Com relação ao PHF-1, marcador de proteína tau, este apresentou uma sensibilidade elevada (90,9%) e valor preditivo negativo (95,8%), quando usado em espécimes da concha superior em relação ao diagnóstico clínico, semelhante ao ocorrido com o marcador 10D5.

Ao fazer o diagnóstico patológico, o PHF-1 apresentou uma sensibilidade boa (77,8%) apenas na concha superior, com valor preditivo negativo alto (77,8%). Assim, a ausência de PHF-1 na concha superior sugere fortemente a ausência deste marcador no SNC.

Em todas as análises, os marcadores apresentaram especificidade baixa (<75%). Desta forma, as proteínas estudadas também podem ser encontradas no epitélio olfatório de indivíduos sem demência clínica e/ou sem comprometimento cerebral.

Esse fato pode decorrer da perda da capacidade regenerativa do epitélio olfatório em certos indivíduos, e não ser, necessariamente, sinal de doença orgânica. Determinar, quando uma agressão passa a ser patológica, ainda é um desafio.

6.6 Quantificação das proteínas tau e β -amiloide no epitélio olfatório

Por se tratar de um estudo pioneiro na área, ainda não se dispõe de uma classificação pré-estabelecida sobre o acometimento do epitélio olfatório por proteína tau e β -amiloide. Alguns estudos descrevem uma análise semiquantitativa, como acometimento ausente, leve, moderado e grave (Arnold, 2010). Witt et al., em 2009, classificaram a mucosa olfatória em cinco fenótipos de acordo com uma escala que varia de características regulares (tipo 0) até epitélio degenerado, sem parâmetros estruturais e histoquímicos (tipo IV). Por considerar essas classificações vagas e passíveis de erros de interpretação, no presente estudo preferiu-se elaborar uma análise porcentual.

A avaliação porcentual do acometimento do epitélio olfatório em toda a lâmina foi realizada para analisar as seções do epitélio olfatório quanto à presença de proteínas tau e β -amiloide. Tomou-se cuidado com a padronização da análise, usando sempre o mesmo microscópio (Zeiss Primo Star - Germany), o mesmo aumento (200x) e as análises feitas pelo mesmo pesquisador e validadas pelos demais pesquisadores. Entretanto, apesar de uma análise quantitativa cuidadosa, a análise qualitativa (presença ou ausência de proteínas) mostrou ser o melhor parâmetro de avaliação.

6.7 Limitações do estudo

Este estudo apresenta algumas limitações a serem consideradas. A amostra estudada exibiu especificidade baixa, na qual muitos indivíduos saudáveis mostraram ser portadores das proteínas tau e β -amiloide no epitélio olfatório, sem manifestações clínicas de disfunção cognitiva. Analisar a taxa de conversão para demência dos indivíduos da amostra, não é possível neste desenho de estudo, por se tratar de um estudo transversal e *post-mortem*. Para esta finalidade, são necessários estudos prospectivos e longitudinais.

Ao estudar todo o epitélio olfatório dos indivíduos da amostra, a presente pesquisa permite realizar uma análise mais fidedigna. Porém, se for feita uma extrapolação para um estudo *in vivo*, por meio de biópsias do epitélio olfatório, a chance de encontrar este epitélio diminui.

7 CONCLUSÃO

7 CONCLUSÃO

A detecção das proteínas tau e β -amiloide no epitélio da concha superior apresenta sensibilidade e valor preditivo negativo altos, para os parâmetros clínicos e neuropatológicos aceitos para o diagnóstico da doença de Alzheimer. Entretanto, a especificidade baixa sugere que essas proteínas podem ser encontradas em indivíduos sem manifestação clínica de demência. Estabelecer quando a presença dessas proteínas torna-se patológica ainda é um desafio.

Os resultados da presente pesquisa mostram que a análise imunoistoquímica para as proteínas tau e beta-amiloide no epitélio olfatório pode ser usada como um possível biomarcador da doença de Alzheimer.

8 ANEXOS

ANEXO A

CRITÉRIOS CLÍNICOS PRINCIPAIS PARA O DIAGNÓSTICO DE DEMÊNCIA (DE QUALQUER ETIOLOGIA) (Frota et al., 2011)

- 1 Demência é diagnosticada quando há sintomas cognitivos ou comportamentais (neuropsiquiátricos) que:
 - 1.1 Interferem com a habilidade no trabalho ou em atividades usuais;
 - 1.2 Representam declínio em relação a níveis prévios de funcionamento e desempenho;
 - 1.3 Não são explicáveis por *delirium* (estado confusional agudo) ou doença psiquiátrica maior;
- 2 O comprometimento cognitivo é detectado e diagnosticado mediante combinação de:
 - 2.1 Anamnese com paciente e informante que tenha conhecimento da história; e
 - 2.2 Avaliação cognitiva objetiva, mediante exame breve do estado mental ou avaliação neuropsicológica. A avaliação neuropsicológica deve ser realizada quando a anamnese e o exame cognitivo breve realizado pelo médico não forem suficientes para permitir diagnóstico confiável.
- 3 Os comprometimentos cognitivos ou comportamentais afetam no mínimo dois dos seguintes domínios:
 - 3.1 *Memória*. Caracterizado por comprometimento da capacidade para adquirir ou evocar informações recentes, com sintomas que incluem: repetição das mesmas perguntas ou assuntos, esquecimento de eventos, compromissos ou do lugar onde guardou seus pertences;

- 3.2 *Funções executivas*. Caracterizado por comprometimento do raciocínio, da realização de tarefas complexas e do julgamento, com sintomas tais como: compreensão pobre de situações de risco, redução da capacidade para cuidar das finanças, de tomar decisões e de planejar atividades complexas ou sequenciais;
- 3.3 *Habilidades visuais-espaciais*. Caracterizado por sintomas que incluem: incapacidade de reconhecer faces ou objetos comuns, encontrar objetos no campo visual, dificuldade para manusear utensílios, para vestir-se, não explicáveis por deficiência visual ou motora;
- 3.4 *Linguagem* (expressão, compreensão, leitura e escrita). Caracterizado por sintomas que incluem: dificuldade para encontrar e/ou compreender palavras, erros ao falar e escrever, com trocas de palavras ou fonemas, não explicáveis por déficit sensorial ou motor;
- 3.5 *Personalidade ou comportamento*. Caracterizado por sintomas que incluem alterações do humor (labilidade, flutuações incharacterísticas), agitação, apatia, desinteresse, isolamento social, perda de empatia, desinibição, comportamentos obsessivos, compulsivos ou socialmente inaceitáveis.

