

Age-related histomorphometrical changes in the cerebellum of autopsied elderly individuals

| Análise das alterações histomorfométricas do cerebelo de idosos autopsiados

ABSTRACT | Introduction: *The aging process occurs in all living beings; however, it is accompanied by the incidence of several histomorphometrical changes. Those age-related changes affect mainly the central nervous system (CNS) organs and above all, the Cerebellum.*
Objective: *The primary goal of this study is to analyze the density of Purkinje cells and the thickness of the granular layer of cerebellum in old and Young-adults. However, we have also made an analysis between genders.*
Methods: *We selected 20 autopsied individuals and grouped in: (n=10) young-adults and (n=10) old-adults and anatomically remove fragments from the vermis posterior lobe (CBV) and the right posterior lobe of the cerebellum (CBL). Both fragments proceed to histological process and hematoxylin-eosin stain protocol. Subsequently, with the computational software AxionVision (Zeiss, Germany) and a light microscope, fragments were analyzed in order to obtain density of Purkinje cells and granular layer thickness (μm) by a free interactive system Image J® (National Institutes of Health, Bethesda, EUA).*
Results: *The Old-adults group has showed a tendency of decrease on the Purkinje cells density in both analyzed areas, vermis and lateral lobe, without statistic relevance. The thickness of the granular layer has showed a significant increase on the old-age individuals in both regions. The subjects were also analyzed by gender, showing a significant decrease of the granular layer thickness in the female group on the CBV.*
Conclusion: *The aging process leads to morphological changes in different areas of cerebellum cortex, it is seems that those age-related modifications advance different between the two genders.*

Keywords | *Cerebellum; Aging; Purkinje cells; Granulosa cells.*

RESUMO | Introdução: O envelhecimento é um processo que acomete em todos os seres vivos, trazendo consigo a ocorrência de alterações histomorfológicas. Essas modificações influenciam diretamente o sistema nervoso central, incluindo o cerebelo. **Objetivo:** Avaliar a densidade das células de Purkinje e espessura da camada granulosa do cerebelo de pacientes idosos e não idosos, bem como fazer uma comparação dessas análises entre os gêneros. **Métodos:** Foram selecionados 20 pacientes autopsiados, e agrupados em: (n=10) idosos e (n=10) não idosos. Fragmentos do vérmis cerebelar posterior (CBV) e do lobo posterior direito (CBL) foram retirados para serem processados histologicamente e corados com hematoxilina e eosina. Posteriormente foi utilizado o programa computacional AxionVision (Zeiss, Germany) para captura de imagens de microscopia de luz e em seguida o sistema analisador de imagens interativo Image J® (National Institutes of Health, Bethesda, EUA) para obtenção da densidade das células de Purkinje (μm) e espessura da camada granulosa (μm). **Resultados:** Os idosos apresentaram uma tendência de diminuição na densidade das células de Purkinje em ambas as regiões avaliadas, porém sem significância estatística. Em relação à espessura da camada granulosa, o grupo considerado idoso apresentou aumento significativamente maior em ambas as regiões estudadas. A comparação entre os gêneros mostrou que as mulheres idosas apresentaram menor espessura da camada granulosa na região CBV quando comparadas aos idosos do gênero masculino. **Conclusão:** O envelhecimento causa alterações histomorfológicas nas diferentes camadas do córtex cerebelar, as quais progredem de forma distinta em homens e mulheres.

Palavras-chave | Cerebelo; Envelhecimento; Células de Purkinje; Células da granulosa.

¹Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Ribeirão Preto/SP, Brasil.

²Universidade Federal do Triângulo Mineiro. Uberaba/MG, Brasil.

INTRODUÇÃO

O Sistema Nervoso Central (SNC) é um dos sistemas biológicos mais afetados pelo processo de envelhecimento, sendo caracterizado por diversas alterações morfofuncionais¹. Normalmente ocorrem processos de atrofia cerebral, perda de neurônios, degeneração granulovacuolar, formação de placas neuríticas, depósitos de lipofuscina e de substância beta amiloide nas células nervosas. Além disso, há redução na velocidade de condução de impulsos nervosos, da intensidade dos reflexos, restrição das respostas motoras, e do poder de reação e da capacidade de coordenação^{2,3}.

