

MESTRADO

MEDICINA LEGAL

Relação entre o tempo de colheita pós-morte e o pH do tecido como medida de qualidade num banco de cérebro

Patrícia da Silva Ferreira

M

2023

Patrícia da Silva Ferreira. Relação entre o tempo de colheita pós-morte e o pH do tecido como medida de qualidade num banco de cérebros



Relação entre o tempo de colheita pós-morte e o pH do tecido como medida de qualidade num banco de cérebros

Patrícia da Silva Ferreira



Patrícia da Silva Ferreira

**Relação entre o tempo de colheita pós-morte e o pH do tecido
como medida de qualidade num banco de cérebros**

Dissertação de candidatura ao grau de
Mestrado em Medicina Legal submetida
ao Instituto de Ciências Biomédicas Abel
Salazar da Universidade do Porto.

Orientador- Prof. Doutor Ricardo Taipa

Categoria- Médico Neuropatologista

Afiliação: Instituto de Ciências
Biomédicas Abel Salazar da
Universidade do Porto.

“As doenças são o resultado não só dos nossos atos, mas também dos nossos pensamentos.”

Mahatma Gandhi (1869-1948)

Agradecimentos

Primeiramente agradeço à minha família, em especial ao meu marido e aos meus filhos pela cedência da minha presença, obrigada pelo apoio, confiança e incentivo para fazer esta caminhada, sem a compreensão deles não teria chegado ao fim.

Agradecer à Professora Dr. Mariana Monteiro que após uma breve conversa, orientou o contato com a pessoa que seria possível desenvolver este projeto.

Ao meu orientador, Professor Dr. Ricardo Taipa por ter aceite o convite.

Aos colaboradores do Banco Português de Cérebros (PBB) pela cooperação neste projeto e pela disponibilização dos dados e material necessário para avançar com o estudo.

Agradecer ao Professor Dr. Pedro Oliveira, na ajuda da elaboração da estatística, sem ele tudo seria mais difícil.

Não podia deixar de agradecer ao Professor Dr. Artur Águas pelo incentivo e apoio na minha matrícula ao Mestrado de Medicina Legal, pois sem ele nem sequer teria iniciado esta jornada.

Aos professores em geral do mestrado, mas em especial à Professora Dr.^a Maria José Pinto da Costa que esteve sempre disponível para tudo, obrigada pelos conselhos, opiniões e incentivo que sempre deu nos momentos mais complicados, sem o seu apoio não teria a força necessária para continuar a lutar até ao fim.

Obrigada a todos os meus amigos que nos momentos de maior cansaço lembravam que os momentos ruins são passageiros e os bons virão e apagaram tudo o que foi de mau.

E quando tudo parecia ser impossível de continuar e o desânimo consome as forças, surge as pessoas que nos dão a mão e aqui fica o meu eterno agradecimento à Professora Dr.^a Maria João Oliveira, à Professora Dr.^a Paula Ferreira e à Professora Dr.^a Paula Silva.

Termino a agradecer aos meus pais, pois foram eles que transmitiram a base da minha resiliência, e também aos meus irmãos que estão sempre na fila da frente a aplaudir as minhas conquistas.

A todos vós, um abraço forte e obrigada!

Resumo

Com o envelhecimento populacional assistiu-se a um aumento do número das doenças crónicas. As patologias neurodegenerativas são um grupo de doenças progressivas e incapacitantes que aumentam exponencialmente com o envelhecimento. Consideradas estas doenças como uma das epidemias do século XXI, a comunidade científica trabalha de forma a obter respostas rápidas para travar este problema de saúde pública.

O diagnóstico definitivo das doenças degenerativas depende ainda na esmagadora maioria dos casos do exame anatomopatológico do tecido cerebral obtido de biópsia ou necropsia. De forma a conhecer melhor a sua etiopatogênese, surgiram os bancos de cérebros que trabalham de forma interdisciplinar com o objetivo de compreender e desenvolver formas de prevenção e tratamento destas doenças. Assim, o objetivo de um banco de cérebros é proporcionar tecido cerebral humano *pós-mortem* para o desenvolvimento da investigação em neurociências. O controle da qualidade dos tecidos cerebrais é uma questão fundamental em estudos cerebrais *post-mortem* para a identificação de fatores patológicos. Uma destas questões assenta sobre a relação da variabilidade do pH no tecido com o tempo de *pós-mortem*, podendo este refletir a qualidade do tecido cerebral e afetar os estudos das patologias degenerativas. O tempo e condições associadas ao processo de doação cerebral podem ser variáveis, surgindo a questão da influência do tempo/ temperatura no processo da autólise e variação do pH, em fragmentos colhidos de cérebros *pós-mortem*. Esta informação reveste-se de importância por forma a evitar discrepâncias na obtenção de resultados nos estudos efetuados com recurso a tecido dos bancos de cérebros que dependam deste fator e não do processo neurobiológico a ser estudado. Esta análise poderá igualmente ter reflexo futuro nos desenvolvimentos Médico-Legais. Com a progressão de novas técnicas de análise de tecidos, será essencial determinar valores padrão de qualidade para estes mesmos estudos e assim interpretar resultados no âmbito Médico-Legal (hora de morte, análise de novos tóxicos ou agentes nocivos, análise proteómica, etc.).

Este trabalho teve como objetivo determinar se o pH do tecido colhido *pós-mortem* é estritamente dependente do tempo de colheita e definir esta medida como um método de apoio à verificação da qualidade do tecido. Para tal foram estudadas amostras do Banco Português de Cérebros (*Portuguese Brain Bank – PBB*). Procedeu-se á consulta dos registos do PBB do Centro Hospitalar Universitário de Santo António por forma a obter: data/hora de morte, a data/hora da colheita, sexo, idade, tipo de patologia, causa de morte e o pH do tecido obtido durante a colheita. Sempre que disponível foi registada a

informação sobre a temperatura ambiental e de refrigeração que estiveram expostos os cadáveres antes da colheita do cérebro. Para a avaliação do valor preditivo do pH na qualidade do tecido para investigação recorreu-se ao método de processamento histológico das amostras por coloração Hematoxilina & Eosina para verificação do estágio da alteração celular.

Verificou-se que as medições de pH se mantêm em todas as regiões do cérebro numa média de pH entre os 6,3 e 6,4, compreendendo uma relação simétrica entre todos os casos estudados. Os nossos resultados referentes ao pH cerebral estão em concordância com outras pesquisas que demonstraram que o pH não parece mudar significativamente em função do intervalo *post-mortem* em contexto de programas de doação de tecido cerebral. De igual forma, o tempo de armazenamento do cadáver nas arcas refrigeradoras não teve influência no pH do tecido cerebral. Verificou-se uma tendência para uma maior degradação nuclear na análise histológica com o aumento do tempo da colheita.

Os nossos resultados mostraram que a metodologia do PBB proporciona tecido com qualidade similar a outros bancos de cérebros internacionais, tendo em conta que o valor de pH como medida se encontra sobreponível ao publicado na literatura. Futuramente será necessário avaliar o estado agónico, como o caso de septicemias, hipoxia, comas, isquemia e fase terminal prolongada na influencia do pH, pois no presente estudo não foi possível recolher informação neste sentido de forma a avaliar estes parâmetros.

Palavras chave: doenças degenerativas, demência, autólise, degradação tecidual, pH do tecido, banco de cérebros.

Abstract

With the ageing population there has been an increase in the number of chronic diseases associated to old age. Neurodegenerative pathologies increase exponentially with age, forming a group of progressive and disabling diseases. Considering these diseases as one of the epidemics of the 21st century, the scientific community has worked arduously to obtain answers in order to stop this public health problem.

In the overwhelming majority of cases, the definitive diagnosis of these degenerative diseases still depends on the anatomopathological examination of the brain tissue obtained from biopsy or necropsy. Therefore, to better understand their etiopathogenesis, brain banks have emerged, working in an interdisciplinary manner, with the objective of understanding these diseases and developing forms of prevention and treatment. Thus, the purpose of a Brain Bank is to provide post-mortem human brain tissue for research and neuroscience development.

Quality control of brain tissues is a key issue in post-mortem brain studies for the identification of pathological factors. One of these issues involves the relationship between the pH variability in the tissue and the post-mortem time, which may reflect on the brain tissue quality and affect the studies of degenerative pathologies.

The time and the conditions associated with the brain donation process can vary, raising the question of the influence of the time/temperature of the autolysis process and pH variation on fragments collected from post-mortem brains. This information is important to avoid discrepancies in the results obtained in studies carried out using tissue from the Brain Bank which depend on this factor and not on the neurobiological process being studied. This knowledge may also have an effect on future Medico-Legal advances. With the development of new tissue analysis techniques, it will be essential to determine quality standard values for these same studies and thus interpret results in a Medico-Legal scope (time of death, analysis of new toxic or harmful agents, proteomic analysis, etc.).

This work aimed to determine if the pH of tissue harvested post-mortem is strictly dependent on the time of harvest and to define this measure as a method to support the verification of tissue quality. For that, samples from “*Banco Português de Cérebros*” (Portuguese Brain Bank – PBB) were studied. using samples and clinical-demographic data for this purpose. The PBB records of the *Centro Hospitalar Universitário de Santo António* were consulted to obtain: date/time of death, date/time of collection, sex, age, type of pathology, cause of death and the pH of the tissue obtained during collection. Whenever

available, information was recorded at the ambient and refrigerated temperatures to which the cadavers were exposed before brain harvesting. To assess the predictive value of pH on tissue quality for research, the method of histological processing of the samples using Haematoxylin & Eosin staining was carried out to verify the stage of cellular alteration.

We found that the pH measurements show that these remain in all regions of the brain at an average pH between 6.3 and 6.4, comprising a symmetrical relationship between all the cases studied. Our results regarding the brain pH are in accordance with other studies that have shown that the pH does not seem to change significantly due to the post-mortem interval in brain donation programs. Similarly, the storage time of the corpse in the cooling coffers had no influence on the pH of the brain tissue. There was a tendency for greater nuclear degradation with increasing of the post-mortem interval.

Our results showed that the PBB methodology provides tissue with a quality similar to other international brain banks, taking into account that the pH value as a measure is comparable to that published in the literature. In the future it will be necessary to evaluate the agonic state, such as the case of septicemia, hypoxia, comas, ischemia and prolonged terminal phase in the influence of pH, because in the present study it was not possible to collect information in this sense in order to evaluate these parameters.

Key words: degenerative diseases, dementia, autolysis, tissue degradation, tissue pH, brain bank.

Lista de abreviaturas

pH – Potencial Hidrogénico

IPM – Intervalo pós-mortem

°C – Graus Celsius

PBB – Banco Português de Cérebros

CHUdSA – Centro Hospitalar Universitário de Santo António

ICBAS – Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar

EMUM – Escola de Medicina da Universidade do Minho

HE – Hematoxilina- Eosina

IMC – Índice de massa corporal

Etc.- Etecetera

ATP – Adenosina trifosfato

Índice

Agradecimentos.....	iii
Resumo	iv
Abstract	vi
Lista de abreviaturas.....	viii
Índice.....	ix
Índice de Quadros	xii
Índice de Esquemas	xiii
Índice de Figuras	xiv
Índice de Tabelas	xv
Índice de Gráficos.....	xvi
Índice de Imagens	xvii
Introdução.....	1
Revisão da literatura.....	3
A tanatognose e o tempo pós-morte	3
Influência da temperatura nos tecidos pós-morte	4
Degradação celular e autólise	4
Potencial Hidrogeniônico no tecido	5
Exame histológico	6
Questão científica	7
Objetivo geral.....	7
Objetivos específicos	7
1. Avaliar a relação entre o pH do tecido cerebral e o tempo <i>post-mortem</i>	7
2. Avaliar se o pH do tecido cerebral depende das condições de refrigeração do corpo antes da colheita.....	7
3. Avaliar o papel da causa de morte, nomeadamente a existência de septicemia, na degradação do tecido cerebral avaliado pelo pH.	7
4. Avaliar a existência de alterações microscópicas do tecido encefálico de acordo com as variáveis do ponto 1, 2 e 3.	7

5. Estabelecer com base nos objetivos prévios intervalos de tempo de colheita de forma a agrupar tecido com características de autólise similares.....	7
Materiais e métodos.....	8
Localização	8
Procedimentos técnicos para colheita e obtenção do material do PBB	8
Método de disseção (Flash Frozen) e a nomenclatura dada por região de corte.....	10
Procedimentos técnicos para recolha das amostras de congelação (Flash Frozen).....	11
Recolha de dados da base de dados do PBB relevantes ao estudo.....	12
Critérios de inclusão e exclusão	13
Análise tintorial da coloração <i>H&E</i> no programa <i>ImageJ</i>	13
Desenho do estudo	14
Análise estatística	15
Resultados.....	16
Representação do número de casos.....	16
Avaliação histológica por comparação dos diferentes intervalos de tempo	18
Histogramas da frequência de pH por regiões.....	22
Relação entre os diferentes grupos de intervalos de tempo e o pH por região do cérebro.....	25
Temperatura.....	29
Comparação histológica.....	31
Comparação tintorial entre as colorações com o menor e o maior intervalo de colheita	35
Relação do estado de preservação dos núcleos com o tempo de colheita.....	38
Discussão	39
Base fundamental do estudo.....	39
Comparação com dados de literatura.....	39
Avaliação das curvas do pH e da temperatura em função do tempo de colheita	40
Análise da componente histológica	41
Conclusão.....	42
Declaração de ética	43
Anexo 1	44
Anexo 1: Parecer da Comissão de ética do ICBAS para a realização do estudo.....	44
“Relação entre o tempo de colheita <i>pós-morte</i> e o pH do tecido como medida de qualidade num banco de cérebros”.	44
Anexo 2	45

Anexo 2: Parecer favorável do CHUdSA para o Projeto de Investigação “Banco de Cérebros para a Investigação em Doenças Neurológicas”	45
Anexo 3	46
Anexo 3: Ilustração do consentimento informado, com os esclarecimentos necessários para a aprovação do dador e autorização á realização da colheita	46
Referências Bibliográficas	47

Índice de Quadros

Quadro 1: Método de disseção (Flash Frozen) e a nomenclatura dada pelas regiões de corte	10
Quadro 2: Representação dos dados por caso em estudo	17

Índice de Esquemas

Esquema 1: Dados retirados da base de dados do PBB para análise	12
Esquema 2: Representação da evolução do tratamento de dados	14
Esquema 3: Representação dos casos em estudo inerentes ao PBB.....	16

Índice de Figuras

Figura 1: Aparelho de medição de pH (cortesia PBB)	9
Figura 2: Cérebro inteiro à esquerda e seccionado á direita (cortesia do PBB).....	9
Figura 3: Placa de congelação com os cortes orientados (cortesia do PBB).....	11

Índice de Tabelas

Tabela 1: Representação dos 20 casos selecionados com menor intervalo entre a data da morte e a data da colheita	19
Tabela 2: Representação dos 20 casos selecionados com o maior intervalo entre a data da morte e a data da colheita.....	20
Tabela 3: Descrição estatística do menor e maior intervalo de tempo entre data de morte/colheita	21
Tabela 4: Descrição estatística do menor e maior valor de pH por região do cérebro.....	21
Tabela 5: Representação estatística da divisão em 3 fases do intervalo de tempo entre data morte/colheita	24
Tabela 6: Temperatura registada no cérebro após colheita	30
Tabela 7: Representação dos valores da temperatura pelos intervalos de tempo.....	31
Tabela 8: Imagens de cortes histológicos em <i>H&E</i> , região parietal do cérebro, onde se observa os casos pelo menor intervalo de colheita: A) BC137 com 12h42min, B) BC141 com 9h10min, C) BC142 com 5h22min, D) BC146 com 8h40min, E) BC151 com 17h. ...	32
Tabela 9: Imagens de cortes histológicos em <i>H&E</i> , região parietal do cérebro, onde se observa os casos com maior intervalo de colheita: F) BC156 com 41h40min, G) BC162 com 33h20min, H) BC169 com 36h45min, I) BC175 com 65h15min, J) BC180 com 29h15min.....	33
Tabela 10: Classificação da autólise caracterizada durante a análise histológica pelos intervalos de tempo	34
Tabela 11: Descrição histológica dos casos selecionados pelo menor e maior intervalo de colheita	34
Tabela 12: Registo da contagem dos núcleos na análise tintorial	38

Índice de Gráficos

Gráfico 1: Frequência do pH frontal	22
Gráfico 2: Frequência do pH temporal	22
Gráfico 3: Frequência do pH parietal	23
Gráfico 4: Frequência do pH occipital	23
Gráfico 5: Frequência do pH cerebello	24
Gráfico 6: Relação entre os diferentes grupos de intervalo de tempo e o pH por região do cérebro	25
Gráfico 7: Representação da curva entre pontos na relação do pH frontal/intervalo	26
Gráfico 8: Representação da curva entre pontos na relação do pH temporal/intervalo	27
Gráfico 9: Representação da curva entre pontos na relação do pH parietal/intervalo	27
Gráfico 10: Representação da curva entre pontos na relação do pH occipital/ intervalo ..	28
Gráfico 11: Representação da curva entre pontos na relação do cerebello/ intervalo	28
Gráfico 12: Representação da variação da temperatura	30
Gráfico 13: Representação da temperatura com as medições de pH por região do cérebro	31
Gráfico 14: Relação entre o rácio de núcleos em degradação e o tempo após a colheita	38

Índice de Imagens

Imagem 1: Lâmina BC142, com um intervalo de colheita de 5h22min. Apresentação da coloração <i>H&E</i> apenas com a hematoxilina.	35
Imagem 2: Lâmina BC137, com um intervalo de colheita de 12h42min. Apresentação da coloração <i>H&E</i> apenas com hematoxilina.	36
Imagem 3: Lâmina BC151, com um intervalo de colheita de 17h. Apresentação da coloração <i>H&E</i> apenas com a hematoxilina.	36
Imagem 4: Lâmina BC162, com um intervalo de colheita de 33h20min. Apresentação da coloração <i>H&E</i> apenas com hematoxilina.	37
Imagem 5: Lâmina BC175, com o maior intervalo de colheita , 65h15min. Apresentação da coloração <i>H&E</i> apenas com a hematoxilina.	37

Introdução

As doenças mentais são extremamente progressivas e incapacitantes, pois levam à perda das funções cognitivas como a memória. A vida quotidiana fica altamente comprometida no que diz respeito ao desenvolvimento de tarefas pessoais, profissionais e sociais. O cuidador está sujeito a uma pressão diária que o leva a um desgaste emocional e físico, e muitas vezes sem apoios psicológicos para conseguirem ultrapassar as adversidades das dificuldades que é tratar destes doentes. O primeiro passo será sempre fazer o diagnóstico de forma a confirmar a patologia neurodegenerativa e tentar perceber se o quadro clínico é reversível [1].

