



**Universidade Estadual de Campinas
Faculdade de Ciências Médicas**

Thamires Naela Cardoso Magalhães

**Biomarcadores moleculares e de neuroimagem em pacientes com
Comprometimento Cognitivo Leve: estudo transversal e longitudinal**

Campinas

2021

THAMIRES NAELA CARDOSO MAGALHÃES

Biomarcadores moleculares e de neuroimagem em pacientes com Comprometimento

Cognitivo Leve: estudo transversal e longitudinal

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Doutora em Ciências, na área de Neurologia.

ORIENTADOR: PROF. DR. MARCIO LUIZ FIGUEREDO BALTHAZAR

ESTE TRABALHO CORRESPONDE À VERSÃO
FINAL DA TESE DEFENDIDA PELA
ALUNA THAMIRES NAELA CARDOSO MAGALHÃES, E ORIENTADA PELO
PROF. DR. MARCIO LUIZ FIGUEREDO BALTHAZAR

CAMPINAS
2021

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

M27b Magalhães, Thamires Naela Cardoso, 1991-
Biomarcadores moleculares e de neuroimagem em pacientes com comprometimento cognitivo leve : estudo transversal e longitudinal / Thamires Naela Cardoso Magalhães. – Campinas, SP : [s.n.], 2021.

Orientador: Marcio Luiz Figueredo Balthazar.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Doença de Alzheimer. 2. Biomarcadores. 3. Neuroimagem. 4. Substância branca. 5. Proteínas Tau. I. Balthazar, Marcio Luiz Figueredo, 1975-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Molecular and neuroimaging biomarkers in patients with mild cognitive impairment : cross-sectional and longitudinal study

Palavras-chave em inglês:

Alzheimer's disease

Biomarkers

Neuroimaging

White matter

Tau proteins

Área de concentração: Neurologia

Titulação: Doutora em Ciências

Banca examinadora:

Marcio Luiz Figueredo Balthazar

Marcondes Cavalcante França Junior

Rachel Paes Guimarães

Geraldo Busatto Filho

André Russowsky Brunoni

Data de defesa: 12-04-2021

Programa de Pós-Graduação: Ciências Médicas

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0002-0825-1387>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/9563417339474285>

COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE DOUTORADO
THAMIRES NAELA CARDOSO MAGALHÃES

ORIENTADOR: MARCIO LUIZ FIGUEREDO BALTHAZAR

MEMBROS TITULARES:

- 1. PROF. DR. MARCIO LUIZ FIGUEREDO BALTHAZAR**
- 2. PROF. DR. MARCONDES CAVALCANTE FRANÇA JUNIOR**
- 3. PROF. DRA. RACHEL PAES GUIMARÃES**
- 4. PROF. DR. GERALDO BUSATTO FILHO**
- 5. PROF. DR. ANDRÉ RUSSOWSKY BRUNONI**

Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

A ata de defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da FCM.

Data de Defesa: 12/04/2021

DEDICATÓRIA

Dedico todo o meu trabalho primeiramente a Deus.

Dedico o resultado final de tanto esforço à minha família, pais, avó, irmãs e marido que estavam sempre ao meu lado em todo caminho, dando suporte e me apoiando nos momentos de alegria e tristeza.

Dedico a amigas que sempre me ajudaram com palavras sábias, e quando mais precisei pude ter toda a certeza que estavam ao meu lado e torciam pelo meu crescimento. Camila, com você e seu exemplo aprendi a nunca desistir. Kate, com você aprendi que temos que entender nosso papel, acolher nossas limitações e ser grata por todas as oportunidades. Luciana, com você aprendi a ter garra e querer sempre mais. Tamires, com você aprendi que não importam as adversidades sempre teremos opções boas nos esperando.

Dedico também a amigos muito queridos que me apoiaram em todos os momentos. Adriel, obrigada pelo companheirismo, paciência e dedicação, graças a você consegui fazer minhas análises no estágio do exterior e não poderia deixar de te homenagear. Vinícius (Bold) por ser esse amigo tão especial que me acompanha há muitos anos.

Dedico aos amigos e colegas do laboratório de Neuroimagem e Física Médica da Universidade Estadual de Campinas que acompanharam meu trabalho.

Dedico a uma amiga muito especial, Madison Honey, que me acompanhou durante meu estágio no exterior me dando apoio e incentivo. Com boas risadas e aventuras aprendi a ser mais leve.

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001 e com apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp) – processo nº 2017/13906-9 – 2019/13003-4.

Agradeço a meu orientador Marcio Luiz Figueredo Balthazar, pela oportunidade de trabalhar no laboratório de neuroimagem (LNI) da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp) e por sua orientação.

Agradeço a participação dos pacientes e seus familiares nas etapas da pesquisa.

Agradeço o uso e colaborações de outros laboratórios para a realização da minha pesquisa, como o Laboratório de Genética Médica da Faculdade de Ciências Médicas chefiado pela professora Iscia Cendes e ao Laboratório de Imunologia do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas chefiado pela professora Leonilda Maria Barbosa do Santos.

Agradeço a colaboração do Laboratório LIM-27 da Universidade de São Paulo, chefiado pelo professor Orestes Vicente Forlenza, bem como a equipe que nos ajudou nas quantificações dos biomarcadores liquoricos.

Agradeço por todas as oportunidades de participar em congressos nacionais e internacionais que definitivamente contribuíram muito para minha carreira.

Agradeço a oportunidade de estágio no exterior, na faculdade de Amsterdam UMC - Vrije Universiteit medical center (VUmc), com a professora Charlotte Teunissen e sua equipe.

Por fim, agradeço por todas as experiências que o Doutorado me proporcionou. Todas fizeram diferença em minha vida profissional, mas principalmente pessoal.

Depois da tempestade vem a bonança.
Provérbio português

RESUMO

As demências neurodegenerativas são doenças que afetam a cognição, o comportamento e a independência do indivíduo, e o tipo mais prevalente é a doença de Alzheimer (DA). Alguns dos principais aspectos da fisiopatologia da DA é o excessivo depósito extracelular do peptídeo beta-amiloide (β A) e acúmulo intracelular da proteína Tau fosforilada (phosphorylated Tau (p-Tau) no cérebro, que podem ser quantificadas no líquido cefalorraquidiano (LCR). Indivíduos em fases prodrômicas como comprometimento cognitivo leve amnésico (CCLa) evoluem para demência da DA provável em uma taxa de ~10-15% ao ano. A busca por biomarcadores que possam diferenciar quais desses pacientes evoluirão para DA é tema de grande interesse, sobretudo pela perspectiva de drogas modificadoras da doença. Em relação a marcadores de neuroimagem, há a hipótese de que a DA pode ser uma síndrome de desconexão de redes neuronais envolvendo anormalidades que começam a nível sináptico e progressivamente resultam em perda e degeneração da substância branca (SB) e cinzenta (SC). No presente trabalho buscamos avaliar transversal e longitudinalmente pacientes com CCLa no *continuum* da DA, ou seja, com alteração do peptídeo β A (β A+) no exame de LCR. Analisamos diferentes técnicas de Ressonância Magnética (volume hipocampal (HV), medidas de imagem por tensor de difusão e conectividade funcional) e análises moleculares (quantificação do peptídeo β A e proteína Tau no LCR), tanto transversalmente quanto longitudinalmente (nesse caso, comparando CCLa β A+ em relação à conversão ou não para DA em um período de 13 meses. Utilizamos os programas Multi-Atlas, UF²C e Freesurfer para avaliar imagens de tensor de difusão, conectividade funcional e volume do hipocampo, respectivamente. Em nosso estudo transversal, encontramos diferenças significativas entre os pacientes e controles nas medidas de integridade da SB em vários tratos. Ainda, encontramos correlações significativas entre essas medidas com os níveis líquóricos da proteína Tau nas estruturas temporais mediais (fórnice e os tratos hipocampais do cíngulo direito). Em relação ao estudo longitudinal, mostramos que relação aos valores de HV o grupo conversor apresentou menor volume quando comparados ao grupo controle. E também observamos diferenças quanto a alterações de SB no feixe parahipocampal do cíngulo direito quando comparado o grupo conversor com os não-conversores e com os controles. As medidas estruturais parecem diferenciar melhor os grupos do que os outros marcadores.

Palavras-chaves: Doença de Alzheimer; Biomarcadores; Neuroimagem; Integridade da substância branca; Proteína Tau.

ABSTRACT

Neurodegenerative dementias are diseases that affect the individual's cognition, behavior and independence. The most prevalent type is the Alzheimer's disease (AD). Some of the main aspects of the pathophysiology of AD are the excessive extracellular deposition of amyloid-beta peptide ($A\beta$) and intracellular accumulation of phosphorylated Tau protein (p-Tau) in the brain, which can be quantified in cerebrospinal fluid (CSF). Individuals in prodromal phases such as amnesic mild cognitive impairment (aMCI) evolve to probable AD dementia at a rate of $\sim 10-15\%$ per year. The search for biomarkers that can differentiate which of these patients will evolve into AD is a topic of great interest, especially from the perspective of disease-modifying drugs. Regarding neuroimaging markers, there is the hypothesis that AD may be a syndrome of disconnection of neuronal networks involving abnormalities that begin at the synaptic level and progressively result in loss and degeneration of the integrity of the white matter (WM) and gray matter (GM). In the present work we seek to evaluate transversal and longitudinally patients with aMCI in the *continuum* of DA, that are, with alteration of the $A\beta$ ($A\beta +$) peptide in the CSF examination. We analyzed different techniques of Magnetic Resonance Imaging (MRI) (hippocampal volume (HV), measurements by diffusion tensor imaging (DTI) and functional connectivity (FC)) and molecular analyzes (quantification of the $A\beta$ peptide and Tau protein in the CSF), both transversely and longitudinally (in this case, comparing aMCI $A\beta +$ in relation to the conversion or not to AD in a period of 13 months. We used the programs Multi-Atlas, UF²C and Freesurfer to evaluate DTI parameters, FC and HV, respectively. In our cross-sectional study, we found significant differences between patients and controls in the measures of WM integrity in several tracts, we also found significant correlations between these measures with the CSF levels of Tau protein in the medial temporal structures (fornix and the hippocampal tracts of the right cingulate). We showed that in relation to the HV values, the converter group had a lower volume when compared to the control group. And we also observed differences in WM changes in the parahypocampal bundle of the right cingulate when comparing the converter group with the non-converters and with the controls. Structural measures seem to differentiate groups better than other markers.

Keywords: Alzheimer's disease; Biomarkers; Neuroimaging; White matter integrity; Tau protein.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Diferenças nas métricas de DTI nas principais regiões: fórnice, cíngulo e cíngulo hipocampal. (Fig.1 – Artigo: <i>Influência do volume hipocampal nas correlações entre danos na substância branca e a proteína Tau em pacientes com CCLa e DA leve</i>).....	45
Figura 2: Diferenças nas métricas de DTI comparando CCLa e controles saudáveis em outras regiões do cérebro. (Fig. 2 – Artigo: <i>Influência do volume hipocampal nas correlações entre danos na substância branca e a proteína Tau em pacientes com CCLa e DA leve</i>).....	46
Figura 3: Diferenças nas métricas DTI comparando CCLa e DA leve em outras regiões do cérebro. (Fig. 3 – Artigo: <i>Influência do volume hipocampal nas correlações entre danos na substância branca e a proteína Tau em pacientes com CCLa e DA leve</i>).....	46
Figura 4: Correlações parciais (r) entre os parâmetros de DTI da substância branca e os níveis do líquido cefalorraquidiano de beta-amilóide (β A), Tau total (t-Tau) e Tau fosforilada (p-Tau). (A) Representação anatômica do cíngulo hipocampal direito (vermelho) e do fórnice direito (verde) e (B) gráficos de correlações significativas - a cor de fundo indica a região anatômica correlacionada com os parâmetros DTI. (Fig. 4 – Artigo: <i>Influência do volume hipocampal nas correlações entre danos na substância branca e a proteína Tau em pacientes com CCLa e DA leve</i>).....	47
Figura 5: Cíngulo hipocampal direito, medida de difusividade radial. (Fig.1 – Artigo: <i>Diferenças na conectividade estrutural e funcional da DMN em pacientes com CCLa amilóide positivo que converteram para demência devido à doença de Alzheimer</i>).....	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Desenho do estudo representado por fluxograma com a relação dos sujeitos incluídos e divididos por estudo.....	22
Tabela 2. Comparação descritiva dos grupos e dados demográficos, principais dados neuropsicológicos e biomarcadores, p corrigido para idade e escolaridade (Tabela 1 – Artigo: <i>Influência do volume hipocampal nas correlações entre danos na substância branca e a proteína Tau em pacientes com CCLa e DA leve</i>)	43
Tabela 3. Comparação de grupo de dados de integridade de SB em regiões significativas. (Tabela 2 – Artigo: <i>Influência do volume hipocampal nas correlações entre danos na substância branca e a proteína Tau em pacientes com CCLa e DA leve</i>)	43
Tabela 4. Dados demográficos e cognitivos (Tabela 1 – Artigo: <i>Diferenças na conectividade estrutural e funcional da DMN em pacientes com CCLa amilóide positivo que converteram para demência devido à doença de Alzheimer</i>)	63
Tabela 5. DA biomarcadores, medidas de conectividade funcional e estrutural da DMN (Tabela 2 – Artigo: <i>Diferenças na conectividade estrutural e funcional da DMN em pacientes com CCLa amilóide positivo que converteram para demência devido à doença de Alzheimer</i>)	64

LISTA DE ABREVIACOES

DA – Doença de Alzheimer

β A – beta amiloide

t-Tau – tau-total

p-Tau – tau-fosforilada

LCR – Líquido Cefalorraquidiano

CCLa – Comprometimento Cognitivo Leve amnstico

RM – Ressonância Magnética

SB – Substância branca

SC – Substância cinzenta

DMN – *Default Mode Network*, rede de modo padrão

RCE – Rede de controle executivo

DTI – *Diffusion tensor imaging*

MD – *mean diffusivity*

RD – *radial diffusivity*

AxD – *axial diffusivity*

CDR – *Clinical Dementia Rating*

MEEM – Mini Exame de Estado Mental

UF²C – *User Friendly Functional Connectivity*

ROI – região de interesse

ELISA – ensaios imunoenzimáticos

SUMÁRIO

1. Introdução.....	14
1.1. Epidemiologia.....	14
1.2. Conceitos diagnósticos.....	14
1.3. Fisiopatologia – marcadores liquóricos.....	15
1.4. Biomarcadores de neuroimagem.....	16
1.4.1.Marcadores de integridade de substância branca.....	17
1.4.2.Marcadores de conectividade funcional.....	18
1.5. Hipóteses de desconexão de redes.....	19
1.6. Motivação do estudo.....	20
2. Objetivos.....	21
2.1. Geral.....	21
2.2. Específico.....	21
3. Métodos	22
3.1. Desenho do Estudo.....	22
3.2. Sujeitos.....	22
3.2.1.Critérios de Inclusão.....	23
3.2.2.Critérios de Exclusão.....	23
3.3. Avaliação por RM	23
3.4. Processamento das imagens.....	24
3.4.1. Imagens DTI – Multi-Atlas.....	24
3.4.2. Imagens funcionais – UF ² C	25
3.5. Análises marcadores	25
3.5.1. β A, t-Tau e p-Tau no LCR	25
4. Resultados.....	27
4.1. <i>Capítulo 1</i>	27
Artigo: Influência do volume hipocampal nas correlações entre danos na substância branca e a proteína Tau em pacientes com CCLa e DA leve	
4.2. <i>Capítulo 2</i>	48
Artigo: Diferenças na conectividade estrutural e funcional da DMN em pacientes com CCLa amilóide positivo que converteram para demência devido à doença de Alzheimer	
5. Discussão Geral.....	66
6. Conclusões.....	70
7. Referências.....	72
8. Anexo 1.....	79
8.1. Parecer do Comitê de Ética.....	79
8.2. Termo de consentimento livre e esclarecido.....	94

DEDICATÓRIA

Dedico todo o meu trabalho primeiramente a Deus.

Dedico o resultado final de tanto esforço à minha família, pais, avó, irmãs e marido que estavam sempre ao meu lado em todo caminho, dando suporte e me apoiando nos momentos de alegria e tristeza.

Dedico a amigas que sempre me ajudaram com palavras sábias, e quando mais precisei pude ter toda a certeza que estavam ao meu lado e torciam pelo meu crescimento. Camila, com você e seu exemplo aprendi a nunca desistir. Kate, com você aprendi que temos que entender nosso papel, acolher nossas limitações e ser grata por todas as oportunidades. Luciana, com você aprendi a ter garra e querer sempre mais. Tamires, com você aprendi que não importam as adversidades sempre teremos opções boas nos esperando.

Dedico também a amigos muito queridos que me apoiaram em todos os momentos. Adriel, obrigada pelo companheirismo, paciência e dedicação, graças a você consegui fazer minhas análises no estágio do exterior e não poderia deixar de te homenagear. Vinícius (Bold) por ser esse amigo tão especial que me acompanha há muitos anos.

Dedico aos amigos e colegas do laboratório de Neuroimagem e Física Médica da Universidade Estadual de Campinas que acompanharam meu trabalho.

Dedico a uma amiga muito especial, Madison Honey, que me acompanhou durante meu estágio no exterior me dando apoio e incentivo. Com boas risadas e aventuras aprendi a ser mais leve.

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001 e com apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp) – processo nº 2017/13906-9 – 2019/13003-4.

Agradeço a meu orientador Marcio Luiz Figueredo Balthazar, pela oportunidade de trabalhar no laboratório de neuroimagem (LNI) da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp) e por sua orientação.

Agradeço a participação dos pacientes e seus familiares nas etapas da pesquisa.

Agradeço o uso e colaborações de outros laboratórios para a realização da minha pesquisa, como o Laboratório de Genética Médica da Faculdade de Ciências Médicas chefiado pela professora Iscia Cendes e ao Laboratório de Imunologia do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas chefiado pela professora Leonilda Maria Barbosa do Santos.

Agradeço a colaboração do Laboratório LIM-27 da Universidade de São Paulo, chefiado pelo professor Orestes Vicente Forlenza, bem como a equipe que nos ajudou nas quantificações dos biomarcadores líquóricos.

Agradeço por todas as oportunidades de participar em congressos nacionais e internacionais que definitivamente contribuíram muito para minha carreira.

Agradeço a oportunidade de estágio no exterior, na faculdade de Amsterdam UMC - Vrije Universiteit medical center (VUmc), com a professora Charlotte Teunissen e sua equipe.

Por fim, agradeço por todas as experiências que o Doutorado me proporcionou. Todas fizeram diferença em minha vida profissional, mas principalmente pessoal.

Depois da tempestade vem a bonança.
Provérbio português

RESUMO

As demências neurodegenerativas são doenças que afetam a cognição, o comportamento e a independência do indivíduo, e o tipo mais prevalente é a doença de Alzheimer (DA). Alguns dos principais aspectos da fisiopatologia da DA é o excessivo depósito extracelular do peptídeo beta-amiloide (β A) e acúmulo intracelular da proteína Tau fosforilada (phosphorylated Tau (p-Tau) no cérebro, que podem ser quantificadas no líquido cefalorraquidiano (LCR). Indivíduos em fases prodrômicas como comprometimento cognitivo leve amnésico (CCLa) evoluem para demência da DA provável em uma taxa de ~10-15% ao ano. A busca por biomarcadores que possam diferenciar quais desses pacientes evoluirão para DA é tema de grande interesse, sobretudo pela perspectiva de drogas modificadoras da doença. Em relação a marcadores de neuroimagem, há a hipótese de que a DA pode ser uma síndrome de desconexão de redes neuronais envolvendo anormalidades que começam a nível sináptico e progressivamente resultam em perda e degeneração da substância branca (SB) e cinzenta (SC). No presente trabalho buscamos avaliar transversal e longitudinalmente pacientes com CCLa no *continuum* da DA, ou seja, com alteração do peptídeo β A (β A+) no exame de LCR. Analisamos diferentes técnicas de Ressonância Magnética (volume hipocampal (HV), medidas de imagem por tensor de difusão e conectividade funcional) e análises moleculares (quantificação do peptídeo β A e proteína Tau no LCR), tanto transversalmente quanto longitudinalmente (nesse caso, comparando CCLa β A+ em relação à conversão ou não para DA em um período de 13 meses. Utilizamos os programas Multi-Atlas, UF²C e Freesurfer para avaliar imagens de tensor de difusão, conectividade funcional e volume do hipocampo, respectivamente. Em nosso estudo transversal, encontramos diferenças significativas entre os pacientes e controles nas medidas de integridade da SB em vários tratos. Ainda, encontramos correlações significativas entre essas medidas com os níveis líquóricos da proteína Tau nas estruturas temporais mediais (fórnice e os tratos hipocampais do cíngulo direito). Em relação ao estudo longitudinal, mostramos que relação aos valores de HV o grupo conversor apresentou menor volume quando comparados ao grupo controle. E também observamos diferenças quanto a alterações de SB no feixe parahipocampal do cíngulo direito quando comparado o grupo conversor com os não-conversores e com os controles. As medidas estruturais parecem diferenciar melhor os grupos do que os outros marcadores.

Palavras-chaves: Doença de Alzheimer; Biomarcadores; Neuroimagem; Integridade da substância branca; Proteína Tau.

ABSTRACT

Neurodegenerative dementias are diseases that affect the individual's cognition, behavior and independence. The most prevalent type is the Alzheimer's disease (AD). Some of the main aspects of the pathophysiology of AD are the excessive extracellular deposition of amyloid-beta peptide ($A\beta$) and intracellular accumulation of phosphorylated Tau protein (p-Tau) in the brain, which can be quantified in cerebrospinal fluid (CSF). Individuals in prodromal phases such as amnesic mild cognitive impairment (aMCI) evolve to probable AD dementia at a rate of ~10-15% per year. The search for biomarkers that can differentiate which of these patients will evolve into AD is a topic of great interest, especially from the perspective of disease-modifying drugs. Regarding neuroimaging markers, there is the hypothesis that AD may be a syndrome of disconnection of neuronal networks involving abnormalities that begin at the synaptic level and progressively result in loss and degeneration of the integrity of the white matter (WM) and gray matter (GM). In the present work we seek to evaluate transversal and longitudinally patients with aMCI in the *continuum* of DA, that are, with alteration of the $A\beta$ ($A\beta +$) peptide in the CSF examination. We analyzed different techniques of Magnetic Resonance Imaging (MRI) (hippocampal volume (HV), measurements by diffusion tensor imaging (DTI) and functional connectivity (FC)) and molecular analyzes (quantification of the $A\beta$ peptide and Tau protein in the CSF), both transversely and longitudinally (in this case, comparing aMCI $A\beta +$ in relation to the conversion or not to AD in a period of 13 months. We used the programs Multi-Atlas, UF²C and Freesurfer to evaluate DTI parameters, FC and HV, respectively. In our cross-sectional study, we found significant differences between patients and controls in the measures of WM integrity in several tracts, we also found significant correlations between these measures with the CSF levels of Tau protein in the medial temporal structures (fornix and the hippocampal tracts of the right cingulate). We showed that in relation to the HV values, the converter group had a lower volume when compared to the control group. And we also observed differences in WM changes in the parahippocampal bundle of the right cingulate when comparing the converter group with the non-converters and with the controls. Structural measures seem to differentiate groups better than other markers.

Keywords: Alzheimer's disease; Biomarkers; Neuroimaging; White matter integrity; Tau protein.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Diferenças nas métricas de DTI nas principais regiões: fórnice, cíngulo e cíngulo hipocampal. (Fig.1 – Artigo: <i>Influência do volume hipocampal nas correlações entre danos na substância branca e a proteína Tau em pacientes com CCLa e DA leve</i>).....	45
Figura 2: Diferenças nas métricas de DTI comparando CCLa e controles saudáveis em outras regiões do cérebro. (Fig. 2 – Artigo: <i>Influência do volume hipocampal nas correlações entre danos na substância branca e a proteína Tau em pacientes com CCLa e DA leve</i>).....	46
Figura 3: Diferenças nas métricas DTI comparando CCLa e DA leve em outras regiões do cérebro. (Fig. 3 – Artigo: <i>Influência do volume hipocampal nas correlações entre danos na substância branca e a proteína Tau em pacientes com CCLa e DA leve</i>).....	46
Figura 4: Correlações parciais (r) entre os parâmetros de DTI da substância branca e os níveis do líquido cefalorraquidiano de beta-amilóide (β A), Tau total (t-Tau) e Tau fosforilada (p-Tau). (A) Representação anatômica do cíngulo hipocampal direito (vermelho) e do fórnice direito (verde) e (B) gráficos de correlações significativas - a cor de fundo indica a região anatômica correlacionada com os parâmetros DTI. (Fig. 4 – Artigo: <i>Influência do volume hipocampal nas correlações entre danos na substância branca e a proteína Tau em pacientes com CCLa e DA leve</i>).....	47
Figura 5: Cíngulo hipocampal direito, medida de difusividade radial. (Fig.1 – Artigo: <i>Diferenças na conectividade estrutural e funcional da DMN em pacientes com CCLa amilóide positivo que converteram para demência devido à doença de Alzheimer</i>).....	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Desenho do estudo representado por fluxograma com a relação dos sujeitos incluídos e divididos por estudo.....	22
Tabela 2. Comparação descritiva dos grupos e dados demográficos, principais dados neuropsicológicos e biomarcadores, p corrigido para idade e escolaridade (Tabela 1 – Artigo: <i>Influência do volume hipocampal nas correlações entre danos na substância branca e a proteína Tau em pacientes com CCLa e DA leve</i>)	43
Tabela 3. Comparação de grupo de dados de integridade de SB em regiões significativas. (Tabela 2 – Artigo: <i>Influência do volume hipocampal nas correlações entre danos na substância branca e a proteína Tau em pacientes com CCLa e DA leve</i>)	43
Tabela 4. Dados demográficos e cognitivos (Tabela 1 – Artigo: <i>Diferenças na conectividade estrutural e funcional da DMN em pacientes com CCLa amilóide positivo que converteram para demência devido à doença de Alzheimer</i>)	63
Tabela 5. DA biomarcadores, medidas de conectividade funcional e estrutural da DMN (Tabela 2 – Artigo: <i>Diferenças na conectividade estrutural e funcional da DMN em pacientes com CCLa amilóide positivo que converteram para demência devido à doença de Alzheimer</i>)	64

LISTA DE ABREVIACOES

DA – Doença de Alzheimer

β A – beta amiloide

t-Tau – tau-total

p-Tau – tau-fosforilada

LCR – Líquido Cefalorraquidiano

CCLa – Comprometimento Cognitivo Leve amnstico

RM – Ressonância Magnética

SB – Substância branca

SC – Substância cinzenta

DMN – *Default Mode Network*, rede de modo padrão

RCE – Rede de controle executivo

DTI – *Diffusion tensor imaging*

MD – *mean diffusivity*

RD – *radial diffusivity*

AxD – *axial diffusivity*

CDR – *Clinical Dementia Rating*

MEEM – Mini Exame de Estado Mental

UF²C – *User Friendly Functional Connectivity*

ROI – região de interesse

ELISA – ensaios imunoenzimáticos

SUMÁRIO

1. Introdução.....	14
1.1. Epidemiologia.....	14
1.2. Conceitos diagnósticos.....	14
1.3. Fisiopatologia – marcadores liquóricos.....	15
1.4. Biomarcadores de neuroimagem.....	16
1.4.1. Marcadores de integridade de substância branca.....	17
1.4.2. Marcadores de conectividade funcional.....	18
1.5. Hipóteses de desconexão de redes.....	19
1.6. Motivação do estudo.....	20
2. Objetivos.....	21
2.1. Geral.....	21
2.2. Específico.....	21
3. Métodos.....	22
3.1. Desenho do Estudo.....	22
3.2. Sujeitos.....	22
3.2.1. Critérios de Inclusão.....	23
3.2.2. Critérios de Exclusão.....	23
3.3. Avaliação por RM.....	23
3.4. Processamento das imagens.....	24
3.4.1. Imagens DTI – Multi-Atlas.....	24
3.4.2. Imagens funcionais – UF ² C.....	25
3.5. Análises marcadores.....	25
3.5.1. β A, t-Tau e p-Tau no LCR.....	25
4. Resultados.....	27
4.1. <i>Capítulo 1</i>	27
Artigo: Influência do volume hipocampal nas correlações entre danos na substância branca e a proteína Tau em pacientes com CCLa e DA leve	
4.2. <i>Capítulo 2</i>	48
Artigo: Diferenças na conectividade estrutural e funcional da DMN em pacientes com CCLa amilóide positivo que converteram para demência devido à doença de Alzheimer	
5. Discussão Geral.....	66
6. Conclusões.....	70
7. Referências.....	72
8. Anexo 1.....	79
8.1. Parecer do Comitê de Ética.....	79
8.2. Termo de consentimento livre e esclarecido.....	94

1. Introdução

1.1. Epidemiologia

As demências neurodegenerativas são doenças que afetam a cognição, o comportamento e a independência do indivíduo. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), estima-se que mais de 60 milhões de pessoas no mundo foram diagnosticadas com o tipo mais comum de demência, a doença de Alzheimer (DA) (2017). A DA tornou-se um grande problema de saúde pública que tende a se intensificar devido, sobretudo ao envelhecimento da população (OMS, 2016), afetando a qualidade de vida das pessoas longevas, especialmente nos países em desenvolvimento. No Brasil o número de pessoas com DA contabiliza atualmente 1,2 milhões de pessoas com uma prevalência de 10,5% na população acima de 65 anos e, a cada ano, surgem 55 mil novos casos (Burlá *et al.*, 2013).

1.2. Conceitos diagnósticos

Em 2011, o *National Institute of Aging/Alzheimer's Association* (NIA/AA) propôs os conceitos diagnósticos separados para os estágios pré-clínicos (sem comprometimento cognitivo na avaliação neuropsicológica e evidência de algum biomarcador para DA), comprometimento cognitivo leve (CCL) devido à DA (comprometimento na memória – CCL amnésico (CCLa) e demência devido a DA (demência e evidência de biomarcador) (Sperling *et al.*, 2011). Após a divulgação desses conceitos, diversos estudos indicaram que o declínio cognitivo na DA ocorre continuamente por um longo período de tempo (Resnick *et al.*, 2010; Wilson *et al.*, 2010; Monsell *et al.*, 2014) e que a progressão das medidas dos biomarcadores também é um processo contínuo que começa antes mesmo dos sintomas (Bateman *et al.*, 2012; Villemagne *et al.*, 2013; Dubois *et al.*, 2016).

Indivíduos em fases pré-demenciais tendem a progredir para a DA provável em uma taxa de aproximadamente 10-15% ao ano (Braak e Braak, 1995; Braak *et al.*, 1998). Uma intervenção hipotética que pudesse atrasar o início da DA em 5 anos resultaria em uma redução de 57% no número de pacientes diagnosticados. Modelos estatísticos recentes sugerem que um instrumento de rastreamento para marcadores do processo fisiopatológico da DA e um tratamento que retarda a progressão em 50% reduziriam esse risco para 5,7% (Sperling *et al.*, 2011).

É sabido que o processo fisiopatológico da DA, assim como a presença de alterações cognitivas sutis, começa anos antes do desenvolvimento dos sintomas sugestivos de CCL ou demência na DA e essas alterações podem ser detectadas ainda em fases pré-clínicas. Apesar disso, alguns indivíduos que apresentam evidência dos processos fisiopatológicos da DA nunca desenvolvem os sintomas da doença. Justamente por isso, os estudos acerca de biomarcadores devem ser incentivados, buscando tanto um melhor entendimento dos processos fisiopatológicos, quanto uma melhor acurácia na sensibilidade e especificidade desses métodos.

1.3. Fisiopatologia – marcadores líquóricos

O entendimento da fisiopatologia da DA aumentou significativamente nos últimos 20 anos, o que exigiu uma revisão em 2011 dos critérios diagnósticos mais utilizados, incorporando os biomarcadores de neuroimagem e líquido cefalorraquidiano (LCR).

Em relação à DA, as características anátomo-patológicas mais marcantes são a presença anormal de placas neuríticas, emaranhados neurofibrilares e diminuição de densidade sináptica. As placas neuríticas são compostas por um núcleo central contendo o peptídeo beta-amiloide (β A). Resumidamente, o peptídeo β A se origina após duas clivagens proteolíticas na proteína precursora do β A (PP β A), que são realizadas pelas enzimas γ e β -secretase. A PP β A também pode ser clivada pela α -secretase, o que evita a formação do β A (Eckman e Eckman, 2007; Poirier *et al.*, 2001). Os emaranhados neurofibrilares contêm filamentos helicoidais pareados originados da hiperfosforilação (*phosphorylated* Tau (p-Tau)) da proteína Tau (uma proteína associada aos microtúbulos), o que gera desestabilização do citoesqueleto celular e morte neuronal (Poirier *et al.*, 2001).

A alteração dessas proteínas leva os pacientes a desenvolver problemas cognitivos e neuropsiquiátricos que prejudicam sua independência funcional (Braskie and Thompson, 2014; Beckett *et al.*, 2015; Kang *et al.*, 2015; Weiner *et al.*, 2015a; Weiner *et al.*, 2015b; Weiner *et al.*, 2017a; Weiner *et al.*, 2017b). Essas proteínas em níveis específicos podem ser quantificadas tanto no LCR quanto em exames de imagem molecular – tomografia por emissão de pósitrons (PET) – determinando se o indivíduo está no *continuum* fisiopatológico da DA.