O cerebelo é uma estrutura do encéfalo que atua regulando o desempenho de funções cognitivas, da atividade motora e a manutenção do equilíbrio. Os mecanismos de trabalho motor são regulados pelos lobos frontais do órgão, enquanto os hemisférios laterais estão envolvidos com processos de memória de trabalho verbal, linguagem e sequência de aprendizado. A região do vérmis cerebelar está relacionada à regulação de processos de condicionamento clássico, trabalho verbal e evocação de memórias⁴.

Nos últimos anos, o papel do cerebelo na compreensão do processo de envelhecimento foi alvo de diversos estudos científicos que observaram redução da área total ocupada pelas células de Purkinje na região do vérmis, bem como, a diminuição do número dessas células e a degeneração de seus dendritos⁵⁻⁷. Essas alterações podem estar diretamente relacionadas com a perda de atividade elétrica e a redução nos níveis cognitivos decorrentes desse processo⁸⁻¹⁰.

Alterações morfológicas cerebelares também são relatadas, como o aumento na espessura da camada granular e a redução na densidade neu-

ronal nessa mesma região, além de grande redução na arborização dendrítica das células de Purkinje em animais de idade mais avançada¹¹.

Os dados fornecidos pela literatura sugerem que a maioria das informações a respeito desse assunto é proveniente de estudos experimentais, dessa forma, a linha de estudo do envelhecimento cerebelar é uma área com grande potencial a ser explorado.

Para realização de estudos com materiais provenientes do SNC humano, há uma dificuldade na obtenção do fragmento, que pode ser realizado apenas por meio da aplicação de dois protocolos: biópsia encefálica ou autópsia. O primeiro método é invasivo, arriscado e requer autorização do paciente e/ou dos familiares para realização do procedimento. Na autópsia, embora o procedimento não ofereça risco ao paciente, exige também a necessidade de autorização familiar. Dessa forma, os resultados obtidos nesse estudo expressam relevância para a comunidade científica e melhor compreensão do assunto, uma vez que foi utilizado material proveniente de autópsia.

Dessa forma, o objetivo do presente trabalho é avaliar a incidência de alterações histomorfológicas nas camadas de células de Purkinje e granulosa do cerebelo de pacientes idosos e não idosos, bem como fazer uma comparação dessas análises entre os gêneros.

MÉTODOS

O projeto de pesquisa do presente trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM), sob protocolo nº 2.287.614.

Estudo quantitativo com seres humanos, observacional, retrospectivo e descritivo. Foram ava-

liados retrospectivamente protocolos de autópsia no período 2000 a 2018 realizadas pela disciplina de Patologia Geral no Hospital de Clínicas da UFTM (HC-UFTM). A amostra consiste em 20 pacientes, agrupados em idosos (n=10) e não idosos (n=10). Os grupos foram pareados segundo gênero e cor. Para os critérios de inclusão foram considerados não idosos os pacientes com idade de 18 a 59 anos, e idosos aqueles com 60 anos ou mais.

A população inicial do estudo constava de cerca 90 indivíduos, no entanto, foram excluídos das análises de pacientes cuja causa do **óbito** foi trauma cranioencefálico, doenças neurodegenerativas, acidente vascular encefálico ou que apresentaram infecção por qualquer agente infeccioso no encéfalo. Também foram excluídos aqueles com prontuários incompletos e/ou ausência de material de necropsia ou em mau estado de conservação.

Do arquivo de peças anatômicas, foram retirados fragmentos de duas regiões cerebelares (Figura 1). Um fragmento do vérmis cerebelar posterior (CBV), referente à região IX, e um fragmento do lobo posterior direito (CBL), região HVIII localizada entre a fissura secundária e pré-piramidal, paralela ao lobo VIII do vérmis. As áreas foram definidas de acordo com as subdivisões de Larsell¹². Após a análise macroscópica, os fragmentos foram submetidos ao processamento histológico e corados pela hematoxilina e eosina (HE).