A compreensão da patogénese das doenças neurodegenerativas requer tecido cerebral humano *post-mortem* referenciado com precisão.

Um biobanco enriquece à medida que adquire tecido humano de qualidade, indexado sempre com informações clínicas, demográficas e de estilo de vida. O facto de modelos animais não conferirem os requisitos necessários para os estudos das patologias neurodegenerativas, esta recolha de tecido passa por ser a melhor solução atual [2].

A colheita de cérebros humanos *post-mortem* guardados num banco de cérebros promovem muitos desenvolvimentos no entendimento dos distúrbios do sistema nervoso [3].

O *BrainNet Europe II* é constituído por uma rede de 19 bancos de cérebros espalhados por toda a Europa e tem o objetivo a recolha de tecido para ser utilizado nos estudos das demências [4].

O tecido cerebral humano é bastante escasso, pois é obtido por meio de doações realizadas principalmente durante as consultas de neurologia, não havendo neste momento mais meios de divulgações e campanhas de sensibilização. A reduzida percentagem de doações de cérebros compromete os cientistas de investigar as patologias, realizar pesquisas e promover o desenvolvimento dos investigadores [5]. Há uma necessidade urgente de encontrar apoios para proporcionar o crescimento de tecido neurológico útil para o banco de cérebros. Outras técnicas não invasivas ajudam na análises de pontos de interesse, no entanto os distúrbios cerebrais são um assunto tão complexo que requer uma análise biológica para obter maior precisão nas respostas [6]. A melhor opção será os estudos de tecido humano pós-mortem para dar avanço às pesquisas [6].

Os bancos trabalham internacionalmente, qualquer contradição pode ser transmitida a todo o mundo e pode deixar em risco a doação espontânea por parte dos doadores para os estudos das patologias neurodegenerativas. Este apoio é importante principalmente por parte das famílias afetadas por doenças do foro neurológico, particularmente quando o recurso a tecido proveniente de autópsias está a diminuir, pois o ministério público dispensa estes casos visto a causa de morte ser quase sempre consequência da patologia e não havendo indícios de outra consequência ou suspeita de morte. O desenvolvimento de opções terapêuticas para estas doenças atualmente incuráveis requer um grande esforço da comunidade científica e sensibilidade das pessoas [7].

É necessário determinar os fatores que indicam a melhor qualidade de um tecido de forma a conseguirem fazer grupos de amostras com condições semelhantes de interesse para os pesquisadores. O potencial hidrogénico (pH) sendo uma medida de equilíbrio e regulação corporal em vida pode ser apontado como um bom indicador da qualidade do RNA [8]. O pH do tecido pode variar entre as regiões do cérebro e as condições de armazenamento podem afetar o pH do tecido cerebral. A variabilidade no pH do tecido pode refletir a qualidade do tecido cerebral e afetar o perfil molecular [9].

A bibliografia sugere que a recolha do tecido cerebral humano *pós-mortem* tem sido de grande importância para a compreensão das doenças neurodegenerativas e que a análise do pH do tecido seria uma grande ajuda no controle de qualidade para estudos da patogénese das doenças cerebrais. [9]. Desta forma, tornou-se clara, que seria pertinente a avaliação do potencial hidrogénico do tecido como sendo uma possível ferramenta de controle de qualidade para estudos das doenças do sistema nervoso central.

No domínio da Medicina Forense este projeto pode refletir o avanço nas perícias que requerem um caráter minucioso das investigações pelos exames complementares de diagnóstico, nomeadamente os exames histológicos, pois podem ser usados como uma ferramenta valiosa para controlo da qualidade dos tecidos para perícias que requerem um estudo pormenorizado e rigoroso nas patologias cerebrais.

Com os devidos progressos de novas técnicas de análise de tecidos, será essencial determinar valores padrão de qualidade para estes mesmos estudos e assim interpretar resultados no âmbito Médico-Legal (hora de morte, análise de novos tóxicos ou agentes nocivos, análise proteómica, etc.). Daí a importância da caracterização da temporização entre o tempo pós-morte e o pH, quanto mais fiável o pH mais fiável o resultado médico, mais provas precisas haverá.

Revisão da literatura

A tanatognose e o tempo pós-morte

O maior anseio na Medicina Legal passa por detetar com precisão e rigor a data/hora da morte. Tem decorrido ao longo dos anos vários estudos nesse sentido. No entanto, o diagnóstico da ocorrência da morte é um assunto ainda complicado visto que o aparecimento destes fenómenos transformativos surgem depois de várias horas após ocorrer a morte [10].

A determinação para o intervalo entre o tempo em que ocorreu a morte e o achar do cadáver é designado por cronotanotognose, também conhecido por intervalo pós-morte (IPM). Esta temporização é difícil de ser especificada pois varia em relação a fenómenos cadavéricos naturais do corpo e varia de acordo com a ação de fatores internos e externos. O estudo destas alterações corporais pode datar um valor provável ou estimado [10].

Quando ocorre a paragem das grandes funções vitais é imposto o desígnio de morte anatómica, com o fim de todo o funcionamento orgânico e progride com o défice total de energia-ATP nas células dos seres vivos proporcionando a morte histológica.

Após um evento como uma paragem cardíaca, o oxigénio, sendo o principal nutriente celular começa a faltar, proporcionando a ocorrência da falência multiorgânica, sendo os neurónios imediatamente afetados, pois resistem pouco tempo com a falta deste [11].

É complexo explicar o exato momento do ponto de não-retorno, sendo qualquer situação de grande impacto capaz de terminar com o equilíbrio do metabolismo energético e síntese energética. Os exames de microscopia eletrônica ainda conseguem mostrar o aspeto de uma célula normal depois do suposto ponto de não retorno. Contudo, evidências apontam que ao microscópio ótico comum é preciso passar no mínimo 4 horas para apurar alterações. Sem recurso a equipamentos, apenas na ótica do observador após 8 a 12 horas após a morte. [11].

Os agentes patogénicos são os grandes desencadeadores da necrose, pode ser visível por uma cicatriz, como no caso do músculo do coração quando ocorre um enfarte ou então a morte de todo um tecido. A redução de energia fornecida, quer por motivos de bloqueios vasculares, obstrução das vias aéreas ou agressões diretas através de agentes químicos ou tóxicos podem levar ao desenvolvimento dessa lesão celular irreversível [11].

No domínio da ciência médico-forense a morte caracteriza-se por sinais abióticos, determinando o fim da vida. São divididos por critérios mediatos e imediatos, nos mediatos estão incluídos a paragem respiratória, cardíaca e a descida da temperatura, os imediatos na morte encefálica [11].

Embora a determinação do IPM seja extremamente importante, existem poucos estudos que descrevam a relação entre a degradação do tecido com os efeitos climáticos que o corpo está exposto e a sua relação com o pH ao longo da sua decomposição.

Influência da temperatura nos tecidos pós-morte

Os sinais abióticos mediatos são verificados ao longo do tempo na consequência da paragem metabólica. O arrefecimento gradual do corpo é um desses sinais. Após a morte a circulação sanguínea do corpo é suspensa e inevitavelmente a temperatura desce gradualmente. A descida da temperatura não se dá da mesma forma em todos os cadáveres pois depende de fatores ambientais, idade ou até do tipo de roupa consoante a estação de ano. A perda sucessiva de calor, até ficar com a mesma do meio ambiente é dominada de termogénese e podem estar envolvidos os fatores físicos de convecção, radiação, condução e evaporação [11]. Dependendo da roupa que tem vestido pode acelerar ou atrasar, no caso de corpos sem roupa a cobrir o corpo acelera; a idade e a massa corporal como no caso dos idosos, crianças e debilitados arrefecem primeiro em relação a pessoas saudáveis. Enquanto no obeso esse processo é mais demorado, assim como corpos com exposição prolongada ao sol, intoxicações e doenças infecciosas, como meningite, tétanos, tifo, cólera, septicemia, etc. (citado por Jorge Paulete (1996, s/p). Portanto, a variação da humidade e da temperatura a que o corpo está exposto após a morte pode alterar imediatamente as características do tecido independentemente do tempo pós-morte. A medição da temperatura do cadáver pode ser considerada como um método estimativo da determinação do IPM. A temperatura é obtida por regiões que não estão em contato com o meio ambiente, como as axilas e região retal.

Degradação celular e autólise

O processo destrutivo inicia-se com a autólise, que ocorre após o óbito. Os fenômenos tanatológicos transformativos do cadáver são descritos por processos de

autólise, sendo uma sequência de acontecimentos autodestrutivos de células e tecidos, proporcionando-se quando está presente uma grande acidificação do meio.

Outro fenômeno tanatológico é a putrefação e ocorre em quatro fases consecutivas. A primeira é a fase da **coloração**, atingindo a zona abdominal com uma mancha verde ao nível do fígado por ação da sulfometahemoglobina e surge entre 16h e 20h depois da morte mantendo-se em média durante sete dias. Na fase **enfisematosa ou gasosa**, os microrganismos produzem gás levando ao inchaço das cavidades, como o abdômen, e inicia-se o descolamento da epiderme e mantém-se de uma a três semanas. Posteriormente, a fase **coliquativa** que necessita de vários meses, havendo a destruição e liquefação dos tecidos. Por fim, a fase da **esqueletização**, pode precisar de alguns meses a alguns anos até a redução completa do corpo a ossos. A autólise começa com uma acumulação de dióxido de carbono nos tecidos, as enzimas lisossomais atuam no citoplasma da própria célula destruindo-a. Uma célula ao morrer liberta potentes enzimas armazenadas no seu lisossoma que darão início ao processo degradativo denominado de autólise, dando entrada à autodigestão celular. Este processo começa a desenvolver-se poucas horas após a morte, ou seja, na fase abiótica do fenômeno cadavérico e prossegue até à fase dos fenômenos destrutivos. A autólise apesar de ser um processo abiótico é melhor classificada como um processo destrutivo, uma vez que causa grandes destruições nas estruturas dos tecidos. As primeiras células a entrar em autólise, derivado à sua consistência morfológica são as células nervosas e da medula. A refrigeração é uma das formas de bloquear o metabolismo celular da autólise, equilibrando as estruturas e os componentes bioquímicos intra/ extracelulares, mantendo as estruturas teciduais os mais próximos do estado “in vivo” [12].

Potencial Hidrogeniônico no tecido

O potencial de hidrogénio é o “pH” e apresenta-se numa escala que vai de 0 a 14, sendo que 7 é o ponto neutro. O nosso corpo está constantemente a regular a temperatura e o pH, mantendo a temperatura entre os 36,5°C e o pH 7 (neutro), de forma manter o equilíbrio corporal.

A temperatura e o pH fazem parte da regulação corporal da maior diversidade de espécies que existe na natureza. Portanto, monitorizar e responder a esses parâmetros físicos e químicos é fundamental para controlar o desenvolvimento de todas as bactérias de vida livre. No laboratório, podemos controlar cuidadosamente esses fatores de

crescimento. Uma parte importante do comportamento de uma grande variedade de bactérias é a capacidade de andarem dentro de gradientes de temperatura e pH para encontrar suas condições ideais de sobrevivência. [13].

A atividade do sistema nervoso dá origem a uma variedade de mudanças de pH e temperatura extracelular e intracelular que são originados através de uma variedade de mecanismos, como a atividade física [14].

Exame histológico

A recolha de material para exame histopatológico deve ser efetuada no menor tempo possível após ocorrer o óbito porque quanto maior o tempo de morte, maior a possibilidade de autólise dos tecidos.

Quando existe suspeita de doenças que desencadeiam o rápido desenvolvimento do fenómeno de autólise, a colheita deve ser efetuada logo que possível.

As colheitas devem ser obtidas e rapidamente fixadas em formol tamponado a 10%. Depois da colheita e fixação, o material pode ser entregue ao laboratório para iniciar processamento ou pode ficar à espera da ocasião conveniente, visto que materiais fixados em formol são preservados por tempo infinito.

Questão científica

Dúvida que levou á origem do desenvolvimento desta investigação:

“A alteração do pH do tecido colhido *post-mortem* é estritamente dependente do tempo de colheita?”

Objetivo geral

Verificar a influencia do tempo/ temperatura no processo da autólise e variação do pH, em fragmentos colhidos de cérebros *post-mortem*, de forma a evitar discrepâncias na obtenção de resultados nos estudos efetuados com recurso a tecido do Banco Português de Cérebros (*Portuguese Brain Bank* – PBB) que dependam deste fator e não do processo neurobiológico a ser estudado.

Objetivos específicos

1. Avaliar a relação entre o pH do tecido cerebral e o tempo *post-mortem*.
2. Avaliar se o pH do tecido cerebral depende das condições de refrigeração do corpo antes da colheita.
3. Avaliar o papel da causa de morte, nomeadamente a existência de septicemia, na degradação do tecido cerebral avaliado pelo pH.
4. Avaliar a existência de alterações microscópicas do tecido encefálico de acordo com as variáveis do ponto 1, 2 e 3.
5. Estabelecer com base nos objetivos prévios intervalos de tempo de colheita de forma a agrupar tecido com características de autólise similares.

Materiais e métodos

Localização

Dados clínico-demográficos e amostras histológicas de cérebros provenientes de necropsias em indivíduos de ambos os sexos, portadores de doenças neurodegenerativas e dadores ao Banco Português de Cérebros (*Portuguese Brain Bank – PBB*) do Centro Hospitalar Universitário de Santo António (CHUdSA) com o protocolo estabelecido pela Unidade de Neuropatologia que detalhamos nas secções seguintes.

Procedimentos técnicos para colheita e obtenção do material do PBB

Os cérebros seleccionados para estudo foram doados pelo próprio durante o acompanhamento nas consultas de neurologia enquanto este tinha capacidades cognitivas para decidir ou então pelo familiar mais próximo quando tal já não era possível através de um formulário de consentimento informado (anexo 3).

O protocolo de doação é a ferramenta imprescindível para que se torne possível a concretização da doação do órgão para estudo.

As necropsias foram realizadas pelos médicos neuropatologistas do serviço do CHUdSA.

Após a observação do cérebro, a segunda etapa passa pela separação do hemisfério cerebral esquerdo do hemisfério cerebral direito fazendo um corte sagital ao longo da fissura longitudinal.

Uma das metades do cérebro é rapidamente submergida em formaldeído a 10%, onde fica a fixar pelo menos durante 3 semanas, sendo esta metade a que vai ser usada para o estudo histológico.

Ao fim das 3 semanas, é seccionado coronalmente e cada uma das diferentes regiões é observada criteriosamente; são escolhidos os fragmentos submetidos a blocos de parafina para os cortes histológicos e corados pela hematoxilina-eosina (HE) ou ainda processamentos de outras técnicas histológicas ou de imunohistoquímica para serem analisados pelo neuropatologista.

Procede-se com imediata medição do pH e temperatura, e dissecação do outro hemisfério, no estado fresco, o que neste estado melhoram a sua especificidade e

qualidade anatómica. São medidas nas diferentes regiões do cérebro, sendo elas a zona frontal, parietal, occipital, temporal e cerebelo através do equipamento *pH meter for skin Hanna* (Figura 1).



Figura 1: Aparelho de medição de pH (cortesia PBB)

As amostras colhidas são divididas por seções de colheita por forma a catalogar em diferentes áreas de interesse anatómico e poderem ser cedidas para investigação de acordo com a solicitação dos investigadores.



Figura 2: Cérebro inteiro à esquerda e seccionado á direita (cortesia do PBB)

Método de disseção (Flash Frozen) e a nomenclatura dada por região de corte

<u>Córtex cerebral posterior</u>	<u>Córtex cerebral anterior</u>	<u>cerebelo</u>
<ul style="list-style-type: none"> • Cortes coronais • 1cm de espessura • Começo ao nível do corpo mamilar • 9 secções – P1 a P9 	<ul style="list-style-type: none"> • Cortes coronais • 1cm de espessura • Começo ao nível do corpo mamilar • 6 a 7 secções – A1-A6/7 	
P1 - normalmente tálamo, núcleos da base da região posterior	A1 - núcleos da base , putamen, globo pálido lateral e médio e hipotálamo	Fragmento do vermis do cerebelo - corte com 0,5cm paralelo com a linha média cerebelar. Linha média em contato com a placa fria
P2 - pode ou não conter tálamo e hipocampo	A2 - núcleos da base da comissura anterior	Núcleo dentado - corte parasagital no hemisfério cerebeloso de ¼ da linha média. Superfície medial em contato com a placa fria
P3 - pode ou não conter o hipocampo	A3 -núcleos da base ao nível do <i>nucleus accumbens</i> , o bloco frontal anterior	Restante hemisfério cortar em seções parasagitais
P4 a P9 - as seções restantes deixadas intatas	A4- 6 - seções deixadas intatas	NOTA: 5 a 6 fragmentos para congelar e ainda em tubos de 1,5ml colocar cerebelo para estudos de pH e DNA.

Quadro 1: Método de disseção (Flash Frozen) e a nomenclatura dada pelas regiões de corte

Procedimentos técnicos para recolha das amostras de congelação (Flash Frozen)

A 2ª metade do cérebro é fotografada antes de iniciar a dissecação.

Retira-se o bulbo olfativo, faz-se a colheita do líquido cefalorraquidiano, mede-se o pH e a temperatura.