ANEXO B

DEMÊNCIA DE ALZHEIMER: CRITÉRIOS CLÍNICOS CENTRAIS (modificado de McKhann et al., 2011)

1. Demência da doença de Alzheimer provável

Preenche critérios para demência e tem adicionalmente as seguintes características:

1.1. Início insidioso (meses ou anos).

1.2. História clara ou observação de piora cognitiva.

1.3. Déficits cognitivos iniciais e mais proeminentes em uma das seguintes categorias:

- Apresentação amnésica (deve haver outro domínio afetado);
- Apresentação não-amnésica (deve haver outro domínio afetado).
 - Linguagem (lembranças de palavras);
 - Visual-espacial (cognição espacial, agnosia para objetos ou faces, simultaneoagnosia e alexia);
 - Funções executivas (alteração do raciocínio, julgamento e solução de problemas).

1.4. Tomografia ou, preferencialmente, ressonância magnética do crânio deve ser realizada para excluir outras possibilidades diagnósticas ou comorbidades, principalmente a doença vascular cerebral.

1.5. O diagnóstico de demência da DA provável não deve ser aplicado quando houver:

- Evidência de doença cerebrovascular importante definida por história de

AVC temporalmente relacionada ao início ou piora do comprometimento cognitivo; ou presença de infartos múltiplos ou extensos; ou lesões acentuadas na substância branca evidenciadas por exames de neuroimagem; ou

- Características centrais de demência com corpos de Lewy (alucinações visuais, parkinsonismo e flutuação cognitiva); ou
- Características proeminentes da variante comportamental da demência frontotemporal (hiperoralidade, hipersexualidade, perseveração); ou
- Características proeminentes de afasia progressiva primária manifestando-se como a variante semântica (também chamada demência semântica, com discurso fluente, anomia e dificuldades de memória semântica) ou como a variante não-fluente, com agramatismo importante; ou
- Evidência de outra doença concomitante e ativa, neurológica ou não-neurológica, ou de uso de medicação que pode ter efeito substancial sobre a cognição.

Os seguintes itens, quando presentes, aumentam o grau de confiabilidade do diagnóstico clínico da demência da DA provável:

- Evidência de declínio cognitivo progressivo, constatado em avaliações sucessivas;
- Comprovação da presença de mutação genética causadora de DA (genes da APP e presenilinas 1 e 2);
- Positividade de biomarcadores que reflitam o processo patogênico da DA (marcadores moleculares através de PET ou liquor; ou neuroimagem estrutural e funcional).

A ocorrência dos itens acima confirma a existência de um mecanismo degenerativo, apesar de não ser específico da DA.

2. Demência da doença de Alzheimer possível

O diagnóstico de demência da DA possível deve ser feito quando o paciente preenche os critérios diagnósticos clínicos para demência da DA, porém apresenta alguma das circunstâncias abaixo:

- 2.1. Curso atípico: início abrupto e/ou padrão evolutivo distinto daquele observado usualmente, isto é lentamente progressivo.
- 2.2. Apresentação mista: tem evidência de outras etiologias conforme detalhado no item dos critérios de demência da DA provável (doença cerebrovascular concomitante; características de demência com corpos de Lewy; outra doença neurológica ou uma comorbidade não-neurológica ou uso de medicação as quais possam ter efeito substancial sobre a cognição).
- 2.3. Detalhes de história insuficientes sobre instalação e evolução da doença.

3. Demência da doença de Alzheimer definida

Preenche critérios clínicos e cognitivos para demência da DA e exame neuropatológico demonstra a presença de patologia da DA segundo os critérios do NIA e do *Reagan Institute Working Group*.

ANEXO C

DIAGNÓSTICO DE COMPROMETIMENTO COGNITIVO LEVE (CCL) POR CAUSA DA DOENÇA DE ALZHEIMER (Modificado de Albert et al., 2011)

Existem dois conjuntos de critérios que podem ser utilizados para o diagnóstico de CCL por causa da DA.

- Critérios clínicos centrais: para uso na prática clínica, sem a necessidade de testes ou procedimentos altamente especializados;
- *Critérios de pesquisa clínica*: que incorporam informações obtidas a partir do uso de biomarcadores e são destinados sobretudo para contextos de pesquisa, centros especializados e ensaios clínicos.

1. Critérios clínicos centrais

1.1. Características clínicas e cognitivas

- Queixa de alteração cognitiva relatada pelo paciente, informante próximo ou profissional;
- Evidência de comprometimento em um ou mais domínios cognitivos tipicamente incluindo a memória, obtida através de avaliação que compreenda os seguintes domínios cognitivos: memória, função executiva, linguagem e habilidades visuais-espaciais; ou exame neuropsicológico;
- Preservação da independência nas atividades funcionais. Pode haver problemas leves para executar tarefas complexas anteriormente habituais, tais como pagar contas, preparar uma refeição ou fazer compras. O paciente pode demorar mais, ser menos eficiente e cometer mais erros ao executar essas atividades. No entanto, ainda é capaz de manter sua

independência com mínima assistência;

- Não preenche critérios para demência. Ainda não existe um consenso sobre quais baterias de testes devem ser utilizadas para o diagnóstico de comprometimento cognitivo no CCL. Preferencialmente devem-se utilizar testes neuropsicológicos, por serem mais sensíveis. Não existe norma para valores de corte, sendo sugeridas pontuações entre 1 e 1,5 desvio-padrão abaixo do esperado. Testes cognitivos de rastreo, como a capacidade de registrar e evocar um endereço, ou lembrar-se de objetos mostrados na consulta e depois escondidos podem ser usados na prática clínica, apesar de sensibilidade menor.

1.2. Etiologia compatível com DA

- Descartar outras doenças sistêmicas ou neurológicas que poderiam ser responsáveis pelo declínio cognitivo;
- Evidência de declínio longitudinal da cognição compatível com evolução natural da DA, quando possível;
- História consistente com DA familiar. A exclusão de outras doenças neurológicas que possam levar a declínio cognitivo (traumatismo, vascular, medicações), deve ser realizada, assim como a pesquisa de sintomas parkinsonianos, fatores de riscos cardiovasculares importantes e alterações vasculares significativas em exames de neuroimagem, além de sinais proeminentes de degeneração lobar frontotemporal, conforme sugerido no diagnóstico de demência da DA provável. A presença de alterações genéticas autossômicas dominantes da DA em familiares do paciente torna ainda mais provável que seu CCL seja devido esta doença.

2. Critérios de pesquisa clínica para CCL devido à DA

Uma vez preenchidos os critérios clínicos de CCL causados pela DA, as informações obtidas por meio de biomarcadores podem conferir diferentes graus de probabilidade da etiologia de DA. Essa classificação de probabilidade necessita ser

testada em estudos futuros antes de ser usada na prática clínica.

- Alta probabilidade.

Biomarcadores de β -amiloide e de lesão/dano neuronal positivos.

- Probabilidade intermediária.

Apenas uma das modalidades é positiva e a outra não foi testada.

- Probabilidade baixa.

Biomarcadores de β -amiloide e de lesão/dano neuronal negativos.