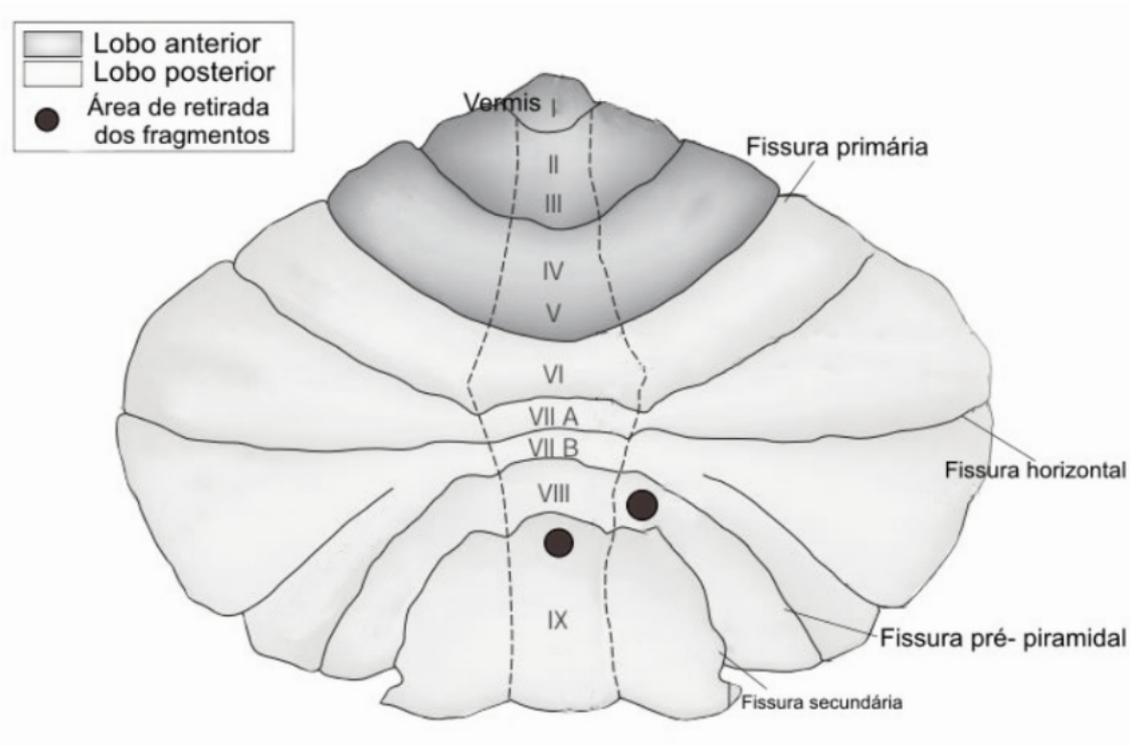
Todo o procedimento da análise morfométrica foi realizado por um único observador e de forma “cega”, ou seja, as lâminas foram avaliadas aleatoriamente. Em cada região, a análise de densidade foi realizada por meio de contagem das células de Purkinje em toda extensão do fragmento através de microscópio de luz convencional com objetiva de 40x (0,14 μ m). Em seguida, foram

capturadas imagens de toda a extensão da camada de células de Purkinje, utilizando o programa analisador de imagens AxionVision (Zeiss, Germany). A partir das imagens capturadas, foi obtida uma medida linear em μ m através do sistema analisador de imagens interativo Image J[®] (National Institutes of Health, Bethesda, EUA) (Figura 2). Após a contagem total das células de Purkinje e da medida linear total da camada foi possível obter a densidade, sendo os valores expressos em números de células por micrômetro (**μ m**).