Faz-se um corte coronal através do hemisfério dos corpos mamilares para separar o córtex anterior e posterior.

Seguidamente fazem-se os cortes de toda a metade do cérebro e são colocados numa placa de congelação.

Nesta fase retira-se um pequeno fragmento do córtex frontal para um tubo de *Falcon* com formol a 10% para despiste da doença priónica.

A técnica de congelamento utilizada é denominada de “flash frozen”, pois garante um congelamento instantâneo do tecido numa placa de titânio que os mantém a uma temperatura de -80°C .

O método de preservação “flash frozen” evita o descongelamento-recongelamento do corte das regiões de interesse, o que se tornava degradativo quer para as amostras quanto para os cérebros de origem.



Figura 3: Placa de congelação com os cortes orientados (cortesia do PBB)

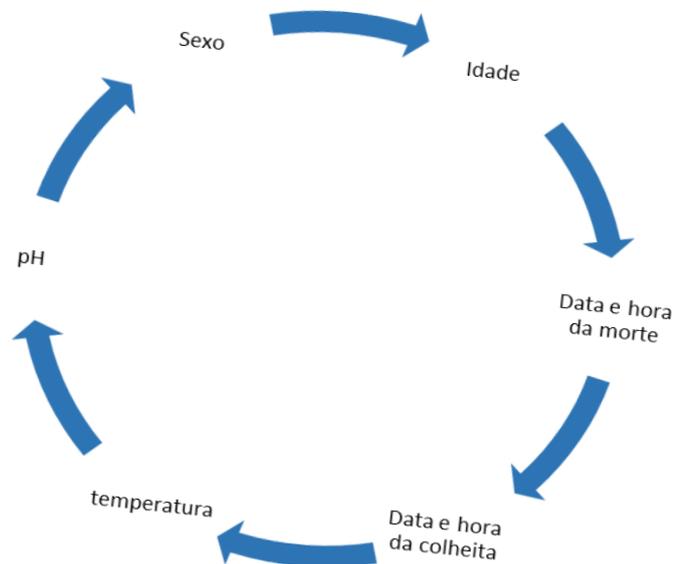
Recolha de dados da base de dados do PBB relevantes ao estudo

Todos os dados provenientes do certificado de óbito, boletim de informação clínica, recolha de parâmetros durante a colheita do órgão e diagnósticos histológicos são registados na base de dados do PBB.

Procedeu-se á consulta dos registos na base de dados do PBB por forma a obter: data/hora de morte, a data/hora da colheita, sexo, idade, pH e temperatura do tecido obtido na colheita (esquema 1).

Efetuaram-se os registos dos parâmetros de interesse e os cálculos dos intervalos de tempo entre a data da morte e a data da colheita (ilustrado no Quadro 2).

Posteriormente, para a avaliação do valor preditivo do pH na qualidade do tecido para investigação recorreu-se ao método de processamento histológico das amostras por coloração Hematoxilina & Eosina para verificação da alteração celular e finalizando com uma análise tintorial.



Esquema 1: Dados retirados da base de dados do PBB para análise

Critérios de inclusão e exclusão

Foram incluídos todos os casos de doações que continham a descrição detalhada e necessária para o estudo, nomeadamente, sexo, idade, data da morte, data da colheita, pH, temperatura e patologias associadas.

Foram criteriosamente verificadas as datas de morte pelo certificado de óbito de forma a que o cálculo do intervalo não fosse enviesado por erros de transcrição. Em seguida, foram selecionados os 20 casos com maior intervalo entre a data de morte e a colheita do cérebro e os 20 casos com o menor intervalo de tempo, isto para estudos de correlação de tempo. Dentro destes foram tratados laboratorialmente 5 casos de cada um dos grupos, todos com doença de Alzheimer, para obtenção de lâminas com os cortes histológicos para observação ao microscópio.

Os casos realçados a amarelo, na tabela 1 e tabela 2, representam os casos que foram selecionados para análise histológica de forma a verificar se houve alteração celular no tecido pelos diferentes intervalos de tempo.

Foram excluídos todos os casos que não tinham os registos acima descritos.

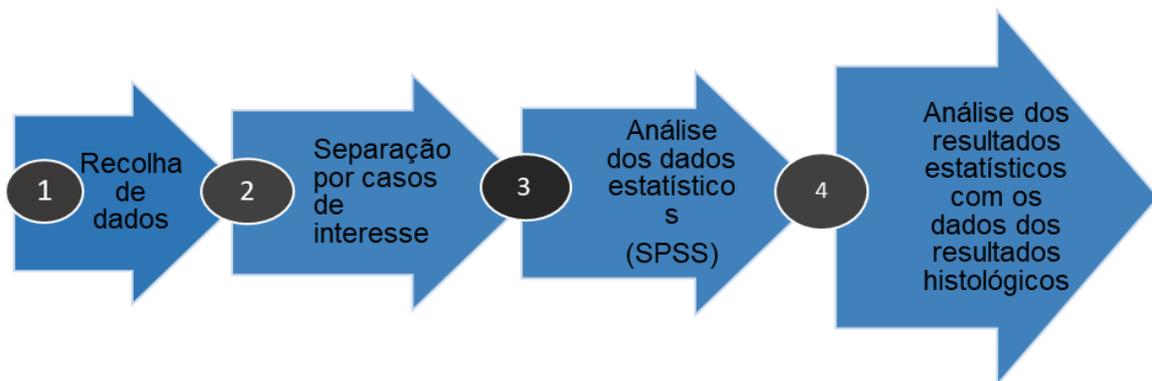
Análise tintorial da coloração *H&E* no programa *ImageJ*

Dado o tempo de post-mortem ser relativamente reduzido para objetivar alterações morfológicas, assim como devido a alterações inerentes às diferentes patologias neurodegenerativas de base, para esta análise foi registada e comparadas as propriedades tintoriais da *H&E*. Para tal as lâminas foram digitalizadas no sistema 3DHistech P1000 Digital Pathology System a 20x. A qualidade de cada digitalização foi posteriormente controlada no software 3DHistech CaseViewer. A partir do programa ImageJ dividiu-se a coloração de *H&E* na sua componente de hematoxilina e eosina. Obtendo-se uma visualização isolada dos núcleos, de forma a perceber se estes se encontram íntegros ou em estado de degeneração nos diferentes intervalos de tempo. Assim, no referido programa, contabilizou-se o total de núcleos presentes, num campo de igual dimensões de cada lâmina, e posteriormente contabilizaram-se os núcleos que demonstravam início de degradação pela observação da simetria e consistência da substância nuclear representada a azul pela coloração *H&E* e ainda a observação do estado da cromatina.

Esta análise foi realizada cega para os dados clínicos e tempo de colheita dos casos.

Desenho do estudo

- 1- Observação de todos os processos inseridos na base de dados do PBB para confirmação dos dados de interesse para o estudo,
- 2- Obtenção de cópias com os dados de interesse para formação dos grupos com a respetiva informação de interesse,
- 3- Separação dos casos de interesse por sexo, idade á morte, data de óbito, data de colheita, pH, temperatura e patologia neurodegenerativa,
- 4- Estudo da associação entre as variáveis, nomeadamente o pH e a temperatura com o intervalo de tempo entre morte/colheita,
- 5- Obtenção de cortes histológicos para análise da alteração celular na sua evolução com o tempo entre a data da morte e a data da colheita,
- 6- Análise dos dados obtidos.



Esquema 2: Representação da evolução do tratamento de dados

Análise estatística

A estatística elaborada é baseada em todos os casos com dados válidos. A data de morte, data de colheita, medidas de pH e temperatura foram as variáveis estudadas. As frequências das variáveis: pH_frontal, pH_temporal, pH_parietal, pH_occipital, pH_cerebelo e temperatura foram verificadas através *STATISTICS=STDDEV* estabelecendo a faixa de variação entre o mínimo, máximo, média e mediana com representação em histogramas. A análise das variáveis: pH_ frontal, pH_temporal, pH_parietal, pH_occipital e pH_cerebelo com a diferença entre a data de morte e a data de colheita foi estudada através *BOXPLOT/STATISTICS* por forma a verificar as oscilações entre elas. O gráfico *SCATTERPLOT(BIVAR)* foi usado para apresentarem as curvas de crescimento entre o pH por região e o intervalo de tempo. O *T-TEST* foi estudado para comparar as médias dos diferentes grupos dos intervalos de tempo. A correlação entre o pH das diferentes regiões com a temperatura foi efetuada com base em testes não paramétricos e realizado o gráfico *SCATTERPLOT(MATRIX)* de forma a expressar a dispersão da temperatura pelas medidas de pH registadas nas diferentes regiões do cérebro.

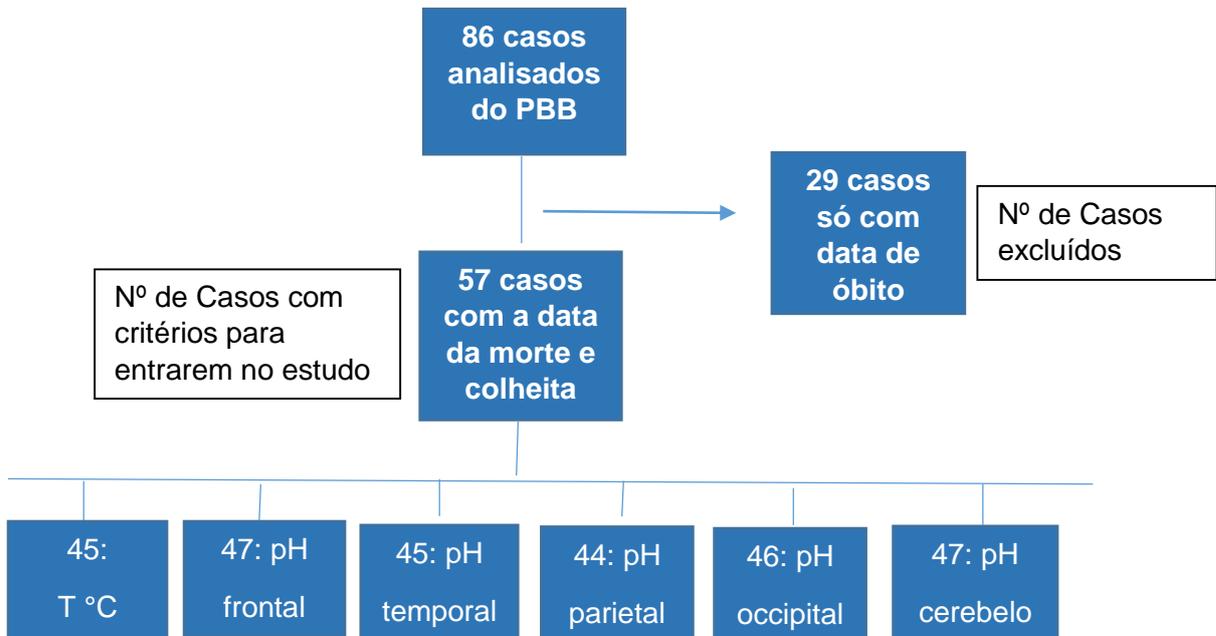
Para a análise da avaliação dos núcleos pela marcação da hematoxilina (análise tintorial) foi calculado o rácio do número de núcleos com degradação tendo em conta o número total de núcleos de cada caso. Foi realizada uma correlação de Spearman para avaliar a relação entre este rácio e tempo após a colheita.

Resultados

Representação do número de casos

Foram analisados 86 casos do PBB, seguindo os passos 1 e 2 mencionados no desenho do estudo.

A distribuição dos casos registados no PBB pela data de morte, data de colheita, medidas de pH e temperatura, está descrita no esquema 3.



Esquema 3: Representação dos casos em estudo inerentes ao PBB

Dados recolhidos da base de dados sujeitos a análise

N°INT	SEXO	IDADE	DATA_MORTE	DATA_COLHEITA	MORTE_COLHEITA	pH_FRONTAL	pH_TEMPORAL	pH_PARIETAL	pH_OCCIPITAL	pH_CEREBELO	T°C
BC116	M	73	08/02/2016 09:20	08/02/2016 13:15	03:55	9999	9999	9999	9999	9999	9999
BC124	M	66	29/08/2016 10:25	29/08/2016 15:30	05:05	9999	9999	9999	9999	9999	9999
BC125	M	63	27/10/2016 05:40	27/10/2016 13:15	07:35	9999	9999	9999	9999	9999	9999
BC126	F	58	10/11/2016 05:55	10/11/2016 12:50	06:55	9999	9999	9999	9999	9999	9999
BC128	M	55	03/01/2017 05:30	03/01/2017 15:45	10:15	9999	9999	9999	9999	9999	9999
BC129	F	79	30/03/2017 13:00	31/03/2017 12:30	23:30	9999	9999	9999	9999	9999	9999
BC130	M	60	08/04/2017 06:50	08/04/2017 14:19	07:29	9999	9999	9999	9999	9999	9999
BC131	M	51	09/04/2017 10:30	09/04/2017 15:38	05:08	9999	9999	9999	9999	9999	9999
BC132	F	70	19/05/2017 12:00	20/05/2017 10:50	22:50	9999	9999	9999	9999	9999	9999
BC134	M	68	07/11/2017 07:35	07/11/2017 16:40	09:05	9999	9999	9999	9999	9999	9999
BC135	F	71	08/11/2017 07:18	08/11/2017 16:35	09:17	5,88	9999	5,85	6,03	5,98	9999
BC136	M	51	04/01/2018 08:00	04/01/2018 16:52	08:52	6,18	6,15	9999	6,45	6,34	21,2
BC137	M	65	04/03/2018 23:45	05/03/2018 12:27	12:42	6,36	6,37	6,10	6,63	6,10	21,0
BC0138	F	68	15/03/2018 11:44	15/03/2018 18:22	06:38	6,18	6,28	6,28	6,11	5,91	23,0
BC0139	F	68	26/01/2018 10:30	26/01/2018 15:30	05:00	6,07	9999	9999	9999	6,02	23,2
BC0140	F	69	04/05/2018 00:00	17/05/1927 00:00	9999	9999	9999	9999	9999	9999	9999
BC0141	M	78	06/06/2018 07:15	06/06/2018 16:25	09:10	5,64	5,68	5,67	5,77	5,77	24,0
BC0142	M	62	01/08/2018 07:05	01/08/2018 12:27	05:22	6,24	6,27	6,07	6,27	6,21	25,9
BC0143	M	50	11/08/2018 09:52	12/08/2018 17:14	31:22:00	6,32	6,52	9999	6,45	6,30	24,0
BC0144	F	67	24/10/2018 06:00	24/10/2018 14:15	08:15	6,3	6,47	6,33	6,19	6,36	26,0
BC0145	M	69	16/11/2018 21:45	17/11/2018 18:00	20:15	6,3	6,42	6,45	6,41	6,34	23,0
BC0146	M	74	27/03/2019 06:45	27/03/2019 15:25	08:40	6,26	6,30	6,38	6,41	6,4	23,5
BC0147	M	79	15/04/2019 12:15	16/04/2019 11:00	22:45	6,37	6,47	6,51	6,54	6,47	19,7
BC148	F	72	16/05/2019 09:30	17/05/2019 11:29	25:59:00	6,51	6,46	6,45	6,11	6,35	23,6
BC0149	F	65	14/07/2019 16:30	15/07/2019 16:13	23:43	6,61	6,82	6,64	6,57	6,41	25,0
BC0150	F	83	08/08/2019 02:06	08/08/2019 14:15	12:09	6,11	6,11	5,88	6,03	5,93	25,0
BC0151	M	63	17/08/2019 00:20	17/08/2019 17:20	17:00	6,16	6,18	6,19	6,14	6,01	25,0
BC0152	F	49	07/09/2019 12:30	08/09/2019 15:00	26:30:00	6,41	6,51	6,54	6,49	6,47	26,0
BC0153	M	74	22/09/2019 07:15	23/09/2019 12:50	29:35:00	6,39	6,43	6,44	6,32	6,40	24,6
BC0154	F	78	18/10/2019 04:00	18/10/2019 13:15	09:15	6,31	6,31	6,20	6,17	6,21	23,0
BC0155	F	68	12/12/2019 01:00	12/12/2019 15:54	14:54	6,45	6,40	6,34	6,20	6,36	22,8
BC0156	F	77	05/01/2020 00:00	06/01/2020 17:40	41:40:00	7,2	7,18	7,09	6,78	6,78	21,0
BC0157	M	59	10/01/2020 16:30	11/01/2020 10:55	18:25	6,41	6,44	6,40	6,40	5,93	18,0
BC0158	F	69	23/01/2020 04:00	24/01/2020 10:30	30:30:00	6,29	6,62	6,27	6,17	6,33	20,5
BC0159	M	75	16/02/2020 00:00	17/02/2020 16:50	40:50:00	6,51	6,56	6,62	6,40	6,44	20,0
BC0160	M	67	20/02/2020 16:50	21/02/2020 14:07	21:17	6,59	6,33	6,41	6,58	6,61	22,8
BC0161	M	64	13/03/2020 14:00	14/03/2020 11:00	21:00	6,39	6,36	6,41	6,41	6,50	22,0
BC0162	F	60	15/03/2020 02:30	16/03/2020 11:50	33:20:00	5,94	5,94	5,95	6,05	5,99	21,0
BC0163	M	65	27/05/2020 17:30	28/05/2020 12:40	19:10	6,57	6,52	6,46	6,41	6,47	28,0
BC0165	F	81	04/06/2020 00:10	04/06/2020 16:58	16:48	6,23	6,39	6,30	6,30	6,32	25,0
BC0166	F	70	12/05/2020 00:00	19/06/2020 00:00	9999	9999	9999	9999	9999	9999	9999
BC0167	M	39	22/07/2020 14:50	23/07/2020 16:00	25:10:00	5,99	6,27	6,40	6,20	6,34	25,8
BC0168	F	18	23/10/2020 00:15	24/10/2020 12:39	36:24:00	6,55	6,43	6,48	6,29	6,52	21,0
BC0169	F	80	29/10/2020 22:50	31/10/2020 11:35	36:45:00	6,20	6,23	6,30	6,21	6,33	21,0
BC0170	F	68	01/11/2020 18:30	03/11/2020 12:10	41:40:00	6,59	6,63	6,30	6,50	6,17	24,0
BC0171	M	77	19/11/2020 00:00	10/12/2020 00:00	9999	9999	9999	9999	9999	9999	9999
BC0172	F	72	08/12/2020 19:45	09/12/2020 18:00	22:15	6,40	6,61	6,34	6,48	6,47	21,5
BC0173	M	87	25/12/2020 06:30	26/12/2020 10:00	27:30:00	6,47	6,51	6,57	6,42	6,53	17
BC0174	M	71	13/01/2021 00:25	13/01/2021 12:40	12:15	6,57	6,39	6,71	6,62	6,68	19,0
BC175	F	77	29/01/2021 23:45	01/02/2021 17:00	65:15:00	6,42	6,47	6,41	6,30	6,54	9999
BC178	F	66	29/04/2021 07:00	30/04/2021 10:30	27:30:00	6,21	6,08	6,26	6,04	6,12	20,1
BC0179	M	72	13/05/2021 20:44	14/05/2021 14:45	18:01	6,53	6,59	6,43	6,39	6,39	24,0
BC0180	M	60	14/05/2021 06:30	15/05/2021 11:45	29:15:00	6,75	6,81	7,11	6,77	6,95	20,9
BC0181	F	64	09/06/2021 03:20	10/06/2021 10:45	31:25:00	6,35	6,42	6,14	6,47	5,96	22,3
BC0182	F	76	31/10/2021 08:30	01/11/2021 10:15	25:45:00	6,19	6,16	6,18	6,11	6,12	21,4
BC0183	M	80	24/12/2021 01:45	26/12/2021 11:10	57:25:00	7,07	6,9	6,87	7,10	6,84	19,5
BC0184	M	75	21/02/2022 21:42	22/02/2022 14:00	16:18	6,37	6,32	6,32	6,38	6,25	21,3
BC0185	M	71	06/03/2022 23:55	07/03/2022 14:45	14:50	6,48	6,53	6,39	6,41	6,58	20,5
BC0186	M	74	12/03/2022 09:20	13/03/2022 11:05	25:45:00	6,5	6,29	6,25	6,31	6,45	19,0
BC0187	M	76	25/03/2022 21:30	26/03/2022 10:50	13:20	6,42	6,40	6,33	6,13	6,54	22,0