- Dados inconclusivos

Resultados incharacterísticos ou conflitantes (biomarcador de β -amiloide positivo e o de lesão/dano neuronal negativo ou vice-versa)

O grau de certeza de probabilidade alta também está relacionado à maior taxa e ao menor tempo de evolução para demência. Ausência de ambos os tipos de biomarcadores obriga a consideração de outra etiologia (que não DA) para o quadro de CCL.

ANEXO D

DIAGNÓSTICO DE DOENÇA DE ALZHEIMER PRÉ-CLÍNICA PARA FINS DE PESQUISA CLÍNICA (Proposto por Sperling et al., 2011)

- Estágio 1: Amiloidose cerebral assintomática.
 - Elevada captação de marcador β Amiloide em PET;
 - Redução de β A-42 no liquor.

- Estágio 2: Amiloidose + Neurodegeneração inicial.
 - Marcadores de deposição β -amiloide positivos;
 - Disfunção neuronal no FDG-PET/fMRI;
 - Aumento de tau/fosfo-Tau no liquor.
 - Redução da espessura cortical/atrofia hipocampal por RM.

- Estágio 3: Positividade para amiloide + evidência de neurodegeneração + declínio cognitivo sutil (testes de alta demanda cognitiva).
 - Preenchimento dos estágios 1 e 2.
 - Evidência de alteração sutil do nível cognitivo prévio.
 - Baixo desempenho em testes cognitivos mais complexos.
 - Não preencher critérios para CCL.

ANEXO E

ENTREVISTA CLÍNICA

ENTREVISTA CLÍNICA	NPROT	NSVO
Data da necropsia: ___/___/___		
Nome: _____ Idade: ___ DN: ___/___/___		
Sexo: _____ Raça: <input type="checkbox"/> B <input type="checkbox"/> N <input type="checkbox"/> P <input type="checkbox"/> A Natural: _____ Proced: _____ Estado Civil: <input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> C <input type="checkbox"/> V <input type="checkbox"/> A <input type="checkbox"/> D Filhos: _____		
Escolaridade: _____ anos (<input type="checkbox"/> A <input type="checkbox"/> <4a <input type="checkbox"/> <8a <input type="checkbox"/> <12a <input type="checkbox"/> >15a)		
Profissão: <input type="checkbox"/> do lar <input type="checkbox"/> doméstica <input type="checkbox"/> outros _____		
Situação: <input type="checkbox"/> Ainda trabalhava <input type="checkbox"/> Aposentado _____ a <input type="checkbox"/> Ap por invalidez _____ a <input type="checkbox"/> Outro _____		
Informante		
<input type="checkbox"/> Parentesco: _____ Freq com o pte: <input type="checkbox"/> D <input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> M _____ Cuidador primário: <input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não		
Com quem residia: _____		
Causa do Óbito: _____		
Como correu o óbito: <input type="checkbox"/> em casa <input type="checkbox"/> no hospital: _____		

HPMA:		

AP: <input type="checkbox"/> Nega ou desconhece qualquer antecedente patológico		
<input type="checkbox"/> HAS <input type="checkbox"/> DM <input type="checkbox"/> DAC <input type="checkbox"/> ICC (TF _____) <input type="checkbox"/> Arritmia <input type="checkbox"/> MP <input type="checkbox"/> IVP/ OAC <input type="checkbox"/> IRC <input type="checkbox"/> DLP		
<input type="checkbox"/> AVCI // h prévio? Há _____ a – <input type="checkbox"/> sem seqüela <input type="checkbox"/> com seqüela: <input type="checkbox"/> cognitiva <input type="checkbox"/> motora _____		
<input type="checkbox"/> AIDS <input type="checkbox"/> Sífilis <input type="checkbox"/> AO/ OP <input type="checkbox"/> Dist Tireóide <input type="checkbox"/> Bronquite/ Asma <input type="checkbox"/> DPOC _____		
<input type="checkbox"/> Down <input type="checkbox"/> Depressão <input type="checkbox"/> Esquizofrenia <input type="checkbox"/> Mania <input type="checkbox"/> D Parkinson		
<input type="checkbox"/> TTOs anteriores: Clínicos: _____ Cirúrgicos: _____		
<input type="checkbox"/> Não fazia tratamento ou acompanhamento médico atualmente _____		
<input type="checkbox"/> Sd demencial diagnosticada em vida: <input type="checkbox"/> não <input type="checkbox"/> sim Há _____ a Etiologia: _____ <input type="checkbox"/> História compatível com Síndrome demencial: <input type="checkbox"/> não <input type="checkbox"/> sim Início dos sintomas: <input type="checkbox"/> lento <input type="checkbox"/> súbito <input type="checkbox"/> memória <input type="checkbox"/> comportamento <input type="checkbox"/> outro _____ Curso: <input type="checkbox"/> lento e progressivo <input type="checkbox"/> rápido <input type="checkbox"/> evolução em degraus <input type="checkbox"/> curso flutuante		
Função anterior à morte		
<input type="checkbox"/> Acuidades visual e auditiva preservadas <input type="checkbox"/> ↓acuidade visual <input type="checkbox"/> óculos <input type="checkbox"/> hipoacusia <input type="checkbox"/> prótese		
<input type="checkbox"/> Dentição preservada <input type="checkbox"/> uso de prótese dentária <input type="checkbox"/> disfagia <input type="checkbox"/> SNG/SNE		
<input type="checkbox"/> Sedentário <input type="checkbox"/> Atividade física: <input type="checkbox"/> caminhada <input type="checkbox"/> doméstica <input type="checkbox"/> outra _____, por _____ anos		
<input type="checkbox"/> Andava: <input type="checkbox"/> sem auxílio <input type="checkbox"/> com auxílio: <input type="checkbox"/> pessoas <input type="checkbox"/> parede/ móveis <input type="checkbox"/> equipamentos auxiliares		
<input type="checkbox"/> Amputações _____ <input type="checkbox"/> Lesões cutâneas (úlceras) _____ <input type="checkbox"/> Acamado		
<input type="checkbox"/> Independente <input type="checkbox"/> Dependente <input type="checkbox"/> Tomava decisões sozinho <input type="checkbox"/> Não tomava decisões		
<input type="checkbox"/> Em que situações relacionava-se com muita gente? _____ freq _____/sem ou _____/anos		
FR: <input type="checkbox"/> Obesidade (P _____ A _____ IMC _____) <input type="checkbox"/> Reposição hormonal _____		
<input type="checkbox"/> Tabagismo: _____ anos/maço <input type="checkbox"/> parou <input type="checkbox"/> Etilismo: <input type="checkbox"/> social <input type="checkbox"/> alcoolismo <input type="checkbox"/> parou		

ESCORES DAS ESCALAS:

IQCODE: _____ CDR: _____ SB: _____ NPI: _____ KATZ: _____ IADL: _____ PARK: _____ SCID D: _____
SCID M: _____ TOC: _____ ABIPEME: _____