O modelo teórico da sequência temporal dos eventos fisiopatológicos na DA aponta o peptídeo β A como peça-chave inicial no desencadeamento do processo. Esse estágio

inicial da DA pré-clínica (estágio 1 ou amiloidose assintomática) pode ser demonstrado por meio de biomarcadores como diminuição do βA_{1-42} no LCR ou alta captação do marcador para βA em exames de PET. Com a progressão do processo, surgem evidências de neurodegeneração com aumento de proteína Tau total e p-Tau no LCR, além de evidências de disfunção neuronal (detectadas por meio de exames de FDG-PET ou Ressonância Magnética funcional - fRM). Nessa fase pré-clínica também é possível encontrar alterações estruturais como diminuição de espessura cortical e atrofia hipocampal. Essas alterações se intensificam com a progressão da doença e, já na fase de demência leve na DA, esses biomarcadores atingem um platô e tendem a permanecer estáveis. Nas fases moderada e avançada há intensificação das alterações desses biomarcadores (Sperling *et al.*, 2011).

1.4. Biomarcadores de neuroimagem

Os estudos sobre predição da DA são quase sempre sobre os indivíduos com evidência de amiloidose cerebral, porém a proteína βA e a proteína Tau não explicam todo o fenômeno da fisiopatologia da doença (Ono, 2017). Os biomarcadores de neuroimagem, adquiridos por exames de RM e PET, também oferecem importantes ferramentas para se avaliar a doença e ainda com o maior benefício de não serem técnicas invasivas. A análise da atrofia do hipocampo fornece biomarcadores confiáveis, embora não necessariamente específico para o processo fisiopatológico de DA (Dickerson and Wolk, 2013; Jack *et al.*, 2016).

Em 2018 houve uma atualização unificadora das classificações rotulada de "estrutura de pesquisa" devido ao seu uso apenas para fins de pesquisa observacional e intervencionista, não para cuidados clínicos de rotina. A DA é definida por seus processos patológicos subjacentes que podem ser documentados por exame *post-mortem* ou *in vivo* por biomarcadores. A estrutura de pesquisa se concentra no diagnóstico de DA com biomarcadores em pessoas vivas. Os biomarcadores são agrupados em deposição do peptídeo βA , proteína Tau e neurodegeneração (p-Tau e/ou atrofia hipocampal) - classificação AT(N). Este sistema de classificação AT(N) agrupa diferentes biomarcadores (imagem e biofluidos) pelo processo patológico que cada um mede. O sistema AT(N) é flexível, pois novos biomarcadores podem ser adicionados aos três grupos existentes quando estiverem disponíveis (Jack *et al.*, 2018).

Apesar de numerosos estudos com diferentes métodos estruturais de RM, a atrofia do hipocampo continua sendo um dos biomarcadores de neuroimagem mais confiáveis,

embora não necessariamente específico para o processo fisiopatológico da DA. Outras técnicas estruturais, como imagem por tensor de difusão (DTI) que avalia a integridade da substância branca (SB), também são promissoras para identificar indivíduos com CCL que converterão para DA e pode também ajudar a entender com mais precisão o processo patológico da doença, especialmente porque este método pode detectar sutis alterações antes mesmo do aparecimento da doença (Pereira *et al.*, 2017; Shu *et al.*, 2017).

1.4.1. Marcadores de integridade de substância branca

A técnica por DTI é usada para avaliar a integridade microestrutural da SB *in vivo*. Essa técnica se baseia na determinação probabilística da difusão da molécula de água no tecido, ajudando a quantificar a integridade dos tratos cerebrais (Kantarci *et al.*, 2017). Estudos usando DTI demonstraram que a integridade da SB se mostra interrompida já nos estágios pré-clínicos da DA (Adluru, *et al.*, 2014; Fischer, *et al.*, 2015; Kantarci, *et al.*, 2014; Prescott, *et al.*, 2014). Essas alterações são inicialmente localizadas nos tratos temporais mediais límbico e tendem a se espalhar para o restante dos tratos temporais e parietais à medida que a doença clínica progride (Demirhan, *et al.*, 2015; Kantarci, *et al.*, 2010; Konukoglu, *et al.*, 2016; Nowrangi, *et al.*, 2013).

Anatomicamente, envolvendo essas mesmas regiões segue a progressão da neurodegeneração da substância cinzenta (SC), atrofia cortical e interrupção metabólica na DA (Jack, *et al.*, 2012, Kuczynski, *et al.*, Villain *et al.*, 2008). Essa concordância anatômica entre a degeneração da SC e SB sugere que a ruptura em tratos pode estar associada à patologia da DA, particularmente com a patologia dos emaranhados neurofibrilares da proteína Tau. Apesar de numerosos estudos na literatura sobre DTI dentro do espectro clínico da doença, pouco se sabe sobre a base patológica desses achados. *In vivo* estudos envolvendo DTI podem revelar um padrão de alterações associadas à patologia da DA.

Os principais índices de difusão usados para analisar a integridade da SB são: anisotropia fracionada (FA), a difusividade média (MD), a difusividade radial (RD) e a difusividade axial (AxD). A diminuição dos valores de FA e o aumento da difusividade estão associados à degeneração na SB (Kantarci *et al.*, 2017). O RD é mais sensível às mudanças no diâmetro e na densidade do axônio: valores altos de RD indicam uma espessura menor da bainha de mielina. AxD representa a direção máxima de difusão e dá uma estimativa primária da direção da fibra (Kantarci *et al.*, 2017). Na DA espera-se

encontrar alterações nessas medidas, observando uma redução da FA e aumento das outras medidas que se relacionam com lesões.

Para as análises de integridade da SB, usamos uma abordagem de segmentação Multi-Atlas, que é uma investigação bastante detalhada e refinada que pode avaliar tratos mais finos e menores, permitindo a análise de diferenças que podem ser mais sutis nos estágios iniciais da doença.

1.4.2. Marcadores de conectividade funcional

Análises de conectividade funcional (CF) por fRM em estado de repouso podem trazer outros potenciais biomarcadores de neuroimagem, especialmente porque o método pode detectar alterações funcionais mesmo antes da atrofia de substância cinzenta (Luria, 1973; Mesulam, 1998; Weiler *et al.*, 2017).

As redes neurofuncionais humanas têm uma organização topológica exclusiva, cada qual contribuindo de forma específica para o funcionamento do sistema como um todo. Pode-se dizer que o estudo da conectividade, tanto funcional quanto estrutural, se baseia em dois conceitos: o de segregação e o de integração. O conceito de segregação é fundamentado pelo fato de que funções cerebrais que respondem a estímulos de mesma natureza podem ser mapeadas em regiões específicas. Já o conceito de integração é fundamentado pela necessidade de uma integração funcional entre diferentes regiões do cérebro que resulta em uma ativação coordenada de diversos grupos neuronais (Bullmore and Sporns, 2009).

A atividade simultânea de diversas regiões cerebrais em conjunto com um padrão definido de comunicação é a base do processamento de informações nos seres humanos, e é nessa atividade onde podemos encontrar anormalidades comuns a determinadas doenças (Bullmore and Sporns, 2009; Pereira *et al.*, 2017).

As doenças neurodegenerativas como a DA estão entre as principais patologias que podem desintegrar essa organização cerebral, causando tanto problemas cognitivos (memória, atenção, linguagem, praxias, funções executivas) quanto sintomas psiquiátricos (apatia, depressão, desinibição, mudança de personalidade, entre outros).

Novos métodos em RM funcional podem ser úteis na identificação destas redes neurofuncionais. Um exemplo é a análise da modulação espontânea do sinal BOLD (“*blood oxygenation level dependent*”), na ausência de um paradigma experimental ou de qualquer outro estímulo explícito. Esta análise é conhecida como conectividade funcional

intrínseca ou "*resting-state fMRI*". Diversos estudos mostraram que na ausência de tarefas ocorre atividade espontânea com oscilações síncronas do sinal BOLD, geralmente em baixa frequência (0,01 a 0,1 Hz), dentro de grupos de regiões corticais e subcorticais espacialmente distintos, mas funcionalmente relacionados (Fox e Raichle, 2007; Deshpande *et al.*, 2010; van den Heuvel e Pol, 2010).

A rede neuronal mais comumente estudada na DA é a Rede de Modo Padrão (*Default Mode Network* (DMN)) onde há evidência precoce de deposição do peptídeo β A. A DMN é constituída por algumas áreas chaves como giro do cíngulo posterior, precúneo, córtex pré-frontal medial anterior, formação hipocampal, entre outras. (Buckner *et al.*, 2008; Balthazar *et al.*, 2014; Chand *et al.*, 2017; Weiler *et al.*, 2017; Habib *et al.*, 2017).

Alguns estudos mostram que há uma desintegração da conectividade funcional (associada a atrofia/ disfunção das estruturas anatômicas) da DMN mesmo na fase inicial da DA (Zhang *et al.*, 2010; Greicius *et al.*, 2004). Outros estudos apontam que há uma menor desativação na DMN quando pacientes com DA executam tarefas cognitivas, o que justificaria em parte o desempenho inferior destes pacientes (Pihlajamäki e Sperling, 2009; Persson *et al.*, 2008).

1.5. Hipóteses de desconexão de redes

Estudos abordando a hipótese de que a DA pode ser uma síndrome de desconexão de redes envolvendo anormalidades que começam a nível sináptico e progressivamente resultam em perda e degeneração da integridade da SB e SC (Delbeuck *et al.*, 2003; Mito *et al.*, 2018) mostram resultados bastante interessantes.

Alguns estudos avaliaram a conectividade estrutural ao longo do tempo, porém ainda não está claro se indivíduos com biomarcadores positivos ou negativos apresentam disfunções na conectividade entre as estruturas anatômicas (Pereira *et al.*, 2017).

As hipóteses que mais vem ganhando atenção atualmente e que poderiam explicar essas desconexões de redes são as hipóteses de degeneração Walleriana (DW) e de retrôgenese. A hipótese de DW envolve alterações corticais primárias às alterações de SB (McAleese *et al.*, 2017) enquanto a hipótese de retrôgenese engloba alterações de SB primária (quebra da mielina e dano axonal) posteriormente levando à morte do corpo neuronal (Alves *et al.*, 2015).

Porém, existe outra possibilidade que chama atenção. Essa possibilidade se refere às alterações estruturais e funcionais causadas pela propagação das proteínas patológicas da

DA, especialmente pela proteína Tau (Vaquer-Alicia e Diamond, 2019). Por exemplo, a hiperfosforilação da proteína Tau leva à desestabilização dos microtúbulos do citoesqueleto que são fundamentais para o transporte axonal, resultando na degradação das proteínas axonais do citoesqueleto e na subsequente perda das fibras do axônio (Chen *et al.*, 2018; Vaquer-Alicia e Diamond, 2019). Outra possibilidade de um dano direto a SB é o padrão de propagação dessas proteínas por meio de redes neurais interconectadas de forma semelhante a um príon (“viral”) (Nussbaum *et al.*, 2013).

Nossa hipótese é que correlações significativas com tratos anatomicamente e funcionalmente distantes de regiões atroficas mais bem estabelecidas suportariam um efeito mais direto das proteínas patológicas, enquanto as correlações dos lobos temporais mediais favoreceriam uma DW e/ou uma disseminação direta da patologia do hipocampo.

1.6. Motivação do estudo

Como já abordado, o processo fisiopatológico da DA começa anos antes do desenvolvimento dos sintomas sugestivos de CCL ou demência na DA e essas alterações podem ser detectadas ainda em fases pré-clínicas. Nesse trabalho buscamos avaliar os biomarcadores transversal e longitudinalmente principalmente nos pacientes com CCLa no *continuum* fisiopatológico da DA (βA^+).

Buscamos verificar se esses biomarcadores estão relacionados uns aos outros no processo de degeneração, indo de acordo com algumas das hipóteses discutidas anteriormente.

Sabemos o quanto é importante o estudo envolvendo os biomarcadores e mais importante ainda é avaliarmos esses marcadores em nossa população brasileira para entendermos melhor o processo de conversão desses pacientes.

Para tal objetivo, selecionamos marcadores bem estabelecidos e outros que parecem ser promissores: a) examinamos os marcadores obtidos através de exame de RM estrutural (parâmetros de DTI) e funcional (conectividade funcional por RM e b) identificamos os marcadores obtidos através do LCR coletado. Buscamos observar também se esses diferentes biomarcadores podem diferenciar os pacientes que converteram para DA ao longo de um período de pelo menos seis meses.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Comparar os grupos CCLa, DA leve e controles tanto transversal como longitudinalmente (nesse caso, considerando a conversão ou não para demência do grupo CCLa) em relação aos biomarcadores de imagem e moleculares, assim como verificar possíveis correlações entre os diferentes biomarcadores.

2.2. Objetivos específicos

2.3.1. *Artigo 1 (análise transversal)*

- Verificar se há diferenças entre os grupos CCLa, controle e DA leve em relação a medidas de DTI (FA, MD, RD e AxD), em cérebro todo;
- Verificar se há correlação entre os parâmetros de DTI com as medidas das proteínas liquóricas (βA_{1-42} , p-Tau e t-Tau).

2.3.2. *Artigo 2*

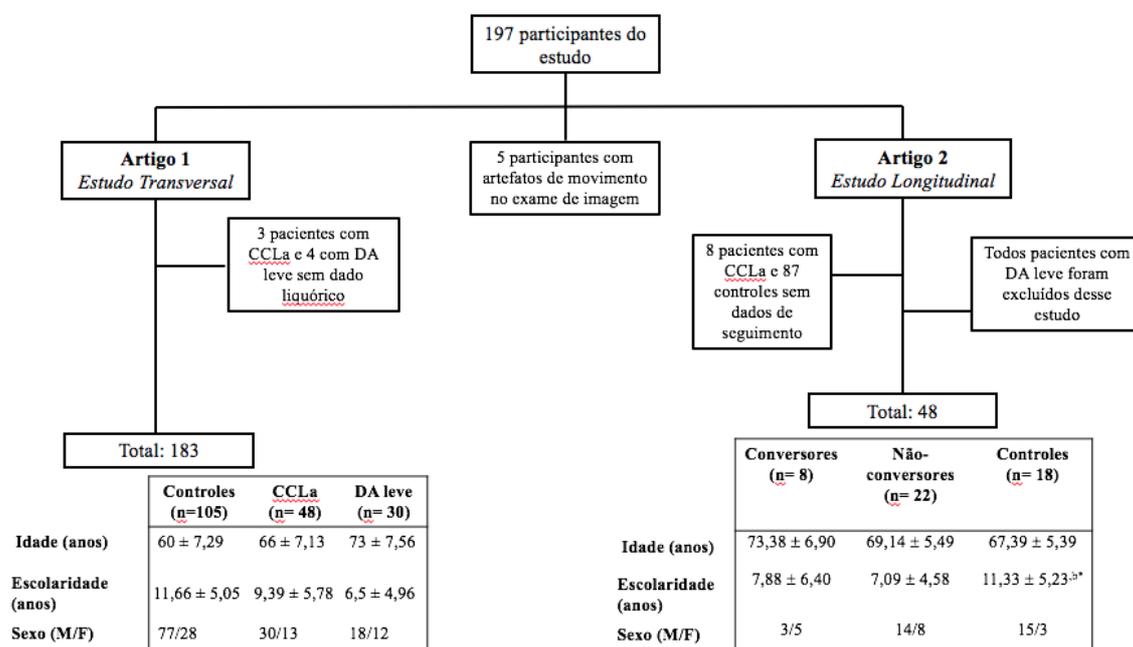
- Avaliar a evolução clínica de pacientes com CCLa $\beta A+$ em relação à conversão ou não para demência, após um período mínimo de 6 meses entre as avaliações neuropsicológicas;
- Verificar se há diferenças nas medidas iniciais do volume hipocampal, da CF e estrutural nos subgrupos conversores, não-conversores e controles;
- Verificar se há diferenças nos níveis de proteínas liquóricas entre os subgrupos conversores e não-conversores.

3. Métodos

3.1. Desenho do Estudo

Fluxograma representando o desenho do estudo incluindo o número de participantes que foram excluídos ao longo da pesquisa devido a diversos fatores, como por exemplo: dados faltantes e/ou problemas na aquisição da imagem.

Tabela 1. Desenho do estudo representado por fluxograma com a relação dos sujeitos incluídos e divididos por estudo



Nota: ±: média e desvio padrão; CCLa: comprometimento cognitivo leve amnésico; DA: doença de Alzheimer.

3.2. Sujeitos

Todos os indivíduos fizeram uma avaliação neuropsicológica detalhada por um profissional qualificado. Foram aplicados testes que avaliaram atividades funcionais, cognição global, memória de trabalho, memória episódica, funções executivas, linguagem e habilidades visuoespaciais. Após classificarmos de acordo com os critérios de inclusão e exclusão (itens: 3.1.1 e 3.1.2), os participantes fizeram também exame de RM, coleta de sangue e/ou LCR. Os indivíduos diagnosticados com CCL e DA leve fizeram coleta do LCR através de punção lombar, mas não obtivemos autorização do comitê de ética para coleta de LCR em controles saudáveis.

Foi realizada também uma coleta e avaliação sanguínea pelo próprio laboratório de coleta do Hospital de Clínicas da Unicamp. Foram analisados hemograma, perfil

lipídico, glicemia, vitamina B12, ácido fólico, hormônios tireoidianos, sorologia para sífilis, função renal e eletrólitos.

Nos estudos que demos seguimento longitudinal, após um período de no mínimo seis meses os participantes foram convocados novamente para nova avaliação neuropsicológica, exame de RM e coleta de sangue.

O protocolo e termo de consentimento assinado pelos participantes do estudo foram aprovados pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP), número do parecer: 3.789.470 / CAAE: 72359417.8.0000.5404 (**Anexo 1**).

Dividimos os sujeitos conforme com os artigos (Capítulo 1 e 2), de acordo com a **Tabela 1**.

3.2.1. Critérios de Inclusão

Baseados nos critérios do NIA/AA para provável DA e para CCL (Albert *et al.*, 2011). *Clinical Dementia Rating* (CDR) (Morris, 1993) = 1 para DA leve, =0,5 para CCLa e =0 para controles. Para o grupo controle: desempenho cognitivo normal para idade e escolaridade, não apresentarem desordem neurológica ou psiquiátrica, ou estarem sob uso de medicação psicoativa; apresentar pontuação considerada normal no Miniexame de Estado Mental (MEEM) (Folstein *et al.*, 1975), levando em consideração a idade e educação (Brucki *et al.*, 2003) e não apresentar anormalidades nas imagens estruturais;

Para dividirmos os grupos CCL-estável e CCL-conversor, nos baseamos no desempenho da avaliação neuropsicológica e mudança do CDR.

3.2.2. Critérios de Exclusão

Escore isquêmico de Hachinski (Hachinski *et al.*, 2006) > 4 para os três grupos (DA leve, CCLa e Controles). Escala Fazekas > 1 (Fazekas *et al.*, 1987). Histórico de outra doença neurológica ou psiquiátrica prévia; de traumatismo crânio-encefálico com perda de consciência por mais de 30 minutos; de exposição crônica a substâncias neurotóxicas ou alcoolismo. Doenças clínicas descompensadas. Uso de drogas sedativas/hipnóticas 24 horas antes dos testes neuropsicológicos e dificuldade de entender ou executar os testes proposto.

3.3. Avaliação por RM

Os exames de RM foram realizados em um aparelho de 3T Achieva-Intera PHILIPS®. Foram adquiridas as seguintes imagens:

a) Para avaliação da substância cinzenta (córtex e gânglios da base) foi adquirida uma imagem T1 tridimensional de alta resolução: voxels isotrópicos de 1mm, adquiridos no plano sagital (240x240x180, voxel size 1x1x1mm³, TR/TE 7/3.201ms, flip angle 8°);

b) RM funcional em repouso (“*resting-state*”) para avaliar conectividade funcional. As imagens funcionais em repouso (fRM) foram adquiridas com o paciente com olhos fechados durante a aquisição. As imagens foram baseadas em imagens eco planar (EPI), TR / TE = 2000/30 ms, FOV = 240 × 240, voxels isotrópicos definido para 3 mm³, nenhuma diferença com um tempo de varrimento total de 6 minutos, resultando em 180 dinâmicas (volumes cerebrais completos) com 40 cortes axiais cada;

c) Para avaliação da integridade da substância branca foi usada uma imagem ponderada por tensor de difusão: sequência spin echo - *Diffusion Tensor Imaging* (DTI), voxel 2x2x2 mm³, interpolada para 1x1x2 mm³; matriz reconstruída 256x256; 70 fatias; TE/TR 61/8500 ms; flip angle de 90 °; 32 direções; sem médias; max b-fator = 1000s/mm²; digitalizar por seis minutos;

d) T2-FLAIR (*fluid attenuation inversion recovery*) com supressão de gordura, para avaliação de lesões de substância branca: Imagens axiais paralelas ao eixo longo do hipocampo, 4 mm de espessura; TR, 12000; TE, 140; matriz, 224x160; e FOV, 200x186x149.

3.4. *Processamento das imagens*

3.4.1. *Imagens DTI – Multi-Atlas*

As imagens foram processadas usando “MRICloud” (<https://mricloud.org/>), uma plataforma web gratuita que é usada para realizar a segmentação automatizada multimodal das imagens.

As imagens DTI foram corregistradas e corrigidas para correntes de Foucault (J *et al.*, 2006) e para movimento do sujeito, uma transformação de 12 parâmetros (Woods *et al.*, 1998). Os parâmetros do DTI foram calculados usando um encaixe linear multivariado e remoção de tecido não cerebral, a imagem b=0, pelo limiar de intensidade, uma ferramenta do software RoiEditor (Y *et al.*, 2011). Após esse processo, um registro não linear utilizando um LDDMM multicontraste foi utilizado, em seguida, aplica-se algoritmo *Diffeomorphic Likelihood Fusion Algorithm* (DLFA) (X *et al.*, 2015). Oito atlas (JHU adult atlas versão 1) foram utilizados para gerar 168 estruturas.

Após esse processamento, obtivemos assim os parâmetros de difusão: difusividade axial (AxD), anisotropia fracionada (FA), difusividade radial (RD) e difusividade média (MD) para cada estrutura.

3.4.2. *Imagens funcionais - UF²C*

Realizamos a análise da conectividade funcional através do programa *User Friendly Functional Connectivity* (UF²C) (2020a) (<http://www.lni.hc.unicamp.br/app/uf2c/>), que é executado dentro de plataforma MATLAB (2014b, The Math Works, Inc. EUA) com o SPM12 (<http://www.fil.ion.ucl.ac.uk/spm/>).

No pré-processamento, as imagens foram realinhadas, co-registradas com as imagens de alta resolução T1, normalizadas (MNI 152) e suavizadas (FWHM 6x6x6mm). Depois foram filtradas (filtro passa-banda 0.008-0.1 HZ) e regredidas linearmente (6 parâmetros de movimento além de sinais globais médios de substância branca e do LCR).

Após o processamento das EPIs, criamos um modelo baseado nos indivíduos controles com uma semente na região do córtex cingulado posterior (PCC) para identificar as regiões da DMN, resultando em oito regiões de interesse (ROIs): o córtex pré-frontal (FRONT), córtex cingulado posterior (PCC), lobo parietal esquerdo (LPARIETO), lobo parietal direito (RPARIETO), lobo temporal direito (RTEMP), lobo temporal esquerdo (LTEMP), hipocampo esquerdo (LHIPPO) e hipocampo direito (RHIPPO).

Esses ROIs da DMN foram usados como uma máscara para determinarmos o mapa r-score para cada indivíduo, obtendo dessa forma um valor médio de conectividade para cada região da DMN. Os valores médios foram transformados para escores z (transformação z de Fischer) que foram usados para análise estatística, abordagem que foi publicada por Magalhães *et cols*, 2018.

3.5. *Análises marcadores moleculares*

3.5.1. β A, t-Tau e p-Tau no LCR

As dosagens das proteínas liquóricas foram realizadas com os kits: para quantificarmos o marcador β A – β INNOTEST® kits (1-42); para quantificarmos a

proteína t-Tau – h-TAU INNOTEST® Ag; e por fim, para quantificarmos a proteína p-Tau – INNOTEST® Phospho-tau (181P) (Fujirebio).

Estes testes são ensaios imunoenzimáticos (ELISA) em que as proteínas são capturadas por anticorpos monoclonais específicos. Suspensões contendo imunoglobulina anti- β A, p-Tau e t-Tau foram adicionadas à superfície inerte de uma placa, a qual foi previamente lavada. Uma mistura contendo amostra de LCR e anticorpos monoclonais (para reconhecimento específico de imunoglobulina) foi adicionada a placa, que por sua vez é protegida para evitar exposição a luz e incubada por uma noite.

Após essa incubação, a placa foi novamente lavada e adicionado estreptavidina-ficoeritrina. Após mais uma incubação de uma hora, uma solução escaneadora (tampão fosfato-salino) foi adicionada à placa seguida de uma lavagem final.

A leitura dos biomarcadores foi realizada pela tecnologia Luminex xMAP. As análises foram realizadas em colaboração com o Laboratório de Neurociências (LIM 27) do Instituto de Psiquiatria da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (USP).

4. Resultados

4.1. Capítulo 1

Artigo 1: Influência do volume hipocampal nas correlações entre danos na substância branca e a proteína Tau em pacientes com CCLa e DA leve

Resumo

Introdução: A doença de Alzheimer (DA) é classicamente considerada uma doença da substância cinzenta (SC) que começa no córtex entorrinal e se espalha para as regiões límbica e neocortical. No entanto, o dano à substância branca (SB) pode ser mais grave e disseminado do que a atrofia cortical esperada. O papel dos biomarcadores da DA e das medidas de integridade da SB em todo o cérebro não está claro, especialmente em pacientes com comprometimento cognitivo leve amnésico (CCLa), um possível estágio prodromático da demência da DA. O dano na SB poderia ser detectado antes mesmo do desenvolvimento de atrofia cortical e sintomas clínicos. As proteínas βA_{42} e podem afetar diretamente na SB.

Métodos: Analisamos neste estudo 183 indivíduos - 48 CCLa no *continuum* da DA (proteína βA_{42} alterada no LCR), 30 pacientes com DA muito leve ou leve e 105 controles. Todos os sujeitos foram submetidos a avaliação neuropsicológica e exame de ressonância magnética. Indivíduos CCLa e com DA leve também foram submetidos à punção do LCR para avaliação de biomarcadores de DA.

Resultados: Observamos várias diferenças significativas na integridade da SB em relação às medidas de DTI entre os indivíduos e encontramos correlações significativas entre o fórnice e os tratos hipocampais do cíngulo direito e as proteínas Tau e p-Tau.

Conclusões: Nossa hipótese é que correlações significativas com tratos anatomicamente distantes de regiões atroficas da SC já bem estabelecidas, como lobos temporais mediais, resistiriam a um efeito mais direto das proteínas patológicas na SB, enquanto correlações do lobo temporal medial favoreceriam WD e/ou uma disseminação direta da patologia do hipocampo.

Influência do volume hipocampal nas correlações entre danos na substância branca e a proteína Tau em pacientes com CCLa e DA leve

T. N. C. Magalhães^{a, d}; R. F. Casseb^{a, c}; C. L. B. Gerbelli^a; M. H. Nogueira^{a, d}; L. R. Pimentel-Siva^{a, d};
C. V. L. Teixeira^{d, e}; A. M. Carletti^a; T. J. R. de Rezende^{a, d}; H. P. G. Joaquim^b; L. L. Talib^b; O.
Forlenza^b; F. Cendes^{a, d}; M. L. F. Balthazar^{a, d}

^aDepartment of Neurology and Neuroimaging Laboratory, School of Medical Sciences, University of Campinas (UNICAMP), Brazil

^bLaboratory of Neuroscience (LIM-27), Department and Institute of Psychiatry, University of Sao Paulo (USP), Brazil

^cSeaman Family MR Research Center, University of Calgary, Calgary, Canada

^dBrazilian Institute of Neuroscience and Neurotechnology, Campinas, São Paulo, Brazil

^eDepartment of Health and Human Services, National Institute on Aging, National Institute of Health, Bethesda, MD, USA

1. Introdução

A doença de Alzheimer (DA) é a doença neurodegenerativa mais comum, é patologicamente caracterizada por uma deposição extracelular excessiva do peptídeo beta-amilóide (βA_{42}) e pelo acúmulo intracelular da proteína Tau total e sua forma fosforilada (p-Tau), entre outras causas, levando a problemas cognitivos e neuropsiquiátricos que prejudicam a independência funcional do indivíduo. Sua prevalência está aumentando principalmente devido ao envelhecimento da população. Segundo as Nações Unidas, o número de idosos nas regiões menos desenvolvidas cresceu de 376 milhões em 2000 para 602 milhões em 2015 - um aumento de 60% - e projeta-se que cresça 71% entre 2015 e 2030 (Nações Unidas, 2015). Essas projeções indicam que 1,7 bilhão de pessoas com 60 anos ou mais viverão nas regiões menos desenvolvidas até 2050 (1, 2).

As causas dos processos neurodegenerativos não são completamente conhecidas. Embora características patológicas notáveis já tenham sido identificadas e utilizadas como biomarcadores, especialmente no líquido cefalorraquidiano (LCR) as proteínas βA_{42} , p-Tau e Tau total (t-Tau); em exames de neuroimagem molecular (tomografia de emissão de pósitrons de amiloide e tau (PET)) e de ressonância magnética (RM). Outros marcadores certamente estão envolvidos na patogênese da doença. Um desses marcadores pode ser os danos caudados na substância branca (SB) para o desenvolvimento e disseminação do processo de neurodegeneração.

A DA é classicamente considerada uma doença da substância cinzenta (SC) que se inicia no córtex entorrinal e se espalha para as regiões límbica e neocortical (3). No entanto, estudos recentes mostraram que o dano na SB é mais grave e generalizado do

que a atrofia cortical esperada (4). Além disso, alguns autores afirmam que no Comprometimento Cognitivo Leve (CCL), um possível estágio de demência prodromática da DA, e mesmo no envelhecimento saudável, os danos na SB podem ser detectados antes mesmo do desenvolvimento de atrofia cortical sintomas clínicos, o que torna improvável a hipótese de Degeneração Walleriana (DW) como único fator causal (5-7).

Nesse contexto, a hipótese da retrogênese, que assume alterações na SB primária (quebra da mielina e dano axonal) posteriormente levando à morte do corpo neuronal, surge como uma hipótese mais interessante (8). Existem regiões anatômicas onde a hipótese de retrogênese pode explicar melhor as alterações de SB, por exemplo, no corpo caloso (CC) (5).

No processo patológico da DA, tanto a proteína beta amiloide quanto a Tau podem afetar diretamente a SB. Por exemplo, a hiperfosforilação da proteína Tau leva à desestabilização dos microtúbulos do citoesqueleto que são fundamentais para o transporte axonal, resultando na degradação das proteínas axonais do citoesqueleto e na subsequente perda das fibras do axônio (9, 10). Outra possibilidade de um dano direto a SB é o padrão de propagação dessas proteínas por meio de redes neurais interconectadas de forma semelhante a um príon (“viral”). O peptídeo βA e/ou a proteína Tau pode se espalhar através de redes cerebrais através de tratos da SB que se conectam com diferentes regiões (11). Essa disseminação pode levar à morte neuronal progressiva característica da DA (12). Outro mecanismo fisiopatológico são as alterações vasculares subcorticais na SB, principalmente em pacientes com fatores de risco cardiovascular. No entanto, não há consenso quanto ao papel das alterações vasculares subcorticais na SB na patogênese da DA “pura”, que poderiam ser consideradas comorbidades e não como agentes causais.

A imagem por tensor de difusão (DTI) é uma técnica bem estabelecida usada para avaliar a integridade microestrutural da SB in vivo. Essa técnica se baseia na determinação probabilística da difusão da molécula de água no tecido, ajudando a quantificar a integridade dos tratos cerebrais (12,13). Os principais índices de difusão usados para analisar a integridade da SB são: anisotropia fracionada (FA), a difusividade média (MD), a difusividade radial (RD) e a difusividade axial (AxD). A diminuição dos valores de FA e o aumento da difusividade estão associados à degeneração na SB (12). O RD é mais sensível às mudanças no diâmetro e na densidade do axônio: valores altos de RD indicam uma espessura menor da bainha de mielina. AxD representa a direção máxima de difusão e dá uma estimativa primária da direção da fibra (12).

Como a associação entre biomarcadores de DA e integridade da SB em todo o cérebro não é clara, especialmente considerando pacientes com CCLa no *continuum* da DA (βA_{42} alterada no LCR), nosso objetivo foi avaliar: 1) diferenças nas medidas de integridade da SB em pacientes com DA leve e CCLa devido à DA em relação aos controles; 2) possíveis correlações entre as proteínas do LCR (βA_{42} , p-Tau e t-Tau) com os parâmetros de DTI da SB (FA, MD, RD, AxD) em CCLa devido à DA e DA leve.

Nossa hipótese é que correlações significativas com tratos anatomicamente distantes de regiões atroficas mais bem estabelecidas por alterações na SC, como lobos temporais mediais (MTL), estariam mais sujeitas a um efeito mais direto das proteínas patológicas, possivelmente levando à hipótese de retrogênese. Enquanto correlações envolvendo o MTL favoreceriam a hipótese da DW e/ou uma disseminação direta da patologia do hipocampo. Nesse caso, objetivamos também verificar a influência dos volumes hipocampais (HV) nessas correlações, hipotetizando que a perda da significância implicaria em uma influência direta da degeneração hipocampal nas correlações.