Para a determinação da espessura da camada granulosa, as imagens de todos os campos histológicos foram capturadas por uma câmera de vídeo conectada a um microscópio de luz convencional, utilizando o programa AxionVision na objetiva de 10x (0,54 μ m). Posteriormente, a medida da espessura da camada granulosa foi realizada utilizando o sistema Image J, sendo o valor expresso em μ m (Figura 2). Para execução desse protocolo, foi utilizada uma metodologia usada previamente em nosso laboratório, no qual foram realizadas 5 medidas por campo, sendo uma medida central, duas nas extremidades e duas de pontos equidistantes entre a medida central e da extremidade¹³.

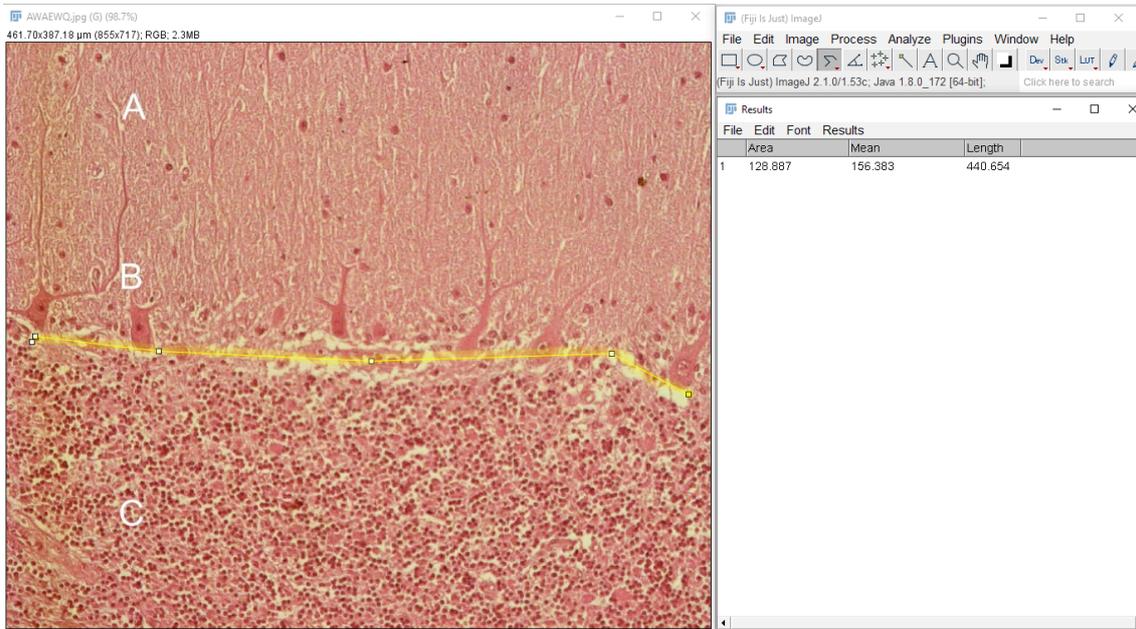
Os resultados foram avaliados utilizando o programa GraphPad Prism 5.0. Em casos de distribuição normal e variância homogênea foi utilizado o teste "t" de Student (t) para comparação de dois grupos, sendo os valores expressos em média \pm desvio padrão ($x \pm dp$). Em valores com distribuição não normal ou normal e variâncias não semelhantes foi utilizado o teste não paramétrico de Mann-Whitney (U). Nesse tipo de distribuição os valores foram expressos em mediana e valores mínimos e máximos (Med, Min-Máx). Foram consideradas estatisticamente significativas as diferenças em que a probabilidade (p) foi menor que 5% ($p < 0,05$).

Figura 1 - Divisão anatômica do cerebelo segundo as áreas funcionais de Larsell.



Fonte: adaptado de Manin¹⁴.

Figura 2 - Análise morfométrica do cerebelo de idosos e não autopsiados no HC-UFTM no período de 2000 a 2018 utilizando o sistema Image J® (National Institutes of Health, Bethesda, EUA)



A: Camada molecular; B: Camada de Células de Purkinje; C: Camada de células granulares.