Quadro 2: Representação dos dados por caso em estudo

Avaliação histológica por comparação dos diferentes intervalos de tempo

De maneira a definir a divisão do intervalo de tempo entre a data da morte/colheita em **3 grupos**, configurando numa **fase de colheita como precoce, intermédia e tardia** de tempos, efetuou-se uma divisão em **3 grupos com igual número de casos**. Obteve-se a divisão dos tempos (representação na tabela 5), que a partir da qual, posteriormente classificou-se morfologicamente as análises histológicas das colorações.

Foram selecionados cortes da mesma região do cérebro, sendo da zona parietal e todos com doença de Alzheimer, com imagens das regiões idênticas de forma a concluir a identificação da alteração celular pela distribuição dos intervalos de tempo.

Para avaliação do nível de autólise dos fragmentos colhidos, foram atribuídas as seguintes classificações após observação histológica: **discreto**, quando se observa neurónios com arquitetura celular mantida (autólise discreta); **moderado**, perda de definição celular neuronal e **acentuado**, com maior perda da definição celular do cérebro. Dividiram-se as imagens da microscopia em dois grupos, o primeiro grupo referente às cinco colheitas com menor tempo de colheita e o segundo grupo com as restantes, de maior tempo de colheita (tabela 1 e 2).

Tabela dos casos com os menores intervalos de tempo

Nº DADOR	SEXO	IDADE Á MORTE	INTERVALO ENTRE DATA MORTE/COLHEITA	PATOLOGIA
BC0135	F	71	9H17MIN	Paralisia supranuclear progressiva
BC0136	M	51	8H52MIN	Degenerescência lobar frontotemporal associada a doença de neurónio motor
BC0137	M	65	12H42MIN	Doença de Alzheimer, Angiopatia amilóide cerebral
BC0138	F	68	6H38MIN	Paralisia supranuclear progressiva
BC0139	F	68	5H00MIN	Hemorragia protuberancial, Amiloidose meningovascular e subpial por TTR

BC0141	M	78	9H10MIN	Doença de Alzheimer, Angiopatia amilóide cerebral A β
BC0142	M	62	5H22MIN	Doença de Alzheimer, Angiopatia amilóide cerebral A β
BC0144	F	67	8H15MIN	Ataxia de natureza indeterminada
BC0146	M	74	8H40MIN	Doença de Alzheimer
BC0150	F	83	12H09MIN	Paralisia Supranuclear Progressiva, Patologia de Alzheimer, Patologia de Lewy
BC0151	M	63	17H00MIN	Doença de Alzheimer
BC0154	F	78	9H15MIN	Paralisia Supranuclear Progressiva
BC0155	F	68	14H54MIN	Amiloidose meningovascular e subpial por TTR (CAA severa)
BC0157	M	59	18H25MIN	Paralisia Supranuclear Progressiva
BC0165	F	81	16H48MIN	Degenerescência Corticobasal
BC0174	M	71	12H15MIN	Angiopatia amiloide cerebral
BC0179	M	72	18H01MIN	Controlo
BC0184	M	75	16H18MIN	Demência vascular
BC0185	M	71	14H50MIN	Degenerescência corticobasal
BC0187	M	76	13H20MIN	Doença de Alzheimer

Tabela 1: Representação dos 20 casos selecionados com menor intervalo entre a data da morte e a data da colheita

Tabela dos casos com os maiores intervalos de tempo

Nº DE DADOR	SEXO	IDADE À MORTE	INTERVALO ENTRE DATA MORTE/ COLHEITA	PATOLOGIA
BC0143	M	50	31H22MIN	Esclerose lateral amiotrófica (TDP43+) associada a mutação do gene C9orf72.

BC0148	F	72	25H59MIN	Atrofia de múltiplos sistemas
BC0152	F	49	26H30MIN	Achados compatíveis com ataxia espinocerebelosa tipo 3 (SCA3) / Machado-Joseph
BC0153	M	74	29H35MIN	Doença de Parkinson
BC0156	F	77	41H40MIN	Doença de Alzheimer
BC0158	F	69	30H30MIN	Doença de Alzheimer e Demência com Corpos de Lewy
BC0159	M	75	40H50MIN	Paralisia supranuclear progressiva
BC0162	F	60	33H20MIN	Doença de Alzheimer
BC0164	F	79	95H15MIN	Doença de Alzheimer associada a doença cerebrovascular
BC0168	F	18	36H24MIN	Niemann-Pick tipo C
BC0169	F	80	36H45MIN	Doença de Alzheimer e demência Vascular
BC0170	F	68	41H40MIN	Paralisia Supranuclear Progressiva
BC0173	M	87	27H30MIN	Doença de Alzheimer
BC0175	F	77	65H15MIN	Doença de Alzheimer
BC0178	F	66	27H30MIN	Demência Fronto-temporal e Patologia neuronal de Lewy
BC0180	M	60	29H15MIN	Doença de Alzheimer
BC0181	F	64	31H25MIN	Angiopatia amiloide
BC0182	F	76	25H45MIN	Paralisia supranuclear progressiva
BC0183	M	80	57H25MIN	Doença de Parkinson
BC0186	M	74	25H45MIN	Doença de Alzheimer

Tabela 2: Representação dos 20 casos selecionados com o maior intervalo entre a data da morte e a data da colheita

Durante os procedimentos de colheita foram descritas as várias alterações morfológicas, assim como as medições dos parâmetros cruciais para a testagem da fiabilidade da qualidade da amostra.

De acordo com os cálculos do intervalo de tempo dos casos existentes no PBB, entre a data da morte e a data da colheita do cérebro, observou-se que o menor intervalo foi aproximadamente 4 horas e o maior intervalo de tempo foi de 65 horas, com um único

caso com um registo de tempo tão elevado (tabela 3 abaixo, e representados valores no quadro 2 acima).

Representação do menor e maior intervalo de tempo

		INTERVALO
Nº	Validos	57
	Ausentes	29
Media		20,7
Mediana		19,2
Desvio padrão		13,0
Variância		169,1
Faixa		61,3
Mínimo		3,9
Máximo		65,2

Tabela 3: Descrição estatística do menor e maior intervalo de tempo entre data de morte/colheita

Foram analisadas as medições de pH entre as diferentes regiões; frontal, temporal, parietal, occipital e cerebelo, verificando-se o mínimo de 5,5 e um máximo de 7,2 (tabela 4 e histogramas abaixo).

Representação do menor e maior valor de pH por região

		pH_ FRONTAL	pH_ TEMPORAL	pH_ PARIETAL	pH_ OCCIPITAL	pH_ CEREBELO
Nº	Validos	47	45	44	46	47
	Ausentes	39	41	42	40	39
Media		6,4	6,4	6,4	6,3	6,3
Mediana		6,4	6,4	6,4	6,4	6,4
Desvio Padrão		0,3	0,2	0,3	0,2	0,2
Variância		0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Faixa		1,6	1,5	1,4	1,3	1,2
Mínimo		5,5	5,7	5,7	5,8	5,8
Máximo		7,2	7,2	7,1	7,1	6,9

Tabela 4: Descrição estatística do menor e maior valor de pH por região do cérebro

Histogramas da frequência de pH por regiões

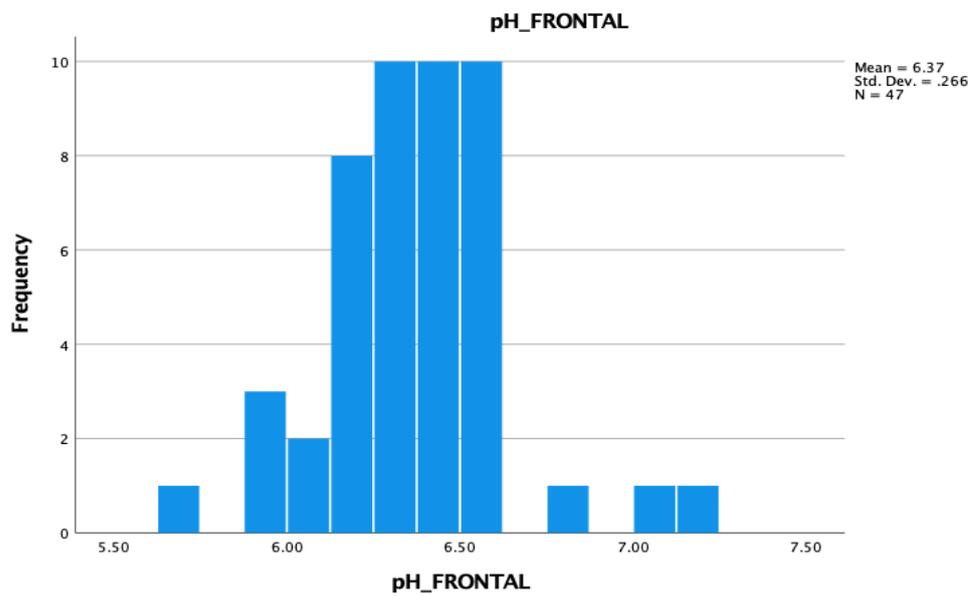


Gráfico 1: Frequência do pH frontal

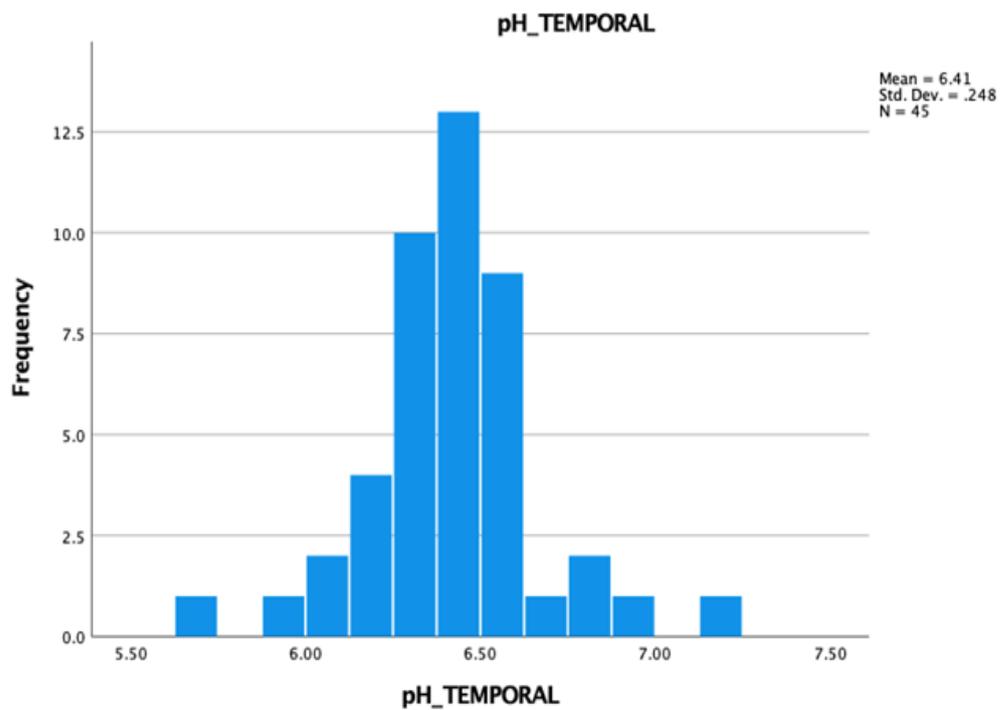


Gráfico 2: Frequência do pH temporal

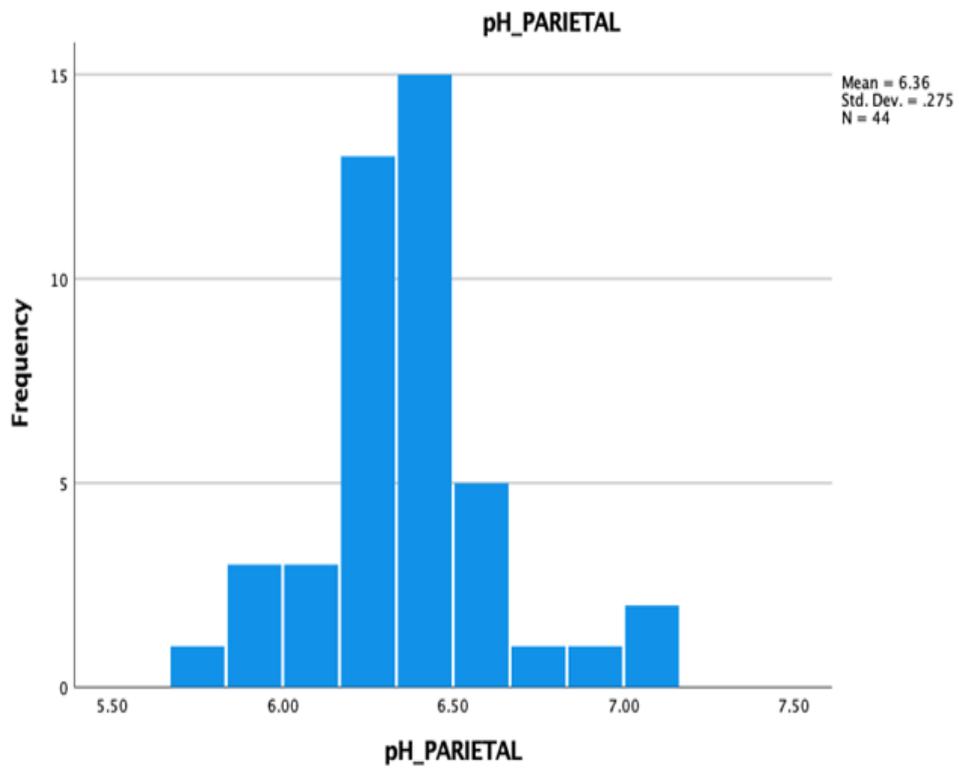


Gráfico 3: Frequência do pH parietal

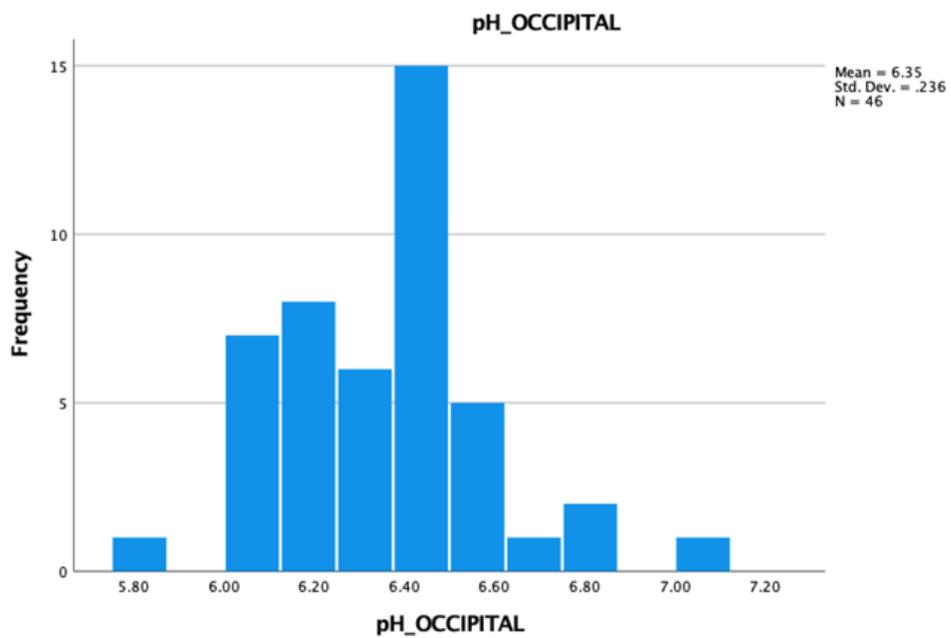


Gráfico 4: Frequência do pH occipital

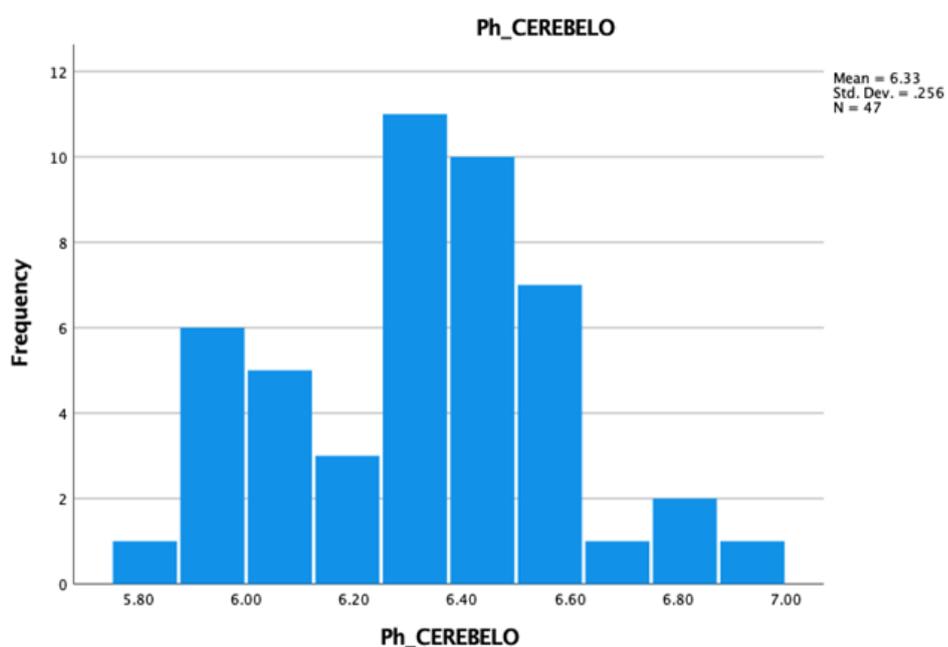


Gráfico 5: Frequência do pH cerebello

Grupos dos intervalos de tempo de colheita

		Frequência	Percent	Percent validados	Percent Cumulativa
Validados	<= 12,25	19	22,1	33,3	33,3
	12,26 – 25.17	19	22,1	33,3	66,7
	25,18+	19	22,1	33,3	100,0
	Total	57	66,3	100,0	
Ausentes	9999	3	3,5		
	Sistema	26	30,2		
	Total	29	33,7		
Total		86	100,0		