2. Métodos

2.1 Sujeitos

Cento e oitenta e três indivíduos foram incluídos neste estudo: 48 CCLa no *continuum* da DA (βA_{42} alterado no LCR), 30 pacientes com DA muito leve ou leve e 105 controles. Todos os sujeitos foram submetidos a avaliação neuropsicológica e exame de ressonância magnética. Indivíduos CCLa e com DA leve também foram submetidos à punção do LCR para avaliação de biomarcadores de DA.

O diagnóstico de provável demência devido à DA cumpriu os critérios definidos pelo Instituto Nacional de Envelhecimento e Associação de Alzheimer (NIA/AA) (14) e todos os pacientes com DA tiveram uma pontuação de Classificação Clínica de Demência (CDR) (15) de 0,5 ou 1. Pacientes com CCLa foram diagnosticados usando os critérios do NIA/AA para CCL (16) e tinham evidências fisiopatológicas de DA, caracterizada por baixo βA_{42} no LCR ($<540\text{pg/mL}$).

Os controles foram identificados como cognitivamente normais: eles não exibiam quaisquer distúrbios neurológicos, psiquiátricos ou necessitavam de medicação psicoativa. Apresentaram escores normais no Mini Exame do Estado Mental (MEEM), considerando a idade e escolaridade (17), e suas imagens estruturais foram caracterizadas

pela ausência de anormalidades. Os controles não apresentaram queixas de memória nem déficits neurológicos, e apresentaram escore de CDR igual a zero.

Os critérios de exclusão para todos os indivíduos incluíram: outras doenças neurológicas, psiquiátricas ou terem sofrido trauma crânio encefálico que resultou em perda de consciência, dependência de drogas ou álcool, uso de drogas sedativas 24 horas antes da avaliação neuropsicológica, exposição crônica anterior a substâncias neurotóxicas, pontuação de Fazekas > 1 e escore de isquemia de Hachinski > 4 (18).

Os procedimentos de pré-diagnóstico também incluíram testes laboratoriais, incluindo dosagem de vitamina B12, sorologia para sífilis e hormônios da tireoide.

2.2 Avaliação neuropsicológica, funcional e neuropsiquiátrica

Um neuropsicólogo experiente, cego para os dados de ressonância magnética e do LCR, realizou as avaliações neuropsicológicas. O estado cognitivo global foi medido por meio do MEEM (19), e a memória episódica foi avaliada pelo Teste de Aprendizagem Auditiva Verbal de Rey (RAVLT) (codificação de subitens, memória episódica - A7 e reconhecimento - RC-FP) (20). Para percepção visual, foram utilizados os seguintes testes: subtestes da Investigação Neuropsicológica de Luria (LNI) (21), utilizando os itens G12, G13, G14 e G17 (item do teste de Raven) (22), e uma cópia do Teste da Figura Complexa de Rey-Osterrieth (23). Para a função executiva utilizamos o *Trail Making Test* A (TMT-A) e B (TMT-B) (24) e o teste de Stroop (congruente - Stroop C, e incongruente - Stroop I) (25). Os testes de linguagem incluíram o *Boston Naming Test* (BNT) (26), fluência verbal semântica (SVF) para categorias (animais) e fluência fonológica para letras (FAS) (27).

2.3. Coleta e manuseio de amostras de CSF

A coleta de LCR foi feita por punção lombar somente nos pacientes com DA e CCLa. As amostras de LCR foram centrifugadas a 700 rpm por 10 minutos, a 4°C e posteriormente aliquotadas em microtubos Eppendorf de 1 ml e armazenados a -80°C até o momento das análises.

2.3.1. Quantificação dos biomarcadores

As medições de βA_{42} , t-Tau e p-Tau foram obtidas usando os kits INNOTEST®- β -amiloide (1-42), h-TAU INNOTEST® Ag e INNOTEST® Phospho-tau (181P) (Fujirebio), respectivamente. Após pré-umedecer a placa de filtro com um tampão de

lavagem, uma suspensão de microesferas contendo os anticorpos de captura correspondentes (AT120, AT270 e 4D7A3 para t-Tau, p-Tau e β A40-42, respectivamente) foi adicionada à placa.

Uma mistura de anticorpos monoclonais de detecção biotinizados, projetada para detectar especificamente um dos anticorpos de captura, e 75 μ L de LCR, foram adicionadas à placa. Após essas etapas, a placa foi protegida da luz e incubada durante a noite. Em seguida, a placa foi lavada e um conjugado de detecção (estreptavidina marcada com ficoeritrina) foi adicionado e incubado por 1 hora em temperatura ambiente. A placa foi lavada novamente e após a adição de uma solução de leitura (tampão fosfato salino), o ensaio foi analisado em plataforma Luminex 100IS (Luminex, Austin, TX, EUA).

As curvas padrão foram construídas para cada biomarcador usando um método de ajuste de curva sigmoideal e os valores médios de fluorescência para as amostras de LCR em duplicata foram usados para determinar a concentração de β A₄₂, t-Tau e p-Tau.

2.4. Aquisição das imagens de ressonância magnética

Todas as imagens de ressonância magnética (MRI) foram adquiridas em um scanner Philips® Achieva 3.0T. O seguinte protocolo foi aplicado a cada sujeito: a) para as análises de volume do hipocampo: sagital ponderado em T1 de alta resolução (voxels isotrópicos de 1x1x1 mm³, TR / TE = 7 / 3,2 ms, FOV = 240 × 240 mm, 180 cortes) ; b) para a análise microestrutural da SB, um protocolo de DTI padrão foi realizado (tamanho do voxel adquirido = 2x2x2 mm³ reconstruído com 1x1x2 mm³, sem lacuna, TR = 8,5 s, TE = 61 ms, 32 direções de difusão com b = 1000 s / mm², matriz de aquisição = 128x128 reconstruída para 256x256).

Para classificar os sujeitos de acordo com a escala de Fazekas, adquirimos imagens ponderadas em T2 de recuperação da inversão atenuada do líquido coronal e axial (FLAIR), anatomicamente alinhadas ao hipocampo (tamanho do voxel reconstruído = 0,45x0,45x4,00 mm³, TR / TE / TI = 12000 / 140/2850 ms, FOV = 220x206 mm, lacuna = 1 mm).

Todos os indivíduos foram submetidos aos exames de ressonância magnética antes da punção do LCR e na mesma semana em que a avaliação neuropsicológica foi realizada. O processamento das imagens e os exames neuropsicológicos foram realizados por profissionais cegos para os dados clínicos.

2.4.1. Processamento DTI e segmentação automatizada

As principais medidas de difusão usadas para analisar a integridade da SB são FA, MD, RD e AxD. Para extrair esses valores, usamos uma segmentação automatizada com base em vários atlas. Todas as análises foram realizadas em espaço nativo. Todas as etapas foram realizadas usando “MRICloud” (MRICloud.org), um serviço público *on-line* para segmentação das imagens de múltiplos contrastes e quantificação desses parâmetros.

As imagens ponderadas por DTI foram corrigidas para correntes de Foucault e co-registradas para remover o movimento do indivíduo. Em seguida, empregamos um algoritmo de multicontraste para registrar todos os atlas às imagens e realizar a segmentação, que emprega um algoritmo de fusão de probabilidade difeomórfica (DLFA) (28, 29). Desse modo, obtivemos os parâmetros de difusão para cada rótulo.

2.4.2. Seleção dos tratos de SB

Através do processamento das imagens DTI descrito acima obtivemos informações de 64 tratos de SB, cada trato com quatro medidas (FA, AxD, MD e RD). Assim, realizamos uma análise de componentes principais (PCA) para selecionar quais regiões de interesse (ROIs) mais contribuíram para a variabilidade da SB em nossa amostra, posterior a essa análise, trabalhamos com as comparações entre os grupos.

Os critérios de Keiser e Catell foram aplicados para extrair fatores. Após a extração, os componentes foram rotacionados usando o método *oblimin* direto não ortogonal. O tamanho da amostra e a adequação do modelo foram avaliados usando o teste de esfericidade de Barlett e a medida de Keizer-Meyer-Olkin (KMO). Escolhemos dentro dos componentes aquelas ROIs com cargas $> 0,7$ (pelo menos 64% da contribuição da variabilidade) para realizar o teste de hipótese.

Todas as PCAs apresentaram $KMO > 0,883$, sugerindo um ajuste adequado aos dados. A análise dos critérios de Kaiser e Catell sugeriu que a variabilidade se concentrou nos dois primeiros componentes. Em seguida, repetimos a análise extraindo apenas um número fixo de dois componentes explicando uma variância total de 40% para FA, 47% para AxD, 55% para MD e 54% RD. Para detalhar melhor os resultados, incluímos ROIs com fatores de carga $> 0,6$ como um valor seguro para interpretar, considerando o tamanho de nossa amostra. No entanto, usamos um fator mais conservador ($> 0,7$) para incluir ROIs na análise subsequente.

2.4.3. Análises do hipocampo - FreeSurfer

O *software* FreeSurfer v.5.3 (30) (<https://surfer.nmr.mgh.harvard.edu>) foi usado para a reconstrução da superfície cortical e para a segmentação anatômica de ressonância magnética do cérebro.

Processamos todas as imagens volumétricas de RM ponderadas em T1 de alta resolução por meio dos estágios de processamento do *software* FreeSurfer para realizar o registro não linear (*warping*) do espaço original para o espaço MNI305 (espaço padrão), segmentações corticais, subcorticais e medições de espessura cortical. Confirmamos visualmente a precisão de deformação das imagens volumétricas ponderadas em T1 para o espaço padrão. Artefatos macroscópicos não afetaram nenhum dos volumes dos participantes.

Para todas as análises, um filtro gaussiano com largura total de 10 mm foi usado para alisar a superfície. O volume da estrutura individual foi calculado a partir de voxels marcados e normalizado para o volume intracraniano total.

2.5. Análise estatística

Todas as análises estatísticas foram realizadas no *software* SPSS (versão 22, SPSS Inc., Chicago, IL, EUA).

Foi realizada uma análise de covariância univariada (ANCOVA) para comparar os testes neuropsicológicos e os dados demográficos entre os grupos usando o teste post-hoc de Bonferroni (nível de p significativo foi escolhido como sendo $<0,05$).

O teste do qui-quadrado foi usado para análises categóricas (gênero), incluímos as variáveis de idade e a educação como covariáveis nas análises.

Para comparar os níveis de proteínas no LCR entre DA leve e CCLa, realizamos um teste t. Para comparar as medidas do DTI entre os grupos, realizamos uma análise multivariada de covariância (MANCOVA) também por meio do teste post-hoc de Bonferroni.

Para verificar a associação entre os dados do DTI e os biomarcadores do LCR, realizamos correlações parciais, incluindo idade e escolaridade. Em seguida, repetimos as análises incluindo medidas de HV, para verificar sua influência nas correlações anteriores.

3. Resultados

3.1. Dados neuropsicológicos e demográficos

Encontramos diferenças significativas em idade e educação, mas não em gênero, de pacientes com DA leve e CCLa em comparação com os controles. Os pacientes com DA e CCLa tiveram desempenho inferior nos testes neuropsicológicos quando comparados ao grupo controle em quase todos os testes, conforme mostrado na **Tabela 1**.

3.2. Níveis dos biomarcadores líquóricos

Comparando os níveis das proteínas no LCR entre DA leve e CCLa no *continuum* de DA, apenas os níveis de t-Tau e βA_{42} /t-Tau foram significativamente diferentes (**Tabela 1**).

3.3. Volumes hipocampais

Como esperado, os pacientes com CCLa e DA leve apresentaram menores valores nos HV (bilateral) em relação aos controles e o grupo DA apresentou HV menor em relação ao grupo CCLa (**Tabela 1**).

3.4. Comparação de grupo de integridade SB

Observamos uma diferença significativa (AxD, MD e RD) em tratos como fórnice, cíngulo e cíngulo hipocampal entre CCLa *versus* controles e CCLa *versus* DA leve, conforme ilustrado na **Figura 1**.

Encontramos também outros tratos significativamente diferentes (incluindo valores de FA) entre pacientes com CCLa *versus* controles (**Figura 2**), e entre CCLa e DA leve (**Figura 3**).

A maior parte dos resultados significativos foram encontrados nos tratos referentes a região temporal - cíngulo hipocampal, fórnice, sagital *stratum*, fibras comissurais e fascículo fronto-occipital inferior, conforme apresentado na **Tabela 2**.

3.5. Correlações entre as proteínas do LCR e as medidas de DTI

Nas análises de correlações parciais consideramos idade e gênero como covariáveis. Ao considerar os grupos CCLa e DA leve juntos, encontramos correlações

parciais significativas entre os tratos da SB com as proteínas t-Tau e p-Tau, mas não com os níveis de βA_{42} . Correlações parciais significativas com proteína t-Tau: FA do fórnice direito ($r = -0,259$; $p = 0,027$), MD ($r = 0,355$; $p = 0,003$) e AxD ($r = 0,251$; $p = 0,03$) do cíngulo hipocampal direito. Em relação às correlações significativas com p-Tau, encontramos apenas AxD do cíngulo direito do hipocampo ($r = 0,317$, $p = 0,009$), conforme mostrado na **Figura 4**.

Não foram encontrados resultados significativos ao considerar os grupos separadamente.

Em seguida, avaliamos se essas correlações significativas entre t-Tau e p-Tau com a SB permaneceriam após controlar para as medidas de HV. Nesse caso, poderíamos especular que essas associações eram independentes da integridade do hipocampo. No entanto, nenhuma correlação significativa sobreviveu, o que poderia implicar que o HV medeia as associações entre Tau e as possíveis alterações nos tratos da SB.

4. Discussão

A relação entre as proteínas patológicas da DA (proteínas Tau, p-Tau e βA) e as alterações microestruturais da SB não é ainda completamente conhecida. Existem diferentes causas possíveis de dano na SB no espectro da doença, como uma degeneração vascular, DW a e a hipótese de retrogênese. Porém um efeito patológico diretamente relacionado a proteína Tau também é uma outra possibilidade plausível.

No presente estudo, primeiro avaliamos as diferenças na integridade microestrutural da SB no *continuum* da DA (pacientes CCLa com βA alterada no LCR e demência DA leve) e controles. Em seguida, verificamos se os níveis de Tau e βA poderiam estar relacionados com os diferentes tratos do cérebro e não apenas em regiões classicamente envolvidas nas fases iniciais da doença.

Para as análises de integridade da SB, usamos uma abordagem de segmentação Multi-Atlas, que é uma investigação mais detalhada e refinada que pode avaliar tratos mais finos e menores, permitindo a análise de diferenças que podem ser mais sutis nos estágios iniciais da doença.

Nossa hipótese é que correlações significativas com tratos anatomicamente e funcionalmente distantes de regiões atroficas mais bem estabelecidas suportariam um efeito mais direto das proteínas patológicas, enquanto as correlações dos lobos temporais mediais favoreceriam uma DW e/ou uma disseminação direta da patologia do hipocampo. Nesse caso, também verificamos a influência dos HV nessas correlações, hipotetizando

que a perda da significância implicaria em efeito direto da degeneração hipocampal nas associações.

Encontramos alterações em diferentes regiões da SB em nossos pacientes com CCLa e DA leve (Tabela 2), como demonstrado em outros estudos (30), mas apenas os tratos diretamente ligados a estruturas de MTL, como o hipocampo, foram significativamente correlacionados com Tau e p-Tau, e não com o peptídeo β A (Figura 4, Figura 1). No entanto, ao controlar para HV, essas correlações perderam sua significância estatística.

Embora o padrão de ruptura da SB nos estágios iniciais da DA possa ocorrer inicialmente nos tratos límbicos e comissural e, posteriormente, possa progredir para fibras de projeção e associação (5), encontramos uma alteração mais disseminada em nossos pacientes com CCLa devido à DA. No entanto, se considerarmos a progressão teórica da doença, a DA começa antes mesmo do aparecimento dos sintomas clínicos, e o dano axonal pode estar presente no espectro da DA em fases clínicas anteriores, como no declínio cognitivo subjetivo (DCS), e até mesmo na fase pré-clínica.

Curiosamente, Racine *et al.* (2014) encontraram alterações das medidas de DTI mesmo em indivíduos cognitivamente normais com alteração da β A, embora em um padrão inverso ao encontrado em indivíduos sintomáticos: aumento da FA e diminuição das medidas de difusividade (31). Wolf *et al.* (2015) encontraram uma relação quadrática entre a deposição de amiloide e as métricas de DTI em idosos cognitivamente saudáveis, ou seja, aumentos na FA e diminuições em MD e RD com o aumento de β A, em níveis baixos observaram o padrão oposto (32). Outros autores encontraram um padrão semelhante ao da DA, mesmo no envelhecimento normal: indivíduos amilóide positivos exibiram FA significativamente menor e AxD maior no fórnice em comparação com indivíduos com níveis mais elevados de β A₄₂ no LCR (33, 34). Brueggen *et al.* (2019) encontraram alterações semelhantes aos nossos achados em indivíduos com DCS na coroa anterior, fascículo longitudinal superior e inferior, cíngulo e esplênio do corpo caloso (35). Portanto, não é de se estranhar que nossos sujeitos, que têm maior chance de se converterem à demência, tenham apresentado tantas alterações em diferentes regiões.

Embora essas alterações na SB no espectro da DA estejam bem estabelecidas, muito pouco se sabe sobre sua etiologia e relação com as proteínas amiloide e Tau. A DA é considerada principalmente uma doença que afeta a SC, com ruptura secundária na SB por DW e/ou ruptura vascular. No entanto, o dano da SB parece ser mais intenso,

amplamente distribuído e aparece mais cedo do que o esperado com base apenas na atrofia cortical (4).

Desta forma, um efeito deletério diretamente relacionado à proteína Tau foi proposto. Com base no fato de que a Tau participa da integridade e estabilização do citoesqueleto axonal ligando-se aos microtúbulos, foi proposto que a falha funcional de Tau poderia estar envolvida na interrupção no transporte axonal (36-39). Estudos recentes demonstraram o mecanismo pelo qual a patologia Tau progride inicialmente dos axônios distais para os dendritos proximais, levando à desconexão sináptica das fibras de mielinização tardia (6, 10). Nesse sentido, a retrogênese, com ruptura primária de SB ao invés de SC, também poderia ser considerada um mecanismo patológico no espectro da DA. No entanto, nosso estudo não revelou quaisquer correlações significativas entre SB e as proteínas patológicas em outras regiões que não tratos do MTL, o que torna essa hipótese improvável na fase inicial da doença.

Nossos achados estão de acordo com os de Kantarci *et al.* (2017), que, em um estudo de DTI *antemortem* e autópsia combinados em uma série de indivíduos com patologia de DA, demonstrou que a elevação da medida de MD e a redução da FA nos tratos temporais mediais, como o cíngulo ventral e o fórnice foram associados a emaranhados neurofibrilares de maior concentração de Tau (12). Um estudo recente combinando Tau PET e DTI, descobriu que a presença da Tau em lobos temporais anteriores pode prever as alterações de integridade na SB em DA (40). Este é um achado interessante, uma vez que Brier *et al.* (2016) descobriram que as medidas de Tau no LCR se correlacionaram com a deposição de Tau PET no lobo temporal (41).

No entanto, no presente estudo, ao controlar para o HV perdemos a significância estatística das correlações. Este achado suporta a influência das alterações na SC nas associações entre Tau e alterações da SB. Embora a clássica DW devido à degeneração do hipocampo surja como a hipótese principal, o estudo mais recente da disseminação da proteína Tau "semelhante a príon" mostra que esse mecanismo também pode afetar diretamente os tratos de SB adjacentes ao hipocampo (42).

A proteína Tau anormal, classicamente presente em estruturas de MTL de indivíduos no *continuum* da DA, tem a propriedade de se agregar à Tau normal em endossomos, onde formam sementes fibrilares que subsequentemente induzem a agregação de Tau endógena. Essas fibrilas, consistindo de Tau endógena e exógena, são liberadas dos neurônios e se espalham, resultando em um processo neurodegenerativo incontrolável no cérebro de pacientes com DA (43). Existem também outras formas de

disseminação da doença, como a transmissão trans-sináptica (44) ou por um mecanismo exossináptico através da microglia (45). Esses achados estão de acordo com a hipótese mais aceita de que a patologia da DA começa nas estruturas da SC e se espalha por regiões interconectadas, levando à ruptura e desconexão das redes neurofuncionais.

As associações entre a integridade da SB e β A são menos claras e não foram encontradas de forma consistente na literatura (41). De acordo com Strain *et al.* (2018), a proteína amiloide pode servir como uma medida para outras patologias, incluindo Tau, que estão intrinsecamente associadas a ela, em vez de causar danos diretos a SB (40). No entanto, outros estudos encontraram correlações entre SB e β A₄₂, mais comumente localizadas em estruturas MTL, incluindo o fórnice, cíngulo, córtex parahipocampal e giro temporal inferior (30).

Considerando a quantidade total dessas descobertas, é difícil explicar que a extensão dos danos da SB na DA e CCLa está diretamente associada com β A e Tau. Provavelmente, a DW, dano direto por disseminação de Tau, retrogênese, neuroinflamação, vascular e outros fatores coexistem nesta doença. Quanto à influência dos efeitos vasculares, todos os indivíduos deste estudo foram normais para a idade quanto às hiperintensidades na SB nos exames de RM, apresentando escala de Fazekas 0 ou 1.

Nosso estudo apresenta várias limitações, como seu caráter transversal, sua abordagem correlacional, que não permite inferir relações causais, e a falta de informações sobre os biomarcadores de DA em controles. Além disso, as medidas de Tau e amiloide no LCR não têm a mesma precisão anatômica do PET. Mais estudos translacionais e longitudinais, incluindo análises *post-mortem*, são necessários para conclusões robustas.

5. Conclusões

Nosso estudo confirma as diversas alterações na SB no *continuum* do Alzheimer, encontramos correlações significativas com os níveis líquóricos da proteína Tau apenas nas estruturas temporais mediais, que não permaneceram após o controlar para as medidas dos volumes do hipocampo, que, neste caso, a associação entre danos na SB e Tau pode ser devido à uma degeneração Walleriana ou propagação direta de Tau pelos hipocampus atróficos.

6. Declarações

6.1. *Aprovação ética e consentimento para participar*

O Comitê de Ética em Pesquisa Médica do Hospital da UNICAMP aprovou este estudo e o consentimento informado por escrito (dos sujeitos ou de seus responsáveis, se incapazes) foi obtido de todos os participantes antes do início do estudo, de acordo com a Declaração de Helsinque.

6.2. *Financiamento*

O estudo foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP). Número da bolsa: 2017 / 01286-6, 2017 / 13906-9, 2011 / 17092-0 e 2018 / 15571-7, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

7. Referências

1. Burla C, Camarano AA, Kanso S, Fernandes D, Nunes R. [A perspective overview of dementia in Brazil: a demographic approach]. *Cien Saude Colet*. 2013;18(10):2949-56.
2. Reitz C, Brayne C, Mayeux R. Epidemiology of Alzheimer disease. *Nat Rev Neurol*. 2011;7(3):137-52.
3. Braak E, Griffing K, Arai K, Bohl J, Bratzke H, Braak H. Neuropathology of Alzheimer's disease: what is new since A. Alzheimer? *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*. 1999;249 Suppl 3:14-22.
4. Agosta F, Weiler M, Filippi M. Propagation of pathology through brain networks in neurodegenerative diseases: from molecules to clinical phenotypes. *CNS Neurosci Ther*. 2015;21(10):754-67.
5. Alves GS, Oertel Knochel V, Knochel C, Carvalho AF, Pantel J, Engelhardt E, et al. Integrating retrogenesis theory to Alzheimer's disease pathology: insight from DTI-TBSS investigation of the white matter microstructural integrity. *Biomed Res Int*. 2015;2015:291658.
6. Amlie-Landes IK, Fjell AM. Diffusion tensor imaging of white matter degeneration in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Neuroscience*. 2014;276:206-15.
7. Van Schependom J, Niemantsverdriet E, Smeets D, Engelborghs S. Callosal circularity as an early marker for Alzheimer's disease. *Neuroimage Clin*. 2018;19:516-26.
8. Stricker NH, Salat DH, Kuhn TP, Foley JM, Price JS, Westlye LT, et al. Mild Cognitive Impairment is Associated With White Matter Integrity Changes in Late-Myelinating Regions Within the Corpus Callosum. *Am J Alzheimers Dis Other Demen*. 2016;31(1):68-75.
9. Ma M, Ferguson TA, Schoch KM, Li J, Qian Y, Shofer FS, et al. Calpains mediate axonal cytoskeleton disintegration during Wallerian degeneration. *Neurobiol Dis*. 2013;56:34-46.
10. Chen HH, Liu P, Auger P, Lee SH, Adolfsson O, Rey-Bellet L, et al. Calpain-mediated tau fragmentation is altered in Alzheimer's disease progression. *Sci Rep*. 2018;8(1):16725.

11. Vaquer-Alicea J, Diamond MI. Propagation of Protein Aggregation in Neurodegenerative Diseases. *Annu Rev Biochem.* 2019;88:785-810.
12. Kantarci K, Murray ME, Schwarz CG, Reid RI, Przybelski SA, Lesnick T, et al. White-matter integrity on DTI and the pathologic staging of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* 2017;56:172-9.
13. Knopman DS, Haerberlein SB, Carrillo MC, Hendrix JA, Kerchner G, Margolin R, et al. The National Institute on Aging and the Alzheimer's Association Research Framework for Alzheimer's disease: Perspectives from the Research Roundtable. *Alzheimers Dement.* 2018;14(4):563-75.
14. McKhann GM, Knopman DS, Chertkow H, Hyman BT, Jack CR, Jr., Kawas CH, et al. The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement.* 2011;7(3):263-9.
15. Morris JC. The Clinical Dementia Rating (CDR): current version and scoring rules. *Neurology.* 1993;43(11):2412-4.
16. Albert MS, DeKosky ST, Dickson D, Dubois B, Feldman HH, Fox NC, et al. The diagnosis of mild cognitive impairment due to Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement.* 2011;7(3):270-9.
17. Brucki SM, Nitrini R, Caramelli P, Bertolucci PH, Okamoto IH. [Suggestions for utilization of the mini-mental state examination in Brazil]. *Arq Neuropsiquiatr.* 2003;61(3b):777-81.
18. Hachinski V, Iadecola C, Petersen RC, Breteler MM, Nyenhuis DL, Black SE, et al. National Institute of Neurological Disorders and Stroke-Canadian Stroke Network vascular cognitive impairment harmonization standards. *Stroke.* 2006;37(9):2220-41.
19. Folstein MF, Folstein SE, McHugh PR. "Mini-mental state". A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *J Psychiatr Res.* 1975;12(3):189-98.
20. Malloy-Diniz LF, Lasmar VA, Gazinelli Lde S, Fuentes D, Salgado JV. The Rey Auditory-Verbal Learning Test: applicability for the Brazilian elderly population. *Rev Bras Psiquiatr.* 2007;29(4):324-9.
21. Christensen AL. Neuropsychological investigation with Luria's methods. *Scand J Work Environ Health.* 1984;10 Suppl 1:33-4.
22. Ratcliff G. Spatial thought, mental rotation and the right cerebral hemisphere. *Neuropsychologia.* 1979;17(1):49-54.
23. Osterrieth PA. Le Test de copie d'une figure complexe : contribution à l'étude de la perception et de la mémoire. Neuchâtel: Delachaux & Niestlé; 1944.
24. Reitan RM. Assessment of neuropsychological testing. *Neurology.* 1997;49(4):1179; author reply 83-5.
25. Stroop JR. Studies of interference in serial verbal reactions. 1935.
26. Kaplan E, Goodglass H, Weintraub S. Boston naming test. Philadelphia: Lea & Febiger; 1983.
27. AL C. Neuropsychological investigation with Luria's methods. *Scandinavian journal of work, environment & health.* 1984;10 Suppl 1.
28. Sabuncu MR, Yeo BT, Van Leemput K, Fischl B, Golland P. A generative model for image segmentation based on label fusion. *IEEE Trans Med Imaging.* 2010;29(10):1714-29.
29. Faria AV, Zhang J, Oishi K, Li X, Jiang H, Akhter K, et al. Atlas-based analysis of neurodevelopment from infancy to adulthood using diffusion tensor imaging and applications for automated abnormality detection. *Neuroimage.* 2010;52(2):415-28.

30. KH A, A B. Relationships Between Diffusion Tensor Imaging and Cerebrospinal Fluid Metrics in Early Stages of the Alzheimer's Disease Continuum. *Journal of Alzheimer's disease : JAD*. 2019;70(4).
 31. AM R, N A, AL A, BT C, OC O, J O, et al. Associations between white matter microstructure and amyloid burden in preclinical Alzheimer's disease: A multimodal imaging investigation. *NeuroImage Clinical*. 2014;4.
 32. D W, FU F, A S, A F. Non-Linear Association between Cerebral Amyloid Deposition and White Matter Microstructure in Cognitively Healthy Older Adults. *Journal of Alzheimer's disease : JAD*. 2015;47(1).
 33. Gold BT, Zhu Z, Brown CA, Andersen AH, LaDu MJ, Tai L, et al. White matter integrity is associated with cerebrospinal fluid markers of Alzheimer's disease in normal adults. *Neurobiol Aging*. 2014;35(10):2263-71.
 34. JL M, P R, M S, A L, J O, M B, et al. White matter changes in preclinical Alzheimer's disease: a magnetic resonance imaging-diffusion tensor imaging study on cognitively normal older people with positive amyloid β protein 42 levels. *Neurobiology of aging*. 2014;35(12).
 35. K B, M D, A C-B, A S, K F, K B, et al. Structural integrity in subjective cognitive decline, mild cognitive impairment and Alzheimer's disease based on multicenter diffusion tensor imaging. *Journal of neurology*. 2019;266(10).
 36. Kosik KS. The molecular and cellular biology of tau. *Brain Pathol*. 1993;3(1):39-43.
 37. Jack CR, Jr., Bennett DA, Blennow K, Carrillo MC, Dunn B, Haeberlein SB, et al. NIA-AA Research Framework: Toward a biological definition of Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement*. 2018;14(4):535-62.
 38. Meeter LHH, Vijverberg EG, Del Campo M, Rozemuller AJM, Donker Kaat L, de Jong FJ, et al. Clinical value of neurofilament and phospho-tau/tau ratio in the frontotemporal dementia spectrum. *Neurology*. 2018;90(14):e1231-e9.
 39. Kimberly L Fiock, Martin E Smalley, John F Crary, Anca M Pasca, Marco M Hefti. Increased Tau Expression Correlates with Neuronal Maturation in the Developing Human Cerebral Cortex. *eNeuro*. 2020;7(3).
 40. JF S, RX S, H B, CM R, BA G, S M, et al. Loss of white matter integrity reflects tau accumulation in Alzheimer disease defined regions. *Neurology*. 2018;91(4).
 41. MR B, B G, K F, J M, A S, J C, et al. Tau and A β imaging, CSF measures, and cognition in Alzheimer's disease. *Science translational medicine*. 2016;8(338).
 42. JM N, ME S, GS B. Alzheimer disease: a tale of two prions. *Prion*. 2013;7(1).
 43. CH M, S K, D P, A T, P SG-H, E M, et al. Extracellular monomeric tau protein is sufficient to initiate the spread of tau protein pathology. *The Journal of biological chemistry*. 2014;289(2).
 44. S T, S W, H C, SL D, C C, AD R, et al. Neuronal uptake and propagation of a rare phosphorylated high-molecular-weight tau derived from Alzheimer's disease brain. *Nature communications*. 2015;6.
 45. H A, S I, S T, M M, J L, T H, et al. Depletion of microglia and inhibition of exosome synthesis halt tau propagation. *Nature neuroscience*. 2015;18(11).
- United Nations, Department of Economic and Social Affairs, Population Division. 2015. World Population Ageing 2015 (ST/ESA/SER.A/390).

Tabela 1. Comparação descritiva dos grupos e dados demográficos, principais dados neuropsicológicos e biomarcadores, p corrigido para idade e escolaridade.

	Controles (n = 105)	CCLa (n = 48)	DA leve (n = 30)
Idade	60 (7,29)	68 (7,13)	73 (7,56) ^{a***, b*}
Educação (anos)	11,66 (5,05)	9,39 (5,78) ^{a*}	6,5 (4,96) ^{a***}
Sexo (M/F)	77/28	30/13	18/12
CDR	0 (0)	0,5 (0) ^{a***}	0,87 (0,21) ^{a***, b***}
Pfeffer	0,53 (0,80)	3,33 (3,04) ^{a**}	12,97 (5,17) ^{a***, b***}
MMSE	28,42 (1,49)	25,59 (2,88) ^{a***}	20,1 (5,92) ^{a***, b***}
RAVLT	45,16 (8,44)	30,54 (8,03) ^{a***}	21,77 (12,33) ^{a***, b***}
A7	8,95 (2,81)	3,78 (2,24) ^{a***}	1,03 (1,58) ^{a***, b***}
<i>Biomarcadores LCR (pg/mL)</i>			
t-Tau	NR	102,79 (66,55)	142,34 (79,32) ^{b*}
p-Tau	NR	45,75 (23,66)	58,97 (36,80)
βA₄₂	NR	375,44 (105,81)	333,87 (113,86)
βA₄₂ / t-Tau	NR	5,06 (2,96)	3,22 (2,4) ^{b**}
βA₄₂ / p-Tau	NR	11,33 (8,5)	7,95 (7,19)
<i>Volume hipocampal (mm³)</i>			
Hipocampo esquerdo (10⁻³)	2,86 (0,44)	2,53 (0,55) ^{a***}	2,09 (0,34) ^{a***, b***}
Hipocampo direito (10⁻³)	3,05 (0,49)	2,71 (0,56) ^{a***}	2,1 (0,42) ^{a***, b***}

Nota: média (desvio padrão). Análise estatística: ANCOVA com teste post hoc de Bonferroni. Pfeffer: Questionário de Atividades Funcionais de Pfeffer. MMSE: Mini Exame do Estado Mental. RAVLT: Teste de Aprendizagem Auditivo Verbal de Rey. A7: Recordação retardada do Teste de Aprendizagem Verbal Auditiva de Rey. CDR: Classificação Clínica de Demência.