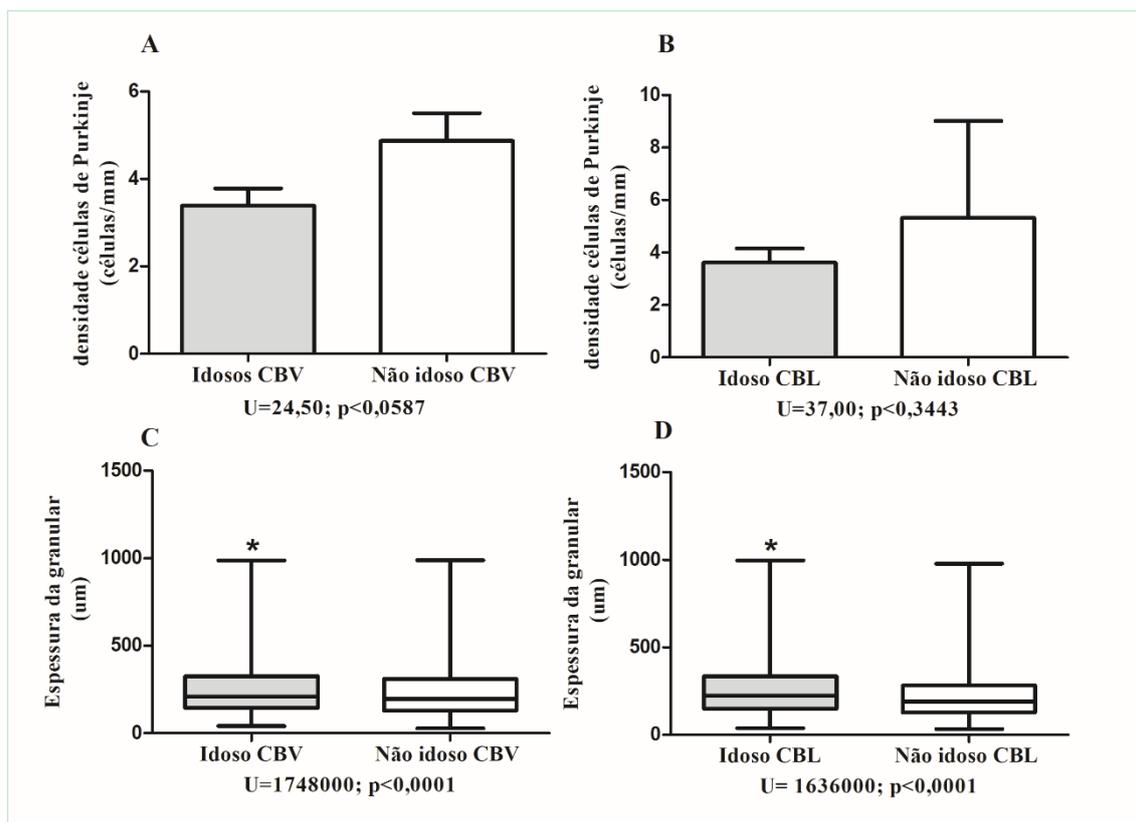
RESULTADOS

A média de idade no grupo de idosos foi de 69,22 ± 7,44 anos e no grupo de não idosos foi de 34,78 ± 9,6 anos. A distribuição dos grupos em relação ao gênero apresentou 40% dos pacientes sendo do sexo masculino e 60% do feminino. Em

relação a etnia, 90% da amostra foi considerada caucasiana e 10% de outras etnias.