CONSENSO DIAGNÓSTICO

Data: _____ Presentes: _____

Diagnóstico Principal: semi comprometimento cognitivo CDR 0,5 M+ CDR 0,5 MD M+ CDR 0,5 MD M-
 DA _____ DV _____ DCL _____ Outras: _____

Outros Diagnósticos: AVE Depressão DP/ Parkinsonismo Outros: _____

RCV: sem RCV I RCV _____

VERSÃO RETROSPECTIVA DO QUESTIONÁRIO IQCODE

Informant questionnaire on cognitive decline in the elderly

(IQCODE – Versão retrospectiva)

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

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

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

Total: _____

QUESTIONÁRIO CDR

ESCORE CLÍNICO DE DEMÊNCIA – FOLHA DE REGISTRO

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

QUESTÕES SOBRE MEMÓRIA PARA O INFORMANTE

1. Ele/ela tem algum problema com sua memória ou seu pensamento (raciocínio)? SIM NÃO
 1a - Se sim, é um problema constante? (em oposição a eventual, raro) SIM NÃO
2. Ele/ela pode se lembrar de eventos recentes? Frequentemente Às vezes Raramente
3. Ele/ela pode se lembrar de uma lista curta de itens (compras)? Frequentemente Às vezes Raramente
4. Houve algum declínio na memória durante o último ano? SIM NÃO
5. Sua memória está comprometida a tal ponto que teria interferido em suas atividades de vida diária de alguns anos atrás? (ou atividades pré-aposentadoria) (opinião de outros informantes) SIM NÃO
6. Ele/ela se esquece completamente de um evento importante (ex. viagem, festa, casamento em família) algumas semanas depois do evento? Frequentemente Às vezes Raramente
7. Ele/ela se esquece de detalhes pertinentes de um evento importante? Frequentemente Às vezes Raramente
8. Ele/ela se esquece completamente de informações importantes do passado distante (ex. data de nascimento, data de casamento, local do emprego)? Frequentemente Às vezes Raramente
9. OBS - Questão removida por não ser aplicável.

QUESTÕES SOBRE ORIENTAÇÃO PARA O INFORMANTE

Com que frequência ele/ela sabe o exato:

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

QUESTÕES SOBRE ASSUNTOS COMUNITÁRIOS PARA O INFORMANTE

Ocupacional

1. O sujeito ainda está trabalhando? SIM NÃO N/A
 Se não aplicável - vá para o item número 4
 Se sim - vá para o item número 3
 Se não - vá para o item número 2
2. Os problemas de memória ou de pensamento (raciocínio) contribuíram para a decisão do sujeito de se aposentar? (A questão 4 é a próxima) SIM NÃO N/A
3. O sujeito tem dificuldade significante em seu trabalho por causa de problemas com memória ou pensamento (raciocínio)?
 Raramente ou nunca Às vezes Frequentemente Não sabe

Social

4. Ele/ela alguma vez dirigiu carro? SIM NÃO
5. Ele/ela dirige carros atualmente? SIM NÃO
6. Se não, é devido a problemas de memória ou pensamento (raciocínio)? SIM NÃO
7. Se ele/ela ainda está dirigindo, há problemas ou riscos devido ao pensamento (raciocínio) pobre? SIM NÃO
8. Ele/ela é capaz de fazer compras para suas próprias necessidades independentemente?
 Raramente ou nunca Às vezes Frequentemente Não Sabe
 (precisa ser acompanhado em qualquer compra) (Pode comprar um número limitado de itens, compra itens duplicados ou esquece itens necessários)
9. Ele/ela é capaz de fazer atividades independentemente fora de sua casa?
 Raramente ou nunca Às vezes Frequentemente Não sabe
 (Frequentemente incapaz de realizar atividades sem ajuda) (Atividades limitadas ou de rotina, por exemplo, participação superficial na igreja ou reuniões, idas a salão de beleza). (Participação significativa em atividades, por exemplo, votar)
10. Ele/ela é levado a eventos sociais fora da casa de familiares?
 Se não, por que não? _____ SIM NÃO
11. Um observador casual do comportamento do sujeito pensaria que ele está doente? SIM NÃO
12. Se institucionalizado, ele/ela participa bem de atividades sociais? SIM NÃO

IMPORTANTE:

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

Se não, por favor, investigue mais.

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

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

QUESTÕES SOBRE O LAR E ATIVIDADES DE LAZER PARA O INFORMANTE

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

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

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

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

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

Atividades da vida diária (Blessed):

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

Por favor, descreva _____

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

Sem função significativa

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

Funciona somente em atividades limitadas

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

Funciona independentemente em algumas atividades

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

Funciona em atividades usuais mas não no nível usual

Funciona normalmente em atividades usuais

IMPORTANTE:

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

Se não, por favor investigue mais.

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

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

QUESTÕES SOBRE O AUTOCUIDADO PARA O INFORMANTE

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

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

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

ESCORE CLÍNICO DE DEMÊNCIA (CDR)

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

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

Inventário Neuropsiquiátrico

(Cummins et al – 1994)