T-Tau: proteína Tau total. p-Tau: Tau fosforilada. βA: peptídeo β-amilóide.

a: diferente dos controles

b: diferente de CCLa

* p < 0,05

** p < 0,01

*** p < 0,001

Tabela 2. Comparação de grupo de dados de integridade de SB em regiões significativas.

	Controles (n = 103)	CCLa (n = 44)	DA leve (n = 29)
<i>Anisotropia fracionada</i>			
L Genu of CC	0,57 (0,03)	0,56 (0,04)	0,54 (0,03) ^{a*}
R Genu of CC	0,56 (0,04)	0,55 (0,04)	0,53 (0,03) ^{a**}
L Body of CC	0,56 (0,03)	0,55 (0,03)	0,54 (0,02) ^{a*}
R Body of CC	0,56 (0,03)	0,55 (0,03)	0,53 (0,02) ^{a*}
R Fornix	0,51 (0,06)	0,48 (0,04)	0,43 (0,04) ^{a***, b**}
R Sagittal Stratum	0,45 (0,01)	0,44 (0,02) ^{a*}	0,43 (0,01) ^{a***}
L Sagittal Stratum	0,45 (0,02)	0,44 (0,02)	0,43 (0,02) ^{a*}
R Anterior Corona Radiata	0,41 (0,02)	0,40 (0,02) ^{a*}	0,39 (0,02)
L Posterior Thalamic Radiation	0,48 (0,02)	0,47 (0,02) ^{a*}	0,46 (0,02) ^{a***}
R Posterior Thalamic Radiation	0,48 (0,02)	0,47 (0,02) ^{a**}	0,46 (0,02) ^{a***}
<i>Difusividade média (x10⁻⁴)</i>			

R external capsule	7,2 (0,4)	7,5 (0,6) ^{a*}	7,6 (0,6) ^{a*}
R inferior fronto-occipital fasciculus	7,6 (0,5)	7,8 (0,5)	8 (0,5) ^{a**}
L Superior Corona Radiata	7,1 (0,3)	7,2 (0,4)	7,5 (0,4) ^{a***, b*}
R Superior Corona Radiata	7,3 (0,3)	7,6 (0,4) ^{a**}	7,7 (0,5) ^{a**}
R superior longitudinal fasciculus	7,4 (0,4)	7,6 (0,4) ^{a**}	7,8 (0,4) ^{a***}
L Cingulum	7,7 (0,3)	7,8 (0,3) ^{a*}	8,1 (0,3) ^{a***, b***}
R Cingulum	7,6 (0,3)	7,8 (0,3) ^{a**}	8 (0,3) ^{a***}
L Anterior Corona Radiata	7,9 (0,4)	8,1 (0,5)	8,4 (0,5) ^{a***, b*}
R anterior corona radiata	8 (0,4)	8,4 (0,5) ^{a**}	8,6 (0,5) ^{a***}
R retrolenticular internal capsule	7,7 (0,4)	8,1 (0,5) ^{a**}	8,3 (0,4) ^{a***}
R sagittal stratum	8,1 (0,4)	8,4 (0,5) ^{a**}	8,8 (0,5) ^{a***, b*}
R posterior corona radiata	7,6 (0,4)	8 (0,5) ^{a***}	8,1 (0,4) ^{a***}
L Genu of CC	9,7 (0,8)	10,1 (0,7)	10,6 (0,8) ^{a***}
R Genu of CC	7,2 (0,8)	7,5 (0,9)	7,6 (0,8) ^{a***}
L Body of CC	9,6 (0,7)	10 (0,8) ^{a**}	10,6 (0,6) ^{a***, b**}
R Body of CC	9,5 (0,7)	10 (0,8) ^{a**}	10,5 (0,5) ^{a***}
R Posterior Thalamic Radiation	8,3 (0,4)	8,5 (0,5) ^{a**}	8,9 (0,6) ^{a***, b***}
R Superior Fronto-occipital Fasciculus	7,8 (0,7)	8,1 (0,7)	8,4 (0,9) ^{a***}
R Fornix Stria Terminalis	9 (0,6)	9,2 (0,6)	9,9 (0,5) ^{a***, b***}
R Cingulum Hippocampa	7,8 (0,3)	8 (0,3) ^{a**}	8,5 (0,3) ^{a***, b***}
<i>Difusividade axial ($\times 10^{-4}$)</i>			
L superior longitudinal fasciculus	11,4 (0,5)	11,4 (0,5)	11,8 (0,4) ^{a**, b**}
R Sagittal Stratum	12,3 (0,6)	12,6 (0,7) ^{a*}	13,1 (0,7) ^{a***, b*}
R external capsule	10,5 (0,5)	10,9 (0,7) ^{a**}	11,1 (0,8) ^{a**}
R superior corona radiata	11,2 (0,5)	11,5 (0,5) ^{a**}	11,6 (0,5) ^{a**}
L Superior Corona Radiata	11 (0,4)	11,1 (0,4)	11,4 (0,5) ^{a***, b*}
R inferior fronto-occipital fasciculus	11,8 (0,7)	12 (0,7)	12,4 (0,8) ^{a**}
R superior longitudinal fasciculus	10,9 (0,5)	11,3 (0,5) ^{a**}	11,5 (0,6) ^{a***}
L Anterior Corona Radiata	11,5 (0,4)	11,6 (0,6)	12 (0,5) ^{a***, b**}
L Body of CC	16,4 (0,9)	17 (0,1) ^{a***}	0,00177 (0,8) ^{a***}
R Body of CC	16,5 (0,9)	17,2 (1,1) ^{a***}	0,00177 (0,8) ^{a***}
R Posterior Corona Radiata	11,5 (0,6)	11,9 (0,6) ^{a***}	12,2 (0,6) ^{a***}
R Anterior Corona Radiata	11,7 (0,4)	12 (0,6) ^{a***}	12,4 (0,7) ^{a***}
R Retrolenticular Internal Capsule	12,4 (0,6)	12,9 (0,7) ^{a***}	13,2 (0,6) ^{a***}
R Posterior Thalamic Radiation	13 (0,6)	13,3 (0,6) ^{a*}	13,7 (0,7) ^{a***, b**}
R Fornix Stria Terminalis	13,9 (0,8)	14,2 (0,9) ^{a***}	15 (0,8) ^{b***}
R Cingulum	11,6 (0,4)	11,8 (0,5)	12,1 (0,5) ^{a***, b*}
R Genu of CC	17 (1,0)	17,6 (1,2)	18 (1,0) ^{a***}
R Tapatum	19 (1,7)	19,7 (1,7)	20 (1,6) ^{a***, b*}
R Cingulum Hippocampal	11,78 (0,5)	11,9 (0,4)	12,5 (0,5) ^{a***, b***}
<i>Difusividade radial ($\times 10^{-4}$)</i>			
L anterior corona radiata	12,3 (0,7)	12,7 (0,9)	13,1 (0,9) ^{a**}
R anterior corona radiata	12,4 (0,8)	12,9 (1,0) ^{a**}	13,3 (1,0) ^{a**}
L cingulum	10,7 (0,5)	11,1 (0,6) ^{a**}	11,3 (0,6) ^{a***}
R cingulum	11,2 (0,5)	11,6 (0,6) ^{a**}	11,8 (0,6) ^{a**}

R inferior fronto-occipital fasciculus	11 (0,8)	11,3 (1,0)	11,8 (0,8) ^{a**, b*}
R external capsule	11,1 (0,8)	11,6 (1,1) ^{a*}	11,8 (1,1)
R superior longitudinal fasciculus	11,2 (0,7)	11,6 (0,8) ^{a**}	11,8 (0,8) ^{a**}
L Superior Corona Radiata	10,4 (0,6)	10,7 (0,8)	11,1 (0,8) ^{a**}
R superior corona radiata	10,7 (0,6)	11,2 (0,8) ^{a**}	11,4 (0,9) ^{a**}
R sagittal stratum	12 (0,7)	12,6 (0,9) ^{a***}	13,2 (0,9) ^{a***, b***}
R retrolenticular internal capsule	10,8 (0,7)	11,3 (0,8) ^{a**}	11,5 (0,7) ^{a**}
R Posterior Corona Radiata	11,3 (0,7)	11,8 (0,9) ^{a***}	12 (1,0) ^{a***}
R Superior Fronto-occipital Fasciculus	11,5 (1,2)	12,2 (1,4) ^{a**}	12,6 (1,6) ^{a***}
R Body of CC	12,1 (1,4)	12,9 (1,6) ^{a**}	13,9 (1,0) ^{a***}

Nota: média (desvio padrão). Análise estatística: MANCOVA com teste post hoc de Bonferroni. R: right (direito); L: left (esquerdo); CC: Corpus Callosum.

a: diferente dos controles

b: diferente de CCLa

* $p < 0,05$

** $p < 0,01$

*** $p < 0,001$

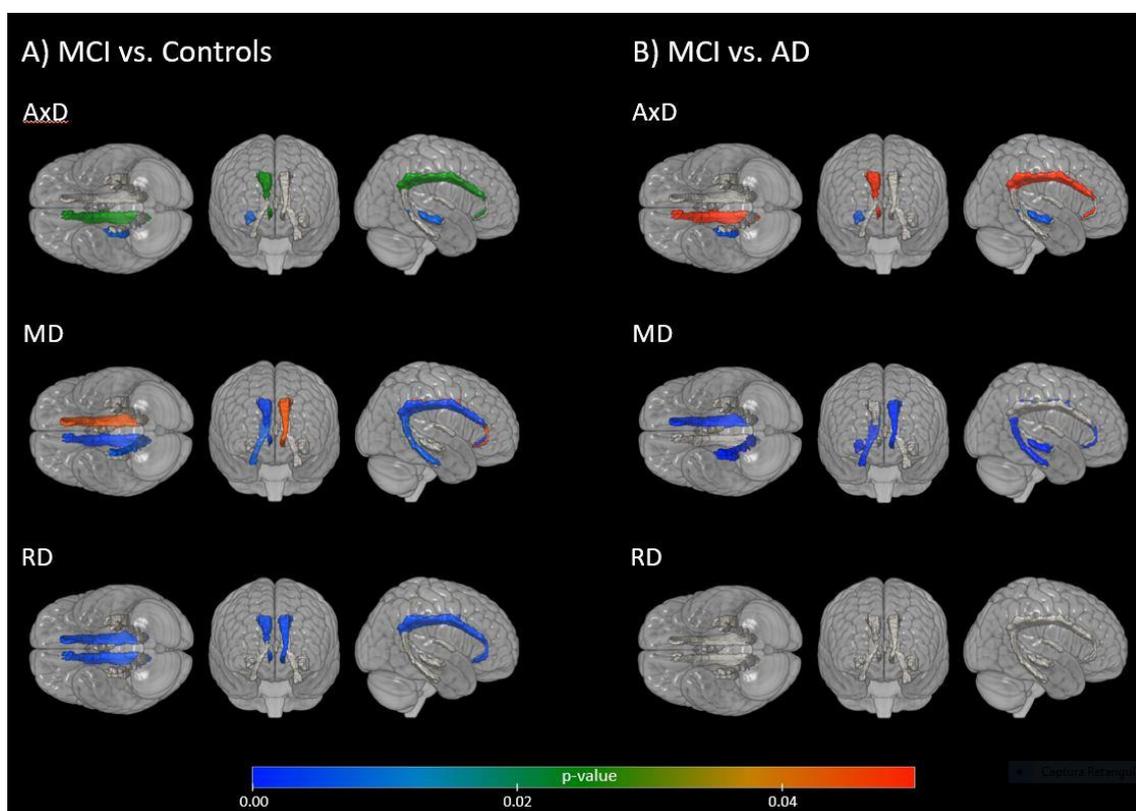


Figura 1. Diferenças nas métricas de DTI nas principais regiões: fórnice, cíngulo e cíngulo hipocampal.

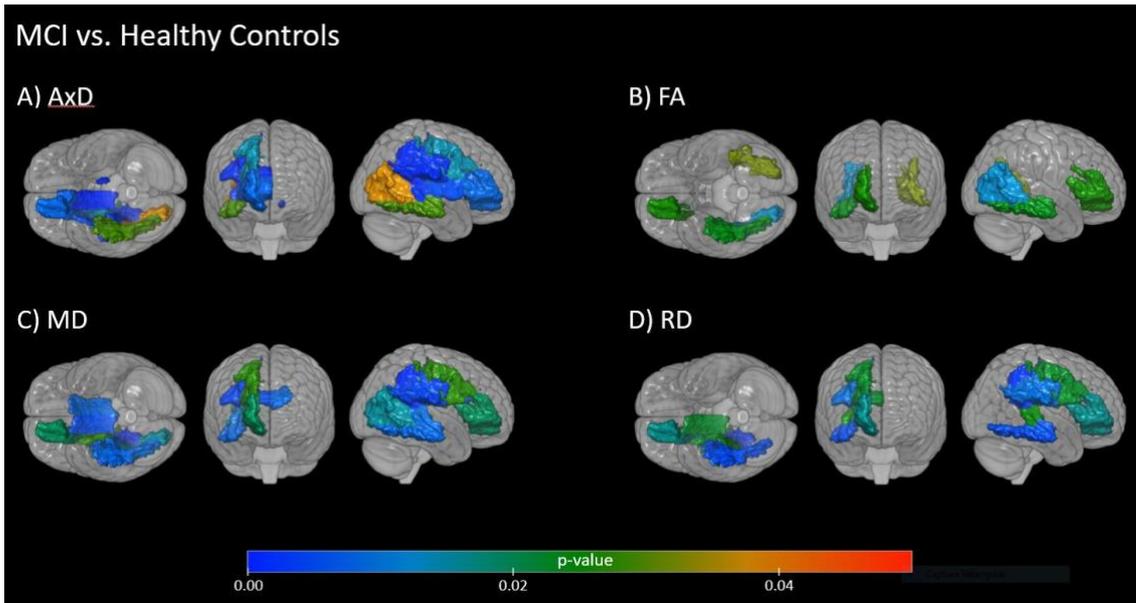


Figura 2. Diferenças nas métricas de DTI comparando CCLa e controles saudáveis em outras regiões do cérebro.

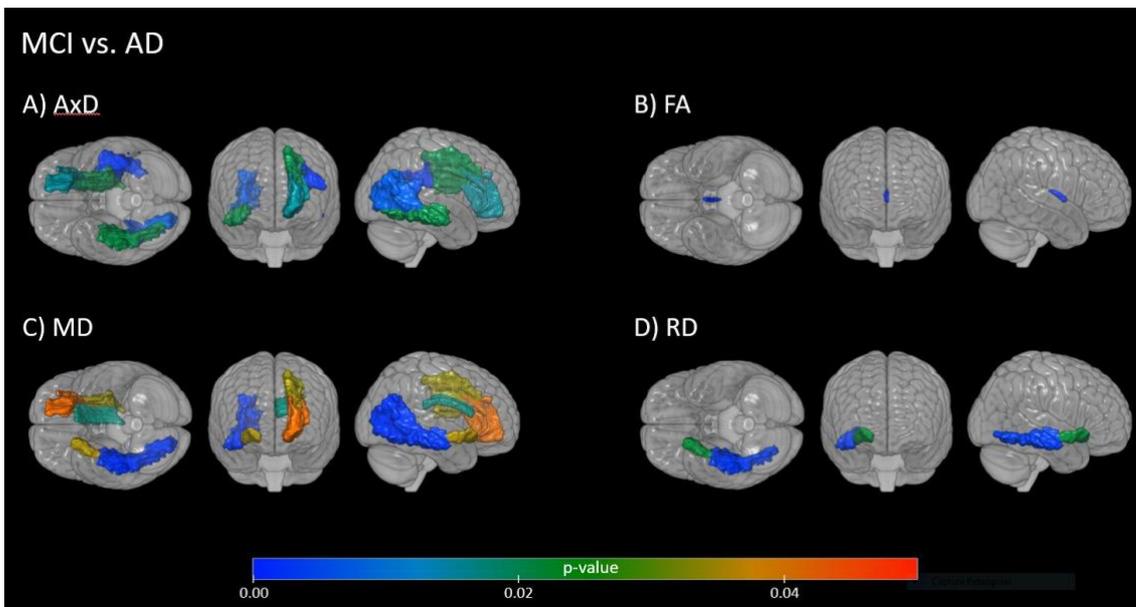


Figura 3. Diferenças nas métricas DTI comparando CCLa e DA leve em outras regiões do cérebro.

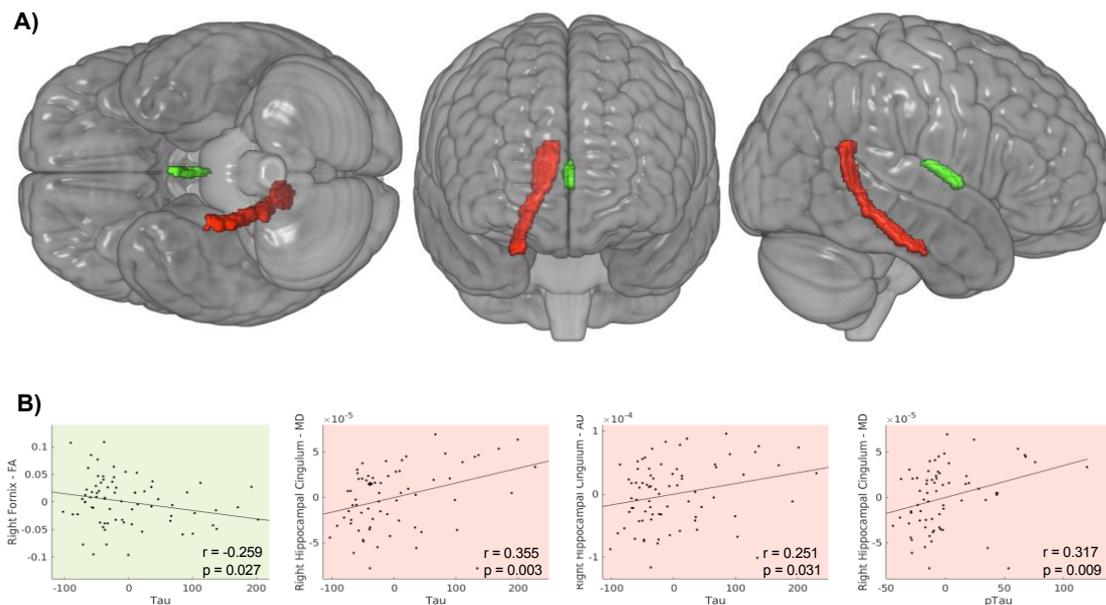


Figura 4. Correlações parciais (r) entre os parâmetros de DTI da substância branca e os níveis do líquido cefalorraquidiano de β -amilóide (β A), Tau total (t-Tau) e Tau fosforilada (p-Tau). (A) Representação anatômica do cíngulo hipocampal direito (vermelho) e do fórnice direito (verde) e (B) gráficos de correlações significativas - a cor de fundo indica a região anatômica correlacionada com os parâmetros DTI.

4.2. Capítulo 2

Artigo 2: Diferenças na conectividade estrutural e funcional da DMN em pacientes com CCLa amilóide positivo que converteram para demência devido à doença de Alzheimer

Resumo

A Rede de Modo Padrão (em inglês “*Default Mode Network*” (DMN)) surgiu como um potencial biomarcador da doença de Alzheimer (DA). No entanto, não está claro se essa rede pode contribuir na diferenciação de pacientes com comprometimento cognitivo leve amnésico (CCLa) com a proteína Beta-amiloide (βA) alterada no líquido cefalorraquidiano (LCR) (CCLa- βA^+) que irão evoluir para doença de Alzheimer. Nesse estudo avaliamos se a conectividade estrutural e funcional (CF), volume do hipocampo (HV), e as dosagens das proteínas do LCR (βA_{42} , p-Tau e t-Tau) podem diferenciar pacientes CCLa- βA^+ conversores de pacientes CCLa – não-conversores. Incluímos quarenta e oito indivíduos (18 controles cognitivamente saudáveis e 30 indivíduos CCLa no *continuum* da DA (βA^+ no LCR)) nesse estudo, que foram acompanhados por aproximadamente 13 meses. Utilizamos os programas Multi-Atlas, UF²C, e Freesurfer para avaliar imagens de tensor de difusão, CF e HV, respectivamente. Para as análises líquóricas, usamos os kits INNOTEST® para quantificar as proteínas βA_{42} , p-Tau e t-Tau. Além disso, realizamos diferentes MANOVAs com outras análises univariadas para diferenciar os grupos. Durante o acompanhamento, 26,6% dos pacientes CCLa- βA^+ converteram para AD. Não houve diferenças nas análises multivariada entre os grupos nos biomarcadores do LCR e nem mesmo na CF das regiões da DMN. Em relação aos valores de HV o grupo CCLa- βA^+ conversores tiveram valores no HV direito menor quando comparados ao grupo controle ($p=0,013$), e maior difusividade radial (RD) no feixe parahipocampal do cíngulo direito quando comparados também ao grupo controle ($p<0,001$) e quando comparados ao grupo CCLa- βA^+ não-conversores ($p=0,036$). Neste estudo exploratório, observamos que os resultados envolvendo medidas estruturais, mas não medidas funcionais, podem melhor diferenciar os indivíduos CCLa- βA^+ que converteram para DA.

Diferenças na conectividade estrutural e funcional da DMN em pacientes com CCLa amilóide positivo que converteram para demência devido à doença de Alzheimer

T. N. C. Magalhães¹; C. L. B. Gerbelli¹; L. R. Pimentel-Silva¹; B. M. de Campos¹; T. J. Rezende¹; L. Rizzi¹; H. P. G. Joaquim²; L. Talib²; O. Forlenza²; F. Cendes¹; M. L. F. Balthazar¹

1. Laboratory of Neuroimaging, Department of Neurology, University of Campinas (UNICAMP), Brazil

2. Laboratory of Neurosciences (LIM 27), Department and Institute of Psychiatry, University of São Paulo (USP).

Introdução

A neurobiologia das redes cerebrais funcionais tem sido cada vez mais estudada, tanto para compreender melhor as complexidades do conectoma humano, quanto para fins clínicos [1]. Clinicamente, os estudos de redes neurofuncionais são especialmente relevantes em doenças que afetam a cognição [2]. Avanços na pesquisa sobre demência apontaram para a hipótese de que doenças neurodegenerativas podem ser consideradas doenças de redes cerebrais [3, 4]. Sob tal modelo, a patologia (na maioria das vezes proteínas mal dobradas, como Tau fosforilada (p-Tau)) se origina em uma região específica e se espalha, transportada ao longo dos axônios, preferencialmente por meio de redes interconectadas [5,6]. Foi sugerido que a demência devido à doença de Alzheimer (DA) é causada em parte por alterações dentro de redes específicas (mais comumente a Rede de Modo Padrão - *Default Mode Network* (DMN), bem como desconexões entre diferentes redes [7,8]. Além disso, as medidas de conectividade dessas redes podem ser úteis como biomarcadores de diferentes doenças cerebrais. [9, 10].

Na DA, as estruturas anatômicas da DMN (córtex cingulado posterior – PCC -, o pré-cuneiforme, os lobos temporais mediais – MTL – córtex pré-frontal medial – MPFC – e córtex parietal inferior) se sobrepõem à deposição de placas contendo o peptídeo beta-amilóide (β A), que é uma das principais características patológicas da doença [11, 12]. Além disso, essas estruturas (especialmente MTL e PCC) estão associadas à memória episódica, o domínio cognitivo mais comumente afetado na DA.

Com relação à conectividade estrutural dessas áreas, o cíngulo e os feixes do cíngulo hipocampal são os principais tratos da substância branca (SB), com muitas fibras de associação cortico-corticais curtas (fibras U) que interligam as partes mediais dos lobos frontal, parietal e temporal [13]. Danos nessas vias podem levar à falha na

comunicação entre elas e, conseqüentemente, causar problemas cognitivos e comportamentais. Em neuroimagem, as mudanças nos tratos da SB podem ser medidas micro estruturalmente por imagem de tensor de difusão (DTI), uma técnica sensível que detecta alterações sutis.

Embora o comprometimento da conectividade funcional e estrutural do DMN na demência devido à DA esteja bem estabelecido [10, 14, 15], pouco se sabe sobre comprometimento cognitivo leve amnésico (CCLa) no *continuum* fisiopatológico da DA (com ao menos a positividade da $\beta A+$ no líquido cefalorraquidiano (LCR)). Este subgrupo de indivíduos com CCL com a síndrome amnésica e amiloide alterada compreende os candidatos mais prováveis a se converterem em AD, com uma taxa de conversão de ~10-15% ao ano. Nesse contexto, no entanto, poucos estudos avaliaram o grupo CCL, não especificamente o tipo amnésico, e a conectividade do DMN.

Yi e colaboradores descobriram que o grau de alteração na conectividade funcional (CF) da DMN no grupo CCLa- $\beta A+$ (mensurada através de exames PiB-PET) foi intermediário ao grupo DA quando comparado aos controles [16]. Em contraste, o grupo CCLa- $\beta A+$ exibiu CF aumentada na DMN em comparação com controles normais (principalmente na região pré-cuneiforme) [16]. Skouras *e cols.* encontraram falhas nos mecanismos de compensação de CF pré-cuneiforme para desacoplamento do hipocampo em pacientes com CCL devido à DA [17]. Koch *e cols.* verificaram influência direta da CF da DMN na associação entre βA patológica e comprometimento cognitivo na fase de DA prodrômica [18].

Em relação à conectividade estrutural, vários estudos encontraram alterações no cíngulo e feixes do hipocampo no grupo CCL [19, 20]. Além disso, alguns autores avaliaram mudanças longitudinais na DMN em indivíduos com fatores de risco para DA, como a presença de *APOE* $\epsilon 4$, e encontraram diferenças funcionais, por exemplo, com um aumento mais lento na CF nos lobos frontais em portadores da *APOE* $\epsilon 4$ [21].

Em resumo, a relevância clínica das medidas de conectividade estruturais e funcionais da DMN para prever a conversão do grupo de alto risco CCLa- $\beta A+$ em um estudo longitudinal não está bem estabelecido. Portanto, procuramos avaliar se as anormalidades microestruturais nas principais partes da SB da DMN (cíngulo e feixes do cíngulo hipocampal) e CF das subpartes DMN poderiam diferenciar pacientes CCLa- $\beta A+$ conversores de não-conversores e do grupo controles saudáveis. Também avaliamos possíveis diferenças de biomarcadores bem estabelecidos da DA: proteínas liquóricas

(βA_{42} , p-Tau e t-Tau) e volume hipocampal (HV). Além disso, realizamos uma extensa bateria de testes neuropsicológicos para avaliar o desempenho cognitivo de cada grupo.

Método

Sujeitos

Quarenta e oito indivíduos (18 controles normais e 30 indivíduos CCLa no *continuum* da DA - com alterações de βA_{42} no LCR) foram acompanhados por uma média de 13 meses (8 convertidos para demência DA - 26,6% - e 22 permaneceram estáveis).

Os pacientes CCL foram diagnosticados usando os critérios essenciais do NIA/AA para CCL [22] e tinham evidência fisiopatológica de DA, caracterizada por baixo βA_{42} no LCR, utilizamos o ponto de corte <540 pg /mL para βA_{42} , um limite tolerante utilizado em muitos estudos para positividade de amiloide [23-26], e de acordo com a nova estrutura de pesquisa em DA, que enfatiza que os pontos de corte devem ser selecionados para se adequar às questões de pesquisa específicas de interesse [27].

Todos os participantes CCL tiveram uma pontuação na avaliação de demência clínica (CDR) [37] de 0,5 (com uma pontuação de memória obrigatória de 0,5). A conversão de CCL para provável demência devido à DA atendeu aos critérios do Instituto Nacional de Envelhecimento e Associação de Alzheimer (NIA/AA) [28], além da evolução da pontuação CDR de 0.5 a 1.

Os controles foram identificados com desempenho normal em testes cognitivos, principalmente CDR = 0, considerando idade e escolaridade. No exame de ressonância magnética (RM), não foram verificadas alterações estruturais e funcionais nas imagens. Não podiam apresentar distúrbios neurológicos ou psiquiátricos, nem usar medicação psicoativa.

Os critérios de exclusão para todos os indivíduos incluíram: outras doenças neurológicas ou psiquiátricas, traumatismo craniano que resultou em perda de consciência, dependência de drogas ou álcool, exposição prévia crônica a substâncias neurotóxicas, Escala de Fazekas > 1 [29], e um escore isquêmico de Hachinski > 4 [30]. Os procedimentos de pré-diagnóstico também incluíram testes de laboratório, incluindo vitamina B12, VDRL e hormônios da tireoide.

Avaliação neuropsicológica

Toda a bateria de testes para avaliação neuropsicológica foi realizada por um neuropsicólogo experiente, cego para os dados da RM e resultados de outros exames.

Para analisarmos o estado cognitivo global foi medido usando o MMSE [31], e a memória episódica foi avaliada pelo Teste de Aprendizagem Auditivo Verbal de Rey (RAVLT) (codificação de subitens, recuperação atrasada - A7 e reconhecimento - RC-FP) [32]. Para a percepção visual, usamos o Teste da Figura Complexa de Rey-Osterrieth (cópia) [33]. Para funções executivas, usamos o *Trail Making Test B* (TMT-B) [34] e o teste de Stroop incongruente (erros e tempo) - Stroop [35]. Os testes de linguagem incluíram o *Boston Naming Test* (BNT), fluência verbal semântica (SVF) para categorias (animais) e fluência fonológica para letras (FAS) [36]. A funcionalidade foi avaliada por CDR [37].

Coleta e manuseio de amostras de CSF

Os pacientes com CCLa foram submetidos à coleta de LCR por punção lombar logo no início do estudo. Após a coleta, as amostras foram centrifugadas a 700 rpm por 10 minutos. Posteriormente, aliquotadas em microtubos Eppendorf de 1 ml e estocadas a 80°C até a análise.

Análise dos biomarcadores líquóricos

As proteínas do LCR – β A₄₂, t-Tau, e p-Tau – foram mensuradas por kits de β -amilóide INNOTEST® (1-42), h-TAU INNOTEST® Ag e INNOTEST® Phospho-tau (181P) (Fujirebio), respectivamente. Analisadas na plataforma Luminex 100IS (Luminex, Austin, TX, USA), tecnologia esta é uma plataforma xMAP baseada em microesferas multiplex que permite análises simultâneas. Seguimos o protocolo conforme recomendado pelo fabricante.

Para obter as curvas padrão, usamos o método de ajuste da curva sigmoïdal e então construímos uma curva para cada biomarcador. Usamos os valores médios de fluorescência para amostras em duplicatas para determinar a concentração das proteínas.

Aquisição das imagens por ressonância magnética (RM)

Todas as imagens foram adquiridas em um scanner Philips® Achieva 3.0T e os seguintes protocolos foram aplicados a todos os indivíduos, bem como em outros estudos nossos [9, 38, 39], usamos o mesmo padrão de aquisição das seguintes imagens:

a) Para encontrar os valores de HV, usamos um T1 sagital de alta resolução - voxels isotrópicos de $1 \times 1 \times 1 \text{ mm}^3$, FOV = $240 \times 240 \text{ mm}$, 180 fatias e TR/TE = 7/3.2 ms;

b) Para obter a CF da DMN, usamos imagens echo-planar (EPI), voxels isotrópicos definidos para $3 \times 3 \times 3 \text{ mm}^3$, FOV = 240×240 , TR/TE = 2000/30ms, sem lacuna

com um tempo total de varredura de 6 minutos, resultando em 180 volumes cerebrais completos com 40 cortes axiais cada. Todos os participantes foram instruídos a manter os olhos fechados, mover-se o menos possível e não adormecer;

c) Para a análise microestrutural da SB, um protocolo DTI padrão foi realizado - tamanho do voxel=2x2x2 mm³ reconstruídos com 1x1x2mm³, sem lacuna, TR=8.5s, TE=61ms, 32 direções de difusão b=1000s/mm², matrix de aquisição=128x128 reconstruído para 256x256;

d) Para análise da escala de Fazekas foi adquirido uma imagem FLAIR (Fluido - Recuperação de Inversão Atenuada) nos planos coronal e axial ponderadas em T2, voxels reconstruídos para 0.45x0.45x4.00mm³ e o intervalo entre as fatias definido para 1 mm, anatomicamente alinhado no hipocampo com parâmetros de imagem definidos para TR/TE/TI (tempo de inversão) = 12000/140/ 2850 e FOV = 220x206.

Todos os participantes foram submetidos a exame de ressonância magnética na mesma semana em que foi realizada a avaliação neuropsicológica.

Volume do hipocampo

Processamos todas as imagens volumétricas T1 de alta resolução usando o software FreeSurfer v.5.3 (<https://surfer.nmr.mgh.harvard.edu>) para reconstrução da superfície cortical e segmentação anatômica do cérebro.

Os volumes das estruturas individuais foram calculados a partir de voxels marcados e normalizados para o volume intracraniano total (TIV). Para as análises, consideramos o volume do hipocampo dividido pelo volume intracraniano total (HV/TIV), conforme relatado anteriormente em nosso estudo [38].