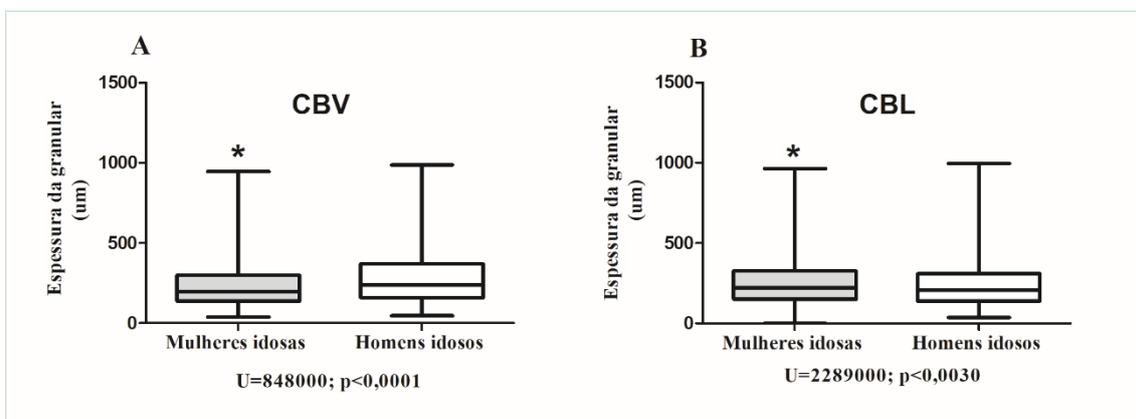
Os indivíduos considerados idosos apresentaram uma tendência de diminuição na densidade das células de Purkinje tanto na região CBV

Figura 3 - Densidade das células de Purkinje e a espessura da camada granular cerebelar de idosos e não idosos autopsiados no HC-UFTM, no período de 2000 a 2018



(CBV: vérmis cerebelar posterior. CBL: fragmento do lobo posterior direito).

Figura 4 - A espessura da camada granular cerebelar de mulheres e homens idosos autopsiados no HC-UFTM, no período de 2000 a 2018



(CBV: vérmis cerebelar posterior. CBL: fragmento do lobo posterior direito).

(3,38 cél/ μm vs 4,86 cél/ μm) quanto na região CBL (3,62 vs 5,32 cél/ μm) (Figura 3A-B), no entanto não foi observada significância estatística entre os grupos. Em relação à espessura da camada granulosa, o grupo idoso apresentou aumento em ambas as regiões analisadas (CBL: 261,80 vs 232,20 μm ; CBV: 258,10 vs 241,00 μm) (Figura 3C-D).

Na comparação entre os gêneros, as mulheres consideradas idosas apresentaram redução significativa na espessura da camada granulosa da região CBV quando comparada aos homens idosos (198,50 μm vs 239,10 μm) (Figura 4). No entanto, quando se analisa a região CBL, o grupo feminino exibiu maior espessura da camada células granulares (200,90 μm vs 181, 80 μm) (Figura 4).

DISCUSSÃO

O presente estudo buscou avaliar os possíveis efeitos do envelhecimento em promover alterações histomorfométricas em um dos principais componentes do SNC, o cerebelo. Existem relatos na literatura, de que organismos idosos podem ser acometidos pela incidência de alterações histomorfométricas que atingem esse órgão, tais como: mudanças no tamanho, número e formato das células de Purkinje. Além disso, reduções da área de superfície de arborização dendrítica também foram observadas, sugerindo que essas mudanças influenciam diretamente no circuito elétrico cerebelar básico^{5,6,11,16}.

As células de Purkinje são grandes neurônios GABAérgicos (Figura 2-B) que realizam sinapses tanto com as células da camada molecular (Figura 2-A) quanto com axônios dos neurônios granulares (Figura 2-C)⁵. A análise da densidade de Purkinje realizada no presente estudo, não nos possibilita afirmar com o devi-

do rigor estatístico que as alterações descritas anteriormente em animais, também se fazem presentes em humanos idosos. No entanto, é passível de destaque à tendência de redução dessas células observadas em ambas regiões avaliadas nos indivíduos idosos, desse modo, é necessário a realização de estudos complementares com o objetivo de melhor compreender o impacto da densidade neuronal cerebelar e suas possíveis consequências em atividades cotidianas, tais como equilíbrio, coordenação e desenvolvimento motor, alterações frequentemente observadas em idosos^{8,9,10,15}.