Tabela 5: Representação estatística da divisão em 3 fases do intervalo de tempo entre data morte/colheita

Relação entre os diferentes grupos de intervalos de tempo e o pH por região do cérebro

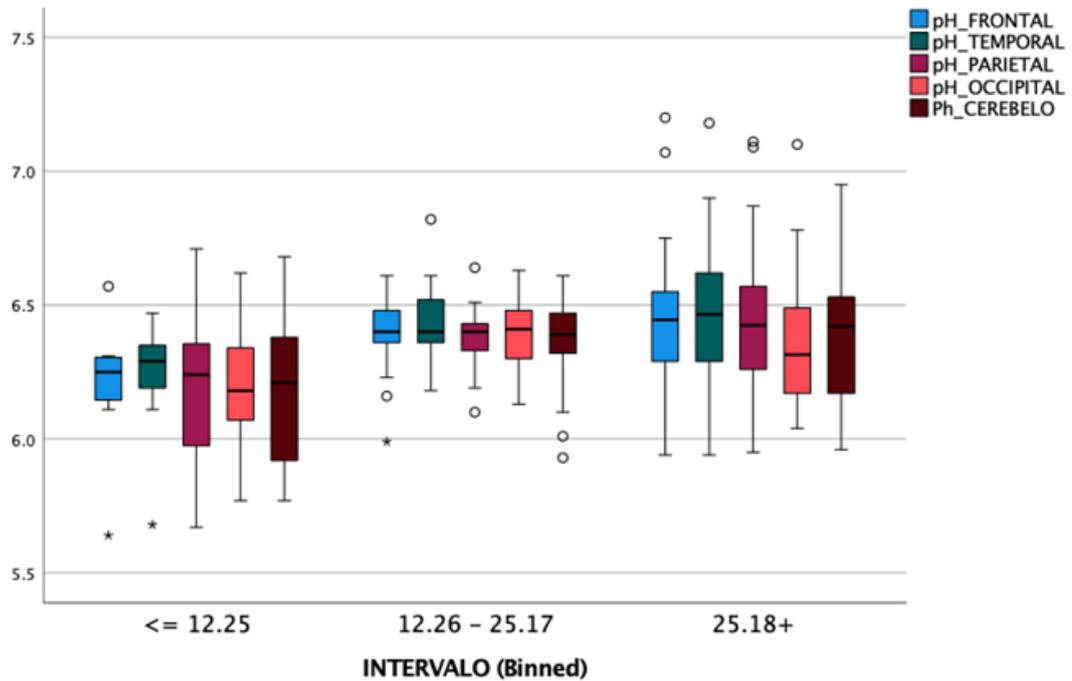


Gráfico 6: Relação entre os diferentes grupos de intervalo de tempo e o pH por região do cérebro

No gráfico 6, anteriormente representado, podemos observar a variação do pH nas diferentes regiões do cérebro com os diferentes grupos de intervalos de tempo de colheita.

Em relação ao intervalo de tempo de colheita antes das 12 horas verificamos que o pH, numa perspetiva global, cresce ligeiramente em comparação com o aumento dos intervalos de tempo representados, seja entre as 12 horas / 25 horas, ou mesmo quando o tempo de colheita ultrapassa as 25 horas. Pormenorizadamente verifica-se que o pH frontal nas colheitas inferiores às 12 horas está entre os 6,2 e sobe gradualmente para os 6,3 no intervalo das 12 às 25 horas e para os 6,4 para o intervalo de colheita superior a 25 horas. Na observação do pH temporal podemos verificar que este se encontra ligeiramente aumentado em relação aos valores do pH frontal no intervalo de colheita inferior às 12 horas, mas mantém-se equiparado com o pH frontal no intervalo das 12 às 25 horas, aumentando ligeiramente nas colheitas superiores a 25 horas. No que diz respeito ao pH parietal podemos verificar que o pH diminui ligeiramente em relação ao pH frontal e temporal em todos os intervalos de tempo de colheita. O pH occipital é aquele que no primeiro intervalo de colheita, antes das 12 horas, apresenta um menor pH, subindo ligeiramente no intervalo das 12 às 25 horas e no maior tempo de colheita o pH desce

bastante em relação aos anteriormente observados. Por fim, em relação ao pH do cerebello, sobe ligeiramente com o aumento do tempo de colheita.

Após esta análise, da relação do pH com os diferentes grupos de intervalos de tempo das colheitas do cérebro, foi necessário apurar a curva de crescimento entre o pH das diferentes regiões de forma a conseguirmos perceber se este seria diferente entre eles.

Curvas de crescimento entre o pH por região e o intervalo de tempo

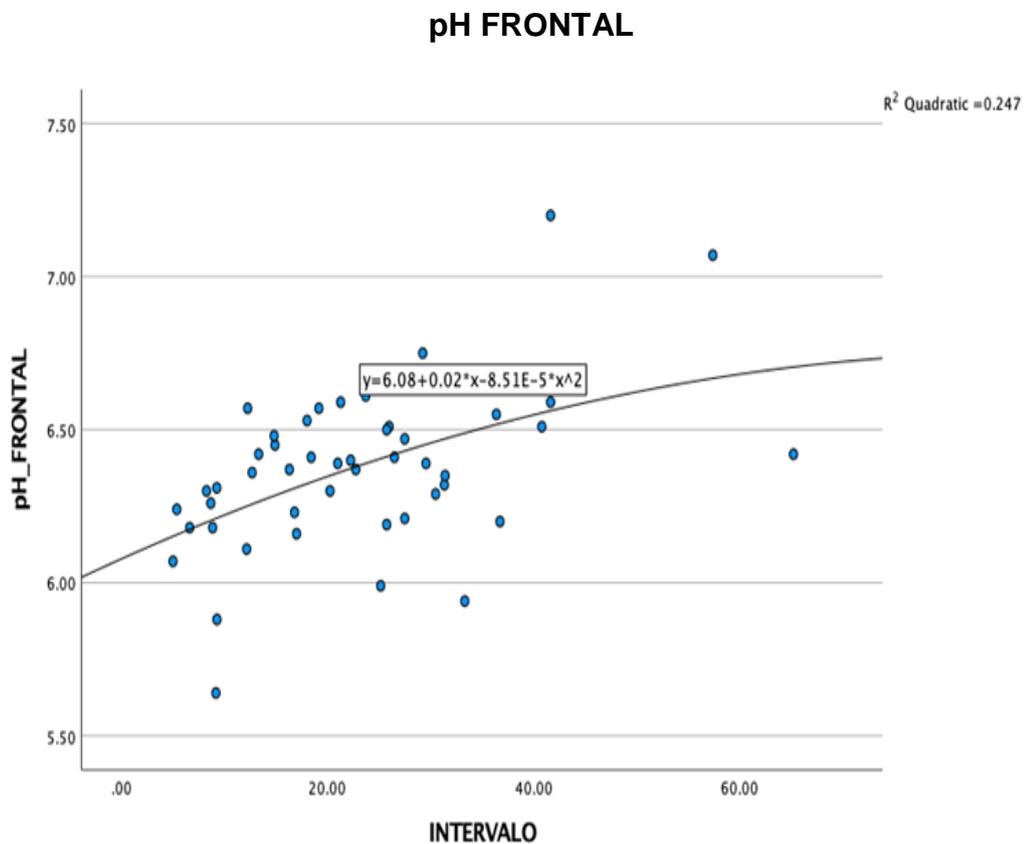


Gráfico 7: Representação da curva entre pontos na relação do pH frontal/intervalo

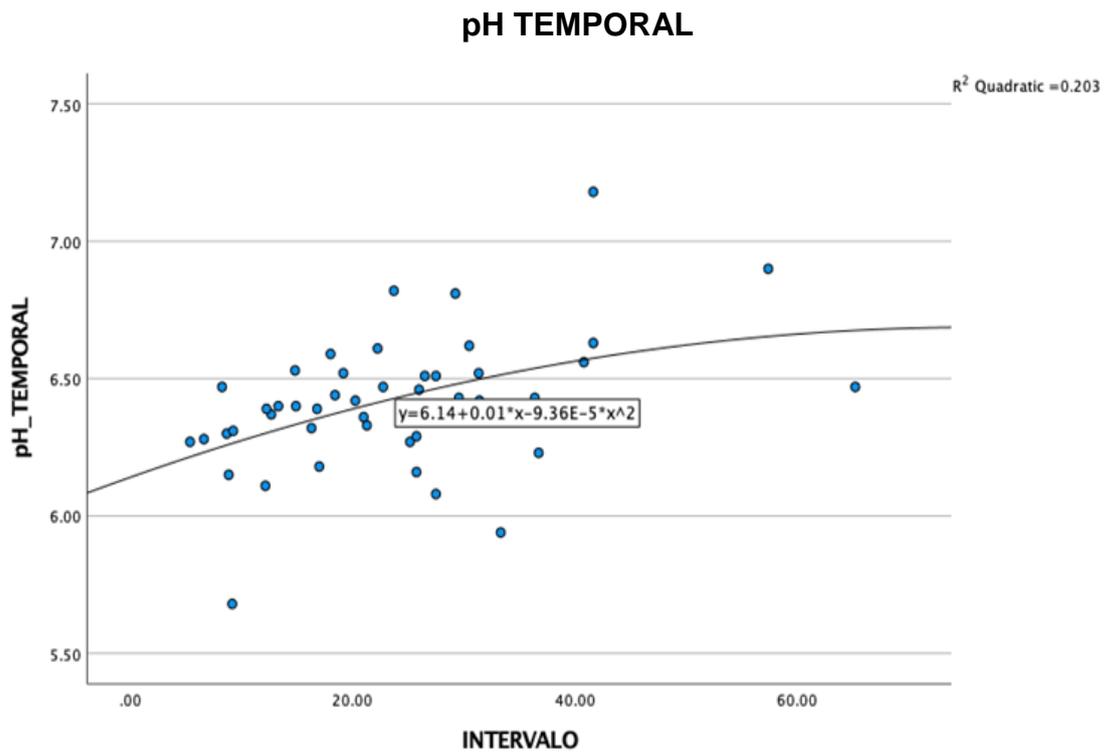


Gráfico 8: Representação da curva entre pontos na relação do pH temporal/intervalo

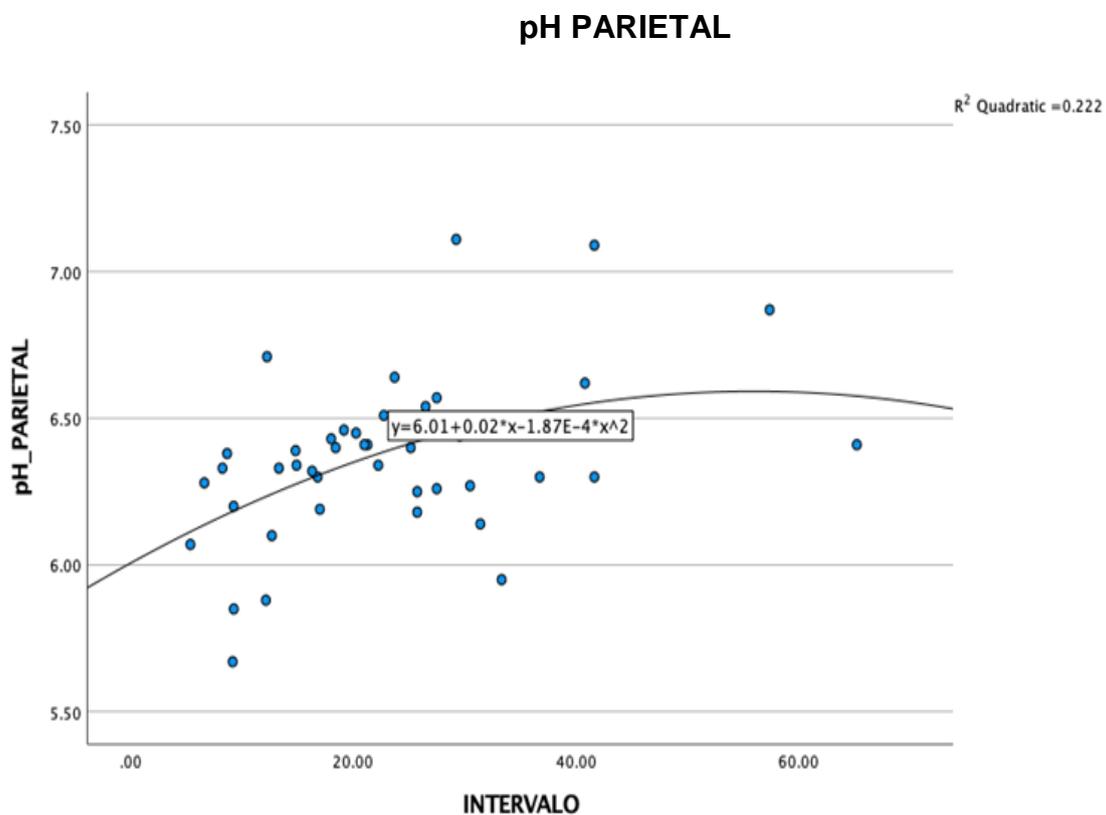


Gráfico 9: Representação da curva entre pontos na relação do pH parietal/intervalo

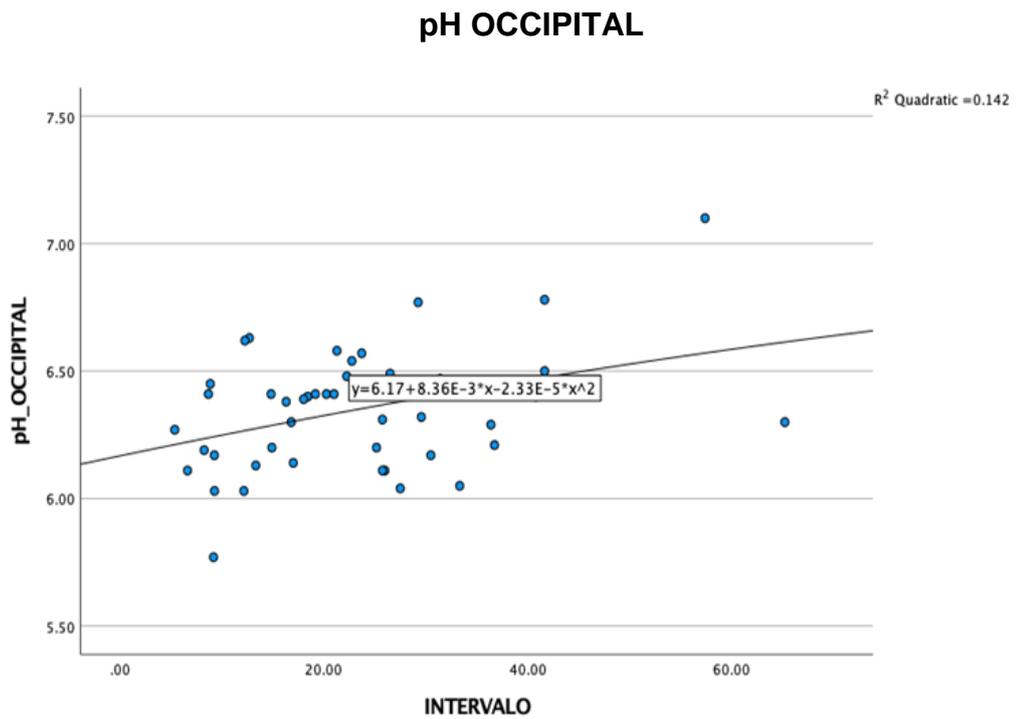


Gráfico 10: Representação da curva entre pontos na relação do pH occipital/ intervalo