Análises de imagem funcional

Realizamos a análise de CF usando a caixa de ferramentas UF²C [40] descrita anteriormente em um estudo nosso [38]. Após o processamento das EPs, criamos um modelo baseado nos indivíduos controles para identificar as regiões da DMN, resultando em oito regiões de interesse (ROIs): o córtex pré-frontal (FRONT), córtex cingulado posterior (PCC), lobo parietal esquerdo (LPARIETO), lobo parietal direito (RPARIETO), lobo temporal direito (RTEMP), lobo temporal esquerdo (LTEMP), hipocampo esquerdo (LHIPPO) e hipocampo direito (RHIPPO).

Esses ROIs da DMN foram usados como uma máscara para encontrarmos o mapa r-score de cada indivíduo, a partir do qual obtivemos um valor médio de conectividade para cada região. Os valores médios foram convertidos para escores z (transformação z de Fischer) que foram usados para análise estatística, a mesma abordagem publicada por Magalhães *et al.* [38].

Análises DTI – Multiatlas

As imagens ponderadas por DTI foram corrigidas (*eddy currents*) e co-registradas para remover o movimento do indivíduo usando uma transformação de 12 parâmetros. Os parâmetros DTI foram calculados usando um ajuste linear multivariado e o crânio desnudado usando a imagem $b = 0$, por limiar de intensidade, uma ferramenta do software RoiEditor (www.MriStudio.org ou www.kennedykrieger.org).

Este pré-processamento foi feito utilizando a plataforma “MRICloud” (MRICloud.org), um serviço público baseado na web para segmentação e quantificação de imagens de múltiplos contrastes. Em seguida, empregamos o algoritmo de multi-contraste LDDMM para cadastrar os atlas às imagens e, a seguir, é feito o parcelamento, que utiliza o algoritmo DLFA [41]. Obtivemos, então, os parâmetros de difusão (difusividade axial (AxD), anisotropia fracionada (FA) e difusividade radial (RD)) e o volume para cada marcador. Selecionamos o cíngulo e os feixes de cíngulo hipocampal para análises, as quais foram realizadas no espaço nativo.

Análise estatística

Diferentes análises multivariadas de variância foram realizadas para comparar os grupos (controles *versus* CCLa- β A+ conversores *versus* CCLa- β A+ não-conversores) considerando características clínicas e biológicas: 1) Dados neuropsicológicos (ajustados para educação); 2) HV (esquerdo e direito); 3) biomarcadores no LCR (β A₄₂, p-Tau and t-Tau); 4) CF da DMN e 5) DTI (cíngulo direito e esquerdo e cíngulo hipocampal – medidas de: FA, RD e AxD).

Se os testes multivariados fossem significativos, realizávamos análises univariadas e os resultados eram considerados significativos após a correção de Bonferroni para comparações múltiplas. Se os testes univariados fossem significativos, realizávamos posteriormente um teste posthoc (Bonferroni) para verificar as diferenças entre os três grupos. A significância estatística foi definida como $p < 0,05$ corrigido para múltiplas comparações. As análises foram realizadas no SPSS v. 25 (SPSS Inc., Chicago, EUA).

Resultados

Não houve diferenças de sexo, idade e tempo de reavaliação. Os grupos CCLa (conversores e não-conversores) apresentaram menor escolaridade quando comparados ao grupo controle ($p = 0,039$).

Considerando os dados cognitivos, na análise multivariada (ajustada para escolaridade) houve diferença estatisticamente significativa entre os três grupos., $F = 3,252$, $p < 0,001$; Lambda de Wilks' = 0,091; eta parcial ao quadrado = 0,699.

Nas análises univariadas, os únicos testes cognitivos a alcançar significância estatística, usando um nível alfa ajustado de Bonferroni de 0.004, foram: 1) MMSE $F = 11,15$, $p < 0,001$, eta parcial ao quadrado = 0,389; 2) RAVLT (todos os subitens): Codificação $F = 17,49$, $p < 0,001$, eta parcial ao quadrado = 0,50; 2) Evocação tardia: $F = 22,78$, $p < 0,001$, eta parcial ao quadrado = 0,566; 3) Reconhecimento: $F = 14,58$, $p < 0,001$, eta parcial ao quadrado = 0,454; 4) Fluência verbal semântica $F = 7,096$, $p = 0,003$, eta parcial ao quadrado = 0,288 (**Tabela 1**).

Não houve diferenças na análise multivariada entre os grupos em relação aos biomarcadores do LCR ($p = 0,092$) e CF da DMN ($p = 0,814$). Contudo, em relação à conectividade estrutural da DMN, houve diferença estatisticamente significativa entre os três grupos na análise multivariada, $F = 1,856$, $p = 0,025$; Lambda de Wilks' = 0,365; eta parcial ao quadrado = 0,396.

Nas análises univariadas, a única medida de DTI a alcançar significância estatística, usando um nível alfa ajustado de Bonferroni de 0,004, foi o cíngulo direito do hipocampo RD: $F = 8,88$, $p = 0,001$, eta parcial ao quadrado = 0,283, teste de post-hoc (Bonferroni) mostraram que os pacientes CCLa conversores tiveram um aumento em na RD em comparação com o grupo pacientes CCLa não-conversores ($p = 0,036$) e controles ($p < 0,001$) (**Figura 1, Tabela 2**).

Também encontramos diferenças significativas em testes multivariados em relação ao HV: $F = 2,823$, $p = 0,031$; Lambda de Wilks' = 0,758; eta parcial ao quadrado = 0,129. O teste univariado, considerando significativo um alfa ajustado = 0,025, mostrou que o HV direito se mostrou diferente entre os grupos: $F = 4,85$, $p = 0,013$, eta parcial ao quadrado = 0,199. Teste post-hoc (Bonferroni) mostrou que os CCLa conversores eram diferentes dos controles ($p = 0,01$) (**Tabela 2**).

Discussão

Neste estudo exploratório, procuramos avaliar as diferenças anatômicas e funcionais da DMN em indivíduos CCLa- β A+ que converteram para DA em comparação com indivíduos não conversores e o grupo controle. Observamos que apenas uma estrutura anatômica, o feixe cíngulo-hipocampo direito, mostrou-se diferente entre os grupos e não encontramos diferenças significativas nas medidas de conectividade funcional da DMN. Ambos os grupos CCLa- β A+ (conversores e não-conversores) foram semelhantes em relação à cognição global, nos testes MMSE e CDR, mas os conversores tiveram um desempenho inferior no subitem do teste RAVLT de reconhecimento do que os não conversores. Os controles tiveram melhor desempenho principalmente nos testes que avaliam a memória.

Os sujeitos CCLa- β A+ são os candidatos mais fortes para evoluir para demência DA. Eles apresentam uma síndrome amnésica do tipo hipocampal e amiloide alterada no LCR, uma condição essencial para o diagnóstico fisiopatológico da DA [27]. Porém, mesmo com essas alterações fisiopatológicas, alguns desses indivíduos permanecem estáveis por anos e não evoluem para demência. Em nosso estudo, 26,6% dos indivíduos CCLa- β A+ converteram para demência DA em uma média de 13 meses.

Devido à relação da DMN com a cognição e a sobreposição anatômica de placas senis contendo a proteína β A, juntamente com emaranhados neurofibrilares em suas regiões, é imperativo entender se disfunções dessa rede podem ser possíveis biomarcadores de demência da DA.

Em relação à CF da DMN, não encontramos nenhuma região significativa capaz de diferenciar os grupos. Esses achados levantam a questão de se a CF intrínseca ou em estado de repouso das redes cerebrais pode ser útil em termos clínicos como biomarcadores da DA. Por sua natureza, as redes neurofuncionais têm respostas adaptativas ativas e mecanismos compensatórios para manter a homeostase [21]. Isso pode significar que medidas compensatórias funcionais podem mascarar as diferenças entre sujeitos com a mesma patologia e mesmo desempenho cognitivo, antes que apresentem sintomas clínicos diferentes, como em nossos pacientes.

Neste contexto, Zhan *e cols.* observaram correlações significativas entre mudanças na conectividade dentro da DMN e mudanças nos escores ADAS-Cog em pacientes com CCL, o que indica que a redução da CF foi correlacionada com prejuízo cognitivo [42].

É importante destacar que a nossa amostragem foi controlada para a fase de CCLa: precoce ou tardio. É possível que em fases anteriores, CCLa apresentassem a conectividade na DMN aumentada e, em fases posteriores, diminuída, de forma semelhante à demência AD. Assim, em um mesmo grupo, poderíamos ter CCLa precoce e tardio apresentando uma combinação de conectividade aumentada/diminuída e, ao analisar o grupo todo, a diferença se perde.

Pacientes com CCLa- β A+ podem ter um padrão semelhante de conectividade com pacientes com DA, como mostrado por Yi *et al.* Em seu estudo, o grupo CCLa- β A- apresentou uma CF aumentada do que os controles, e o grupo CCLa- β A+ apresentou um padrão intermediário ao grupo DA [16]. Além disso, como pretendíamos estudar possíveis biomarcadores no tempo zero, não avaliamos as mudanças longitudinais na CF da DMN, a qual pode ser diferente dos não-conversores após um ano.

Chiesa e cols., por exemplo, encontraram diferenças nas conexões funcionais da DMN em indivíduos assintomáticos em risco de DA (portadores de *APOE ϵ 4*) em um estudo de 2 anos [21]. Por fim, outros métodos de análise de conectividade podem ser mais sensíveis na detecção de diferenças sutis, como medidas de grafos.

Em relação à conectividade estrutural da DMN, avaliamos duas das estruturas principais: o cíngulo e os feixes do cíngulo do hipocampo. Descobrimos que o feixe hipocampal do cíngulo direito era diferente entre os grupos conversores *versus* não conversores e conversores *versus* controles. Estes tratos carregam projeções do hipocampo para o giro cíngulado, áreas comumente associadas à patologia da DA e ao desempenho da memória episódica. Encontramos alterações nas medidas de RD, que estão mais relacionadas à disfunção miélica, embora isso não seja necessariamente verdadeiro em regiões com intenso cruzamento de fibras. Em condições patológicas com edema e alterações inflamatórias, as medidas de DTI tendem a subestimar a extensão da desmielinização, o que não é o caso de nossos pacientes. [43]. Seria tentador especular que o feixe hipocampal do cíngulo direito está rompido por causa da proteína Tau patológico se espalhando por axônios interconectados ou devido à uma degeneração Walleriana secundária à atrofia hipocampal.

Outra hipótese plausível é da retrogênese, que assume alterações primárias na SB através da quebra da mielina e dano axonal e secundariamente levando à morte do corpo neuronal [44]. Encontramos evidências preliminares de que a desconexão estrutural da DMN, medida por análises de DTI, pode ser uma variável que pode melhor diferenciar os indivíduos CCLa- β A+ que se converterá em demência DA. Outros autores, embora

não abordando especificamente este mesmo grupo, também encontraram alterações na microestrutura da SB [45].

De acordo com estudos anteriores, as conexões cerebrais que mais frequentemente se distinguem entre indivíduos controles saudáveis e pacientes com demência são encontradas em regiões do córtex cingulado. [46-48]. A neuroimagem estrutural também forneceu dados consistentes com essas observações. A atrofia patológica do hipocampo encontrada em pacientes com DA precoce leva a alterações das conexões anatômicas do cíngulo posterior e do hipocampo com o resto do cérebro, o que também é refletido por déficit de memória imediata [49-51].

Estudos baseados em ROI demonstraram maior MD e/ou menor FA no hipocampo [52, 53], e trato cingulado posterior na DA também em estágios pré-clínicos [52, 54]. Curiosamente, um outro estudo sugeriu que as medidas de difusividade do hipocampo são melhores preditores de conversão de CCL do que o volume [53]. Uma meta-análise que incluiu setenta e sete estudos de DTI em CCLa (n = 1844) concluiu que FA e MD no feixe do cíngulo do hipocampo alterados são medidas mais confiáveis [55].

Em conclusão, nosso estudo exploratório sugeriu que alterações estruturais (feixe do cíngulo do hipocampo direito), mas não alterações funcionais de conectividade da DMN, poderiam diferenciar melhor os indivíduos CCLa- β A⁺ que converteram em demência devido à DA daqueles indivíduos CCLa- β A⁺ que permaneceram estáveis e dos controles. Algumas limitações de nosso estudo são o pequeno tamanho da amostra (apenas 8 conversores) e uma única técnica para avaliar a conectividade funcional. Estudos futuros com um tamanho de amostra maior poderão explicar melhor este processo de conversão.

Aprovação Ética e Consentimento de participação

O Comitê de Ética em Pesquisa Médica do Hospital da UNICAMP aprovou este estudo (CAAE: 09634412.5.0000.5404). O consentimento informado por escrito (dos sujeitos ou de seus responsáveis, se incapazes) foi obtido de todos os participantes antes do início do estudo, de acordo com a Declaração de Helsinque.

Financiamento

O estudo foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP). Número da bolsa: 2017 / 01286-6, 2017 / 13906-9, 2011 / 17092-0 e 2018 / 15571-7, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

Referências

1. van den Heuvel MP, Sporns O. A cross-disorder connectome landscape of brain dysconnectivity. *Nat Rev Neurosci.* 2019;20(7):435-46. doi: 10.1038/s41583-019-0177-6.
2. Jones DT, Graff-Radford J, Lowe VJ, Wiste HJ, Gunter JL, Senjem ML, et al. Tau, amyloid, and cascading network failure across the Alzheimer's disease spectrum. *Cortex.* 2017;97:143-59. doi: 10.1016/j.cortex.2017.09.018.
3. Seeley WW, Crawford RK, Zhou J, Miller BL, Greicius MD. Neurodegenerative diseases target large-scale human brain networks. *Neuron.* 2009;62(1):42-52. doi: 10.1016/j.neuron.2009.03.024.
4. Raj A, Powell F. Models of Network Spread and Network Degeneration in Brain Disorders. *Biol Psychiatry Cogn Neurosci Neuroimaging.* 2018;3(9):788-97. doi: 10.1016/j.bpsc.2018.07.012.
5. Franzmeier N, Rubinski A, Neitzel J, Kim Y, Damm A, Na DL, et al. Functional connectivity associated with tau levels in ageing, Alzheimer's, and small vessel disease. *Brain.* 2019;142(4):1093-107. doi: 10.1093/brain/awz026.
6. Franzmeier N, Neitzel J, Rubinski A, Smith R, Strandberg O, Ossenkoppele R, et al. Functional brain architecture is associated with the rate of tau accumulation in Alzheimer's disease. *Nat Commun.* 2020;11(1):347. doi: 10.1038/s41467-019-14159-1.
7. Agosta F, Pievani M, Geroldi C, Copetti M, Frisoni GB, Filippi M. Resting state fMRI in Alzheimer's disease: beyond the default mode network. *Neurobiol Aging.* 2012;33(8):1564-78. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2011.06.007.
8. Banks SJ, Zhuang X, Bayram E, Bird C, Cordes D, Caldwell JZK, et al. Default Mode Network Lateralization and Memory in Healthy Aging and Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis.* 2018;66(3):1223-34. doi: 10.3233/jad-180541.
9. Balthazar ML, de Campos BM, Franco AR, Damasceno BP, Cendes F. Whole cortical and default mode network mean functional connectivity as potential biomarkers for mild Alzheimer's disease. *Psychiatry Res.* 2014;221(1):37-42. doi: 10.1016/j.psychres.2013.10.010.
10. Matura S, Kohler J, Reif A, Fusser F, Karakaya T, Scheibe M, et al. Intrinsic functional connectivity, CSF biomarker profiles and their relation to cognitive function in mild cognitive impairment. *Acta Neuropsychiatr.* 2019;1-24. doi: 10.1017/neu.2019.49.
11. Vaquer-Alicea J, Diamond MI. Propagation of Protein Aggregation in Neurodegenerative Diseases. *Annu Rev Biochem.* 2019;88:785-810. doi: 10.1146/annurev-biochem-061516-045049.
12. Mayo CD, Garcia-Barrera MA, Mazerolle EL, Ritchie LJ, Fisk JD, Gawryluk JR. Relationship Between DTI Metrics and Cognitive Function in Alzheimer's Disease. *Front Aging Neurosci.* 2018;10:436. doi: 10.3389/fnagi.2018.00436.
13. Bullmore E, Sporns O. Complex brain networks: graph theoretical analysis of structural and functional systems. *Nat Rev Neurosci.* 2009;10(3):186-98. doi: 10.1038/nrn2575.

14. De Vogelaere F, Santens P, Achten E, Boon P, Vingerhoets G. Altered default-mode network activation in mild cognitive impairment compared with healthy aging. *Neuroradiology*. 2012;54(11):1195-206. doi: 10.1007/s00234-012-1036-6.
15. Petrella JR, Sheldon FC, Prince SE, Calhoun VD, Doraiswamy PM. Default mode network connectivity in stable vs progressive mild cognitive impairment. *Neurology*. 2011;76(6):511-7. doi: 10.1212/WNL.0b013e31820af94e.
16. Yi D, Choe YM, Byun MS, Sohn BK, Seo EH, Han J, et al. Differences in functional brain connectivity alterations associated with cerebral amyloid deposition in amnesic mild cognitive impairment. *Front Aging Neurosci*. 2015;7:15. doi: 10.3389/fnagi.2015.00015.
17. Skouras S, Falcon C, Tucholka A, Rami L, Sanchez-Valle R, Lladó A, et al. Mechanisms of functional compensation, delineated by eigenvector centrality mapping, across the pathophysiological continuum of Alzheimer's disease. *Neuroimage Clin*. 2019;22:101777. doi: 10.1016/j.nicl.2019.101777.
18. Koch K, Myers NE, Göttler J, Pasquini L, Grimmer T, Förster S, et al. Disrupted Intrinsic Networks Link Amyloid- β Pathology and Impaired Cognition in Prodromal Alzheimer's Disease. *Cereb Cortex*. 2015;25(12):4678-88. doi: 10.1093/cercor/bhu151.
19. Mayo CD, Mazerolle EL, Ritchie L, Fisk JD, Gawryluk JR. Longitudinal changes in microstructural white matter metrics in Alzheimer's disease. *Neuroimage Clin*. 2017;13:330-8. doi: 10.1016/j.nicl.2016.12.012.
20. Bharath S, Joshi H, John JP, Balachandar R, Sadanand S, Saini J, et al. A Multimodal Structural and Functional Neuroimaging Study of Amnesic Mild Cognitive Impairment. *Am J Geriatr Psychiatry*. 2017;25(2):158-69. doi: 10.1016/j.jagp.2016.05.001.
21. Chiesa PA, Cavedo E, Vergallo A, Lista S, Potier MC, Habert MO, et al. Differential default mode network trajectories in asymptomatic individuals at risk for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement*. 2019;15(7):940-50. doi: 10.1016/j.jalz.2019.03.006.
22. Albert MS, DeKosky ST, Dickson D, Dubois B, Feldman HH, Fox NC, et al. The diagnosis of mild cognitive impairment due to Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement*. 2011;7(3):270-9. doi: 10.1016/j.jalz.2011.03.008.
23. Forlenza OV, Radanovic M, Talib LL, Aprahamian I, Diniz BS, Zetterberg H, et al. Cerebrospinal fluid biomarkers in Alzheimer's disease: Diagnostic accuracy and prediction of dementia. *Alzheimers Dement (Amst)*. 2015;1(4):455-63. doi: 10.1016/j.dadm.2015.09.003.
24. Struyfs H, Molinuevo JL, Martin JJ, De Deyn PP, Engelborghs S. Validation of the AD-CSF-index in autopsy-confirmed Alzheimer's disease patients and healthy controls. *J Alzheimers Dis*. 2014;41(3):903-9. doi: 10.3233/JAD-131085.
25. Mo JA, Lim JH, Sul AR, Lee M, Youn YC, Kim HJ. Cerebrospinal fluid β -amyloid1-42 levels in the differential diagnosis of Alzheimer's disease--systematic review and meta-analysis. *PLoS One*. 2015;10(2):e0116802. doi: 10.1371/journal.pone.0116802.
26. Ritchie C, Smailagic N, Noel-Storr AH, Takwoingi Y, Flicker L, Mason SE, et al. Plasma and cerebrospinal fluid amyloid beta for the diagnosis of Alzheimer's disease dementia and other dementias in people with mild cognitive impairment (MCI). *Cochrane Database Syst Rev*. 2014(6):CD008782. doi: 10.1002/14651858.CD008782.pub4.
27. Jack CR, Jr., Bennett DA, Blennow K, Carrillo MC, Dunn B, Haeberlein SB, et al. NIA-AA Research Framework: Toward a biological definition of Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement*. 2018;14(4):535-62. doi: 10.1016/j.jalz.2018.02.018.
28. McKhann GM, Knopman DS, Chertkow H, Hyman BT, Jack CR, Jr., Kawas CH, et al. The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: recommendations from the

- National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement.* 2011;7(3):263-9. doi: 10.1016/j.jalz.2011.03.005.
29. Fazekas F, Chawluk JB, Alavi A, Hurtig HI, Zimmerman RA. MR signal abnormalities at 1.5 T in Alzheimer's dementia and normal aging. *AJR Am J Roentgenol.* 1987;149(2):351-6. doi: 10.2214/ajr.149.2.351.
30. Hachinski V, Iadecola C, Petersen RC, Breteler MM, Nyenhuis DL, Black SE, et al. National Institute of Neurological Disorders and Stroke-Canadian Stroke Network vascular cognitive impairment harmonization standards. *Stroke.* 2006;37(9):2220-41. doi: 10.1161/01.str.0000237236.88823.47.
31. Folstein MF, Folstein SE, McHugh PR. "Mini-mental state". A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *J Psychiatr Res.* 1975;12(3):189-98.
32. Malloy-Diniz LF, Lasmar VA, Gazinelli Lde S, Fuentes D, Salgado JV. The Rey Auditory-Verbal Learning Test: applicability for the Brazilian elderly population. *Rev Bras Psiquiatr.* 2007;29(4):324-9.
33. Osterrieth PA. Le Test de copie d'une figure complexe : contribution à l'étude de la perception et de la mémoire. Neuchâtel: Delachaux & Niestlé; 1944.
34. Norton JC. The Trail Making Test and Bender Background Interference Procedure as screening devices. *J Clin Psychol.* 1978;34(4):916-22. doi: 10.1002/1097-4679(197810)34:4<916::aid-jclp2270340418>3.0.co;2-4.
35. Scarpina F, Tagini S. The Stroop Color and Word Test. *Front Psychol.* 2017;8:557. doi: 10.3389/fpsyg.2017.00557.
36. Williams BW, Mack W, Henderson VW. Boston Naming Test in Alzheimer's disease. *Neuropsychologia.* 1989;27(8):1073-9. doi: 10.1016/0028-3932(89)90186-3.
37. Morris JC. The Clinical Dementia Rating (CDR): current version and scoring rules. *Neurology.* 1993;43(11):2412-4.
38. Magalhães TNC, Weiler M, Teixeira CVL, Hayata T, Moraes AS, Boldrini VO, et al. Systemic Inflammation and Multimodal Biomarkers in Amnesic Mild Cognitive Impairment and Alzheimer's Disease. *Mol Neurobiol.* 2018;55(7):5689-97. doi: 10.1007/s12035-017-0795-9.
39. Weiler M, de Campos BM, Nogueira MH, Pereira Damasceno B, Cendes F, Balthazar ML. Structural connectivity of the default mode network and cognition in Alzheimer's disease. *Psychiatry Res.* 2014;223(1):15-22. doi: 10.1016/j.psychres.2014.04.008.
40. de Campos BM, Coan AC, Lin Yasuda C, Casseb RF, Cendes F. Large-scale brain networks are distinctly affected in right and left mesial temporal lobe epilepsy. *Hum Brain Mapp.* 2016;37(9):3137-52. doi: 10.1002/hbm.23231.
41. Tang X, Crocetti D, Kuttan K, Ceritoglu C, Albert MS, Mori S, et al. Segmentation of brain magnetic resonance images based on multi-atlas likelihood fusion: testing using data with a broad range of anatomical and photometric profiles. *Front Neurosci.* 2015;9:61. doi: 10.3389/fnins.2015.00061.
42. Zhan Y, Ma J, Alexander-Bloch AF, Xu K, Cui Y, Feng Q, et al. Longitudinal Study of Impaired Intra- and Inter-Network Brain Connectivity in Subjects at High Risk for Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis.* 2016;52(3):913-27. doi: 10.3233/JAD-160008.
43. Winkiewski PJ, Sabisz A, Naumczyk P, Jodzio K, Szurowska E, Szarmach A. Understanding the Physiopathology Behind Axial and Radial Diffusivity Changes-What Do We Know? *Front Neurol.* 2018;9:92. doi: 10.3389/fneur.2018.00092.
44. Stricker NH, Salat DH, Kuhn TP, Foley JM, Price JS, Westlye LT, et al. Mild Cognitive Impairment is Associated With White Matter Integrity Changes in Late-

- Myelinating Regions Within the Corpus Callosum. *Am J Alzheimers Dis Other Dement.* 2016;31(1):68-75. doi: 10.1177/1533317515578257.
45. Alm KH, Bakker A. Relationships Between Diffusion Tensor Imaging and Cerebrospinal Fluid Metrics in Early Stages of the Alzheimer's Disease Continuum. *J Alzheimers Dis.* 2019;70(4):965-81. doi: 10.3233/JAD-181210.
46. Davatzikos C, Xu F, An Y, Fan Y, Resnick SM. Longitudinal progression of Alzheimer's-like patterns of atrophy in normal older adults: the SPARE-AD index. *Brain.* 2009;132(Pt 8):2026-35. doi: 10.1093/brain/awp091.
47. Garcés P, Angel Pineda-Pardo J, Canuet L, Aurtenetxe S, López ME, Marcos A, et al. The Default Mode Network is functionally and structurally disrupted in amnesic mild cognitive impairment - a bimodal MEG-DTI study. *Neuroimage Clin.* 2014;6:214-21. doi: 10.1016/j.nicl.2014.09.004.
48. Pineda-Pardo JA, Bruña R, Woolrich M, Marcos A, Nobre AC, Maestú F, et al. Guiding functional connectivity estimation by structural connectivity in MEG: an application to discrimination of conditions of mild cognitive impairment. *Neuroimage.* 2014;101:765-77. doi: 10.1016/j.neuroimage.2014.08.002.
49. Devanand DP, Pradhaban G, Liu X, Khandji A, De Santi S, Segal S, et al. Hippocampal and entorhinal atrophy in mild cognitive impairment: prediction of Alzheimer disease. *Neurology.* 2007;68(11):828-36. doi: 10.1212/01.wnl.0000256697.20968.d7.
50. Weiner MW, Veitch DP, Aisen PS, Beckett LA, Cairns NJ, Green RC, et al. Recent publications from the Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative: Reviewing progress toward improved AD clinical trials. *Alzheimers Dement.* 2017;13(4):e1-e85. doi: 10.1016/j.jalz.2016.11.007.
51. den Heijer T, van der Lijn F, Koudstaal PJ, Hofman A, van der Lugt A, Krestin GP, et al. A 10-year follow-up of hippocampal volume on magnetic resonance imaging in early dementia and cognitive decline. *Brain.* 2010;133(Pt 4):1163-72. doi: 10.1093/brain/awq048.
52. Fellgiebel A, Müller MJ, Wille P, Dellani PR, Scheurich A, Schmidt LG, et al. Color-coded diffusion-tensor-imaging of posterior cingulate fiber tracts in mild cognitive impairment. *Neurobiol Aging.* 2005;26(8):1193-8. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2004.11.006.
53. Fellgiebel A, Dellani PR, Greverus D, Scheurich A, Stoeter P, Müller MJ. Predicting conversion to dementia in mild cognitive impairment by volumetric and diffusivity measurements of the hippocampus. *Psychiatry Res.* 2006;146(3):283-7. doi: 10.1016/j.psychres.2006.01.006.
54. Choo IH, Lee DY, Oh JS, Lee JS, Lee DS, Song IC, et al. Posterior cingulate cortex atrophy and regional cingulum disruption in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* 2010;31(5):772-9. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2008.06.015.
55. Yu J, Lam CLM, Lee TMC. White matter microstructural abnormalities in amnesic mild cognitive impairment: A meta-analysis of whole-brain and ROI-based studies. *Neurosci Biobehav Rev.* 2017;83:405-16. doi: 10.1016/j.neubiorev.2017.10.026.

Tabela 1. Dados demográficos e cognitivos

	Conversores N=8	Não- conversores N=22	Controles n=18	Teste Multivariado (Wilk's Lambda)	Teste univariado (p corrigido)	partial eta squared
Idade	73,38 ± 6,90	69,14 ± 5,49	67,39 ± 5,39			-
Gênero F/M	3/5	14/8	15/3			-
Escolaridade (anos)	7,88 ± 6,40	7,09 ± 4,58	11,33 ± 5,23 ^{b*}			-
Tempo de reavaliação (meses)	15,88 ± 6,08	12,67 ± 6,17	11,36 ± 5,78			-
Testes cognitivos [§]				< 0,001	corrigido p <0,004 < 0,0001	0,699
MMSE	26,18 ± 0,64	26,17 ± 0,40	28,76 ± 0,39 ^{a**,b***}		< 0,0001	0,389
RAVLT Codificado	24,63 ± 3,38	33,36 ± 2,14	46,61 ± 2,09 ^{a***,b***}		< 0,0001	0,500
RAVLT Evocação tardia	2,34 ± 1,10	4,58 ± 0,69	10,03 ± 0,68 ^{a***,b***}		< 0,0001	0,566
RAVLT Reconhecimento	1,17 ± 1,84	7,75 ± 1,17 ^{a*}	12,81 ± 1,14 ^{a***b*}		< 0,0001	0,454
Stroop Tempo	128,84 ± 9,71	121,95 ± 6,15	103,15 ± 6,02		0,04	-
Stroop Erros	4,77 ± 2,17	6,09 ± 1,37	2,63 ± 1,34		0,23	-
TMT-B (segundos)	150,15 ± 23,85	157,22 ± 15,12	106,35 ± 14,38		0,06	-
Semantic VF (animais)	15,27 ± 1,38	14,23 ± 0,87	18,91 ± 0,85 ^{b**}		0,003	0,288
Phonemic VF (FAS)	29,39 ± 3,25	28,05 ± 1,76	36,34 ± 2,01		0,025	-
BNT	52,82 ± 2,69	52,42 ± 1,71	55,01 ± 1,67		0,56	-
Figura complexa do Rey – cópia	30,23 ± 2,88	28,99 ± 1,83	31,85 ± 1,78		0,56	-
Teste do desenho do Relógio	8,37 ± 0,68	8,04 ± 0,43	8,58 ± 0,42		0,69	-

Nota: (Média ± Desvio padrão (DP)). MMSE: Mini-exame do estado mental; RAVLT: Teste de Aprendizagem Auditivo Verbal de Rey; TMT-B: Teste de trilha, parte B; VF: fluência verbal; BNT: Teste de Nomenclatura de Boston. Médias ajustadas por idade.