A análise da espessura da camada granulosa cerebelar evidenciou um aumento dessa nos indivíduos idosos, tanto na região do vérmis quanto no lobo posterior. O aumento da espessura da camada granulosa também foi observada em gatos por Zhang¹¹, o qual propôs a incidência de um aumento de aproximadamente 8% nos animais mais envelhecidos. No entanto, esse mesmo trabalho relatou redução de 22% na densidade dos neurônios que compõe a mesma camada granulosa, sugerindo o que parece ser a existência de um mecanismo adaptativo com objetivo de preservar o funcionamento do órgão e minimizar os efeitos do envelhecimento. Dessa forma, conforme ocorre a redução das células de Purkinje e do número de neurônios da camada granulosa, existe um processo de hiperplasia e hipertrofia de astrócitos, produzindo efeito neuroprotetor sobre o órgão para suprir os danos causados e manter o desempenho fisiológico^{11,17}.

Estudos recentes na área de neurociência têm levantando a hipótese de que além das alterações relacionadas a idade, o processo de envelhecimento pode progredir de maneira distinta nos diferentes gêneros, impactando em diver-

dos órgãos do SNC como cérebro, tronco encefálico e cerebelo¹⁸⁻²⁰. Vários estudos, usando técnicas de neuroimagem, como a ressonância magnética, relatam diferenças existentes nos hemisférios cerebelares, no vérmis e na ponte de homens e mulheres idosos²¹⁻²³. O estudo de Raz e colaboradores²⁴ revelou que mulheres idosas apresentaram maior atrofia das regiões citadas acima quando comparadas aos homens idosos. E esse resultado vai de encontro com os nossos achados, pois as mulheres idosas apresentaram redução significativa da espessura da camada granulosa cerebelar. No entanto, a região do lobo posterior apresentou aumento, e acreditamos que esse isso pode ser resultado de um mecanismo adaptativo com objetivo de preservar o funcionamento do órgão¹¹. Em relação às diferenças entre os gêneros, os resultados ainda são divergentes e está longe de serem esclarecidos, portanto mais estudos são necessários.

CONCLUSÃO

As alterações histomorfológicas que acometem diferentes regiões cerebelares, como o aumento da espessura da camada granular decorrente do processo de envelhecimento sugere a existência de um mecanismo adaptativo e compensatório para manutenção do funcionamento do órgão. Além disso, foi observado que existe uma diferença em relação ao gênero, apontando que o processo de senescência parece atingir de maneira distinta os diferentes sexos.

REFERÊNCIAS

1. Nordon DG, Guimarães RR, Kozonoe DY, Mancilha VS, Neto VSD. Perda cognitiva em idosos. *Rev Fac Ciênc Médicas Sorocaba*. 2009;11(3):5-8.
2. Reuter-Lorenz PA, Jonides J, Smith EE, Hartley A, Miller A, Marshuetz C et al. Age differences in the frontal lateralization of verbal and spatial working memory revealed by PET. *J Cogn Neurosci*. 2000;12(1):174-87.
3. Seidler RD, Bernard JA, Burutolu TB, Fling BW, Gordon MT, Gwin JT et al. Motor control and aging: links to age-related brain structural, functional, and biochemical effects. *Neurosci Biobehav Rev*. 2010;34(5):721-33.
4. Paul R, Grieve SM, Chaudary B, Gordon N, Lawrence J, Cooper N et al. Relative contributions of the cerebellar vermis and prefrontal lobe volumes on cognitive function across the adult lifespan. *Neurobiol Aging*. 2009;30(3):457-65.
5. Gilerovich EG, Fedorova EA, Grigorev IP, Korzhevskii DE. Morphological bases of reorganization of the rat cerebellar cortex in senescence. *Zhurnal Evoliutsionnoï Biokhimii Fiziol*. 2015;51(5):370-6.
6. Rogers J, Zornetzer SF, Bloom FE, Mervis RE. Senescent microstructural changes in rat cerebellum. *Brain Res*. 1984;292(1):23-32.
7. Zhang C, Zhu Q, Hua T. Effects of ageing on dendritic arborizations, dendritic spines and somatic configurations of cerebellar purkinje cells of old cat. *Pak J Zool*. 2011;43(6):1191-6.
8. Bernard JA, Seidler RD. Moving forward: age effects on the cerebellum underlie cognitive and motor declines. *Neurosci Biobehav Rev*. 2014;42:193-207.
9. MacLulich AMJ, Edmond CL, Ferguson KJ, Wardlaw JM, Starr JM, Seckl JR et al. Size of the neocerebellar vermis is associated with cognition in healthy elderly men. *Brain Cogn*. 2004;56(3):344-8.
10. Bernard JA, Leopold DR, Calhoun VD, Mittal VA. Regional cerebellar volume and cognitive function from adolescence to late middle age. *Hum Brain Mapp*. 2015;36(3):1102-20.
11. Zhang C, Hua T, Zhu Z, Luo X. Age-related changes of structures in cerebellar cortex of cat. *J Biosci*. 1 mar 2006;31(1):55-60.
12. Larsell O. Morphogenesis and evolution of the cerebellum. *Arch Neurol Psychiatry*. 1934;31(2):373-95.