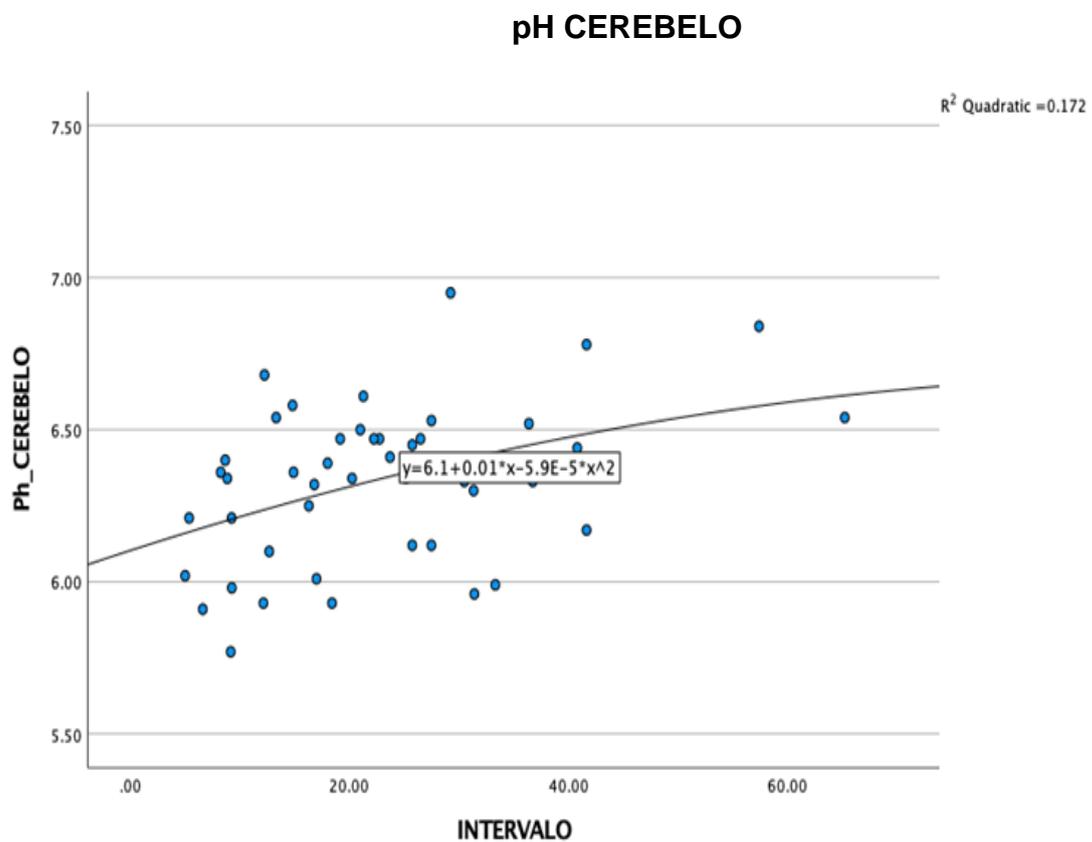


Gráfico 11: Representação da curva entre pontos na relação do cerebello/ intervalo

As curvas do pH em função do tempo são semelhantes em todas as regiões, com um crescimento inicial, a que se segue um patamar para valores mais elevados de tempo. O melhor modelo para ajuste dos dados foi o modelo quadrático, o que explica a forma das curvas. Estas curvas de pH com forma ascendente não apresentam significância estatística. A diferença do pH entre os diferentes intervalos é marginal, não se podendo concluir que quanto maior o intervalo de tempo maior o pH. Observando-se assim que não há diferenças estatisticamente significativas entre os grupos estudados.

Temperatura

De forma a verificar a influencia da temperatura procedeu-se ao estudo dos dados registados durante o procedimento técnico da colheita do cérebro.

Os cadáveres são mantidos logo após a morte em arcas refrigeradoras à temperatura de 1 a 2°C.

O número de casos validos verificados estatisticamente são 45, com uma média de 22,4°C, uma mediana de 22,3°C e com um desvio padrão de 2,4 (tabela 6).

Dentro dos casos validos apurou-se o valor minimo de 17,0°C para um intervalo de tempo de 27h e 30min e o máximo de 28,0°C para um intervalo de 19h e 10min, (quadro 2 e tabela 6).

O gráfico 13, abaixo representado, mostra que a temperatura medida no cérebro logo após à sua colheita, não tem uma grande dispersão, não sendo esta capaz de promover alterações significativas do pH nas diferentes regiões.

Os valores médios / medianos da temperatura mantêm-se constantes ao longo dos intervalos de tempo com uma distribuição simétrica e desvio padrão baixo (tabela 6).

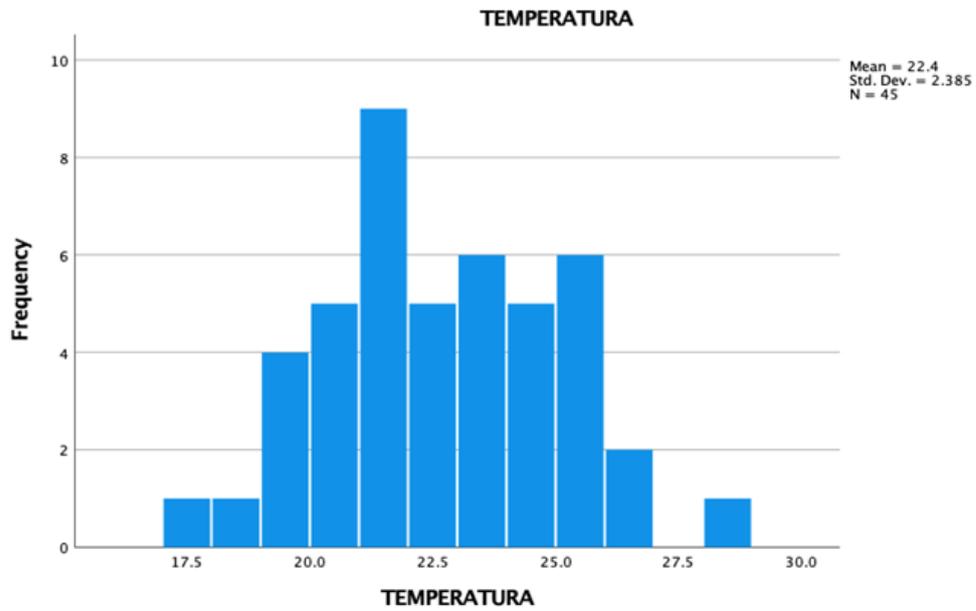


Gráfico 12: Representação da variação da temperatura

Representação dos valores da temperatura

TEMPERATURA		
N	Validos	45
	Ausentes	41
Média		22,4
Mediana		22,3
Desvio padrão		2,4
Variância		5,7
Faixa		11,0
Mínimo		17,0
Máximo		28,0

Tabela 6: Temperatura registada no cérebro após colheita

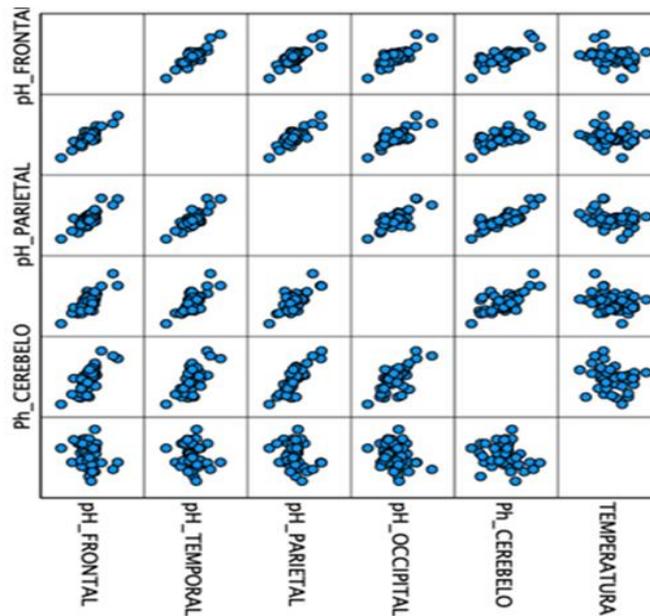


Gráfico 13: Representação da temperatura com as medições de pH por região do cérebro

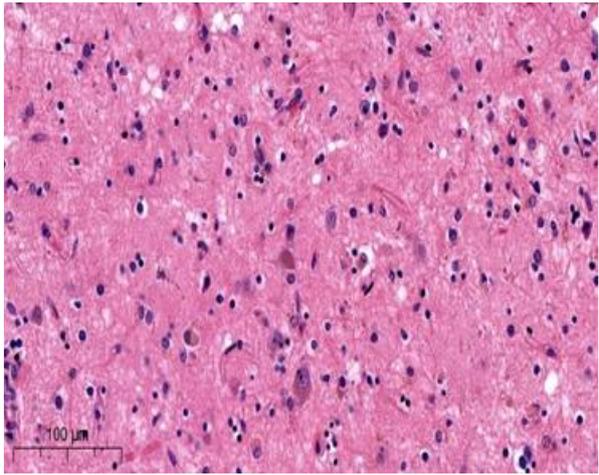
Variação da temperatura pelos diferentes grupos de intervalos de tempo

INTERVALO	N	Média da Temperatura
25.18+	18	21.5
12.26 - 25.17	17	22.8
<= 12.25	10	23.4
Sig.		.090

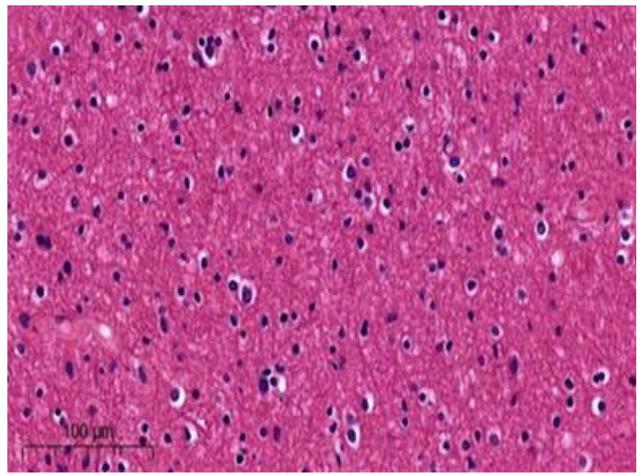
Tabela 7: Representação dos valores da temperatura pelos intervalos de tempo

Comparação histológica

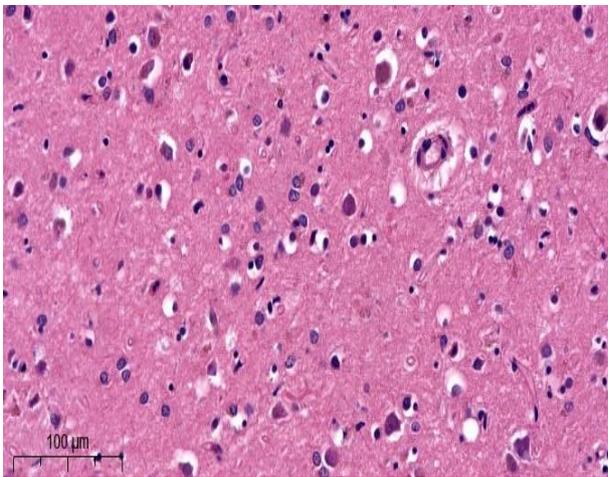
Posteriormente serão apresentadas as imagens da microscopia dos dois grupos selecionados, o primeiro grupo referente às cinco colheitas com menor tempo de colheita e o segundo grupo com as restantes, de maior tempo de colheita (tabela 8 e 9).



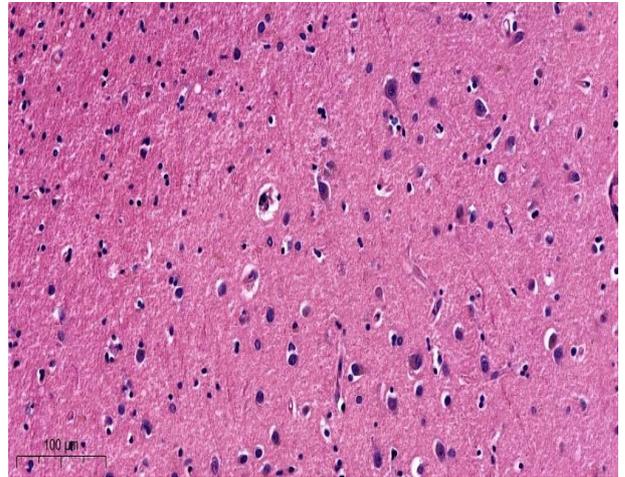
A



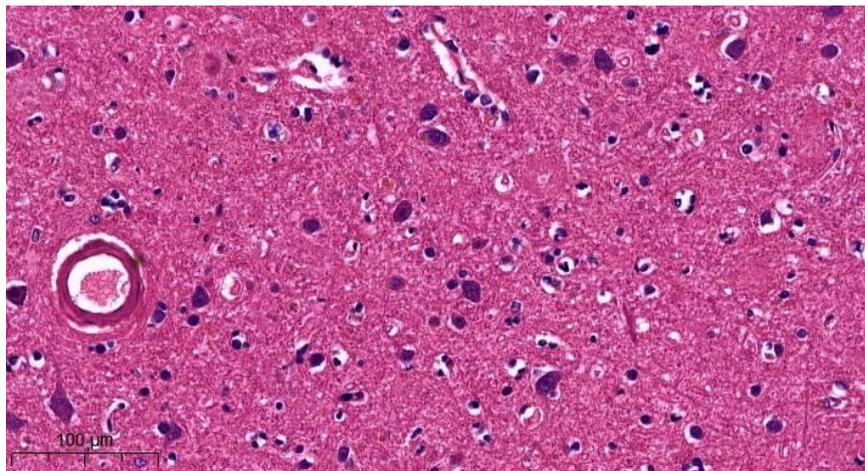
B



C



D



E

Tabela 8: Imagens de cortes histológicos em *H&E*, região parietal do cérebro, onde se observa os casos pelo menor intervalo de colheita: A) BC137 com 12h42min, B) BC141 com 9h10min, C) BC142 com 5h22min, D) BC146 com 8h40min, E) BC151 com 17h.

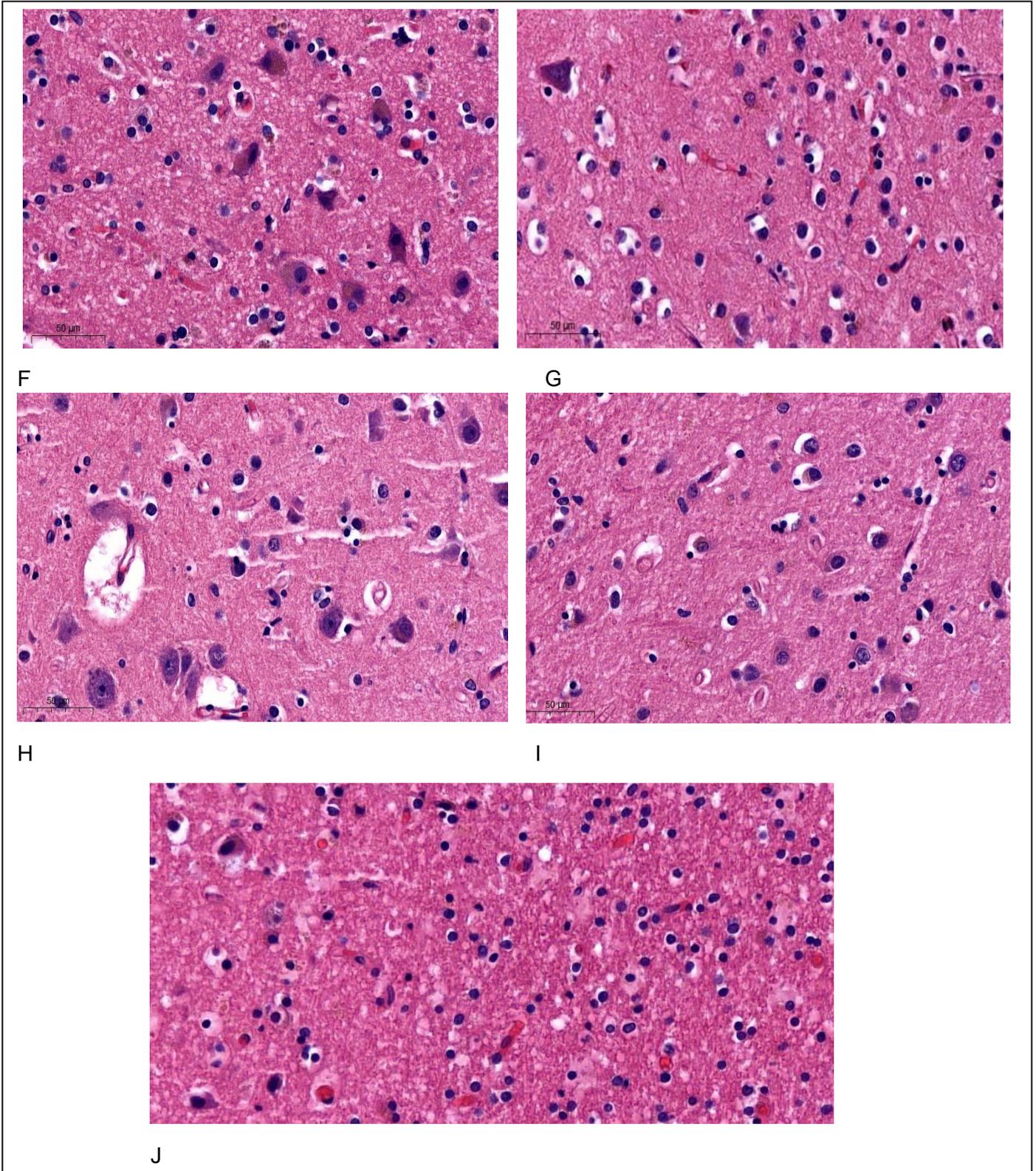


Tabela 9: Imagens de cortes histológicos em *H&E*, região parietal do cérebro, onde se observa os casos com maior intervalo de colheita: F) BC156 com 41h40min, G) BC162 com 33h20min, H) BC169 com 36h45min, I) BC175 com 65h15min, J) BC180 com 29h15min

Grupos dos Intervalos de tempo	Grau de autólise		
	Discreta	Moderada	Acentuada
≤ 12,25	X		
12,26 a 25,17	X		
>25,18	X		

Tabela 10: Classificação da autólise caracterizada durante a análise histológica pelos intervalos de tempo

Casos selecionados para estudo morfológico	Descrição histológica
Menor tempo de colheita	
BC137 - 12h42min	Neurônios com arquitetura celular mantida
BC141 - 9h10min	
BC142 - 5h22min	
BC146 - 8h40min	
BC151 - 17h00min	
Maior tempo de colheita	
BC156 - 41h40min	Neurônios com arquitetura celular mantida
BC162 - 33h20min	
BC169 - 36h45min	
BC175 - 65h15min	
BC180 - 29h15min	

Tabela 11: Descrição histológica dos casos selecionados pelo menor e maior intervalo de colheita

Comparação tintorial entre as colorações com o menor e o maior intervalo de colheita

As imagens representadas a baixo (imagem 1, 2, 3, 4 e 5), são a representação de uma parte de igual tamanho do corte total efetuado inicialmente para a coloração histológica, onde a partir desta contabilizaram-se os núcleos. Estão indicados a vermelho na imagem 1, 2, 3, 4 e 5 os que começam a degradarem-se.