§Testes cognitivos: médias ajustadas para educação

a: significativamente diferente dos conversores CCLa-βA +

b: significativamente diferente de CCLa-βA + não conversores

*** p <0,001

** p <0,01

* p <0,05

Tabela 2. DA biomarcadores, medidas de conectividade funcional e estrutural da DMN

	Conversores	Não-conversores	Controles	Testes Multivariados (Wilk's Lambda)	Testes univariados p-valores corrigidos	Partial Eta squared
<i>LCR biomarcadores:</i>				0,092		0,223
βA_{42} (pg/mL)	379,53 \pm 82,91	360,40 \pm 102,03	NR		-	-
p-Tau (pg/mL)	57,69 \pm 33,95	38,58 \pm 19,44	NR		-	-
t-Tau (pg/mL)	143,45 \pm 93,04	80,18 \pm 39,17	NR		-	-
<i>Volumes hipocampus:</i>				0,031	corrected p <0,025	0,129
D HV/TIV (%)	0,2320 \pm 0,05	0,2594 \pm 0,05	0,3078 \pm 0,06 ^{a*}		0,013	0,199
E HV/TIV (%)	0,2378 \pm 0,05	0,26 \pm 0,01	0,2844 \pm 0,04		0,108	-
<i>DMN CF:</i>				0,814		
Frontal	0,2615 \pm 0,079	0,3197 \pm 0,08	0,3348 \pm 0,09		-	-
E Hippo	0,2454 \pm 0,06	0,2521 \pm 0,06	0,2525 \pm 0,08		-	-
D Hippo	0,2241 \pm 0,05	0,2426 \pm 0,06	0,2440 \pm 0,07		-	-
E Parieto	0,3002 \pm 0,11	0,3459 \pm 0,10	0,3759 \pm 0,10		-	-
D Parieto	0,3201 \pm 0,11	0,3415 \pm 0,10	0,3654 \pm 0,08		-	-
E Temporal	0,2422 \pm 0,13	0,2912 \pm 0,09	0,2967 \pm 0,08		-	-
D Temporal	0,2372 \pm 0,09	0,2630 \pm 0,07	0,2976 \pm 0,08		-	-
PCC	0,4228 \pm 0,09	0,4882 \pm 0,10	0,5018 \pm 0,10		-	-
<i>DMN Conectividade Estrutural (DTI):</i>				0,025	corrected p <0,004	0,396
E Cíngulo-FA	0,4898 \pm 0,027	0,4822 \pm 0,023	0,4943 \pm 0,018		0,23	-
D Cíngulo-FA	0,4491 \pm 0,023	0,4455 \pm 0,019	0,4488 \pm 0,012		0,81	-
E Cíngulo-Hipocampo-FA	0,4082 \pm 0,019	0,4227 \pm 0,016	0,4265 \pm 0,018		0,056	-
D Cíngulo-Hipocampo-FA	0,4119 \pm 0,019	0,4263 \pm 0,013	0,4264 \pm 0,016		0,06	-
E Cíngulo – AxD ($\cdot 10^{-3}$)	1,2468 \pm 0,04	1,2360 \pm 0,05	1,2132 \pm 0,04		0,17	-
D Cíngulo- AxD ($\cdot 10^{-3}$)	1,1964 \pm 0,05	1,1926 \pm 0,03	1,1576 \pm 0,04		0,028	-
E Cíngulo-Hipocampo-AxD ($\cdot 10^{-3}$)	1,2412 \pm 0,04	1,2228 \pm 0,05	1,2007 \pm 0,04		0,25	-
D Cíngulo-Hipocampo-AxD ($\cdot 10^{-3}$)	1,2979 \pm 0,05	1,2019 \pm 0,03	1,1698 \pm 0,05		0,008	-
E Cíngulo – RD ($\cdot 10^{-3}$)	1,1043 \pm 0,06	1,1146 \pm 0,06	1,0632 \pm 0,06		0,023	-
D Cíngulo- RD ($\cdot 10^{-3}$)	1,1633 \pm 0,06	1,1671 \pm 0,00001	1,2536 \pm 0,05		0,07	-
E Cíngulo-Hipocampo-RD ($\cdot 10^{-3}$)	1,2937 \pm 0,08	1,2347 \pm 0,06	1,2012 \pm 0,05		0,009	-
D Cíngulo-Hipocampo-RD ($\cdot 10^{-3}$)	1,2745 \pm 0,04	1,2136 \pm 0,04 ^{a*}	1,1744 \pm 0,06 ^{a***}		0,001	0,283

Nota: (Média \pm Desvio padrão (DP)). HV/TIV: volume hipocampal/volume intracranial total; E: esquerdo; D: direito; FRONT: córtex pré-frontal; PCC: córtex cingulado posterior; LPARIETO: lobo parietal esquerdo; RPARIETO: lobo parietal direito; RTEMP: lobo temporal direito; LTEMP: lobo temporal esquerdo; LHIPPO: esquerdo hipocampo; RHIPPO: hipocampo direito; FA: anisotropia fracionária; RD: difusividade radial; AxD: difusividade axial.

a: significativamente diferente dos conversores CCLa- β A +

b: significativamente diferente de CCLa- β A + não conversores

*** $p < 0,001$

** $p < 0,01$

* $p < 0,05$

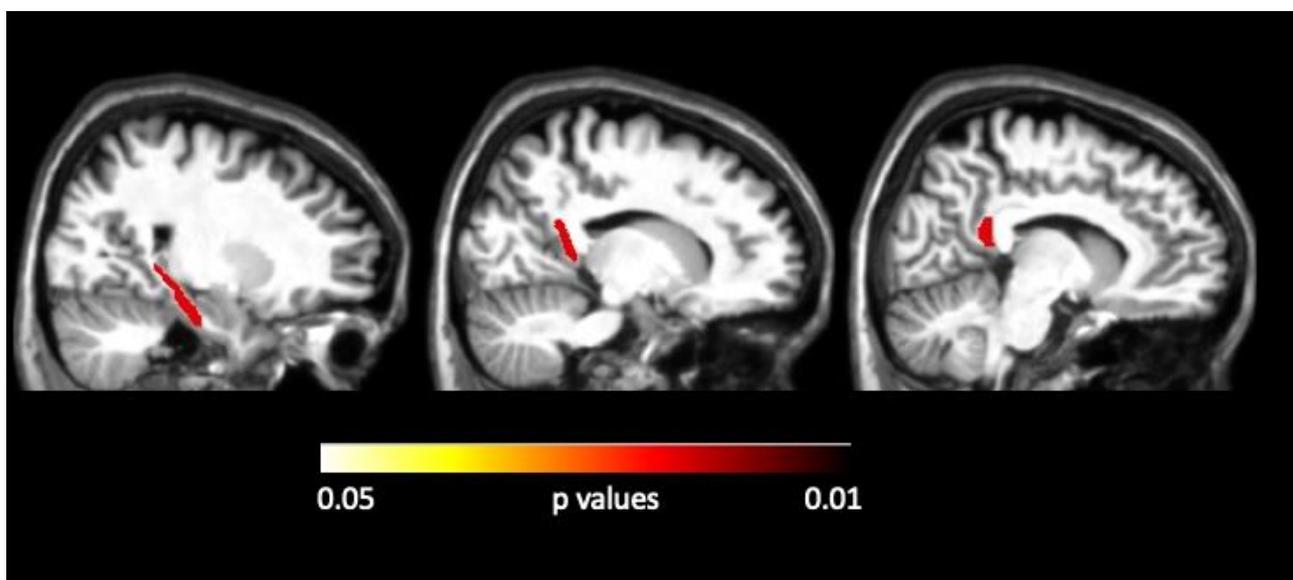


Figura 1. Cíngulo hipocampal direito, medida de difusividade radial.

5. Discussão Geral

Conforme já abordado sobre as atualizações nos critérios do NIA-AA em 2018 (Jack, *et al.* 2018), afim de refinar os estudos sobre as alterações patológicas que ocorrem no *continuum* da DA e incluir os biomarcadores, agora com um consenso crescente de que a aplicação desses deve ser harmonizada conceitualmente ao longo do processo da doença e que os biomarcadores de neurodegeneração não são equivalentes aos que refletem o acúmulo da proteína amilóide e Tau patológica, aumentou-se a importância de estudos com dados longitudinais.

Partindo disto, em nosso trabalho focamos em incluir os indivíduos CCL amnésico e com alteração de β A no LCR, onde já discutimos anteriormente a maior probabilidade desses pacientes converterem para DA. No primeiro momento de nossa pesquisa abordamos de uma maneira transversal os dados, onde os pacientes foram distribuídos conforme os critérios propostos anteriormente em 2011 (Jack, *et al.* 2011), e posteriormente acompanhamos nossos pacientes com CCL (média de 13 meses) para verificarmos a diferença dos biomarcadores de neuroimagem e líquóricos no processo de conversão para DA.

De uma maneira geral, quando comparamos os grupos em relação a todos os biomarcadores incluídos neste estudo, observamos várias alterações em diferentes tratos da SB em nossos pacientes com CCLa e DA leve, principalmente quando comparados ao grupo controle, como demonstrado em outros estudos por Kantarci, *et al* 2019. Além do mais, encontramos correlações entre as medidas de DTI e as proteínas patológicas da DA. Já os outros biomarcadores não se mostram tão sensíveis em evidenciar essas diferenças e tão pouco diferenciar os grupos dos pacientes conversores dos não-conversores. Como esperado, encontramos diferenças quanto a volumetria do hipocampo, assunto no qual já muito debatido pela literatura.

Há muito tempo que a DA é considerada principalmente uma doença que afeta a SC com alterações secundárias na SB, porém o dano observado na SB parece ser mais severo, disperso e pode aparecer mais precocemente do que a atrofia cortical (Kantarci *et al.*, 2019; Wassenaar *et al.*, 2019). Apesar do padrão de ruptura da SB nos tratos límbicos e comissural e, posteriormente, progredir para fibras de projeção e associação (Alves GS, *et al.* 2015), encontramos uma alteração mais disseminada em nossos pacientes com CCLa devido à DA. No entanto, se considerarmos a progressão teórica da doença, a

patologia da DA começa antes mesmo do aparecimento dos sintomas clínicos e o dano axonal pode estar presente no espectro da DA em fases clínicas pré-clínica.

No capítulo 1 inicialmente avaliamos as diferenças na integridade microestrutural da SB nos pacientes *continuum* da DA e controles. Em seguida verificamos se os níveis da proteína t-Tau, p-Tau e β A no LCR poderiam estar correlacionados com a SB em diferentes tratos do cérebro, não apenas em regiões classicamente envolvidas nas fases iniciais da doença. Para a análises de SB, usamos uma abordagem de segmentação automatizada – Multi-Atlas – o qual nos permite encontrar diferenças mais sutis que provavelmente aparecem em estágios iniciais à doença.

Nas análises de correlação entre marcadores moleculares e de imagem, ao controlarmos para o volume do hipocampo essas correlações perderam sua significância estatística. Este achado mostra a influência da atrofia na SC na associação entre a proteína Tau e as alterações na SB. Embora a clássica DW devido à degeneração do hipocampo surja como a hipótese principal, o estudo mais recente da disseminação da proteína Tau "semelhante a um príon" mostra que esse mecanismo também pode afetar diretamente os tratos de SB adjacentes ao hipocampo (Nussbaum, *et al.* 2013).

Recentes estudos demonstraram o mecanismo pelo qual a patologia Tau progride inicialmente dos axônios distais para os dendritos proximais, levando à desconexão sináptica das fibras de mielinização tardia (Amlien, *et al.* 2014; Chen, *et al.* 2018). Nesse sentido, a retrogênese com ruptura primária de SB ao invés de SC, também poderia ser considerada um mecanismo patológico no espectro da DA.

Nossos dados não demonstraram correlações significativas entre SB e as proteínas patológicas em outras regiões que não nos tratos do MTL, favorecendo talvez uma DW e/ou uma disseminação direta da patologia do hipocampo. Nesse caso, também verificamos a influência dos HV nessas correlações, hipotetizando que a perda da significância implicaria em efeito direto da degeneração hipocampal nas associações.

O intuito do capítulo 2 foi avaliar de maneira exploratória as diferenças anatômicas e funcionais da DMN em indivíduos CCLa- β A⁺ que converteram para demência da DA em comparação com pacientes CCLa não-conversores e controles.

Como já mencionado anteriormente, um dos principais motivos de abordarmos essa rede neuronal é pelo característico acúmulo do peptídeo β A em suas regiões. E as regiões que constituem essa rede são também regiões comumente ligadas ao processo da memória e funções cognitivas que são afetadas ao longo da doença (Weiler *et al.*, 2017).

Em nossos achados observamos que apenas uma estrutura anatômica, o feixe do cíngulo-hipocampal direito, se mostrou diferente entre os grupos, principalmente na comparação entre conversores e não-conversores, e não encontramos diferenças significativas na conectividade funcional da DMN. Nossos resultados levantam a questão se a conectividade funcional intrínseca ou em estado de repouso das redes cerebrais pode ser mesmo tão sensível e usada em termos clínicos como possíveis biomarcadores de DA.

As redes neurofuncionais têm respostas adaptativas ativas e mecanismos compensatórios para manter a homeostase (Bullmore and Sporns, 2009; JJ and L, 2016). Isso poderia significar que medidas compensatórias funcionais poderiam mascarar as diferenças entre os sujeitos com a mesma patologia e mesmo desempenho cognitivo, antes que apresentassem sintomas clínicos diferentes, como no caso de nossos pacientes. Além disso, como nossa intenção era estudar possíveis biomarcadores no tempo inicial, não avaliamos as mudanças longitudinais na conectividade da DMN, o que poderia nos permitir ver sutis mudanças quanto as medidas de conectividade.

Retomando nosso achado principal do capítulo 2, observamos diferenças em relação ao feixe do cíngulo-hipocampal direito entre os indivíduos conversores comparados com os indivíduos não conversores e entre conversores comparados aos controles. Este trato carrega projeções do hipocampo para o giro do cíngulo, áreas comumente associadas à patologia da DA e ao desempenho da memória episódica (Bubb, *et al.*, 2018). As alterações foram observadas nas medidas de RD, que estão mais relacionadas à disfunção mielínica (Mayo *et al.*, 2019).

Em consonância com os resultados apresentados no capítulo 1, poderíamos especular que o feixe hipocampal do cíngulo direito poderia estar comprometido devido ao “espalhamento” patológico da proteína Tau através de axônios interconectados. Porém, se controlarmos esse resultado pelo volume do hipocampo o mesmo pode acontecer e perder a significância estatística, indicando assim as outras hipóteses de DW secundária à atrofia hipocampal (Alves *et al.*, 2015), ou até mesmo por retrogênese, que assume atrofia da SB primária através da quebra da bainha de mielina e dano axonal levando à morte do corpo neuronal (Alves *et al.*, 2015).

É notável que com os nossos achados ainda seja prematuro afirmar de fato ação da proteína Tau nas alterações da SB, que parecem mais sensíveis em discriminar os grupos do que os outros biomarcadores. Sabemos que outras análises precisariam ser feitas para afirmarmos tal hipótese, porém vale ressaltar que esses achados em estudos brasileiros são escassos e que resultados internacionais não refletem nossa população.

Estudos com a proteína Tau tem ganhado cada vez mais foco nas pesquisas atuais com DA. Muito embora toda a patologia da doença tenha tido muito enfoque no peptídeo β A, anomalias na proteína Tau bem como suas diferentes formas tem chamado bastante a atenção e se mostrado muito relacionada com os mecanismos que acontecem ao todo do processo da doença (Congdon e Sigurdsson, 2018; Mroczko, *et al.*, 2019; Lauretti e Praticò, 2020).

Conectividade funcional e estrutural são conceitos muito recentes e um método em ascensão; para melhores resultados e dados mais consistente ainda são necessários muitos estudos nesse assunto. O estudo de áreas separadas anatomicamente trabalhando em sincronia pode trazer resoluções de inúmeras perguntas feitas sobre a funcionalidade do cérebro e suas alterações sofridas por doenças, principalmente as doenças neurodegenerativas. Além disso, traz também a possibilidade de conhecimento de vários parâmetros que podem diferenciar individualmente os pacientes.

As limitações deste estudo incluem o tamanho amostral pequeno especialmente no capítulo 2, no qual subdividimos os pacientes com CCL em conversores e não-conversores e a abordagem de uma única técnica para avaliar a CF e sem uma avaliação longitudinal dessas medidas. No capítulo 1 as análises correlacionais não nos permite inferir relações causais. Além disso, as medidas de Tau e amiloide no LCR não têm a mesma precisão anatômica do PET. Nas limitações no geral, não avaliamos nossos pacientes CCL em fases iniciais e/ou tardias, o que nos permitiria uma melhor compreensão do processo de conversão. Assim também como a abordagem das técnicas em nosso estudo, como a técnica do Multi-Atlas que faz uma segmentação detalhada de cada trato de SB e é sabido que a DA tem como característica sem bastante disseminada por todo o cérebro. Talvez uma técnica que analise o trato como um todo poderia nos revelar maiores alterações e correlações com os outros biomarcadores. Poderíamos também ter incluído o estudo de outras redes funcionais que nos daria maior robustez quanto aos dados de CF. Mais estudos translacionais e longitudinais são importantes para inferir conclusões assertivas quanto ao processo de conversão e entendimento do processo neurodegenerativo da doença.

6. Conclusões

Artigo 1 (análise transversal)

- Foram encontradas diferenças entre os grupos CCLa, controle e DA leve em relação a medidas de DTI (FA, MD, RD e AxD) em tratos referentes a região temporal como fórnice, cíngulo e cíngulo hipocampal;
- Os níveis de t-Tau e $\beta A_{42}/t\text{-Tau}$ foram significativamente diferentes entre os pacientes;
- Foram encontrados menores HV nos pacientes quando comparados aos controles;
- Foram encontradas correlações entre as medidas de FA, MD e AxD com os níveis das proteínas líquóricas (p-Tau e t-Tau), não encontramos correlações com os níveis de βA_{42} . Em seguida, avaliamos se essas correlações significativas entre t-Tau e p-Tau com a SB permaneceriam após controlar para as medidas de HV. Nesse caso, poderíamos especular que essas associações eram independentes da integridade do hipocampo. No entanto, nenhuma correlação significativa sobreviveu, o que poderia implicar que o HV medeia as associações entre Tau e as possíveis alterações nos tratos da SB.

Artigo 2 (análise longitudinal)

- Dos 48 pacientes com CCLa βA_{42}^+ acompanhados por um período de no mínimo 6 meses observamos que 8 pacientes converteram (26,6%) e 22 mantiveram o diagnóstico;
- Não foram encontradas diferenças quanto as medidas de conectividade funcional da DMN;
- Foram encontradas diferenças quanto ao volume hipocampal direito ($< HV$) dos conversores quando comparados com o grupo controle;
- Não encontramos diferenças nos níveis de proteínas líquóricas entre os subgrupos conversores e não-conversores;
- Observamos que o trato do cíngulo-hipocampal direito na medida de RD se mostrou diferente entre pacientes conversores dos não-conversores e entre os conversores dos controles;

- Nosso estudo exploratório sugeriu que alterações estruturais, mas não alterações funcionais de conectividade, podem diferenciar melhor pacientes com CCLa- β A + que converteram para DA daqueles que permaneceram estáveis e dos controles.

7. Referências

- WHO Dementia: a public health priority. WHO 2016 2016-07-01 12:29:33 [cited; Available from: http://www.who.int/mental_health/publications/dementia_report_2012/en/]
- WHO | Ageing and Life Course. WHO 2017 2017-05-29 15:59:47 [cited; Available from: <http://www.who.int/ageing/en/>]
- Simoa® HD-1 Analyzer | Quanterix. 2019 [cited; Available from: <https://www.quanterix.com/products-technology/instruments/hd-1>]
- UF²C - User-Friendly Functional Connectivity. 2020a [cited; Available from: <https://www.lniunicamp.com/uf2c>]
- V-PLEX Validated Assay Kits | Meso Scale Discovery. 2020b [cited; Available from: https://www.mesoscale.com/en/products_and_services/assay_kits/v-plex]
- Agosta F, Weiler M, Filippi M. Propagation of pathology through brain networks in neurodegenerative diseases: from molecules to clinical phenotypes. *CNS Neurosci Ther* 2015; 21(10): 754-67.
- Abrahamson EE, Ikonovic MD. Brain injury-induced dysfunction of the blood brain barrier as a risk for dementia. *Exp Neurol*. 2020 Jun; 328:113257. doi: 10.1016/j.expneurol.2020.113257. Epub 2020 Feb 21. PMID: 32092298.
- Adluru N, Destiche DJ, Lu SY, Doran ST, Birdsill AC, Melah KE, Okonkwo OC, Alexander AL, Dowling NM, Johnson SC, Sager MA, Bendlin BB. White matter microstructure in late middle-age: Effects of apolipoprotein E4 and parental family history of Alzheimer's disease. *Neuroimage Clin*. 2014; 4:730-42. DOI: 10.1016/j.nicl.2014.04.008 [PubMed: 24936424]
- Albert MS, DeKosky ST, Dickson D, Dubois B, Feldman HH, Fox NC, *et al*. The diagnosis of mild cognitive impairment due to Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* 2011; 7(3): 270-9.
- Alm KH, Bakker A. Relationships Between Diffusion Tensor Imaging and Cerebrospinal Fluid Metrics in Early Stages of the Alzheimer's Disease Continuum. *J Alzheimers Dis*. 2019;70(4):965-981. doi: 10.3233/JAD-181210. PMID: 31306117; PMCID: PMC6860011.
- Alves GS, Oertel Knochel V, Knochel C, Carvalho AF, Pantel J, Engelhardt E, *et al*. Integrating retrogenesis theory to Alzheimer's disease pathology: insight from DTI-TBSS investigation of the white matter microstructural integrity. *Biomed Res Int* 2015; 2015: 291658.
- Balthazar ML, Pereira FR, Lopes TM, da Silva EL, Coan AC, Campos BM, *et al*. Neuropsychiatric symptoms in Alzheimer's disease are related to functional connectivity alterations in the salience network. *Hum Brain Mapp* 2014; 35(4): 1237-46.
- Bateman RJ, Xiong C, Benzinger TL, Fagan AM, Goate A, Fox NC, *et al*. Clinical and biomarker changes in dominantly inherited Alzheimer's disease. *N Engl J Med* 2012; 367(9): 795-804.
- Braak H, Braak E. Staging of Alzheimer's disease-related neurofibrillary changes. *Neurobiol Aging*. 1995 May-Jun;16(3):271-8; discussion 278-84. doi: 10.1016/0197-4580(95)00021-6. PMID: 7566337.
- Braak H, Braak E, Bohl J, Bratzke H. Evolution of Alzheimer's disease related cortical lesions. *J Neural Transm Suppl*. 1998;54:97-106. doi: 10.1007/978-3-7091-7508-8_9. PMID: 9850918.

- Beckett LA, Donohue MC, Wang C, Aisen P, Harvey DJ, Saito N. The Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative phase 2: Increasing the length, breadth, and depth of our understanding. *Alzheimers Dement* 2015; 11(7): 823-31.
- Bendlin BB, Carlsson CM, Johnson SC, Zetterberg H, Blennow K, Willette AA, *et al.* CSF T-Tau/Abeta42 predicts white matter microstructure in healthy adults at risk for Alzheimer's disease. *PLoS One* 2012; 7(6): e37720.
- Bubb EJ, Metzler-Baddeley C, Aggleton JP. The cingulum bundle: Anatomy, function, and dysfunction. *Neurosci Biobehav Rev.* 2018 Sep; 92:104-127. doi: 10.1016/j.neubiorev.2018.05.008. Epub 2018 May 16. PMID: 29753752; PMCID: PMC6090091.
- Burlá C, Camarano AA, Kanso S, *et al.* Panorama prospectivo das demências no Brasil: um enfoque demográfico. *Cien Saude Colet* 2013; 18(10):2949-2956.
- Braskie MN, Thompson PM. A focus on structural brain imaging in the Alzheimer's disease neuroimaging initiative. *Biol Psychiatry* 2014; 75(7): 527-33.
- Brucki SM, Nitrini R, Caramelli P, Bertolucci PH, Okamoto IH. [Suggestions for utilization of the mini-mental state examination in Brazil]. *Arq Neuropsiquiatr* 2003; 61(3b): 777-81.
- Buckner RL, Andrews-Hanna JR, Schacter DL. The brain's default network: anatomy, function, and relevance to disease. *Ann N Y Acad Sci* 2008; 1124: 1-38.
- Bullmore E, Sporns O. Complex brain networks: graph theoretical analysis of structural and functional systems. *Nat Rev Neurosci* 2009; 10(3): 186-98.
- Burnham SC, Bourgeat P, Dore V, Savage G, Brown B, Laws S, *et al.* Clinical and cognitive trajectories in cognitively healthy elderly individuals with suspected non-Alzheimer's disease pathophysiology (SNAP) or Alzheimer's disease pathology: a longitudinal study. *Lancet Neurol* 2016; 15:1044-53.
- Brueggen K, Dyrba M, Cardenas-Blanco A, Schneider A, Fliessbach K, Buerger K, Janowitz D, Peters O, Menne F, Priller J, Spruth E, Wiltfang J, Vukovich R, Laske C, Buchmann M, Wagner M, Röske S, Spottke A, Rudolph J, Metzger CD, Kilimann I, Dobisch L, Düzel E, Jessen F, Teipel SJ; DELCODE Study Group. Structural integrity in subjective cognitive decline, mild cognitive impairment and Alzheimer's disease based on multicenter diffusion tensor imaging. *J Neurol.* 2019 Oct;266(10):2465-2474. doi: 10.1007/s00415-019-09429-3. Epub 2019 Jun 21. PMID: 31227891.
- Byrne LM, Rodrigues FB, Blennow K, Durr A, Leavitt BR, Roos RAC, *et al.* Neurofilament light protein in blood as a potential biomarker of neurodegeneration in Huntington's disease: a retrospective cohort analysis. *Lancet Neurol* 2017; 16(8): 601-9.
- Casati M, Ferri E, Gussago C, Mazzola P, Abbate C, Bellelli G, *et al.* Increased expression of TREM2 in peripheral cells from mild cognitive impairment patients who progress into Alzheimer's disease. *Eur J Neurol* 2018; 25(6): 805-10.
- Caroli A, Prestia A, Galluzzi S, Ferrari C, van der Flier WM, Ossenkoppele R, *et al.* Mild cognitive impairment with suspected nonamyloid pathology (SNAP): prediction of progression. *Neurology* 2015; 84:508-15.
- Chand GB, Wu J, Hajjar I, Qiu D. Interactions of the Salience Network and Its Subsystems with the Default-Mode and the Central-Executive Networks in Normal Aging and Mild Cognitive Impairment. *Brain Connect* 2017; 7(7): 401-12.
- Chatterjee P, Goozee K, Sohrabi HR, Shen K, Shah T, Asih PR, *et al.* Association of Plasma Neurofilament Light Chain with Neocortical Amyloid-beta Load and Cognitive Performance in Cognitively Normal Elderly Participants. *J Alzheimers Dis* 2018; 63(2): 479-87.

- Congdon EE, Sigurdsson EM. Tau-targeting therapies for Alzheimer disease. *Nat Rev Neurol*. 2018 Jul;14(7):399-415. doi: 10.1038/s41582-018-0013-z. PMID: 29895964; PMCID: PMC6463489.
- Das R. and Chinnathambi S. Microglial priming of antigen presentation and adaptive stimulation in Alzheimer's disease. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 2019; 76(19).
- Delbeuck X, Van der Linden M, Collette F. Alzheimer's disease as a disconnection syndrome? *Neuropsychol Rev* 2003; 13(2): 79-92.
- Dickerson BC, Wolk DA. Biomarker-based prediction of progression in MCI: Comparison of AD signature and hippocampal volume with spinal fluid amyloid-beta and tau. *Front Aging Neurosci* 2013; 5: 55.
- Demirhan A, Nir TM, Zavaliangos-Petropulu A, Jack CR Jr, Weiner MW, Bernstein MA, Thompson PM, Jahanshad N. Alzheimer's Disease Neuroimaging I. Feature Selection Improves the Accuracy of Classifying Alzheimer Disease Using Diffusion Tensor Images. *Proc IEEE Int Symp Biomed Imaging*. 2015; 2015:126–30. DOI: 10.1109/ISBI.2015.7163832 [PubMed: 26413201]
- Deshpande G, Santhanam P, Hu X. Instantaneous and causal connectivity in resting state brain networks derived from functional MRI data. *NeuroImage*. 2010; (22):1-10.
- Dubois B, Hampel H, Feldman HH, Scheltens P, Aisen P, Andrieu S, *et al*. Preclinical Alzheimer's disease: Definition, natural history, and diagnostic criteria. *Alzheimers Dement* 2016; 12(3): 292-323.
- Eckman CB, Eckman EA. An update on the amyloid hypothesis. *Neurol Clin* 2007;25:669-682.
- Fazekas F, Chawluk JB, Alavi A, Hurtig HI, Zimmerman RA. MR signal abnormalities at 1.5 T in Alzheimer's dementia and normal aging. *AJR Am J Roentgenol* 1987; 149(2): 351-6.
- Fischer FU, Wolf D, Scheurich A, Fellgiebel A. Altered whole-brain white matter networks in preclinical Alzheimer's disease. *Neuroimage Clin*. 2015; 8:660–6. DOI: 10.1016/j.nicl.2015.06.007 [PubMed: 26288751]
- Folstein MF, Folstein SE, McHugh PR. "Mini-mental state". A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *J Psychiatr Res* 1975; 12(3): 189-98.
- Fox MD, Raichle ME. Spontaneous fluctuations in brain activity observed with functional magnetic resonance imaging. *Nat Rev Neurosci* 2007;8(9):700-711.
- Gallardo G. and Holtzman D. M. Amyloid- β and Tau at the Crossroads of Alzheimer's Disease. *Advances in experimental medicine and biology* 2019; 1184.
- Gordon BA, Blazey T, Su Y, Fagan AM, Holtzman DM, Morris JC, *et al*. Longitudinal beta-amyloid deposition and hippocampal volume in preclinical Alzheimer disease and suspected non-alzheimer disease pathophysiology. *JAMA Neurol* 2016; 73:1192–200.
- Greicius MD, Srivastava G, Reiss AL, Menon V. Default-mode network activity distinguishes Alzheimer's disease from healthy aging: Evidence from functional MRI. *PNAS* 2004; 101:4637– 4642.
- Hachinski V, Iadecola C, Petersen RC, Breteler MM, Nyenhuis DL, Black SE, *et al*. National Institute of Neurological Disorders and Stroke-Canadian Stroke Network vascular cognitive impairment harmonization standards. *Stroke* 2006; 37(9): 2220-41.
- Jackson J, Bianco G, Rosa AO, Cowan K, Bond P, Anichtchik O, Fern R. White matter tauopathy: Transient functional loss and novel myelin remodeling. *Glia*. 2018 Apr;66(4):813-827. doi: 10.1002/glia.23286. Epub 2018 Jan 8. PMID: 29315804.

- Jack CR, Jr., Bennett DA, Blennow K, Carrillo MC, Dunn B, Haeberlein SB, *et al.* NIA-AA Research Framework: Toward a biological definition of Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* 2018; 14(4): 535-62.
- Jack CR, Jr., Bennett DA, Blennow K, Carrillo MC, Feldman HH, Frisoni GB, *et al.* A/T/N: An unbiased descriptive classification scheme for Alzheimer disease biomarkers. *Neurology* 2016; 87(5): 539-47.
- Jack CR Jr, Knopman DS, Weigand SD, Wiste HJ, Vemuri P, Lowe V, Kantarci K, Gunter JL, Senjem ML, Ivnik RJ, Roberts RO, Rocca WA, Boeve BF, Petersen RC. An operational approach to National Institute on Aging-Alzheimer's Association criteria for preclinical Alzheimer disease. *Ann Neurol*. 2012; 71(6):765–75. DOI: 10.1002/ana.22628 [PubMed: 22488240]
- Kang JH, Korecka M, Figurski MJ, Toledo JB, Blennow K, Zetterberg H, *et al.* The Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative 2 Biomarker Core: A review of progress and plans. *Alzheimers Dement* 2015; 11(7): 772-91.
- Knopman DS, Jack CR Jr, Wiste HJ, Weigand SD, Vemuri P, Lowe VJ, *et al.* Brain injury biomarkers are not dependent on beta- amyloid in normal elderly. *Ann Neurol* 2013; 73:472–80.
- Kantarci K, Avula R, Senjem ML, Samikoglu AR, Zhang B, Weigand SD, Przybelski SA, Edmonson HA, Vemuri P, Knopman DS, Ferman TJ, Boeve BF, Petersen RC, Jack CR Jr. Dementia with Lewy Bodies and Alzheimer Disease: Neurodegenerative Patterns Characterized by DTI. *Neurology*. 2010; 74(22):1814–21. [PubMed: 20513818]
- Kantarci K, Schwarz CG, Reid RI, Przybelski SA, Lesnick TG, Zuk SM, Senjem ML, Gunter JL, Lowe V, Machulda MM, Knopman DS, Petersen RC, Jack CR Jr. White matter integrity determined with diffusion tensor imaging in older adults without dementia: influence of amyloid load and neurodegeneration. *JAMA Neurol*. 2014a; 71(12):1547–54. DOI: 10.1001/jamaneurol. 2014.1482 [PubMed: 25347157]
- Larissa Graboski JP. Instituto Alzheimer Brasil. 2017.
- Konukoglu E, Coutu JP, Salat DH, Fischl B. Alzheimer's Disease Neuroimaging I. Multivariate statistical analysis of diffusion imaging parameters using partial least squares: Application to white matter variations in Alzheimer's disease. *Neuroimage*. 2016; 134:573–86. DOI: 10.1016/ j.neuroimage.2016.04.038 [PubMed: 27103138]
- Kuczynski B, Targan E, Madison C, Weiner M, Zhang Y, Reed B, Chui HC, Jagust W. White matter integrity and cortical metabolic associations in aging and dementia. *Alzheimers Dement*. 2010; 6(1):54–62. [PubMed: 20129319]
- Lauretti E, Praticò D. Alzheimer's disease: phenotypic approaches using disease models and the targeting of tau protein. *Expert Opin Ther Targets*. 2020 Apr;24(4):319-330. doi: 10.1080/14728222.2020.1737012. Epub 2020 Mar 6. PMID: 32116063; PMCID: PMC7201870.
- Leemans A, Jeurissen B, Sijbers J, Jones D. ExploreDTI: a graphical toolbox for processing, analyzing, and visualizing diffusion MR data. *undefined* 2020.
- Luria, A. R. (1973). *The working brain*. New York: Basic Books.
- Mayo CD, Garcia-Barrera MA, Mazerolle EL, Ritchie LJ, Fisk JD, Gawryluk JR. Relationship Between DTI Metrics and Cognitive Function in Alzheimer's Disease. *Front Aging Neurosci* 2018; 10: 436.
- Mayo CD, Garcia-Barrera MA, Mazerolle EL, Ritchie LJ, Fisk JD, Gawryluk JR; Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative. Relationship Between DTI Metrics and Cognitive Function in Alzheimer's Disease. *Front Aging Neurosci*. 2019 Jan 9;10:436. doi: 10.3389/fnagi.2018.00436. PMID: 30687081; PMCID: PMC6333848.
- McAleese KE, Walker L, Graham S, Moya ELJ, Johnson M, Erskine D, Colloby SJ, Dey M, Martin-Ruiz C, Taylor JP, Thomas AJ, McKeith IG, De Carli C, Attems J. Parietal

- white matter lesions in Alzheimer's disease are associated with cortical neurodegenerative pathology, but not with small vessel disease. *Acta Neuropathol.* 2017 Sep;134(3):459-473. doi: 10.1007/s00401-017-1738-2. Epub 2017 Jun 21. PMID: 28638989; PMCID: PMC5563333.
- Mesulam MM. From sensation to cognition. *Brain* 1998;121:1013-1052.
- Mito R, Raffelt D, Dhollander T, Vaughan DN, Tournier JD, Salvado O, *et al.* Fibre-specific white matter reductions in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Brain* 2018.
- Monsell SE, Mock C, Hassenstab J, Roe CM, Cairns NJ, Morris JC, *et al.* Neuropsychological changes in asymptomatic persons with Alzheimer disease neuropathology. *Neurology* 2014; 83(5): 434-40.
- Morris JC. The Clinical Dementia Rating (CDR): current version and scoring rules. *Neurology* 1993; 43(11): 2412-4.
- Morgan AR, Touchard S, Leckey C, O'Hagan C, Nevado-Holgado AJ; NIMA Consortium, Barkhof F, Bertram L, Blin O, Bos I, Dobricic V, Engelborghs S, Frisoni G, Frölich L, Gabel S, Johannsen P, Kettunen P, Kłoszewska I, Legido-Quigley C, Lleó A, Martinez-Lage P, Mecocci P, Meersmans K, Molinuevo JL, Peyratout G, Popp J, Richardson J, Sala I, Scheltens P, Streffer J, Soinen H, Tainta-Cuezva M, Teunissen C, Tsolaki M, Vandenberghe R, Visser PJ, Vos S, Wahlund LO, Wallin A, Westwood S, Zetterberg H, Lovestone S, Morgan BP; Annex: NIMA–Wellcome Trust Consortium for Neuroimmunology of Mood Disorders and Alzheimer's Disease. Inflammatory biomarkers in Alzheimer's disease plasma. *Alzheimers Dement.* 2019 Jun;15(6):776-787. doi: 10.1016/j.jalz.2019.03.007. Epub 2019 Apr 30. PMID: 31047856; PMCID: PMC6565806.
- Mormino EC, Betensky RA, Hedden T, Schultz AP, Amariglio RE, Rentz DM, *et al.* Synergistic effect of beta-amyloid and neurodegeneration on cognitive decline in clinically normal individuals. *JAMA Neurol* 2014; 71:1379–85
- Mormino EC, Papp KV, Rentz DM, Schultz AP, LaPoint M, Amariglio R, *et al.* Heterogeneity in suspected non-Alzheimer disease pathophysiology among clinically normal older individuals. *JAMA Neurol* 2016; 73:1185–91.
- Mroczko B, Groblewska M, Litman-Zawadzka A. The Role of Protein Misfolding and Tau Oligomers (TauOs) in Alzheimer's Disease (AD). *Int J Mol Sci.* 2019 Sep 20;20(19):4661. doi: 10.3390/ijms20194661. PMID: 31547024; PMCID: PMC6802364.
- Nowrangi MA, Lyketsos CG, Leoutsakos JM, Oishi K, Albert M, Mori S, Mielke MM. Longitudinal, region-specific course of diffusion tensor imaging measures in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement.* 2013; 9(5):519–28. DOI: 10.1016/j.jalz.2012.05.2186 [PubMed: 23245561]
- Nussbaum JM, Seward ME, Bloom GS. Alzheimer disease: a tale of two prions. *Prion.* 2013 Jan-Feb;7(1):14-9. doi: 10.4161/pri.22118. Epub 2012 Sep 10. PMID: 22965142; PMCID: PMC3609044.
- Ono K. Alzheimer's disease as oligomeropathy. *Neurochem Int* 2017.
- Palop JJ, Mucke L. Network abnormalities and interneuron dysfunction in Alzheimer disease. *Nat Rev Neurosci.* 2016 Dec;17(12):777-792. doi: 10.1038/nrn.2016.141. Epub 2016 Nov 10. PMID: 27829687.
- Pereira JB, van Westen D, Stomrud E, Strandberg TO, Volpe G, Westman E, *et al.* Abnormal Structural Brain Connectome in Individuals with Preclinical Alzheimer's Disease. *Cereb Cortex* 2017: 1-12.
- Persson J, Lind J, Larsson A, Ingvar M, Slegers K, van Broeckhoven C, *et al.* Altered deactivation in individuals with genetic risk for Alzheimer's disease. *Neuropsychologia* 2008;46(6): 1679-1687.