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

				Total: /144 pontos												
Delírios	O paciente acredita que alguém está tentando rouba-lo ou prejudica-lo?			Frequência				Severidade			Estresse					
Sim	Não	NA		1	2	3	4	1	2	3	0	1	2	3	4	5
Alucinações	O paciente age como se escutasse vozes? Fala com pessoas que não existem?			Frequência				Severidade			Estresse					
Sim	Não	NA		1	2	3	4	1	2	3	0	1	2	3	4	5
Agitação/ Agressividade	O paciente é teimoso e rejeita ajuda dos outros? Tem períodos que se recusa a cooperar?			Frequência				Severidade			Estresse					
Sim	Não	NA		1	2	3	4	1	2	3	0	1	2	3	4	5
Depressão/ Disforia	O paciente age como se estivesse triste ou de "baixo astral"? Refere sentir-se triste ou deprimido?			Frequência				Severidade			Estresse					
Sim	Não	NA		1	2	3	4	1	2	3	0	1	2	3	4	5
Ansiedade	O paciente fica agitado quando se separa de você? Ele apresenta sinais de nervosismo, preocupado, assusta-se por razões não aparentes? Parece muito tenso ou irrequieto?			Frequência				Severidade			Estresse					
Sim	Não	NA		1	2	3	4	1	2	3	0	1	2	3	4	5
Elação/ Euforia	O paciente parece animado demais ou excessivamente feliz – sem razão? Acha graça onde outros não acham?			Frequência				Severidade			Estresse					
Sim	Não	NA		1	2	3	4	1	2	3	0	1	2	3	4	5
Apatia/ Indiferença	O paciente parece menos interessado em suas atividades habituais ou nas atividades e planos dos outros?			Frequência				Severidade			Estresse					
Sim	Não	NA		1	2	3	4	1	2	3	0	1	2	3	4	5
Desinibição	O paciente parece agir impulsivamente? Ex, diz coisas que podem magoar as pessoas sem qualquer constrangimento ou fala abertamente coisas íntimas que em geral não se diz em público? Tira a roupa em frente de outras pessoas/ público – momentos não apropriados?			Frequência				Severidade			Estresse					
Sim	Não	NA		1	2	3	4	1	2	3	0	1	2	3	4	5
Irritabilidade/ Labilidade	O paciente é impaciente e mau-humorado? Ele tem dificuldades para lidar com atrasos ou para ficar esperando algo que esteja programado? Seu humor é instável?			Frequência				Severidade			Estresse					
Sim	Não	NA		1	2	3	4	1	2	3	0	1	2	3	4	
Distúrbios Motores	O paciente fica fazendo coisas repetitivas, como lidar andando ao redor da casa, mexendo nos botões da roupa, enrolando um cordão ou fazendo outras coisas repetitivamente? Anda sem motivo aparente?			Frequência				Severidade			Estresse					
Sim	Não	NA		1	2	3	4	1	2	3	0	1	2	3	4	5
Comportamentos Noturnos	O paciente acorda você a noite, acorda muito cedo, cochila muito durante o dia? Tem dificuldade para dormir? Ele levanta à noite (não contar vezes que levanta p/ urinar e volta a dormir imediatamente)? Anda ao acaso à noite, veste-se ou perturba seu sono?			Frequência				Severidade			Estresse					
Sim	Não	NA		1	2	3	4	1	2	3	0	1	2	3	4	5
Apetite e alimentação	O paciente perdeu ou ganhou peso? Mudou o gosto pelos alimentos?			Frequência				Severidade			Estresse					
Sim	Não	NA		1	2	3	4	1	2	3	0	1	2	3	4	5

FREQUENCIA

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

SEVERIDADE

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

ESTRESSE DO CUIDADOR

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

Índice de Katz para Atividades de Vida Diária

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

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

I = 1 ponto e D = 0 ponto

TOTAL: ____/6

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

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

Não aplicável Park. : _____

ESCALA DE ATIVIDADES INSTRUMENTAIS DA VIDA DIÁRIA (IADL)
(Lawton & Brody)

A – Habilidade para usa o telefone		E – Lavanderia	
1. Utiliza o telefone por iniciativa própria	1	1. Lava completamente as roupas	1
2. Discar alguns números conhecidos	1	2. Lava pequenas peças: meias, etc	1
3. Atende mas não faz ligações	1	3. Toda a roupa deve ser lavada por terceiros	0
4. Não usa o telefone de modo algum	0		
B – Compras		F – Transporte	
1. Faz compras independente/e	1	1. Usa independentemente transportes públicos ou dirige seu próprio carro	1
2. Faz pequenas compras independente/e	0	2. Chama de táxi, mas não usa transporte público	1
3. Precisa ser acompanhado nas compras	0	3. Usa transporte público se acompanhado	1
4. Incapaz de fazer compras	0	4. Locomove-se limitadamente de táxi ou carro com auxílio de outros	0
		5. Não sai de casa/ Não usa nenhum transporte	0
C – Preparo de alimentos		G – Medicação	
1. Planeja, prepara e serve adequadamente as refeições independentemente	1	1. É responsável por tomar sua medicação em dose e horários corretos	1
2. Prepara adequadamente as refeições se alguém lhe fornecer os ingredientes	0	2. Assume responsabilidade por tomar sua medicação se separada anteriormente por outros	0
3. Aquece, serve e prepara refeições, mas não garante uma dieta adequada	0	3. Não é capaz de tomar sua medicação	0
4. Necessita que alguém prepare e sirva a refeição	0		
D – Tarefas domésticas		H – Finanças	
1. Matem a casa sozinho ou com auxílio ocasional (p.ex: auxílio para tarefas pesadas)	1	1. Controla suas finanças independentemente (conta de banco, talão de cheque, preenche cheques, paga contas)	1
2. Realiza tarefas diárias leves, como lavar louça, fazer a cama	1	2. Controla contas no dia a dia, mas necessita de auxílio com banco, compras maiores,...	1
3. Realiza tarefas diárias leves, mas não consegue fazê-las dentro dos padrões de limpeza	1	3. Incapaz de controlar finanças	0
4. Necessita de auxílio com todas as tarefas domésticas	1		
5. Não faz/ participa de nenhuma tarefa doméstica	0		

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

Total: _____ / 8 pontos

Perguntas adicionais:

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

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

Episódio Maior Depressivo no Passado – SCID

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

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

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

Critério: 1 2 3 ? Quando foi isso?

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

Crítério: 1 2 3 ? Assinalar: Perda de peso ou redução do apetite _____ Ganho de peso ou aumento do apetite _____
4) Como estava o sono dele(a)? (Dificuldade para dormir, acordando frequentemente, dificuldades em ficar acordado, acordando muito cedo, ou, dormindo demais? Quantas horas por noite comparado com o habitual? Isso acontecia quase todas as noites?)

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

Crítério: 1 2 3 ? Assinalar: agitação psicomotora _____ retardo psicomotor _____
6) Como estava a energia dele(a)? (Cansado(a) o tempo inteiro? Quase todos os dias?)

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

Crítério: 1 2 3 ? Assinalar: Sentimento de inutilidade _____ Culpa inadequada _____
8) Ele(a) tinha dificuldade para se concentrar ou pensar? (Com que tipo de coisas isso interferia?) Quase todos os dias?
SE NÃO: Era difícil para ele(a) tomar decisões sobre coisas do dia a dia? Quase todos os dias?

Crítério: 1 2 3 ? Assinalar: Capacidade de pensar diminuída _____ Indecisão _____
9) As coisas estavam tão ruins que ele(a) pensava muito em morte ou que estaria em melhor situação se estivesse morto(a)? E quanto a se ferir?

Crítério: 1 2 3 ? Assinalar: Pensamentos de morte recorrentes _____ Ideação suicida _____ Tentativa de suicídio _____
10) Durante aquele tempo ficou difícil para ele(a) trabalhar, cuidar das coisas em casa, ou se relacionar com as pessoas?
SIM () NÃO ()

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

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

13) Isso começou logo depois de alguém próximo a ele(a) morrer? SIM () NÃO ()
Durou mais que 2 meses? SIM () NÃO ()

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

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

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

A- Em sua casa tem?

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

TOTAL: _____

B- Qual a instrução do chefe de família?

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

TOTAL: _____

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

9 REFERÊNCIAS

9 REFERÊNCIAS¹

Albers MW, Tabert MH, Devanand DP. Olfactory dysfunction as a predictor of neurodegenerative disease. *Curr Neurol Neurosci Rep*. 2006;6(5):379-86.