Após observação das várias lâminas, concluiu-se que nos intervalos de tempo de 5h22min a 12h42min, encontram-se núcleos bem preservados e íntegros na sua maioria (imagem 1 e imagem 2), começando às 17h a aparecer mais núcleos a entrar num estado de degradação (imagem 3). Observando-se maior progressão em intervalos mais elevados, como os representados, a 33h20min e 65h15min (imagem 4 e imagem 5).

Avaliação dos núcleos pela marcação da hematoxilina

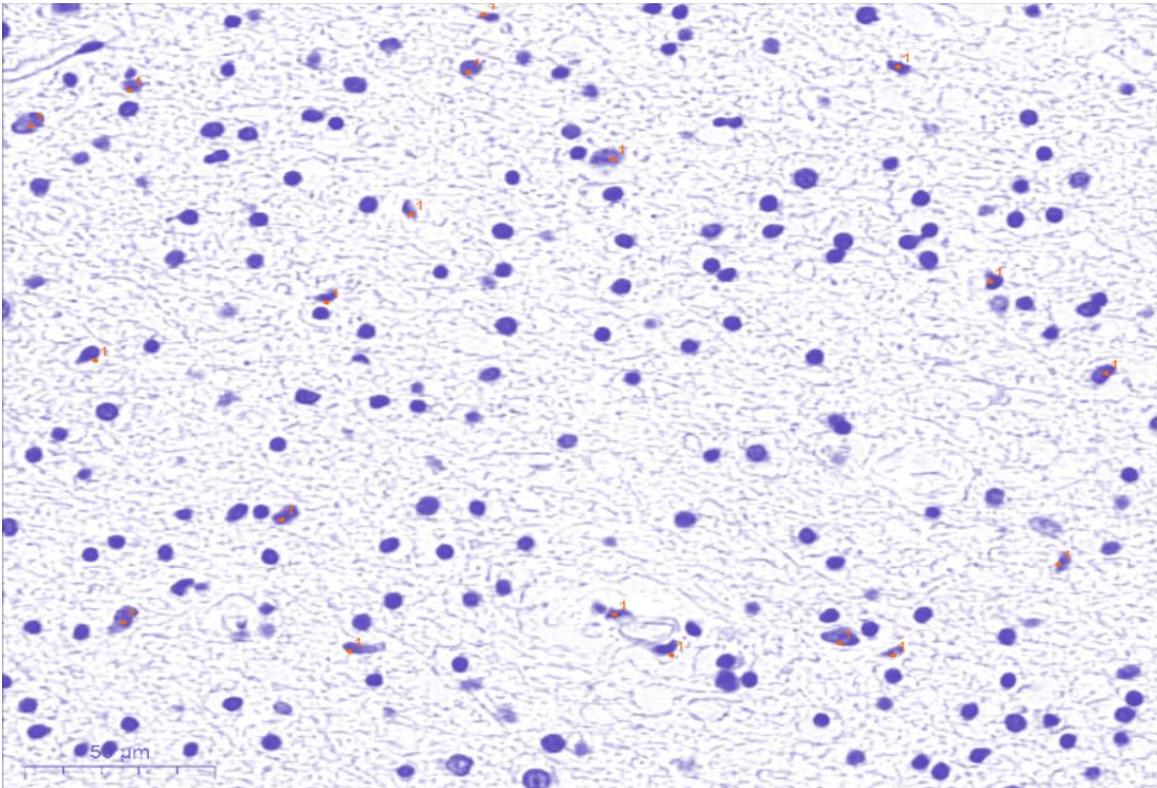


Imagem 1: Lâmina BC142, com um intervalo de colheita de 5h22min. Apresentação da coloração *H&E* apenas com a hematoxilina.

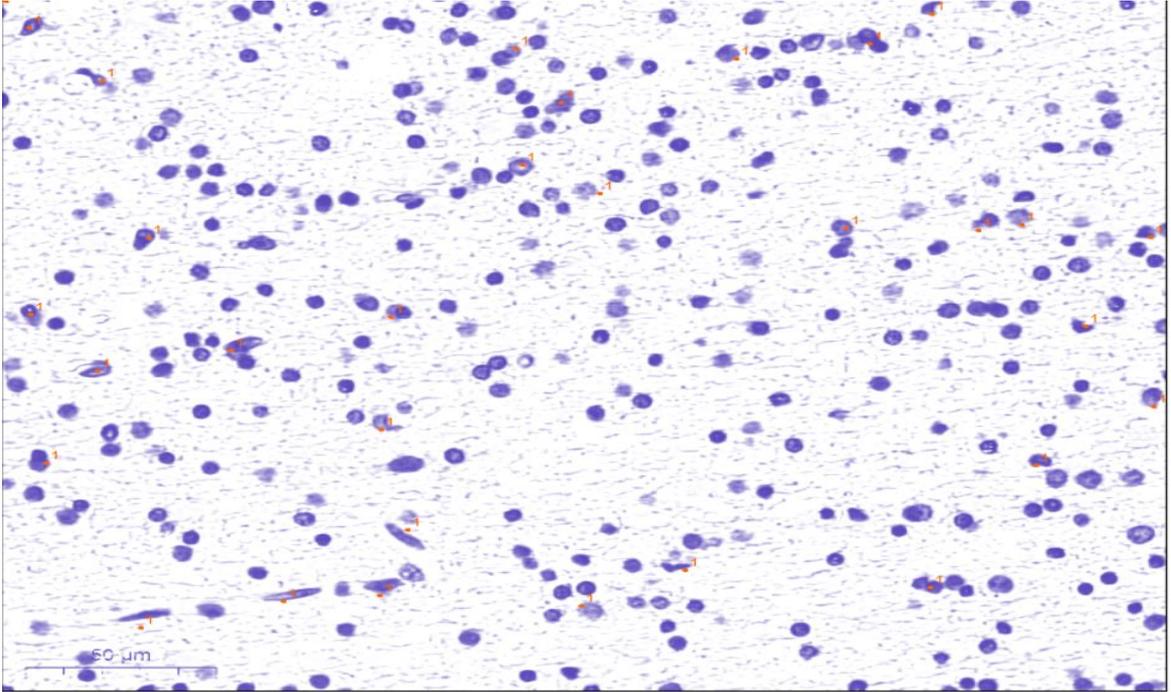


Imagem 2: Lâmina BC137, com um intervalo de colheita de 12h42min. Apresentação da coloração *H&E* apenas com hematoxilina.

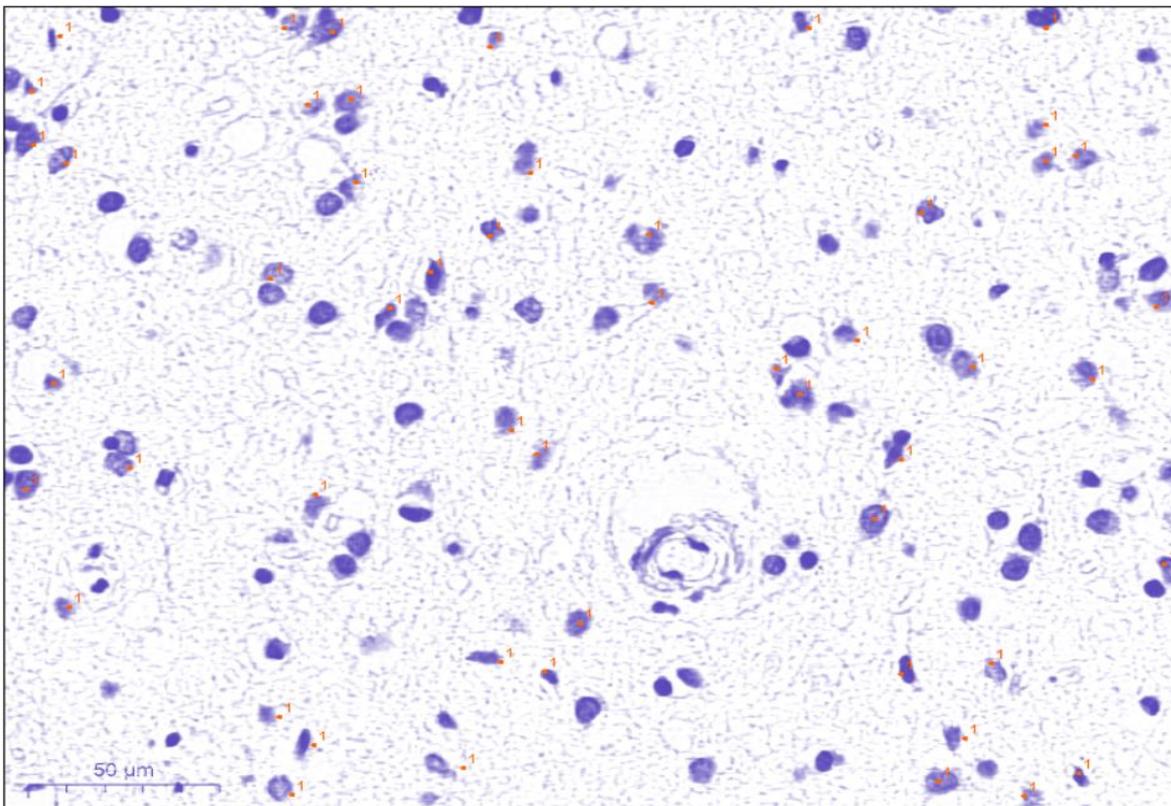


Imagem 3: Lâmina BC151, com um intervalo de colheita de 17h. Apresentação da coloração *H&E* apenas com a hematoxilina.

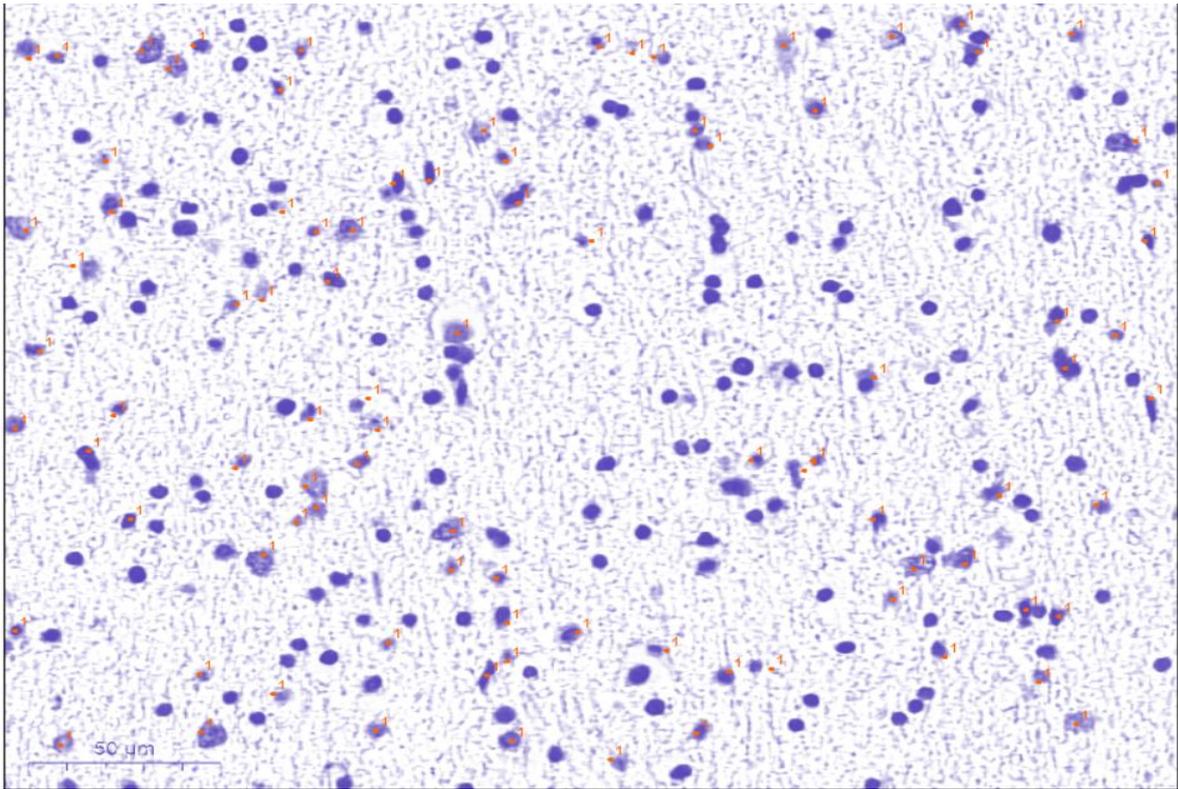


Imagem 4: Lâmina BC162, com um intervalo de colheita de 33h20min. Apresentação da coloração *H&E* apenas com hematoxilina.

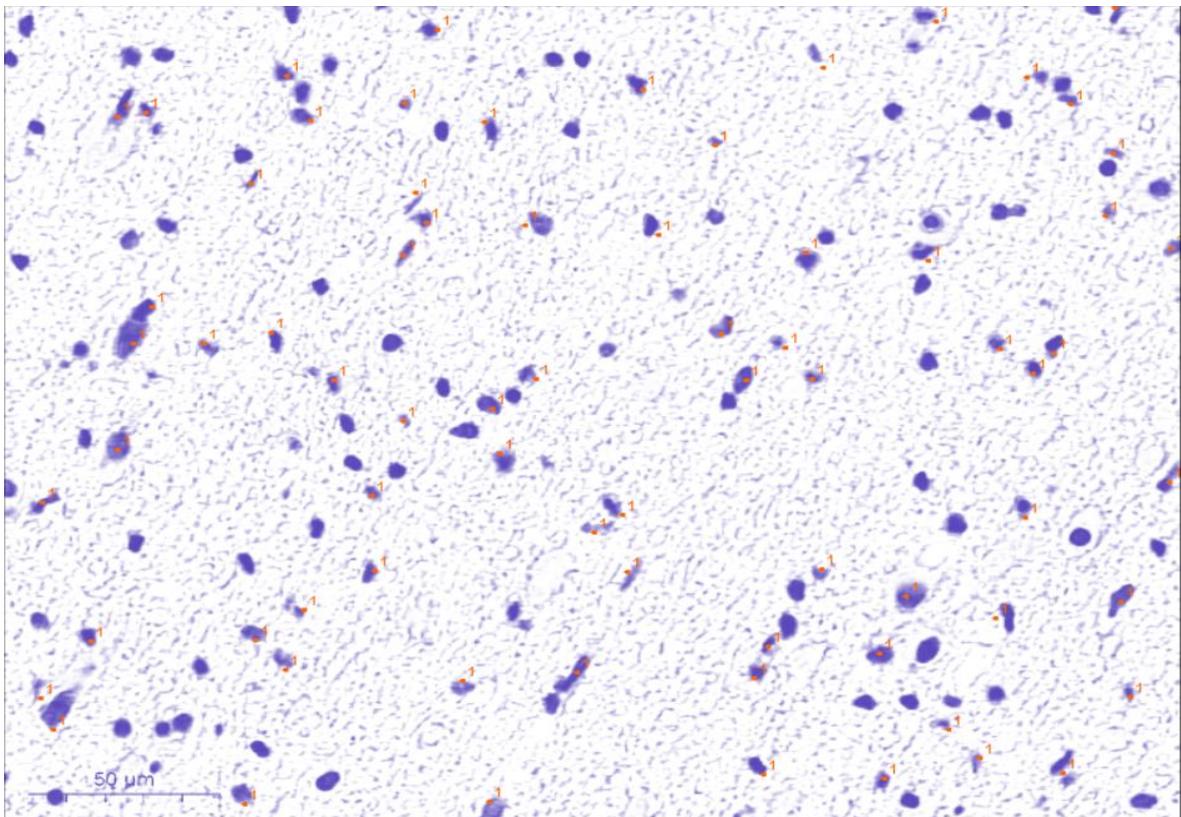


Imagem 5: Lâmina BC175, com o maior intervalo de colheita , 65h15min. Apresentação da coloração *H&E* apenas com a hematoxilina.

Na tabela em baixo (tabela 12) estão representados os resultados obtidos e no gráfico 14 a relação entre o rácio de núcleos em degradação e o tempo após a colheita.