- Pihlajamäki M, Sperling RA. Functional MRI assessment of task-induced deactivation of the default mode network in Alzheimer's disease and at-risk older individuals. *Behav Neurol* 2009;21(1):77-91.
- Poirier J, Danik M, Blass JP. Pathophysiology of the Alzheimer syndrome. In: Gauthier S. *Clinical diagnosis and management of Alzheimer's disease*. London: Martin Dunitz Ed; 2001. p. 17-27.
- Prescott JW, Guidon A, Doraiswamy PM, Roy Choudhury K, Liu C, Petrella JR. The Alzheimer structural connectome: changes in cortical network topology with increased amyloid plaque burden. *Radiology*. 2014; 273(1):175–84. DOI: 10.1148/radiol.14132593 [PubMed: 24865310]
- Resnick SM, Sojkova J, Zhou Y, An Y, Ye W, Holt DP, *et al*. Longitudinal cognitive decline is associated with fibrillar amyloid-beta measured by [¹¹C]PiB. *Neurology* 2010; 74(10): 807-15.
- Takeda S. Progression of Alzheimer's disease, tau propagation, and its modifiable risk factors. *Neurosci Res*. 2019 Apr;141:36-42. doi: 10.1016/j.neures.2018.08.005. Epub 2018 Aug 16. PMID: 30120962.
- Tang X, Crocetti D, Kuttan K, Ceritoglu C, Albert MS, Mori S, Mostofsky SH, Miller MI. Segmentation of brain magnetic resonance images based on multi-atlas likelihood fusion: testing using data with a broad range of anatomical and photometric profiles. *Front Neurosci*. 2015 Mar 3;9:61. doi: 10.3389/fnins.2015.00061. PMID: 25784852; PMCID: PMC4347448.
- Tzourio-Mazoyer N, Landeau B, Papathanassiou D, Crivello F, Etard O, Delcroix N, Mazoyer B, Joliot M. Automated anatomical labeling of activations in SPM using a macroscopic anatomical parcellation of the MNI MRI single-subject brain. *Neuroimage*. 2002 Jan;15(1):273-89. doi: 10.1006/nimg.2001.0978. PMID: 11771995.
- Shu N, Wang X, Bi Q, Zhao T, Han Y. Disrupted Topologic Efficiency of White Matter Structural Connectome in Individuals with Subjective Cognitive Decline. *Radiology* 2017: 162696.
- Sperling RA, Aisen PS, Beckett LA, Bennett DA, Craft S, Fagan AM, *et al*. Toward defining the preclinical stages of Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* 2011; 7(3): 280-92.
- Sun Y, Yin Q, Fang R, Yan X, Wang Y, Bezerianos A, *et al*. Disrupted functional brain connectivity and its association to structural connectivity in amnesic mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *PLoS One* 2014; 9(5): e96505.
- van den Heuvel MP, Pol HE. Exploring the brain network: A review on resting-state fMRI functional connectivity. *European Neuropsychopharmacology*. 2010;20(8):519-534.
- Vaquer-Alicea J, Diamond MI. Propagation of Protein Aggregation in Neurodegenerative Diseases. *Annu Rev Biochem*. 2019;88:785-810.
- Villain N, Desgranges B, Viader F, de la Sayette V, Mezenge F, Landeau B, Baron JC, Eustache F, Chetelat G. Relationships between hippocampal atrophy, white matter disruption, and gray matter hypometabolism in Alzheimer's disease. *J Neurosci*. 2008; 28(24):6174–81. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.1392-08.2008 [PubMed: 18550759]
- Villemagne VL, Burnham S, Bourgeat P, Brown B, Ellis KA, Salvado O, *et al*. Amyloid beta deposition, neurodegeneration, and cognitive decline in sporadic Alzheimer's disease: a prospective cohort study. *Lancet Neurol* 2013; 12(4): 357-67.
- Vos SJ, Xiong C, Visser PJ, Jasielc MS, Hassenstab J, Grant EA, *et al*. Preclinical Alzheimer's disease and its outcome: a longitudinal cohort study. *Lancet Neurol* 2013; 12:957–65.

- Vos SJ, Gordon BA, Su Y, Visser PJ, Holtzman DM, Morris JC, et al. NIA-AA staging of preclinical Alzheimer disease: discordance and concordance of CSF and imaging biomarkers. *Neurobiol Aging* 2016; 44:1–8.
- van Harten AC, Smits LL, Teunissen CE, Visser PJ, Koene T, Blankenstein MA, et al. Preclinical AD predicts decline in memory and executive functions in subjective complaints. *Neurology* 2013; 81:1409–16.
- Wassenaar TM, Yaffe K, van der Werf YD, Sexton CE. Associations between modifiable risk factors and white matter of the aging brain: insights from diffusion tensor imaging studies. *Neurobiol Aging*; 2019. p. 56-70.
- Weiler M, de Campos BM, Teixeira CVL, Casseb RF, Carletti-Cassani AFMK, Vicentini JE, Magalhães TNC, Talib LL, Forlenza OV, Balthazar MLF. Intranetwork and internetwork connectivity in patients with Alzheimer disease and the association with cerebrospinal fluid biomarker levels. *J Psychiatry Neurosci*. 2017 Nov;42(6):366-377. doi: 10.1503/jpn.160190. PMID: 28375076; PMCID: PMC5662458.
- Weiner MW, Veitch DP, Aisen PS, Beckett LA, Cairns NJ, Cedarbaum J, et al. 2014 Update of the Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative: A review of papers published since its inception. *Alzheimers Dement* 2015b; 11(6): e1-120.
- Weiner MW, Veitch DP, Aisen PS, Beckett LA, Cairns NJ, Green RC, et al. The Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative 3: Continued innovation for clinical trial improvement. *Alzheimers Dement* 2017a; 13(5): 561-71.
- Weiner MW, Veitch DP, Aisen PS, Beckett LA, Cairns NJ, Green RC, et al. Recent publications from the Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative: Reviewing progress toward improved AD clinical trials. *Alzheimers Dement* 2017b; 13(4): e1-e85.
- Wilson RS, Leurgans SE, Boyle PA, Schneider JA, Bennett DA. Neurodegenerative basis of age-related cognitive decline. *Neurology* 2010; 75(12): 1070-8.
- Wisse LE, Butala N, Das SR, Davatzikos C, Dickerson BC, Vaishnavi SN, et al. Suspected non-AD pathology in mild cognitive impairment. *Neurobiol Aging* 2015; 36:3152–62.
- Woods RP, Grafton ST, Holmes CJ, Cherry SR, Mazziotta JC. Automated image registration: I. General methods and intrasubject, intramodality validation. *J Comput Assist Tomogr* 1998; 22(1): 139-52.
- Zhang HY, Wang SJ, Liu B, Ma ZL, Yang M, Zhang ZJ, et al. Resting Brain Connectivity: Changes during the Progress of Alzheimer Disease. *Radiology* 2010;256(2):598-606.
- Zhuang J, Hrabe J, Kangarlu A, Xu D, Bansal R, Branch CA, Peterson BS. Correction of eddy-current distortions in diffusion tensor images using the known directions and strengths of diffusion gradients. *J Magn Reson Imaging*. 2006 Nov;24(5):1188-93. doi: 10.1002/jmri.20727. PMID: 17024663; PMCID: PMC2364728.

8. Anexos

8.1. Parecer do comitê de ética

COMISSÃO NACIONAL DE
ÉTICA EM PESQUISA



PARECER CONSUBSTANCIADO DA CONEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Preditores biológicos da conversão de Comprometimento Cognitivo Leve para Demência da Doença de Alzheimer: neuroimagem multimodal, genética e biomarcadores líquóricos

Pesquisador: THAMIRES NAELA CARDOSO MAGALHAES

Área Temática: Pesquisas com coordenação e/ou patrocínio originados fora do Brasil, excetuadas aquelas com copatrocínio do Governo Brasileiro;

Versão: 9

CAAE: 72359417.8.0000.5404

Instituição Proponente: Hospital de Clínicas da UNICAMP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.789.470

Apresentação do Projeto:

As informações contidas nos campos "Apresentação do Projeto", "Objetivo da Pesquisa" e "Avaliação dos Riscos e Benefícios" foram obtidas dos documentos contendo as Informações Básicas da Pesquisa (PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_1340482_E2.pdf de 09/12/2019) e do Projeto Detalhado.

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



PARECER CONSUBSTANCIADO DA CONEP

INTRODUÇÃO

As demências neurodegenerativas são doenças que afetam a cognição, o comportamento e a independência do indivíduo. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) (1), estima-se que, no ano de 2010 mais de 35 milhões de pessoas no mundo foram diagnosticadas com o tipo mais comum de demência, a doença de Alzheimer (DA), esse número tem dobrado a cada 20 anos; ou seja, em 2030 serão mais de 65 milhões e em 2050 mais de 115 milhões de pessoas, cuja prevalência está aumentando progressivamente devido, sobretudo, ao envelhecimento da população. Em abril de 2012, a OMS publicou o documento chamado “Demência: Uma Questão de Saúde Pública” (2), ressaltando a preocupação para esse problema que afeta a qualidade de vida das pessoas longevas, especialmente nos países em desenvolvimento. A população idosa pode chegar a 1,2 bilhão em 2025 e aos 2 bilhões em 2050, correspondendo, respectivamente, a 22,1% e 19,6% da população mundial (3), junto com esse aumento, vem o aumento dos casos de DA. No Brasil, a doença alcança uma prevalência de 7,1% na população acima de 65 anos (4). Quanto aos aspectos clínicos, o primeiro sintoma geralmente observado é a dificuldade em armazenar informações novas (memória episódica), enquanto as lembranças remotas são preservadas até certo estágio. À medida que a doença progride, outras funções cognitivas são afetadas (5). Nesse contexto clínico, utiliza-se o conceito de Comprometimento Cognitivo Leve (CCL) em pacientes com uma ou mais alterações cognitivas objetivas, sem comprometimento da independência nas atividades do cotidiano.

Endereço: SRTVN 701, Via W 5 Norte, lote D - Edifício PO 700, 3º andar

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.719-040

UF: DF

Município: BRASÍLIA

Telefone: (61)3315-5877

E-mail: conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 3.789.470

O termo CCL é contextualizado como uma possível fase intermediária entre envelhecimento normal e demência, e é classificado em dois subtipos principais: amnésico (CCLa) e não amnésico. O subtipo amnésico é o mais comum e faz referência à indivíduos com comprometimento da memória, especialmente a episódica. O diagnóstico de CCL inclui: queixa cognitiva, de preferência confirmada por uma pessoa que conviva com o paciente; comprometimento cognitivo objetivo, (desempenho abaixo do esperado considerando-se idade e escolaridade) e preservação da independência funcional (6). Estudos mais atualizados têm ressaltado a importância de se abordar também fases iniciais ao CCL, o chamado declínio cognitivo subjetivo (DCS), já que confirmam que o processo patológico da DA acontece décadas ou até mesmo anos antes do aparecimento dos sintomas (7). Esses estudos têm mostrado que estudar fases iniciais à DA é de extrema importância para se observar biomarcadores mais confiáveis e específicos (8, 9). Indivíduos com DCS tem mais propensão a converter para doença do que indivíduos sem queixas de memória consistentes (tanto pessoal quanto por observada por terceiros) (10, 11). Em 2012, a Subjective Cognitive Decline Initiative Group (SCD-I) propôs o conceito de DCS para melhorar a caracterização de pessoas com queixas cognitivas, mas com desempenho normal na avaliação neuropsicológica, levando em consideração os seguintes critérios para tal classificação: 1. declínio persistente na capacidade cognitiva em comparação com um estado previamente normal e não relacionado a um evento agudo; 2. desempenho normal ajustado à idade, sexo e educação em testes cognitivos padronizados, que são usados para classificar CCL ou DA prodrômica (12); início da queixa nos últimos 5 anos; sentimento de pior desempenho que outros da mesma faixa etária; confirmação do declínio cognitivo por um informante; e pontuação > 7 na Memory Complaint Scale tanto para o paciente quanto para o questionário do informante (13). Portanto, a tendência das pesquisas será aprofundar no estudo das fases iniciais do declínio cognitivo. De acordo com dados epidemiológicos, aproximadamente 7% a 15% dos indivíduos com CCLa desenvolvem DA em um ano (14-16), por isso, é importante procurar um diagnóstico mais precoce possível e/ou um biomarcador que permita prever o

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 3.789.470

desenvolvimento da doença. Embora a sensibilidade do diagnóstico clínico seja relativamente alta, a especificidade pode ser mais baixa (17) devido ao fato de a DA ser uma doença heterogênea, que envolve diversas alterações, como alterações neuroquímicas, moleculares e genéticas, por exemplo. A positividade de biomarcadores pode contribuir para a identificação dos indivíduos com CCL que mais possivelmente evoluirão para DA (18). No estudo de Andreasen (2003), 44 pacientes com CCL que evoluíram para DA ao longo de um ano demonstraram que a positividade dos biomarcadores líquóricos (proteína beta-amiloide (A) e proteína Tau) contribuiu para um aumento da razão de risco para a conversão (19). Em relação aos biomarcadores de neuroimagem, vários estudos descreveram significativa atrofia do hipocampo envolvendo pacientes com DA (20- 24) e CCL (21, 25, 26), quando comparados com idosos saudáveis. A diminuição do volume do hipocampo já pode estar presente mesmo na fase pré-clínica (27) e pode ser preditor de conversão de CCL para DA (21). Além da região do hipocampo outras regiões têm apresentado um padrão de atrofia na doença, denominadas como “assinatura cortical da DA” (AC-DA) sendo estas: regiões temporal medial, giro temporal inferior, polo temporal, giro angular, giro frontal superior, sulco frontal inferior, lóbulo parietal superior, giro supramarginal e precúneo (28). Segundo Dickerson (2013) para predição de demência nos indivíduos com CCL a AC-DA se mostrou mais sensível que as medidas de volume hipocampal e melhor também que os biomarcadores líquóricos em um tempo relativamente curto (29). Estudos com imagens funcionais são abordagens mais recentes e podem ser muito promissoras. Alguns estudos (30-32) mostram distúrbios na Default Mode Network (DMN), uma das redes neurais mais correlacionadas com DA. A relevância da DMN na fisiopatologia da demência também é apoiada pelas observações de que suas regiões constituintes são frequentemente os locais de atrofia precoce, e de deposição de placas senis contendo A (31, 33, 34). De acordo com a revisão de Habib (2017) técnicas para análise de neuroimagem, principalmente para análise de imagens funcionais podem ser sensíveis aos primeiros eventos de patologia da DA, antes mesmo da perda de substância cinzenta e manifestações clínicas (35). Os biomarcadores de neuroimagem também têm mostrado grande relação com os biomarcadores moleculares (genética, A e proteína Tau). Os efeitos do gene APOE 4 em redes cerebrais têm sido cada vez mais estudados na DA pré-clínica (36), revelando alterações funcionais na DMN (37). Há também evidências de que no estado de repouso as análises podem ser mais sensíveis na distinção de indivíduos assintomáticos em risco (presença do gene APOE 4 e histórico familiar) quando comparado aos controles (38, 39). Segundo o (40) alguns estudos envolvendo genética e neuroimagem têm sido relacionados com a neurodegeneração em modelos animais e perda de volume hipocampal em pacientes com CCL (41, 42). Conforme demonstrado

Endereço: SRTVN 701, Via W 5 Norte, lote D - Edifício PO 700, 3º andar

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.719-040

UF: DF

Município: BRASÍLIA

Telefone: (61)3315-5877

E-mail: conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 3.789.470

em estudos longitudinais por Andrawis et al., 2012 e Apostolova et al., 2014, em pacientes com DA e CCL, o gene APOE 4 obteve significativo efeito na mudança estrutural do hipocampo (43, 44). Outro estudo envolvendo esses biomarcadores foi de Hohman (2014), que relacionou a proteína Tau com marcadores genéticos e a diminuição do volume hipocampal em pacientes com CCL e DA (45). Estudos do Dominantly Inherited Alzheimer's Network study (DIAN), também identificaram essa relação dos biomarcadores de neuroimagem e biomarcadores moleculares. Eles mostram que a região do precúneo se apresentou como um local de depósito de A precoce, aproximadamente até 15 anos antes do início dos sintomas da DA (46). Essas descobertas estão de acordo com outro estudo (47), no qual foi incluído indivíduos portadores da mutação no gene PSEN1 e estes mostraram aumento de Florbetapir (18F) (48), substância que se liga às placas de A nas áreas da AC-DA. Além dos genes descritos para os casos de DA familiar (Amyloid Precursor Protein (APP), Presenilin-1 e 2 (PSEN1 e PSEN2)), novas tecnologias, como Genome-Wide Association Studies (GWAS), levaram à descrição de outros genes que podem estar relacionados com a susceptibilidade de desenvolver DA, como por exemplo, os polimorfismos (SNPs) dos genes CLU, PICALM e CR1 (49-51). Os genes CLU e CR1 estão relacionados às proteínas clusterina e receptors do sistema complemento (3b/4b), respectivamente, cuja função está ligada ao clearance de A, influenciando na agregação e a toxicidade desse peptídeo. Um alelo de risco genético recentemente confirmado do gene CLU, conhecido também como APOJ, presente em aproximadamente 88% dos caucasianos, confere maiores probabilidades de desenvolver DA (52). O gene PICALM (phosphatidilinositol -binding clathrin assembly protein) está associado ao ciclo da vesícula sináptica e afeta o processamento da proteína precursora de amiloide pelas vias endocíticas. No estudo de meta-análise de Jun (2010) os resultados demonstraram associação dos genes CLU, PICALM e CR1 à DA somente entre caucasianos, enquanto que o genótipo APOE esteve associado a qualquer etnia (53). No nosso país, com várias etnias miscigenadas, temos poucas informações sobre estes fatores como risco para o desenvolvimento de DA. Nesse estudo, pretendemos avaliar de forma longitudinal quais desses biomarcadores predizem com maior precisão a conversão de pacientes com CCLa para demência da DA, assim como se avaliação simultânea desses marcadores aumenta a capacidade de predição. Pretendemos refinar tanto a avaliação em neuroimagem estrutural (hipocampus e AC-DA), como regiões da DMN através de um método de análise mais preciso (análise baseada em Multi-Atlas). Pretendemos também avaliar a influência de genes bem estabelecidos como o APOE, como genes pouco estudados em nossa população. Neste estudo pretendemos avaliar as neuroimagens, adquiridas por ressonância magnética (MRI), através de uma abordagem automatizada e que segmente todo cérebro de forma robusta. Neste sentido,

Endereço: SRTVN 701, Via W 5 Norte, lote D - Edifício PO 700, 3º andar

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.719-040

UF: DF

Município: BRASÍLIA

Telefone: (61)3315-5877

E-mail: conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 3.789.470

métodos de segmentação que utilizam algoritmos baseados em múltiplos atlas (Multi-Atlas) nos permitem realizar uma análise multimodal de uma mesma estrutura ou de outras estruturas anatômicas, permitindo uma análise mais personalizada para cada indivíduo (54). Além disso, como os atlas de segmentação usados nesta abordagem são de pessoas com idade entre 50- 90 anos, a identificação das estruturas anatômicas torna-se mais robusta e fiel à realidade (54, 55). Não obstante, segundo Leung (2010), uma segmentação mais robusta nos permite encontrar danos mais sutis que podem ser mais adequados a estudos prospectivos relativamente curtos (6 meses a 1 ano) (56).

HIPÓTESE

A evolução de pacientes com comprometimento e/ou declínio que converterão para DA é heterogênea, por isso avaliar como os biomarcadores moleculares (genética e proteínas do LCR) se associam com os biomarcadores de imagem é de fundamental importância para que talvez seja possível diferenciar pacientes com CCL ou DCS que realmente representem uma DA prodrômica.

METODOLOGIA

Designados como Parte 1 e Parte 2.

A Parte 1 será caracterizada por um estudo exploratório, com a finalidade de comparar os biomarcadores de neuroimagem e moleculares entre os idosos cognitivamente preservados, os idosos com comprometimento cognitivo leve e os pacientes com doença de Alzheimer leve. Já a Parte 2 apresenta um desenho experimental que se caracteriza pela comparação entre dois grupos: a) CCL "conversor" e b) CCL "nãoconversor" em relação a variáveis de neuroimagem estrutural e funcional no momento inicial (baseline) e após 6 meses/1 ano.

CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Os critérios de inclusão serão baseados nos critérios do NIA/AA para provável DA (57) e para CCL (6), score isquêmico de Hachinski (58) < 4 para todos os grupos. Clinical Dementia Rating (CDR) (59) = 0,5 ou 1 para DA leve, =0,5 para CCLa e =0 para controles. Para o diagnóstico de DCS usaremos as recomendações do SCD-I Working Group(12):

1. Declínio persistente na capacidade cognitiva em comparação com um estado previamente normal e não relacionado a um evento agudo;
2. desempenho normal ajustado à idade, sexo e educação em testes cognitivos padronizados, que são usados para classificar CCL ou DA prodrômica(12). Para aumentar as chances de ser um

Endereço: SRTVN 701, Via W 5 Norte, lote D - Edifício PO 700, 3º andar

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.719-040

UF: DF

Município: BRASÍLIA

Telefone: (61)3315-5877

E-mail: conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 3.789.470

indivíduo com DA pré-clínica, adotaremos as características clínicas da DA, com declínio subjetivo relacionado à memória; início da queixa nos últimos 5 anos; sentimento de pior desempenho que outros da mesma faixa etária; confirmação do declínio cognitivo por um informante; e pontuação > 7 na Memory Complaint Scale tanto para o paciente quanto para o questionário do informante(13).

Para o grupo controle: desempenho cognitivo normal para idade e escolaridade; não apresentarem desordem neurológica ou psiquiátrica, ou estarem sob uso de medicação psicoativa; apresentar pontuação considerada normal no Mini Exame de Estado Mental (MEEM) (60), levando em consideração a idade e educação (61), não apresentar anormalidades nas imagens estruturais.

CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

- História de outra doença neurológica ou psiquiátrica prévia;
- História de traumatismo crânio-encefálico com perda de consciência por mais de 30 minutos;
- História de exposição crônica a substâncias neurotóxicas ou alcoolismo;
- Uso de drogas sedativas/hipnóticas 24 horas antes dos testes neuropsicológicos;
- Dificuldade de entender ou executar os testes proposto;
- Escala Fazekas (0 ou 1) (Fazekas et al., 1987).

Objetivo da Pesquisa:

OBJETIVO PRIMÁRIO

Avaliar a capacidade de predição de conversão de pacientes com CCL para demência da DA através de biomarcadores genéticos, de neuroimagem estrutural e funcional e de proteínas A e Tau no LCR. Nosso estudo pretende também caracterizar geneticamente a nossa amostra em relação a genes que podem aumentar a susceptibilidade de evolução para DA.

OBJETIVOS SECUNDÁRIOS

- Avaliar a capacidade de predição de variáveis de neuroimagem estrutural (volume hipocampal e espessura das regiões da AC-DA) e funcional (subpartes da DMN) para conversão de CCL para DA;
- Avaliar a capacidade de predição dos genes APOE, CLU, PICALM e CR1 para conversão de CCL para DA;
- Avaliar a capacidade de predição das proteínas líquóricas A1-42, p-Tau e t-Tau para conversão de CCL para DA;
- Observar se indivíduos com DCS podem converter para CCL ou DA leve e avaliar quais dos biomarcadores que serão abordados neste projeto podem prever essa conversão;
- Avaliar se há correlação entre os preditores biológicos do estudo e a mudança em variáveis

Endereço: SRTVN 701, Via W 5 Norte, lote D - Edifício PO 700, 3º andar

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.719-040

UF: DF

Município: BRASÍLIA

Telefone: (61)3315-5877

E-mail: conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 3.789.470

cognitivas (MEEM) e funcionais (CDR SB) no período de 6 meses/1 ano.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

RISCOS

A coleta do líquido será realizada nas costas (região lombar). A dor que acompanha a punção lombar é semelhante aquela da coleta de sangue. O desconforto será mínimo, pois será realizada com anestesia local por profissional treinado e devidamente habilitado para a realização de punção lombar. Após submeter-se a punção lombar, o paciente deverá permanecer em repouso em casa, por 24 horas, e aumentar a ingestão de líquidos. Este repouso é importante para evitar dor de cabeça após a punção, impossibilitando a realização das atividades habituais. Se houver dor, mesmo com o repouso, o paciente deverá permanecer por mais alguns dias sem atividades e ingerir a medicação prescrita pelo seu médico. Este tipo de dor de cabeça não traz qualquer prejuízo ao paciente, mas necessita de repouso para desaparecer. O exame de Ressonância Magnética funcional não traz nenhum risco para o paciente. Não podem realizar esse exame apenas aqueles que possuem metal no corpo (como próteses, fios, secundários a cirurgias anteriores) ou têm medo ou pânico de locais fechados. O único desconforto relacionado a este exame é o ruído intermitente durante os primeiros 15 minutos. Depois disso o ruído será muito menor. O pessoal técnico providenciará tapa-ouvidos para que o exame seja mais confortável.

BENEFÍCIOS

O diagnóstico precoce do comprometimento cognitivo trará um tratamento precoce para paciente.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Estudo nacional e unicêntrico, prospectivo, não randomizado.

Além do Brasil, participará o seguinte país no estudo: Países Baixos (Holanda).

Número de participantes incluídos no Brasil: 100.

Participarão os seguintes centros de pesquisa no Brasil: Hospital de Clínicas da UNICAMP

Haverá armazenamento de amostras em banco de material biológico na cidade de Amsterdã (localizado na Holanda). O laboratório central, para onde as amostras serão enviadas, é o Hospital das Clínicas da UNICAMP, Campinas, Brasil e VU University Medical Center (VUmc), Amsterdã Holanda.

Previsão de início do estudo: 01/11/2017.

Previsão de encerramento do estudo: 30/08/2019.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Endereço: SRTVN 701, Via W 5 Norte, lote D - Edifício PO 700, 3º andar

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.719-040

UF: DF

Município: BRASILIA

Telefone: (61)3315-5877

E-mail: conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 3.789.470

Vide item "Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações".

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Análise das respostas ao Parecer Consubstanciado n° 3.736.104 emitido pela Conep em 08/12/2019:

1. Quanto ao Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) - para participantes com sintomas clínicos de Doença de Alzheimer e Comprometimento Cognitivo Leve referente ao arquivo "TCLE_Pacientes_E2.pdf", postado na Plataforma Brasil em 13/08/2019, seguem as considerações:

1.1. O TCLE deve ser conciso e de fácil compreensão por um indivíduo LEIGO, não sendo desejável a utilização de construções gramaticais complexas. Diante do exposto, solicita-se que o TCLE seja revisado, utilizando linguagem CLARA E ACESSÍVEL. Salienta-se que é necessário substituir os termos técnicos como: "apolipoproteína E (APOE)", "1 a 5", "CLU", "PICALM", "CR1", "alelos", "tau", "beta-amiloide", por palavras de fácil entendimento ou adicionar breve explicação sobre o termo empregado no texto (Resolução CNS no 466 de 2012, itens II.23 e IV.1.b).

RESPOSTA: Atendemos a solicitação quanto a parte envolvendo os nomes dos genes. Para melhor entendimento do participante deixaremos somente a parte que falamos sobre a análise de genes que podem ser fatores de riscos. Quanto as outras palavras que podem ser mais difíceis de compreensão, são necessárias para o entendimento dos procedimentos e finalidade da pesquisa, não sendo possível substituí-las. Um pesquisador (incluído como equipe de pesquisa) sempre estará presente durante todos os procedimentos e esclarecendo todas as dúvidas quanto os termos para os participantes da pesquisa. Lembrando também, que os participantes podem levar o termo para casa para buscar auxílio antes de aceitar a participar da pesquisa.

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

1.2. Na página 1 de 5 lê-se: "Caso seja necessário, receberei informações sobre como obter o suporte adequado dentro das possibilidades do Sistema Único de Saúde (SUS)". Solicita-se que seja expresso de forma clara e objetiva no TCLE que o pesquisador e o patrocinador não irão onerar os planos de saúde, o SUS, ou o próprio participante da pesquisa (Resolução no 466 de 2012, item III.2.o).

RESPOSTA: Solicitação esclarecida no TCLE.

ANÁLISE: PENDÊNCIA NÃO ATENDIDA. A pesquisadora inseriu no TCLE o seguinte trecho "Caso seja

Endereço: SRTVN 701, Via W 5 Norte, lote D - Edifício PO 700, 3º andar

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.719-040

UF: DF

Município: BRASILIA

Telefone: (61)3315-5877

E-mail: conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 3.789.470

necessário, receberei informações sobre como obter o suporte adequado dentro das possibilidades do Sistema Único de Saúde (SUS), ou seja, minha participação ou não no estudo não envolve em nenhum prejuízo quanto ao uso do SUS.". Portanto, a inadequação persiste. Solicita-se que seja expresso de forma clara e objetiva no TCLE que o pesquisador e o patrocinador NÃO IRÃO ONERAR os planos de saúde, o SUS, ou o próprio participante da pesquisa (Resolução nº 466 de 2012, item III.2.o).

RESPOSTA: Seguindo a solicitação sugerida pelo revisor, alteramos novamente esta parte no TCLEs para melhor esclarecimento ao participante da pesquisa.

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

2. Quanto ao Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – Reconsentimento referente ao arquivo intitulado "TCLE_amostras_exterior_Holanda.pdf", postado na Plataforma Brasil em 13/08/2019, seguem as considerações:

2.1. O TCLE deve ser conciso e de fácil compreensão por um indivíduo LEIGO, não sendo desejável a utilização de construções gramaticais complexas. Diante do exposto, solicita-se que o TCLE seja revisado, utilizando-se linguagem CLARA E ACESSÍVEL. Salienta-se que é necessário substituir os termos técnicos como: "líquido cefalorraquidiano", "processos inflamatórios", "proteínas", "contrastes" por palavras de fácil entendimento ou adicionar breve explicação sobre o termo empregado no texto (Resolução CNS 466 de 2012, itens II.23 e IV.1.b).