13. Aquino Favarato GKN, Silva ACS, Oliveira LF, Fonseca Ferraz ML, Teixeira PA, Cavellani CL. Skin aging in patients with acquired immunodeficiency syndrome. *Ann Diagn Pathol.* 2020;24:35-9.
14. Manni E, Petrosini L. A century of cerebellar somatotopy: a debated representation. *Nat Rev Neurosci.* 2004;5(3):241-9.
15. Bernard JA, Seidler RD. Relationships between regional cerebellar volume and sensorimotor and cognitive function in young and older Adults. *The Cerebellum.* 2013;12(5):721-37.
16. Zhang C, Zhu Q, Hua T. Aging of cerebellar Purkinje cells. *Cell Tissue Res.* 2010;341(3):341-7.
17. Sabbatini M, Barili P, Bronzetti E, Zaccheo D, Amenta F. Age-related changes of glial fibrillary acidic protein immunoreactive astrocytes in the rat cerebellar cortex. *Mech Ageing Dev.* 1999;108(2):165-72.
18. Raz N, Rodrigue KM. Differential aging of the brain: patterns, cognitive correlates and modifiers. *Neurosci Biobehav Rev.* 2006;30(6):730-48.
19. Ampatzis K, Dermon CR. Sex differences in adult cell proliferation within the zebrafish (*Danio rerio*) cerebellum. *Eur J Neurosci.* 2007;25(4):1030-40.
20. Oguro H, Okada K, Yamaguchi S, Kobayashi S. Sex differences in morphology of the brain stem and cerebellum with normal ageing. *Neuroradiology.* 1998;40(12):788-92.
21. Luft AR. Patterns of age-related shrinkage in cerebellum and brainstem observed in vivo using three-dimensional MRI volumetry. *Cereb Cortex.* 1999;9(7):712-21.
22. Raz N, Dupuis JH, Briggs SD, McGavran C, Acker JD. Differential effects of age and sex on the cerebellar hemispheres and the vermis: A Prospective MR Study. 1998;7.
23. Torvik A, Torp S, Lindboe CF. Atrophy of the cerebellar vermis in ageing a morphometric and histologic study. :12.
24. Raz N, Gunning-Dixon F, Head D, Williamson A, Acker JD. Age and sex differences in the cerebellum and the ventral pons: a prospective MR study of healthy adults. 2001;7.

Correspondência para/Reprint request to:

Murilo Augusto Duarte Vieira

Faculdade de Medicina de Ribeirão

Universidade de São Paulo

CEP: 14.049-900

E-mail: muriloadvieira@usp.br

Recebido em: 17/03/2021

Aceito em: 25/10/2021