Albert MS, DeKosky ST, Dickson D, Dubois B, Feldman HH, Fox NC, Gamst A, Holtzman DM, Jagust WJ, Petersen RC, Snyder PJ, Carrillo MC, Thies B, Phelps CH. 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. *Alzheimers Dement*. 2011;7(3):270-9.

Areza-Fegyveres R, Nitrini R. Diagnóstico ambulatorial e diagnóstico precoce (marcadores biológicos) em demências – enfoque multidisciplinar: das bases fisiopatológicas ao diagnóstico e tratamento. São Paulo, Editora Atheneu, 2011.

Arnold SE, Lee EB, Moberg PJ, Stutzbach, BAL, Kazi, BSH, Han, MSLY, Lee VMY, Trojanowski JQ. Olfactory epithelium amyloid- β and paired helical filament-tau pathology in Alzheimer's Disease. *Ann Neurol*. 2010;67:462-9.

Attems J, Lintner F, Jellinger KA. Olfactory involvement in aging and Alzheimer's disease: An autopsy study. *J Alzheimers Dis*. 2005;7:149-57.

Attems J, Jellinger KA. Olfactory tau pathology in Alzheimer disease and mild cognitive impairment. *Clin Neuropathol*. 2006;25(6):265-71.

Bailey BJ, Johnson JT. Otorrinolaringologia Cirurgia de Cabeça e Pescoço. 4ª edição. Revinter, 2010.

Ballard C, Gauthier S, Corbett A, Brayne C, Aarsland D, Jones E. Alzheimer's disease. *Lancet*. 2011;377:1019-31

Braak H, Braak E. Neuropathological staging of Alzheimer related changes. *Acta Neuropathol*. 1991;82:239-59.

¹ Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

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

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

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

Budson AE, Solomon PR. New diagnostic criteria for Alzheimer's disease and mild cognitive impairment for the practical neurologista. *Practical Neurology* 2012;12:88-96.

Burke WJ, Miller JP, Rubin EH, Coben LA e Martin RL. Reliability of the Washington University Clinical Dementia Rating. *Arch Neurol.* 1988;45:31-2.

Bustamante SE, Bottino CM, Lopes MA, Azevedo D, Hototian SR, Litvoc J, Jacob Filho W. Combined instruments on the evaluation of dementia in the elderly: preliminary results. *Arq Neuropsiquiatr.* 2003;61:601-6.

Camarano AA (org.). Cuidados de longa duração para a população idosa: um novo risco social a ser assumido? Rio de Janeiro. IPEA. 2010: pp. 13-38.

Camarano AA. Envelhecimento, condições de vida e política previdenciária. Como ficam as mulheres? Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada (IPEA). Texto para discussão, v. 883. 1999.

Doty RL. Odor perception in neurodegenerative disease cap 23. *Handbook of Olfaction and Gustation* (2nd edition). Doty RL Editor. New York., 2003.

Doty RL. The smell threshold test TM Administration Manual, 2nd Edition, Sonsonics, Inc., Philadelphia, USA. 2009.

Doty RL. The olfactory vector hypothesis of neurodegenerative disease: is it viable? *Ann Neurol.* 2008;63:7-15.

Doty RL, Perl DP, Steele JC, et al. Olfactory dysfunction in three neurodegenerative diseases. *Geriatrics.* 1991;46(S1):47-51.

Doty RL, Shaman P, Dann M. Development of the University of Pennsylvania Smell Identification Test: a standardized microencapsulated test of olfactory function. *Physiol Behav.* 1984;32(3):489-502.

Dubois B, Feldman HH, Jacova C, Dekosky ST, Barberger-Gateau P, Cummings J, Delacourte A, Galasko D, Gauthier S, Jicha G, Meguro K, O'brien J, Pasquier F, Robert P, Rossor M, Salloway S, Stern Y, Visser PJ, Scheltens P. Research criteria for the diagnosis of Alzheimer's disease: revising the NINCDS-ADRDA criteria. *Lancet Neurol.* 2007;6:734-46.

Duyckaerts C, Dickson D. Neuropathology of Alzheimer's Disease and its Variants. In Dickson D, Weller R. Editors. *Neurodegeneration: The Molecular Pathology of Dementia and Movement Disorders*, Willey-Blackwell, 2nd Edition, 2011, 496p.

- Escada PA, Lima C, Silva JM. The human olfactory mucosa. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2009;266:1675-80.
- Farfel JM, Nitrini R, Suemoto CK, Grinberg LT, Ferretti RE, Leite RE, Tampellini E, Lima L, Farias DS, Neves RC, Rodriguez RD, Menezes PR, Fregni F, Bennett DA, Pasqualucci CA, Jacob Filho W; Brazilian Aging Brain Study Group. Very low levels of education and cognitive reserve: a clinicopathologic study. *Neurology*. 2013;13;81(7):650-7.
- Féron F, Perry C, McGrath JJ, Mackay-Sim A. New techniques for biopsy and culture of human olfactory epithelial neurons. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 1998 Aug;124(8):861-6.
- Ferretti REL, Damin A, Brucki SMD, Morillo LS, Balbino ES, Lima MCA, Battela C, Ruiz L, Grinberg LT, Farfel JM, Leite REP, Suemoto CK, Pasqualucci CA, Rosemberg S, Saldiva PHN, Jacob Filho W, Nitrini R (2010) Postmortem diagnosis of dementia by informant interview. *Dement Neuropsychol*. 2010;4:138-44.
- Folstein MF, Folstein SE, McHugh PR. "Mini-mental state": a practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *J Psychiatr Res*. 1975;12:189-98.
- Frey HJ, Mattila KM, Korolainen MA, Pirttilä T. Problems associated with biological markers of Alzheimer's disease. *Neurochem Res*. 2005;30(12):1501-10.
- Frota NAF, Nitrini R, Damasceno BP, Forlenza O, Dias-Tosta E, Silva AB, Herrera Jr E, Magaldi RM. Critérios para o diagnóstico de doença de Alzheimer. *Dement Neuropsychol* 2011;5(Suppl 1):5-10.
- Fujishiro H, Tsuboi Y, Lin WL, Uchikado H, Dickson DW. Co-localization of tau and α -synuclein in the olfactory bulb in Alzheimer's disease with amygdala Lewy bodies. *Acta Neuropathol*. 2008;116:17-24.
- Godoy, MDCL, Voegels RL, Pinna FR, Imamura R, Farfel JM. Olfaction in neurologic and neurodegenerative diseases: A Literature Review. *Int Arch Otorhinolaryngol*. 2015;19:176-9.
- Grinberg LT, Ferretti RE, Farfel JM, Leite R, Pasqualucci CA, Rosemberg S, Nitrini R, Saldiva PHN, Jacob Filho W. Brain bank of the Brazilian aging brain study group - a milestone reached and more than 1,600 collected brains. *Cell Tissue Bank*. 2007;8(2):151-62.
- Grinberg LT. Neuropatologia das demências. Em *Demências – enfoque multidisciplinar: das bases fisiopatológicas ao diagnóstico e tratamento*. São Paulo, Editora Atheneu, 2011.