RESPOSTA: Solicitação para revisão atendida, mudamos os termos que poderiam dificultar a compreensão dos pacientes e os que permaneceram fizemos uma breve explicação.

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

2.2. Na página 1 de 5 lê-se: "Caso seja necessário, receberei informações sobre como obter o suporte adequado dentro das possibilidades do Sistema Único de Saúde (SUS)". Solicita-se que seja expresso de forma clara e objetiva no TCLE que o pesquisador e o patrocinador não irão onerar os planos de saúde, o SUS, ou o próprio participante da pesquisa (Resolução no 466 de 2012).

RESPOSTA: Solicitação esclarecida no TCLE.

ANÁLISE: PENDÊNCIA NÃO ATENDIDA. A pesquisadora inseriu no TCLE o seguinte trecho "Caso seja necessário, receberei informações sobre como obter o suporte adequado dentro das possibilidades do Sistema Único de Saúde (SUS), ou seja, minha participação ou não no estudo não envolve em nenhum prejuízo quanto ao uso do SUS.". Portanto, a inadequação persiste. Solicita-se que seja

Endereço: SRTVN 701, Via W 5 Norte, lote D - Edifício PO 700, 3º andar

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.719-040

UF: DF

Município: BRASÍLIA

Telefone: (61)3315-5877

E-mail: conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 3.789.470

expresso de forma clara e objetiva no TCLE que o pesquisador e o patrocinador NÃO IRÃO ONERAR os planos de saúde, o SUS, ou o próprio participante da pesquisa (Resolução nº 466 de 2012, item III.2.o).

RESPOSTA: Seguindo a solicitação sugerida pelo revisor, alteramos novamente esta parte no TCLEs para melhor esclarecimento ao participante da pesquisa.

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

2.3. Na página 3 de 4 lê-se: “A pesquisadora Thamires N. C. Magalhães pode interromper sua participação nesse estudo a qualquer momento que julgar apropriado, como quando houver fatores de exclusão que sejam descobertos durante a pesquisa, por exemplo, através da análise dos prontuários”. Solicita-se informar no TCLE que o estudo poderá ser interrompido mediante aprovação prévia do CEP ou, quando for necessário, para que seja salvaguardada segurança do participante da pesquisa. Neste caso, o CEP deverá ser comunicado a posteriori na primeira oportunidade (Resolução CNS 251 de 1997, item III.2.e; Resolução 466 de 2012, item III.2.u).

RESPOSTA: Esclarecemos e alteramos isso no TCLE.

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

2.4. Na página: 3 de 4, lê-se: “A previsão do prazo de armazenamento das amostras depositadas no Biorrepositório é de 10 anos. Toda nova pesquisa a ser realizada com o material armazenado será submetida para aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) e da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP)”. No entanto, a declaração que consta no documento intitulado: “Regulamento_biorrepositorio.pdf”, postado em: 24/09/2017 prevê que após o estudo, as amostras, quando autorizadas serão transferidas para um biobanco ou outro biorrepositório. Solicita-se incluir esta informação no TCLE.

RESPOSTA: Informação incluída no TCLE.

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

3. Quanto ao Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) - controles, referente ao arquivo intitulado “TCLE_Controles_E2.pdf, postado na Plataforma Brasil em 13/08/2019, seguem as considerações:

3.1. O TCLE deve ser conciso e de fácil compreensão por um indivíduo LEIGO, não sendo desejável a utilização de construções gramaticais complexas. Diante do exposto, solicita-se que o TCLE seja

Endereço: SRTVN 701, Via W 5 Norte, lote D - Edifício PO 700, 3º andar

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.719-040

UF: DF

Município: BRASILIA

Telefone: (61)3315-5877

E-mail: conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 3.789.470

revisado, utilizando-se linguagem CLARA E ACESSÍVEL. Salienta-se que é necessário substituir os termos técnicos como: “uma punção lombar”, “proteínas”, por palavras de fácil entendimento ou adicionar breve explicação sobre o termo empregado no texto (Resolução CNS no 466 de 2012, itens II.23 e IV.1.b).

RESPOSTA: Solicitação esclarecida no TCLE.

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

3.2. Na página 3 de 4 lê-se: “A coleta de sangue será feita por punção venosa, risco da punção venosa”. Solicita-se descrever os riscos inerentes à coleta de sangue, tais como inchaço, hematoma, entre outros.

RESPOSTA: Esclarecemos nos TLCEs essa informação.

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

3.3. Solicita-se descrever no TCLE quais FAMÍLIAS de genes/segmentos de DNA e/ou RNA serão analisadas nas amostras biológicas coletadas para o estudo. O pesquisador poderá descrever os genes estudados de forma agrupada segundo a funcionalidade ou o efeito (exemplo: genes relacionados ao aparecimento do câncer, inflamação, morte celular, resposta ao tratamento etc.) não sendo necessário listá-los individualmente, respeitando-se a capacidade de compreensão do participante de pesquisa (Carta Circular no 041/2015/CONEP/CNS/MS, itens 2.a e 2.b).

RESPOSTA: Para ficar com uma linguagem mais simples, como solicitado, decidimos deixar somente a parte que dizemos que são genes de riscos para a doença de Alzheimer.

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

3.4. Na página 1 de 5 lê-se: “Os participantes também têm direito a laudo do exame de ressonância magnética e aos resultados dos exames biológicos”. Solicita-se incluir que o participante terá acesso, a todos os resultados de exames do estudo. Solicita-se adequação.

RESPOSTA: Adequação solicitada atendida.

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

4. Quanto ao arquivo “PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_1340482_E2.pdf” de 13/08/2019: foi informado o orçamento de R\$ 57.452,58, e no item patrocinador consta financiamento próprio. Solicita-se que seja apresentado orçamento financeiro mais detalhado, que especifique TODOS os recursos, fontes e destinação (Norma Operacional CNS no 001 de 2013, item 3.3.e).

Endereço: SRTVN 701, Via W 5 Norte, lote D - Edifício PO 700, 3º andar

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.719-040

UF: DF

Município: BRASÍLIA

Telefone: (61)3315-5877

E-mail: conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 3.789.470

RESPOSTA: Foi adicionado como outros documentos o orçamento provindos da agência financiadora do projeto que é a FAPESP.

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

5. Solicita-se inserir na Plataforma Brasil o compromisso da instituição destinatária no exterior quanto à vedação do patenteamento e da utilização comercial do material biológico humano armazenado em biorrepositório (Item 16 da Resolução CNS no 441 de 2011; Artigo 12 da Portaria MS no 2.201 de 2011; Item 3, Anexo II, da Norma Operacional CNS no 001 de 2013). RESPOSTA: Este documento já foi providenciado anteriormente e se encontra no arquivo "Documentos_Holanda". Por se tratar de instituição no exterior os documentos estão em inglês e estão traduzidos em um outro arquivo denominado "Documentos_Traduzidos".

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

6. O cronograma do estudo não está adequado, pois informa que ele já teria iniciado. Sendo assim, solicita-se esclarecimento e, caso necessário, adequação do cronograma com relação à data de início do estudo, dado que este ainda se encontra em análise no Sistema CEP/Conep até a presente data. Ressalta-se ainda a necessidade de adequação do cronograma de forma a descrever a duração das diferentes etapas da pesquisa, com compromisso explícito do pesquisador de que o estudo será iniciado somente a partir da aprovação pelo Sistema CEP/Conep (Norma Operacional CNS no 001 de 2013, item 3.3.f).

RESPOSTA: A data de início está de acordo com o início da viagem da pesquisadora responsável pelo projeto, conforme estágio aprovado pela Fapesp. A aluna começou seus estudos no dia 01 de outubro de 2019 e regressará em 31 de março de 2020. Pois além de trabalhar com as amostras a aluna exercerá outras funções no laboratório para fins de sua aprendizagem e aperfeiçoamento, cumprindo o objetivo do estágio no exterior. Enquanto o processo de permissão para amostras está em andamento, a aluna aguarda sua aprovação para iniciar os experimentos. O cronograma que se refere ao processo como um todo, referente ao doutorado da aluna, já foi previamente analisado e aprovado pelo CEP. Muitas das etapas de pesquisa já foram realizadas e fica impossível acrescentá-las ao site da plataforma Brasil, já que são datas no passado. Porém, para fins de esclarecimentos acrescentamos duas etapas (análises moleculares no exterior e análises dos resultados gerais) ao cronograma do site da Plataforma Brasil.

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

Endereço: SRTVN 701, Via W 5 Norte, lote D - Edifício PO 700, 3º andar

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.719-040

UF: DF

Município: BRASILIA

Telefone: (61)3315-5877

E-mail: conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 3.789.470

Considerações Finais a critério da CONEP:

Diante do exposto, a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - Conep, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS nº 466 de 2012 e na Norma Operacional nº 001 de 2013 do CNS, manifesta-se pela aprovação da emenda proposta ao projeto de pesquisa.

Situação: Emenda aprovada.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_134048_2_E2.pdf	09/12/2019 18:24:05		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_amostras_exterior_Holanda_versao9.pdf	09/12/2019 08:39:07	THAMIRES NAELA CARDOSO MAGALHAES	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Pacientes_E2_versao9.pdf	09/12/2019 08:38:54	THAMIRES NAELA CARDOSO MAGALHAES	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Contrales_E2_versao9.pdf	09/12/2019 08:38:38	THAMIRES NAELA CARDOSO MAGALHAES	Aceito
Outros	Resposta_PB_E2_versao9.pdf	09/12/2019 08:36:17	THAMIRES NAELA CARDOSO MAGALHAES	Aceito
Outros	orcamento.pdf	22/10/2019 06:20:39	THAMIRES NAELA CARDOSO MAGALHAES	Aceito
Outros	Emenda_2_atualizada.pdf	13/08/2019 14:29:31	THAMIRES NAELA CARDOSO MAGALHAES	Aceito
Outros	Documentos_Traduzidos.pdf	10/06/2019 10:54:37	THAMIRES NAELA CARDOSO MAGALHAES	Aceito
Outros	Documentos_Holanda.pdf	04/06/2019 14:44:29	THAMIRES NAELA CARDOSO MAGALHAES	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoDoutorado_atualizado.pdf	11/05/2018 10:02:37	THAMIRES NAELA CARDOSO MAGALHAES	Aceito
Declaração de	Regulamento_biorrepositorio.pdf	24/09/2017	THAMIRES NAELA	Aceito

Endereço: SRTVN 701, Via W 5 Norte, lote D - Edifício PO 700, 3º andar

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.719-040

UF: DF

Município: BRASÍLIA

Telefone: (61)3315-5877

E-mail: conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 3.789.470

Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	Regulamento_biorrepositorio.pdf	22:53:16	CARDOSO MAGALHAES	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Infraestrutura.pdf	23/06/2017 11:22:22	THAMIRES NAELA CARDOSO MAGALHAES	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_Rosto_Assinada.pdf	23/06/2017 11:21:26	THAMIRES NAELA CARDOSO MAGALHAES	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

BRASILIA, 26 de Dezembro de 2019

Assinado por:
Jorge Alves de Almeida Venancio
(Coordenador(a))

Endereço: SRTVN 701, Via W 5 Norte, lote D - Edifício PO 700, 3º andar

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.719-040

UF: DF

Município: BRASILIA

Telefone: (61)3315-5877

E-mail: conep@saude.gov.br

8.2. Termo de consentimento livre e esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO - Controles

Projeto: Preditores biológicos da conversão de Comprometimento Cognitivo Leve para Demência da Doença de Alzheimer: neuroimagem multimodal, genética e biomarcadores líquidos

Pesquisador responsável: MSc. Thamires N. Cardoso Magalhães

Você está sendo convidado a participar como voluntário de uma pesquisa. Este documento, chamado Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, visa assegurar seus direitos como participante e é elaborado em duas vias, uma que deverá ficar com você e outra com o pesquisador.

Por favor, leia com atenção e calma, aproveitando para esclarecer suas dúvidas. Se houver perguntas antes ou mesmo depois de assiná-lo, você poderá esclarecê-las com o pesquisador. Se preferir, pode levar este Termo para casa e consultar seus familiares ou outras pessoas antes de decidir participar. Não haverá nenhum tipo de penalização ou prejuízo se você não aceitar participar ou retirar sua autorização em qualquer momento.

Doença de Alzheimer (DA)

É uma doença que começa geralmente no idoso e afeta aos poucos a memória e outras habilidades mentais como linguagem, orientação, habilidades manuais, podendo ter sintomas psiquiátricos como depressão, alucinações, delírios, dificultando o dia-a-dia do paciente. Em nosso estudo, pretendemos avaliar pessoas com doença de Alzheimer em sua fase inicial.

Comprometimento Cognitivo Leve (CCL)

É o termo usado para pessoas que apresentam algum problema cognitivo (memória, linguagem, atenção, etc.) sem que isso não comprometa de forma significativa a independência da pessoa no dia-a-dia. Quem tem CCL tem chance aumentada de vir a desenvolver DA no futuro.

Justificativa e objetivos:

O estudo que estamos realizando tem por objetivo principal detectar possíveis alterações iniciais em pessoas com CCL e DA, através de exames de sangue, líquido cefalorraquidiano – que será extraído através de uma punção lombar) e ressonância magnética do cérebro (sem uso de contrastes). Esse tipo de estudo é importante para que se possa melhorar o diagnóstico precoce dessas doenças e, no futuro, tornar o tratamento mais efetivo. Sabe-se que a doença de Alzheimer está relacionada a alterações em algumas proteínas que se depositam no cérebro, como por exemplo, proteínas chamadas tau e beta-amiloide. Nesse projeto de pesquisa pretendemos fazer a dosagem dessas proteínas e relacioná-las com os sintomas de memória, entre outros, assim como com imagens do cérebro (por meio de exame de ressonância magnética) e a genética do paciente (presença ou não de genes que podem aumentar o risco de desenvolvimento da doença de Alzheimer). Esses genes, entretanto, não dão certeza se a pessoa virá a ter essa doença, apenas mostra se ela/ele tem chance maior de vir a desenvolvê-la. Os exames das pessoas normais são fundamentais para entendermos melhor as causas da doença. Eles serão comparados com os exames de voluntários não-

Rubrica do pesquisador: _____

Rubrica do participante: _____

diagnosticados com Doença de Alzheimer, visando melhorar o diagnóstico precoce da mesma.

Procedimentos:

Os voluntários passarão por etapas durante a participação na pesquisa.

1ª Etapa: Os voluntários farão testes neuropsicológicos (similares a testes psicotécnicos) e ressonância magnética cerebral. Estes exames não são invasivos e não causam danos ao paciente.

2ª Etapa: Os voluntários serão perguntados sobre a autorização para coleta de 10ml do sangue para os estudos. No dia da coleta é necessário estar em jejum e não precisa interromper medicações utilizadas.

Após um período de 6 meses à 1 ano, os voluntários serão novamente chamados para refazermos essas etapas, afim de compararmos os resultados preliminares.

Desconfortos e riscos:

Você não deve participar deste estudo se teve outra doença neurológica ou psiquiátrica; histórico de traumatismo crânio-encefálico com perda de consciência por mais de 30 minutos; histórico de exposição crônica a substâncias neurotóxicas ou alcoolismo e uso de drogas sedativas/hipnóticas 24 horas antes dos testes neuropsicológicos.

Em relação aos exames biológicos: A coleta de sangue é feita como nos exames de rotina, através de punção venosa.

Em relação ao exame de ressonância magnética: O exame não traz nenhum risco para o indivíduo, porém só não podem realizar esse exame apenas aqueles que possuem metal no corpo (como próteses, fios, secundários a cirurgias anteriores) ou têm medo ou pânico de locais fechados. O procedimento é semelhante a uma tomografia. Um alto falante dentro do campo magnético possibilita a constante comunicação com as pessoas responsáveis pelo exame. Durante todo o tempo o pessoal médico e paramédico pode ver e ouvir a pessoa, que pode ser removida se for preciso. O procedimento pode durar entre 30 a 45 minutos. O único desconforto relacionado a este exame é o ruído intermitente durante os primeiros 15 minutos, depois disso o ruído será menor. O pessoal técnico providenciará tapa-ouvidos para que o exame seja mais confortável.

Benefícios

Para o voluntário não existe um benefício imediato, mas sua participação nos da oportunidade de estudar mais a fundo sobre a doença de Alzheimer, para que futuramente novos métodos diagnósticos e terapêuticos sejam desenvolvidos.

Acompanhamento e assistência:

Caso ocorra qualquer desconforto intermitente após os procedimentos, o paciente deverá entrar em contato com a equipe de pronto atendimento do Hospital de Clínicas da UNICAMP e com a equipe de pesquisa, que orientarão as medidas a serem tomadas para aliviar os sintomas, sem nenhum custo. Durante o decorrer do estudo informaremos ao paciente o andamento da pesquisa, podendo este deixar de participar da pesquisa a qualquer momento, sem prejuízo no atendimento que recebe ou receberá pelo HC – UNICAMP, caso decida não colaborar com a equipe, pois a participação do paciente é voluntária.

Sigilo e privacidade:

Você tem a garantia de que sua identidade será mantida em sigilo e nenhuma informação será dada a outras pessoas que não façam parte da equipe de pesquisadores. Na divulgação dos resultados desse estudo, seu nome não será citado. Os resultados dos líquidos biológicos e de ressonância magnética do estudo poderão fazer parte do prontuário médico.

Rubrica do pesquisador: _____

Rubrica do participante: _____

Ressarcimento e Indenização:

O ressarcimento será feito em casos de necessidade da parte do paciente, pois as etapas da pesquisa serão feitas em rotina do participante e do Hospital das Clínicas. Os participantes têm direito a laudo do exame de ressonância magnética e aos resultados dos exames biológicos. Você terá a garantia ao direito a indenização diante de eventuais danos decorrentes da pesquisa.

Aconselhamento genético:

Neste estudo, pretendemos avaliar a presença de genes que, de acordo com pesquisas em populações de outros países, podem ser um dos fatores de risco para o desenvolvimento da doença de Alzheimer. Se houver necessidade, os indivíduos poderão ser orientados no ambulatório de Neurogenética do Hospital de Clínicas da Unicamp, sob supervisão da Profa. Dra. Íscia Lopes-Cendes. O sr(a). tem o direito de ser informado sobre o resultado de seu exame:

- () desejo ser informado dos resultados do exame genético;
 () não desejo ser informado dos resultados do exame genético.

Armazenamento de MATERIAL BIOLÓGICO:

Após o estudo realizado, geralmente sobra um pouco dos líquidos biológicos coletados, que podem ainda ser utilizados em pesquisas futuras, sem a necessidade de realizar novamente procedimentos de punção, com todos os seus riscos e desconfortos. Toda nova pesquisa a ser realizada com o material armazenado será submetida para aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Unicamp e, quando for o caso, da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP). Eu:

- () concordo em participar do presente estudo, porém NÃO AUTORIZO o armazenamento do meu material biológico, devendo o mesmo ser descartado ao final desta pesquisa.
 () concordo em participar do presente estudo e AUTORIZO o armazenamento do meu material biológico, sendo necessário meu consentimento a cada nova pesquisa, que deverá ser aprovada pelo CEP institucional e, se for o caso, pela CONEP.

Você, ou seu representante legal, a qualquer tempo e sem quaisquer ônus ou prejuízos, pode retirar o consentimento da guarda e utilização do seu material biológico armazenado.

Em caso de falecimento ou condição incapacitante, os direitos sobre o material armazenado deverão ser dados a: _____
 Telefone: _____ E-mail _____.

Contato:

Em caso de dúvidas sobre a pesquisa, você poderá entrar em contato com os pesquisadores Thamires N. C. Magalhães nos telefones (19) 3521-7754 / 3521-9217 ou (19) 99433-3257, ou através do e-mail thamiresncm@hotmail.com e o Prof. Dr. Marcio Luiz Figueredo Balthazar nos telefones (19) 3521-7754 / 3521-9217.

Em caso de denúncias ou reclamações sobre sua participação e sobre questões éticas do estudo, você poderá entrar em contato com a secretaria do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da UNICAMP das 08:30hs às 11:30hs e das 13:00hs as 17:00hs na Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126; CEP 13083-887 Campinas – SP; telefone (19) 3521-8936 ou (19) 3521-7187; e-mail: cep@fcm.unicamp.br.

O Comitê de Ética em Pesquisa (CEP).

Rubrica do pesquisador: _____

Rubrica do participante: _____

O papel do CEP é avaliar e acompanhar os aspectos éticos de todas as pesquisas envolvendo seres humanos. A Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP), tem por objetivo desenvolver a regulamentação sobre proteção dos seres humanos envolvidos nas pesquisas. Desempenha um papel coordenador da rede de Comitês de Ética em Pesquisa (CEPs) das instituições, além de assumir a função de órgão consultor na área de ética em pesquisas

Consentimento livre e esclarecido:

Após ter recebido esclarecimentos sobre a natureza da pesquisa, seus objetivos, métodos, benefícios previstos, potenciais riscos e o incômodo que esta possa acarretar, aceito participar e declaro estar recebendo uma via original deste documento assinada pelo pesquisador e por mim, tendo todas as folhas por nós rubricadas:

Nome do (a) participante _____

Contato telefônico: _____

E-mail (opcional): _____

Data: ____/____/____.
(Assinatura do participante ou nome e assinatura do seu RESPONSÁVEL LEGAL)

Responsabilidade do Pesquisador:

Asseguro ter cumprido as exigências da resolução 466/2012 CNS/MS e complementares na elaboração do protocolo e na obtenção deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Asseguro, também, ter explicado e fornecido uma via deste documento ao participante. Informo que o estudo foi aprovado pelo CEP perante o qual o projeto foi apresentado. Comprometo-me a utilizar o material e os dados obtidos nesta pesquisa exclusivamente para as finalidades previstas neste documento ou conforme o consentimento dado pelo participante.

Data: ____/____/____.
(Assinatura do pesquisador)

Rubrica do pesquisador: _____

Rubrica do participante: _____

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO - Pacientes**Projeto: Preditores biológicos da conversão de Comprometimento Cognitivo Leve para Demência da Doença de Alzheimer: neuroimagem multimodal, genética e biomarcadores líquidos****Pesquisador responsável:** MSc. Thamires N. Cardoso Magalhães

Você está sendo convidado a participar como voluntário de uma pesquisa. Este documento, chamado Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, visa assegurar seus direitos como participante e é elaborado em duas vias, uma que deverá ficar com você e outra com o pesquisador.

Por favor, leia com atenção e calma, aproveitando para esclarecer suas dúvidas. Se houver perguntas antes ou mesmo depois de assiná-lo, você poderá esclarecê-las com o pesquisador. Se preferir, pode levar este Termo para casa e consultar seus familiares ou outras pessoas antes de decidir participar. Não haverá nenhum tipo de penalização ou prejuízo se você não aceitar participar ou retirar sua autorização em qualquer momento.

Doença de Alzheimer (DA)

É uma doença que começa geralmente no idoso e afeta aos poucos a memória e outras habilidades mentais como linguagem, orientação, habilidades manuais, podendo ter sintomas psiquiátricos como depressão, alucinações, delírios, dificultando o dia-a-dia do paciente. Em nosso estudo, pretendemos avaliar pessoas com doença de Alzheimer em sua fase inicial.

Comprometimento Cognitivo Leve (CCL)

É o termo usado para pessoas que apresentam algum problema cognitivo (memória, linguagem, atenção, etc.) sem que isso não comprometa de forma significativa a independência da pessoa no dia-a-dia. Quem tem CCL tem chance aumentada de vir a desenvolver DA no futuro.

Justificativa e objetivos:

O estudo que estamos realizando tem por objetivo principal detectar possíveis alterações iniciais em pessoas com CCL e DA, através de exames de sangue, líquido (líquido cefalorraquidiano – que será extraído através de uma punção lombar) e ressonância magnética do cérebro (sem uso de contrastes). Esse tipo de estudo é importante para que se possa melhorar o diagnóstico precoce dessas doenças e, no futuro, tornar o tratamento mais efetivo. Sabe-se que a doença de Alzheimer está relacionada a alterações em algumas proteínas que se depositam no cérebro, como por exemplo, proteínas chamadas tau e beta-amiloide. Nesse projeto de pesquisa pretendemos fazer a dosagem dessas proteínas e relacioná-las com os sintomas de memória, entre outros, assim como com imagens do cérebro (por meio de exame de ressonância magnética) e a genética do paciente (presença ou não de genes que podem aumentar o risco de desenvolvimento da doença de Alzheimer). Esses genes, entretanto, não dão certeza se a pessoa virá a ter essa doença, apenas mostra se ela/ele tem chance maior de vir a desenvolvê-la. Os exames das pessoas normais são fundamentais para entendermos melhor as causas da doença. Eles serão comparados com os exames de voluntários não-diagnosticados com Doença de Alzheimer, visando melhorar o diagnóstico precoce da mesma.

Procedimentos:

Os voluntários passarão por etapas durante a participação na pesquisa.

Rubrica do pesquisador: _____

Rubrica do participante: _____

1ª Etapa: Os voluntários farão testes neuropsicológicos (similares a testes psicotécnicos) e ressonância magnética cerebral. Estes exames não são invasivos e não causam danos ao paciente.

2ª Etapa: O paciente durante procedimento diagnóstico no ambulatório de neurologia da UNICAMP / HC será perguntado da autorização para coleta de 10ml do líquido (obtida pela punção lombar) e 10ml do sangue para os estudos. No dia da coleta é necessário estar em jejum e não precisa interromper medicações utilizadas.

Após um período de 6 meses à 1 ano, os voluntários serão novamente chamados para refazermos essas etapas, não necessariamente precisará coletar líquido de novo, afim de compararmos os resultados preliminares e acompanharmos caso haja uma possível evolução para CCL e/ou DA.

Desconfortos e riscos:

Você **não** deve participar deste estudo se teve outra doença neurológica ou psiquiátrica; histórico de traumatismo crânio-encefálico com perda de consciência por mais de 30 minutos; histórico de exposição crônica a substâncias neurotóxicas ou alcoolismo e uso de drogas sedativas/hipnóticas 24 horas antes dos testes neuropsicológicos.

Em relação aos exames biológicos: A coleta de sangue é feita como nos exames de rotina, através de punção venosa. A coleta do líquido será realizada nas costas (região lombar). A dor que acompanha a punção lombar varia entre pacientes. A punção será realizada com anestesia local e por profissional treinado, devidamente habilitado para a realização desse tipo de exame. Após submeter-se a punção lombar, o paciente deverá permanecer em repouso em casa, se possível mais deitado, por 24 horas, e aumentar a ingestão de líquidos. Este repouso é importante para evitar dor de cabeça após a punção. Este tipo de dor de cabeça não traz qualquer prejuízo ao paciente, mas necessita de repouso para desaparecer. Se a dor persistir o paciente deverá permanecer por mais alguns dias sem atividades que exigem esforço físico e ingerir a medicação prescrita pelo seu médico. Para ambas as coletas o material é descartável e as agulhas atuais (modelo 22G x 3.5 = 70x7) são as mais finas e de excelente qualidade.

Em relação ao exame de ressonância magnética: O exame não traz nenhum risco para o indivíduo, porém só não podem realizar esse exame apenas aqueles que possuem metal no corpo (como próteses, fios, secundários a cirurgias anteriores) ou têm medo ou pânico de locais fechados. O procedimento é semelhante a uma tomografia. Um alto falante dentro do campo magnético possibilita a constante comunicação com as pessoas responsáveis pelo exame. Durante todo o tempo o pessoal médico e paramédico pode ver e ouvir a pessoa, que pode ser removida se for preciso. O procedimento pode durar entre 30 a 45 minutos. O único desconforto relacionado a este exame é o ruído intermitente durante os primeiros 15 minutos, depois disso o ruído será menor. O pessoal técnico providenciará tapa-ouvidos para que o exame seja mais confortável.

Benefícios

Para o voluntário não existe um benefício imediato, mas sua participação nos da a oportunidade de estudar mais a fundo sobre a doença de Alzheimer, para que futuramente novos métodos diagnósticos e terapêuticos sejam desenvolvidos.

Acompanhamento e assistência:

Caso ocorra qualquer desconforto intermitente após os procedimentos, o paciente deverá entrar em contato com a equipe de pronto atendimento do Hospital de Clínicas da UNICAMP e com a equipe de pesquisa, que orientarão as medidas a serem tomadas para aliviar os sintomas, sem nenhum custo. Durante o decorrer do estudo informaremos ao paciente o andamento da pesquisa, podendo este deixar de participar da pesquisa a qualquer

Rubrica do pesquisador: _____

Rubrica do participante: _____

momento, sem prejuízo no atendimento que recebe ou receberá pelo HC – UNICAMP, caso decida não colaborar com a equipe, pois a participação do paciente é voluntária.

Sigilo e privacidade:

Você tem a garantia de que sua identidade será mantida em sigilo e nenhuma informação será dada a outras pessoas que não façam parte da equipe de pesquisadores. Na divulgação dos resultados desse estudo, seu nome não será citado. Os resultados dos líquidos biológicos e de ressonância magnética do estudo poderão fazer parte do prontuário médico.

Ressarcimento e indenização:

O ressarcimento será feito em casos de necessidade da parte do paciente, pois as etapas da pesquisa serão feitas em rotina do participante e do Hospital das Clínicas. Os participantes têm direito a laudo do exame de ressonância magnética e aos resultados dos exames biológicos. Você terá a garantia ao direito a indenização diante de eventuais danos decorrentes da pesquisa.

Aconselhamento genético:

Neste estudo, pretendemos avaliar a presença de genes que, de acordo com pesquisas em populações de outros países, podem ser um dos fatores de risco para o desenvolvimento da doença de Alzheimer. Se houver necessidade, os indivíduos poderão ser orientados no ambulatório de Neurogenética do Hospital de Clínicas da Unicamp, sob supervisão da Profa. Dra. Íscia Lopes-Cendes. O sr(a). tem o direito de ser informado sobre o resultado de seu exame:

- desejo ser informado dos resultados do exame genético;
 não desejo ser informado dos resultados do exame genético.

Armazenamento de MATERIAL BIOLÓGICO:

Após o estudo realizado, geralmente sobra um pouco dos líquidos biológicos coletados, que podem ainda ser utilizados em pesquisas futuras, sem a necessidade de realizar novamente procedimentos de punção, com todos os seus riscos e desconfortos. Toda nova pesquisa a ser realizada com o material armazenado será submetida para aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Unicamp e, quando for o caso, da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP). Eu:

- concordo em participar do presente estudo, porém NÃO AUTORIZO o armazenamento do meu material biológico, devendo o mesmo ser descartado ao final desta pesquisa.
 concordo em participar do presente estudo e AUTORIZO o armazenamento do meu material biológico, sendo necessário meu consentimento a cada nova pesquisa, que deverá ser aprovada pelo CEP institucional e, se for o caso, pela CONEP.

Você, ou seu representante legal, a qualquer tempo e sem quaisquer ônus ou prejuízos, pode retirar o consentimento da guarda e utilização do seu material biológico armazenado.

Em caso de falecimento ou condição incapacitante, os direitos sobre o material armazenado deverão ser dados a: _____
 Telefone: _____ E-mail _____.

Contato:

Em caso de dúvidas sobre a pesquisa, você poderá entrar em contato com os pesquisadores Thamires N. C. Magalhães nos telefones (19) 3521-7754 / 3521-9217 ou

Rubrica do pesquisador: _____

Rubrica do participante: _____

(19) 99433-3257, ou através do e-mail thamiresncm@hotmail.com e o Prof. Dr. Marcio Luiz Figueredo Balthazar nos telefones (19) 3521-7754 / 3521-9217.

Em caso de denúncias ou reclamações sobre sua participação e sobre questões éticas do estudo, você poderá entrar em contato com a secretaria do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da UNICAMP das 08:30hs às 11:30hs e das 13:00hs as 17:00hs na Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126; CEP 13083-887 Campinas – SP; telefone (19) 3521-8936 ou (19) 3521-7187; e-mail: cep@fcm.unicamp.br.

O Comitê de Ética em Pesquisa (CEP).

O papel do CEP é avaliar e acompanhar os aspectos éticos de todas as pesquisas envolvendo seres humanos. A Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP), tem por objetivo desenvolver a regulamentação sobre proteção dos seres humanos envolvidos nas pesquisas. Desempenha um papel coordenador da rede de Comitês de Ética em Pesquisa (CEPs) das instituições, além de assumir a função de órgão consultor na área de ética em pesquisas

Consentimento livre e esclarecido:

Após ter recebido esclarecimentos sobre a natureza da pesquisa, seus objetivos, métodos, benefícios previstos, potenciais riscos e o incômodo que esta possa acarretar, aceito participar e declaro estar recebendo uma via original deste documento assinada pelo pesquisador e por mim, tendo todas as folhas por nós rubricadas:

Nome do (a) participante _____

Contato telefônico: _____

E-mail (opcional): _____

_____ Data: ____/____/____.
(Assinatura do participante ou nome e assinatura do seu RESPONSÁVEL LEGAL)

Responsabilidade do Pesquisador:

Asseguro ter cumprido as exigências da resolução 466/2012 CNS/MS e complementares na elaboração do protocolo e na obtenção deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Asseguro, também, ter explicado e fornecido uma via deste documento ao participante. Informo que o estudo foi aprovado pelo CEP perante o qual o projeto foi apresentado. Comprometo-me a utilizar o material e os dados obtidos nesta pesquisa exclusivamente para as finalidades previstas neste documento ou conforme o consentimento dado pelo participante.

_____ Data: ____/____/____.
(Assinatura do pesquisador)

Rubrica do pesquisador: _____

Rubrica do participante: _____