Tempo de colheita	Núcleos em início de degradação	Núcleos integros	Total de núcleos	Núcleos em início de degradação em cada 100
BC142- 5h22min	19	148	167	11
BC137- 12h42min	30	176	206	15
BC151- 17h00min	52	51	103	50
BC162- 33h20min	96	100	196	48
BC175- 65h15min	73	56	129	57

Tabela 12: Registo da contagem dos núcleos na análise tintorial

Relação do estado de preservação dos núcleos com o tempo de colheita

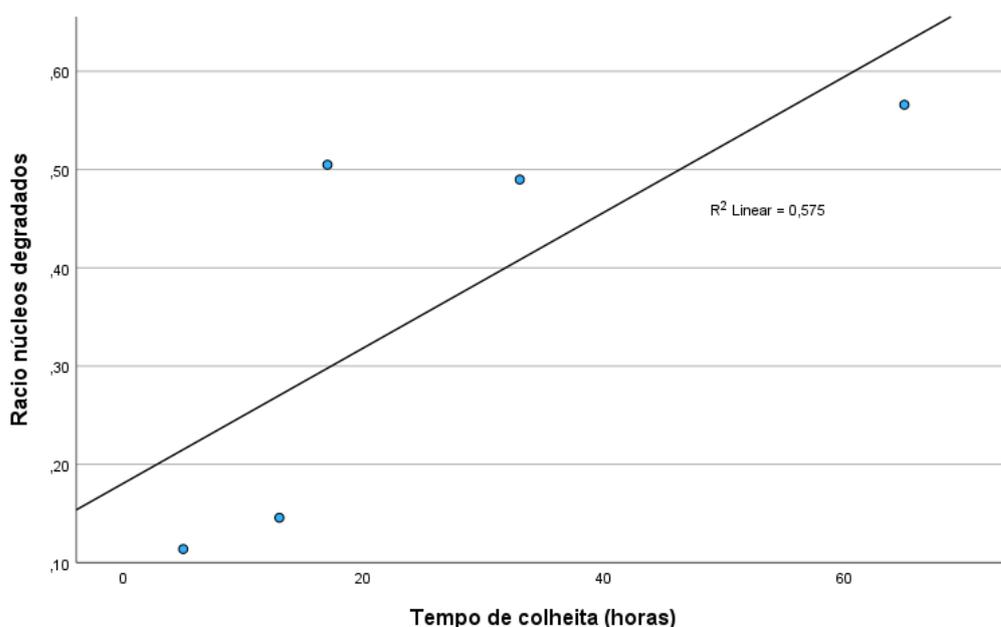


Gráfico 14: Relação entre o rácio de núcleos em degradação e o tempo após a colheita

Apesar do número reduzido de casos, o que limita a interpretação, observou-se uma relação estatisticamente significativa nesta análise ($r = 0.900$; $p < 0.05$, Spearman).

Discussão

Base fundamental do estudo

A base fundamental do estudo assenta na promoção da qualidade da intervenção da recolha do cérebro para as necessidades da comunidade científica nos estudos das doenças degenerativas. Este trabalho permitiu determinar o seguinte:

- I. Confiança no protocolo usado durante a colheita do cérebro,
- II. Segurança no método de medição do pH como fator de qualidade da amostra, sendo que não se verificaram diferenças significativas neste parâmetro em relação com o intervalo entre a data da morte e a data da colheita.
- III. Compreensão da necessidade de uma intervenção multidisciplinar, pois exige assegurar todos os registos, desde a execução do exame do hábito externo do cadáver, com medição externa da temperatura corporal, registo do índice de massa corporal (IMC) e registo da hora entre a verificação do óbito e a entrada na arca refrigeradora, assim como os acontecimentos ante-mortem.
- IV. Estratégia de unificação dos passos a realizar por tempos exatos a partir do momento que o cadáver está rececionado no PBB, evitando discrepâncias na avaliação do estado de cada um, a não ser as adquiridas antes da entrada no serviço.
- V. Perceção da necessidade do levantamento da informação clínica para mensuração da avaliação dos parâmetros de qualidade.

Comparação com dados de literatura

As medições de pH no presente estudo evidenciam que estas mantêm-se em todas as regiões do cérebro numa média de pH entre os 6,3 e 6,4, compreendendo uma relação simétrica entre todos os casos estudados. Esta uniformidade entre os casos relaciona-se com a temperatura constante a que o corpo é sujeito antes da autópsia, com a entrada na refrigeração e num intervalo de tempo entre a data de morte e a colheita do cérebro relativamente curtos. Adicionalmente, facto de todos os casos apresentarem doenças do foro neurodegenerativo, não sendo estas mortes violentas ou com períodos agónicos extremamente prolongados, apesar de não haver dados concretos do ante-mortem, pode contribuir para este resultado. Estes valores são verificados noutros estudos, onde

demonstram os valores de pH da substância cinzenta e branca do lobo frontal foram 6,24 (5,62–7,08) e 6,27 (5,62–7,05), respectivamente. O pH da substância cinzenta do lobo occipital foi de 6,22 (5,48–6,96) [8].

O pH cerebral idealmente maior que 6 foi usado, consistente com estudos anteriores. Condições agônicas adversas resultam em pH e qualidade de RNA mais baixos, e muitos indivíduos com distúrbios neurológicos têm períodos agônicos prolongados em comparação com controlo neurologicamente normais [2].

Os nossos resultados referentes ao pH cerebral estão de acordo com outros estudos que demonstraram que o pH não parece mudar significativamente em função do intervalo *post-mortem* assim como o tempo de armazenamento do cadáver nas arcas refrigeradoras não teve influência no pH do tecido cerebral. No entanto, a controvérsia permanece em relação aos efeitos do estado agônico e intervalo *post-mortem*. Estudos descobriram que esses parâmetros não têm uma influência significativa no pH do tecido. Pesquisas anteriores também estabeleceram que a isquemia pode alterar as concentrações de neurotransmissores e neuropeptídeos, atividades enzimáticas e preservação de mRNA, apoiando o conceito de que o estado agônico influencia significativamente a bioquímica do tecido cerebral [4].

Futuramente será necessário avaliar o estado agônico, como o caso de septicemias, hipoxia, comas, isquemia e fase terminal prolongada na influencia do pH, pois no presente estudo não foi possível recolher informação neste sentido de forma a avaliar estes parâmetros.

Avaliação das curvas do pH e da temperatura em função do tempo de colheita

A representação estatística das curvas de pH em função do tempo pós-morte mostrou diferenças de pH marginais, sem diferenças estatisticamente significativas entre os grupos estudados.

Em relação à temperatura medida no cérebro após colheita também não se verificou uma grande dispersão entre os diferentes intervalos de tempo. Os valores médios/medianos da temperatura mantêm-se constantes ao longo dos intervalos de tempo com uma distribuição simétrica e desvio padrão baixo, portanto, não é capaz de promover alterações significativas no pH nas diferentes regiões .

Análise da componente histológica

Com a utilização da técnica de coloração histológica por hematoxilina-eosina, foi possível demonstrar que morfologicamente, entre os diferentes tempos de colheita, os tecidos mantiveram-se numa relação de semelhança quanto ao seu grau de preservação, principalmente por manterem características estruturais integras. Portanto, a comparação obtida das imagens inseridas na tabela 8 e 9, permitiram fazer a reflexão da preservação da arquitetura celular entre os menores e maiores tempos e quando comparados os aspetos microscópicos dos diferentes cortes de cérebro, não se verificou diferenças significativas entre os estados de preservação de cada um.

De forma a realizar uma observação quantitativa menos subjetiva avançou-se com a avaliação tintorial. Nas lâminas digitalizadas foi possível observar com um maior foco de precisão os núcleos e proceder à sua avaliação estrutural. Quando comparadas as imagens 1 e 2, as de menor tempo, relativamente com as imagens 3, 4 e 5, as de maior tempo, podemos observar que nestes tempos existe um maior número de núcleos a iniciarem o estado de degradação. No entanto, estas alterações celulares são ainda pouco marcadas de forma a influenciarem o pH recolhido pelos intervalos de tempo das amostras obtidas pelo PBB.

Conclusão

Esta tese promove uma reflexão sobre a necessidade de otimizar os meios de qualidade da técnica inerente à colheita do cérebro. O principal objetivo é a conquista da fiabilidade, quer no que diz respeito à preservação do órgão o mais perto possível do estado “in vivo”, quer na confiança transmitida à comunidade científica.

Os nossos resultados mostraram que a metodologia do PBB proporciona tecido com qualidade similar a outros bancos de cérebros internacionais, tendo em conta que o valor de pH como medida se encontra sobreponível ao publicado na literatura. A progressão do estudo para o entendimento do processo de autólise com as medições do pH e a temperatura a que o órgão está sujeito são imperativas para o avanço de um programa elucidativo das necessidades a adaptar ao processo da colheita.

Na sua vertente teórica, esta tese acrescenta informação a respeito da evolução da degradação dos núcleos com os tempos de colheita aplicados no PBB, de forma a garantir um protocolo com credibilidade dos procedimentos. A obtenção de um protocolo de execução rigoroso aplicado à colheita e manutenção dos tecidos cerebrais pode melhorar a capacidade de entendimento dos fenómenos biológicos de interesse inerentes aos estudos das doenças neurodegenerativas, diminuindo os fatores de confusão.

O estudo revela a dificuldade em definir um controle completamente ideal e um único caminho para a caracterização específica nos casos futuros. Revelou ainda a evidência de algumas necessidades a adotar no processo de colheita do cérebro de forma a obter resultados com maior certeza na qualidade da amostra. Tais como, informações mais precisas sobre a forma de morte e dos eventos do estado agónico, obter informações sobre a hospitalização, coma, mecanismos de suporte artificial e outras variáveis clínicas que possam influenciar o pH.

O protocolo definido pelo estudo permitiu definir intervalos de tempo aceitáveis para a colheita do tecido cerebral *post-mortem* submetido ao projeto do PBB, a partir dos tempos já aplicados. No entanto, o reduzido número de casos limitou as conclusões, não se conseguiu apurar outros tempos aceitáveis para além daqueles já praticados e considerados como intervalos de tempo de segurança por forma a evitar danos ocorrido por intervenção do início da autólise.

Por fim dizer, que é de suma importância respeitar os tempos de colheita dentro dos menores intervalos de tempo e de igual forma respeitar a refrigeração adequada.

Declaração de ética

Todos os procedimentos usados para este estudo, foram realizados com a aprovação do “Comité de Ética do Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar e Universidade do Porto” (ver anexo 1).

Anexo 1

**Anexo 1: Parecer da Comissão de ética do ICBAS para a realização do estudo.
“Relação entre o tempo de colheita *pós-morte* e o pH do tecido como medida de
qualidade num banco de cérebros”.**

Exma. Senhora
Dr^a Patrícia da Silva Ferreira

SCE/HCC/003

2022-03-25

2022/CE/P05/(P383/CETI/ICBAS)



Informa-se que o projeto de Investigação Clínica com o título “**Relação entre o tempo de colheita pós-morte e o pH do tecido como medida de qualidade num banco de cérebros**”, com a referência 2022/CE/P05(P383/CETI/ICBAS), submetido à Comissão de Ética conjunta CHUP/ICBAS, foi apreciado em reunião plenária de 16 de fevereiro de 2022, tendo obtido parecer favorável nessa data.

Com os nossos cumprimentos,

O Diretor,

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'H. Cyrne Carvalho', written over a horizontal line.

(Prof. Doutor Henrique Cyrne Carvalho)

PV

RUA DE JORGE VITERBO FERREIRA, 228, 4050-313 PORTO - PORTUGAL
TELEFONE: +351 220 428 000
FAX: +351 220 428 090
www.icbas.up.pt

Anexo 2

Anexo 2: Parecer favorável do CHUdSA para o Projeto de Investigação “Banco de Cérebros para a Investigação em Doenças Neurológicas”



Hospital Santo António | Hospital Maria Pia | Maternidade Júlio Dinis | Hospital Joaquim Urbano

Largo Prof. Abel Salazar
4099-001 PORTO
www.hgsa.pt

Exmo. Sr.
Dr. Ricardo Taipa
Serviço de Anatomia Patológica

ASSUNTO: Projecto de Investigação - “Banco de Cérebros para Investigação em Doenças Neurológicas” - ‘N/
REF.º 207/11(130-DEFI/185-CES)

O Conselho de Administração do CHP **autoriza** a realização do estudo de investigação acima mencionado nesta Instituição, no Serviço de Neurologia e no Serviço de Anatomia Patológica, sendo Investigador Principal, o Dr. Ricardo Taipa.

O estudo de investigação foi previamente analisado pela Comissão de Ética para a Saúde e pelo Gabinete Coordenador de Investigação do Departamento de Ensino, Formação e Investigação do CHP, bem como pela Direcção Clínica, tendo obtido Parecer Favorável.

Cumprimentos,

CONSELHO DE ADMINISTRAÇÃO
18.11.2012

Dr. SOLLAR ALBERGO Presidente	Dr.ª ÉLIA GOMES Vogal Executiva
Dr. PAULO BARBOSA Director Clínico	Dr. PORTO GOMES Vogal Executiva
	Enf.ª EDUARDO ALVES Enfermeiro Director

* Em todas as eventuais comunicações posteriores sobre este estudo é indispensável indicar a nossa ref.ª.

Anexo 3

Anexo 3: Ilustração do consentimento informado, com os esclarecimentos necessários para a aprovação do dador e autorização á realização da colheita



Responsáveis Prof. Dr. Ricardo Taipa
Prof. Dr. Melo Pires
Técnica coordenadora Inês Reis
Administrativa Manuela Moreira



Unidade de Neuropatologia • Departamento de Neurociências
Hospital Santo António • C.H.Porto
Largo Prof. Abel Salazar, 4099-001 Porto • Tel 913 504 401
geral@bancodecerebros.chporto.pt

TERMO DE CONSENTIMENTO INFORMADO Doação de tecido cerebral para investigação

Eu, abaixo-assinado _____ fui informado de que o tecido cerebral doado se destina a estabelecer um diagnóstico e permitirá o estudo das alterações que ocorrem ao nível das células cerebrais, aumentando o conhecimento acerca da doença e promovendo o objetivo comum da comunidade científica que é a cura. Foi-me fornecido um folheto informativo mais extenso em suporte de papel.

Sei que uma parte do tecido vai ser utilizada para estudo diagnóstico, sendo os resultados comunicados ao médico assistente e familiar mais próximo. A outra parte vai ser armazenada, por um período mínimo de 20 anos, para ser utilizada posteriormente em estudos de investigação, eticamente aprovados, neste hospital, outras instituições nacionais ou estrangeiras. Sei ainda que alguns dos estudos que vão ser efetuados são estudos genéticos.

Sei que os dados clínicos poderão ser utilizados na investigação, sendo que me foi garantido que todos os dados relativos à identificação dos participantes são confidenciais e que será mantido o anonimato.

Também autorizo a divulgação dos resultados obtidos no meio científico, garantindo o anonimato.

Sei que este consentimento pode ser retirado a qualquer momento, sem nenhum tipo de penalização por este facto. Compreendi a informação que me foi dada, tive oportunidade de fazer perguntas e as minhas dúvidas foram esclarecidas. Aceito participar de livre vontade no estudo acima mencionado.

Nome do dador (Letras maiúsculas)

Data ____/____/____

Assinatura

Nome do Médico Responsável (Letras maiúsculas)

Data ____/____/____

Assinatura

Referências Bibliográficas

1. Goldfarb, D.C., *Demências*. 2004: Casa do Psicólogo.
2. Palmer-Aronsten, B., et al., *An International Survey of Brain Banking Operation and Characterization Practices*. Biopreserv Biobank, 2016. **14**(6): p. 464-469.
3. Bell, J.E., et al., *Management of a twenty-first century brain bank: experience in the BrainNet Europe consortium*. Acta Neuropathol, 2008. **115**(5): p. 497-507.
4. Monoranu, C.M., et al., *pH measurement as quality control on human post mortem brain tissue: a study of the BrainNet Europe consortium*. Neuropathol Appl Neurobiol, 2009. **35**(3): p. 329-337.
5. Dufour, B.D., et al., *Hispano-American Brain Bank on Neurodevelopmental Disorders: An initiative to promote brain banking, research, education, and outreach in the field of neurodevelopmental disorders*. Brain Pathol, 2021: p. e13019.
6. Amaral, D.G., et al., *Autism BrainNet: A network of postmortem brain banks established to facilitate autism research*. Handb Clin Neurol, 2018. **150**: p. 31-39.
7. Graeber, M.B., *Twenty-first century brain banking: at the crossroads*. Acta Neuropathol, 2008. **115**(5): p. 493-6.
8. Durrenberger, P.F., et al., *Effects of antemortem and postmortem variables on human brain mRNA quality: a BrainNet Europe study*. J Neuropathol Exp Neurol, 2010. **69**(1): p. 70-81.
9. Ono, C.T., et al., *Minimal amount of tissue-based pH measurement to improve quality control in neuropsychiatric post-mortem brain studies*. Psychiatry Clin Neurosci, 2019. **73**(9): p. 566-573.
10. Garrido, R.G. and M.J.T. Naia, *Cronotanatognose: a influência do clima tropical na determinação do intervalo post-mortem*. Lex Humana (ISSN 2175-0947), 2014. **6**(1): p. 180-195.
11. LEITE, G.A.A. and F.R. do PRADO, *SINAIS ABIÓTICOS: PUTREFAÇÃO, AUTÓLISE, MACERAÇÃO*. ETIC-ENCONTRO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA-ISSN 21-76-8498, 2019. **15**(15).
12. Menon, L.M.L., et al., *Tanatologia forense e odontologia legal: interface e importância na rotina pericial*. Odonto, 2011. **19**(37): p. 15-23.
13. Manson, M.D., *pH Sensing in Bacillus subtilis: a New Path to a Common Goal*. J Bacteriol, 2020. **202**(4).
14. Chesler, M., *Regulation and modulation of pH in the brain*. Physiol Rev, 2003. **83**(4): p. 1183-221.