- Herrera Jr E, Caramelli P, Silveira ASB, Nitrini R. Epidemiologic survey of dementia in a community-dwelling Brazilian population. *Alzheimer Dis Assoc Disord.* 2002;16:103-8.
- Hughes CP, Berg L, Dauziger WL, Coben LA, Martin RL. A new clinical scale for the staging of dementia. *Brit J Psychiat.* 1982;140:566-72.
- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Tábuas Completas de Mortalidade – 2013. Brasília. Disponível em: http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/projecao_da_populacao/2013/
- Ittner LM, Götz J. Amyloid- β and tau - a toxic *pas de deux* in Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci.* 2011;12(2):65-72.
- Jack CR Jr, Albert MS, Knopman DS, McKhann GM, Sperling RA, Carrillo MC, Thies B, Phelps CH. Introduction to the recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement.* 2011;7(3):257-62.
- Jack CR Jr, Knopman DS, Jagust WJ, Shaw LM, Aisen PS, Weiner MW, Petersen RC, Trojanowski JQ. Hypothetical model of dynamic biomarkers of the Alzheimer's pathological cascade. *Lancet Neurol.* 2010;9(1):119.
- Jagust WJ, Davies P, Tiller-Borcich JK, Reed BR. Focal Alzheimer's disease. *Neurology.* 1990;40:14-19.
- Jellinger KA, Attems J. Alzheimer pathology in the olfactory bulb. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2005;31(2):203.
- Jorm AF. The Informant Questionnaire on Cognitive Decline in the Elderly (IQCODE): a review. *Int Psychogeriatr.* 2004;16(3):275-93.
- Jorm AF, Jacomb PA. The informant questionnaire on cognitive decline in the elderly (IQCODE): Socio-demographic correlates, reliability, validity and some norms. *Psychol Med.* 1989;19:1015-22.
- Jorm, AF; Scott, R; Cullen, JS e MacKinnon, AJ. Performance of the informant Questionnaire on Cognitive Decline in the Elderly (IQCODE) as a screening test for dementia. *Psychol Med.* 1991;21:785-90.
- Kalache, A, Veras RP, Ramos LR. O envelhecimento da população: um desafio novo. *Rev Saúde Pública* 1987;21:200-10.
- Kern RC. Chronic sinusitis and anosmia: pathologic changes in the olfactory mucosa. *Laryngoscope.* 2000;110(7):1071-7.

- Kim KS, Choi YS, Kim HJ, et al. The risk of olfactory disturbance from conchal plate injury during ethmoidectomy. *Am J Rhinol*. 2003;17:307-10.
- Klatka LA, Schiffer RB, Powers JM, Kazee AM. Incorrect diagnosis of Alzheimer's disease. A clinicopathologic study. *Arch Neurol*. 1996;53:35-42.
- Kovács T, Cairns NJ, Lantos PL. Olfactory centres in Alzheimer's disease: olfactory bulb is involved in early Braak's stages. *Neuroreport*. 2001;12(2):285-8.
- Lanza DC1, Moran DT, Doty RL, Trojanowski JQ, Lee JH, Rowley JC 3rd, Crawford D, Kennedy DW. Endoscopic human olfactory biopsy technique: a preliminary report. *Laryngoscope*. 1993;103(7):815-9.
- Lawton MP, Brody EM. The instrumental activities of Daily Living Scale. *Gerontologist*. 1969;9:179-86.
- Lee SH, Lim HH, Lee HM, et al. Olfactory mucosal findings in patients with persistent anosmia after endoscopic sinus surgery. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 2000;109:720-25.
- Leopold DA, Hummel T, Schwob JE, Hong SC, Knecht M, Kobal G. Anterior distribution of human olfactory epithelium. *Laryngoscope*. 2000;110:417-21.
- Levine DN, Lee JM, Fischer CM. The visual variant of Alzheimer's disease: A clinicopathologic study. *Neurology*. 1993;43:305-13.
- Lim A, Tsuang D, Kukull W, Nochlin D, Leverenz J, McCormick W, Bowen J, Teri L, Thompson J, Peskind ER, Raskind M, Larson EB. Cliniconeuropathological correlation of Alzheimer's disease in a community-based case series. *J Am Geriatr Soc*. 1999;47:564-9.
- McKeith IG. Consensus guidelines for the clinical and pathologic diagnosis of dementia with Lewy bodies (DLB): report of the Consortium on DLB International Workshop. *J Alzheimers Dis*. 2006;9(3S):417-23.
- McKhann GM, Drachman D, Folstein M, Katzman R, Price D, Stadlan EM. Clinical diagnosis of Alzheimer's Disease: Report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Service Task Force on Alzheimer's Disease. *Neurology*. 1984;34(7):939-44.
- McKhann GM, Knopman DS, Chertkow H, Hyman BT, Jack CR Jr, Kawas CH, Klunk WE, Koroshetz WJ, Manly JJ, Mayeux R, Mohs RC, Morris JC, Rossor MN, Scheltens P, Carrillo MC, Thies B, Weintraub S, Phelps CH. 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):263-9.

- Mirra SS, Heyman A, McKeel D, Sumi SM, Crain BJ, Brownlee LM, Vogel FS, Hughs JP, van Belle G, Berg L. The consortium to establish a registry for Alzheimer's Disease (CERAD). Part II. Standardization of the neuropathologic assessment of Alzheimer's Disease. *Neurology*. 1991;41:479-86.
- Morris, JC. The Clinical Dementia Rating Scale (CDR): Current version and scoring rules. *Neurology*. 1993;43:2412-3.
- Morris JC. Early-stage and preclinical Alzheimer disease. *Alzheimer Dis Assoc Disord*. 2005;19:163-5.
- Nakashima T, Kimmelman CP, Snow JB Jr. Structure of human fetal and adult olfactory neuroepithelium. *Arch Otolaryngol*. 1984;110(10):641-6.
- Nasri F. O envelhecimento populacional no Brasil. *Einstein (São Paulo)*. 2008;6(Supl.1):S4-6.
- Nunes PV, Forlenza OV, Gattaz WF. Lithium and risk for Alzheimer's disease in elderly patients with bipolar disorder. *Br J Psychiatry*. 2007;190:359-60.
- Paik SI, Lehman MN, Seiden AM, Duncan HJ, Smith DV. Human olfactory biopsy. The influence of age and receptor distribution. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 1992 Jul;118(7):731-8.
- Peters JM, Hummel T, Kratzsch T, Lötsch J, Skarke C, Frölich L. Olfactory function in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease: an investigation using psychophysical and electrophysiological techniques. *Am J Psychiatry*. 2003;160(11):1995-2002.
- Petersen RC, Smith GE, Waring SC, Ivnik RJ, Tangalos EG, Kokmen E. Mild cognitive impairment: clinical characterization and outcome. *Arch Neurol*. 1999;56:303-8.
- Pinna FR, Ctenas B, Weber R, Saldiva PH, Voegels RL. Olfactory neuroepithelium in the superior and middle turbinates: which is the optimal biopsy site? *Int. Arch. Otorhinolaryngol*. 2013;17(2):131-8.
- Prince M, Albanese E, Guerhet M, Prina M. World Alzheimer Report. Dementia and risk reduction. *Alzheimer Disease International*. 2014, 104 p.
- Price JL, Morris JC. Tangles and plaques in nondemented aging and "preclinical" Alzheimer's disease. *Ann Neurol*. 1999;45(3):358-68.
- Ravid R, Van Zwieten EJ, Swaab DF. Brain banking and the human hypothalamus--factors to match for, pitfalls and potentials. *Prog Brain Res*. 1992;93:83-95.

Santos GB, Farfel JM, Grinberg LT, Ferretti REL, Leite REP, Pasqualucci CA, Nitrini R, Jacob Filho W. Acometimento do bulbo olfatório pela doença de Alzheimer. [Monografia de conclusão de curso – Biomedicina]. Universidade Bandeirante (atual Anhanguera), São Paulo, 2010.

Schmitt FA, Davis DG, Wekstein DR, Smith CD, Ashford JW, Markesbery WR. "Preclinical" AD revisited: neuropathology of cognitively normal older adults. *Neurology*. 2000;55:370-6.

Seiberling KA, Conley DB. Aging and olfactory and taste function. *Otolaryngol Clin North Am*. 2004;37(6):1209-28.

Smutzer GS, Arnold SE, Doty RL, Trojanowski JQ. Olfactory system neuropathology in neurodegenerative diseases and schizophrenia. In: Doty RL, ed. *Handbook of olfaction and gustation*. 2nd ed. New York, NY: Marcel Dekker, 2003:503-24.

Sorabi et al. (2012) Sohrabi HR, Bates KA, Weinborn MG, Johnston AN, Bahramian A, Taddei K, Laws SM, Rodrigues M, Morici M, Howard M, Martins G, Mackay-Sim A, Gandy SE, Martins RN. Olfactory discrimination predicts cognitive decline among community-dwelling older adults. *Transl Psychiatry*. 2012 May;2:e118.

Sperling RA, Aisen PS, Beckett LA, Bennett DA, Craft S, Fagan AM, Iwatsubo T, Jack CR Jr, Kaye J, Montine TJ, Park DC, Reiman EM, Rowe CC, Siemers E, Stern Y, Yaffe K, Carrillo MC, Thies B, Morrison-Bogorad M, Wagster MV, Phelps CH. Toward defining the preclinical stages of Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimer's Dement*. 2011 May;7(3):280-92.

Suemoto CK, Nitrini R, Grinberg LT, Ferretti RE, Farfel JM, Leite RE, Menezes PR, Fregni F, Jacob Filho W, Pasqualucci CA, Brazilian Aging Brain Study Group. Atherosclerosis and dementia: a cross-sectional study with pathological analysis of the carotid arteries. *Stroke*. 2011;42:3614-5.

Takada LT, Nitrini R. Diagnóstico da Doença de Alzheimer. Em *Demências – enfoque multidisciplinar: das bases fisiopatológicas ao diagnóstico e tratamento*. São Paulo, Editora Atheneu, 2011.

The Ronald and Nancy Reagan Research Institute of the Alzheimer's Association and the National Institute on Aging Working Group. Consensus report of the Working Group on: "Molecular and Biochemical Markers of Alzheimer's Disease". *Neurobiol Aging*. 1998;19(2):109-16.

Tsuboi Y, Wszolek ZK, Graff-Radford NR, Cookson N, Dickson DW. Tau pathology in the olfactory bulb correlates with Braak stage, Lewy body pathology and apolipoprotein epsilon4. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2003;29(5):503-10.

Veras RP, Ramos LR, Kalache A. Crescimento da população idosa no Brasil: Transformações e consequências na sociedade. *Rev Saúde Públ.* 1987;21:255-333.

Waldton S. Clinical observations of impaired cranial nerve function in senile dementia. *Acta Psychiatr Scand.* 1974;50(5):539-47.

Witt M, Bormann K, Gudziol V, Pehlke K, Barth K, Minovi A, Hähner A, Reichmann H, Hummel T. Biopsies of olfactory epithelium in patients with Parkinson's disease. *Mov Disord.* 2009;24(6):906-14.

Wolf-Heidegger. *Atlas de Anatomia Humana.* 6ª ed. Guanabara Koogan, 2006, 846p.

APÊNDICES

APÊNDICE 1



APROVAÇÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 11/05/2011, APROVOU o Protocolo de Pesquisa nº 177/11 intitulado: “ACOMETIMENTO DO EPITÉLIO OLFATÓRIO PELA DOENÇA DE ALZHEIMER: UM ESTUDO DE CORRELAÇÃO CLÍNICO-PATOLÓGICA ” apresentado pelo Departamento de OFTALMOLOGIA E OTORRINOLARINGOLOGIA

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

Pesquisador (a) Responsável: Prof. Dr. Richard Louis Voegels
Pesquisador (a) Executante: Maria Dantas Costa Lima Godoy

CEP-FMUSP, 12 de Maio de 2011.

Prof. Dr. Roger Chammas
Coordenador
Comitê de Ética em Pesquisa

APÊNDICE 2



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

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

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

1. NOME DO PACIENTE :

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : M F DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO : Nº APTO:

BAIRRO: CIDADE

CEP: TELEFONE: DDD (.....)

2. RESPONSÁVEL LEGAL

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)

DOCUMENTO DE IDENTIDADE : SEXO: M F DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO: Nº APTO:

BAIRRO: CIDADE:

CEP: TELEFONE: DDD (.....)

II - DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

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

2. PESQUISADOR: Lea Tezenholz Grinberg

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

UNIDADE DO HCFMUSP: Departamento de Patologia

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

SEM RISCO	<input checked="" type="checkbox"/>	RISCO MÍNIMO	RISCO MÉDIO
RISCO BAIXO		RISCO MAIOR	

4. DURAÇÃO DA PESQUISA : 3 anos

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

Muito obrigada por sua atenção.

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

Este estudo irá funcionar da seguinte maneira:

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

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

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

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

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

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

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

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

A responsável pela pesquisa em caso de dúvidas é,

Dra. Lea Tenenholz Grinberg

CRM-SP: 105290

Telefone: (011) 30667322

VI - CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

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

São Paulo, de de 200 .

assinatura do participante da pesquisa ou responsável legal

assinatura do pesquisador
(carimbo ou nome Legível)