



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

Thamires Naela Cardoso Magalhães

**Inflamação sistêmica e os principais biomarcadores da
Doença de Alzheimer**

Systemic inflammation and Alzheimer's disease biomarkers

CAMPINAS

2017

Thamires Naela Cardoso Magalhães

Inflamação sistêmica e os principais biomarcadores da Doença de Alzheimer

Systemic inflammation and Alzheimer's disease biomarkers

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Mestre em Ciências, Área de Concentração em Neurologia.

Dissertation presented to School of Medical Sciences of the University of Campinas, as part of the demanded requirements required to obtain the title of Master of Science, Area of Concentration in Neurology.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Marcio Luiz Figueredo Balthazar

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

CAMPINAS

2017

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): CNPq, 133343/2015-4; FAPESP, 2011/17092-0

ORCID: <http://orcid.org/http://orcid.org/> 0

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

Magalhães, Thamires Naela Cardoso, 1991-
M27i Inflamação sistêmica e os principais biomarcadores da Doença de
Alzheimer / Thamires Naela Cardoso Magalhães. – Campinas, SP : [s.n.],
2017.

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

1. Doença de Alzheimer. 2. Citocinas. I. Balthazar, Marcio Luiz Figueredo.
II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Systemic inflammation and Alzheimer's disease biomarkers

Palavras-chave em inglês:

Alzheimer's disease

Cytokines

Área de concentração: Neurologia

Titulação: Mestra em Ciências

Banca examinadora:

Marcio Luiz Figueredo Balthazar [Orientador]

Márcia Regina Cominetti

André Schwambach Vieira

Data de defesa: 17-02-2017

Programa de Pós-Graduação: Ciências Médicas

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE MESTRADO
THAMIRES NAELA CARDOSO MAGALHÃES

ORIENTADOR (a): Prof(a). Dr(a). Marcio Luiz Figueredo Balthazar

MEMBROS:

1. Prof(a). Dr(a). Marcio Luiz Figueredo Balthazar – Unidade/Instituição: FCM- UNICAMP
2. Prof(a). Dr(a). André Schwambach Vieira – Unidade/Instituição: IB-UNICAMP
3. Prof(a). Dr(a). Márcia Regina Cominetti – Unidade/Instituição: CCBS-UFSCAR

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 da banca examinadora encontra-se no processo de vida acadêmica do aluno.

Data: 17/02/2017

Dedico este trabalho primeiramente a Deus. Dedico a toda minha família, ao meu falecido tio José Carlos Lana, minha vó Zaira, minha tia Tarcila e minha mãe, exemplos de vida, que sempre estiveram ao meu lado e foram responsáveis por tornar meus sonhos uma realidade, aos meus amigos, meu noivo e professores que fizeram e fazem parte da minha vida e sabem o quanto batalhei para chegar até esse momento. Esses dois anos passaram-se rápido, mas a jornada foi longa, cheia de lutas e conquistas, mas principalmente de crescimento.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus por sempre me iluminar e cuidar de mim em todos os momentos.

A minha família por estarem ao meu lado em todos os momentos, me aconselhando e apoiando. Tudo que sou hoje é graças a vocês.

Ao meu noivo, Angelo, pela paciência, apoio, carinho e incentivo.

Ao meu orientador Prof. Dr. Marcio Luiz Figueredo Balthazar, pela oportunidade de fazer o Mestrado sob sua orientação, pela sua supervisão, paciência, compreensão e valiosas ajudas.

A todo o grupo da pesquisa de Alzheimer da Universidade Estadual de Campinas, principalmente a Camila Vieira Ligo Teixeira e Marina Weiler que me incentivaram e ajudaram a concretizar este trabalho.

Aos amigos do laboratório de Neuroimagem e Física Médica da Universidade Estadual de Campinas pelo apoio e amizade.

Aos amigos Brunno M. Campos e Thiago Junqueira pela paciência e valiosas ajudas com o trabalho das imagens.

Ao grupo de coleta do Hospital de Clínicas da Universidade Estadual de Campinas, pelo carinho e cuidado com os pacientes.

Aos colegas do Instituto Biológico da Universidade Estadual de Campinas, pelo apoio na realização dos experimentos, pela ajuda e atenção.

Aos colegas do LIM-27 da Universidade Estadual de São Paulo, também pelo apoio com os experimentos, pela ajuda e atenção.

Aos pacientes e seus familiares.

*“Há duas formas para viver a sua vida:
Uma é acreditar que não existe milagre.
A outra é acreditar que todas as coisas são um milagre.”*

Fernando Pessoa (1888-1935)

RESUMO

A demência na doença de Alzheimer (DA) é um grave problema de saúde pública que tende a se intensificar devido, sobretudo, ao envelhecimento da população. Quanto aos aspectos clínicos da doença, o primeiro sintoma geralmente observado é a dificuldade em armazenar informações novas, afetando principalmente a memória episódica, à medida que a doença progride, outras funções cognitivas também são afetadas. A fisiopatologia da DA é caracterizada por uma série de alterações neuropatológicas que incluem: placas senis que contêm em excesso depósitos extracelulares de peptídeo β -amiloide (β A) e emaranhados neurofibrilares intracelulares que contêm proteína Tau hiperfosforilada (p-Tau), levando a uma maciça perda sináptica, morte neuronal e alterações funcionais em redes neurais, como na *Default Mode Network* (DMN). A conectividade funcional (CF) da DMN é alterada na DA devido ao acúmulo de β A em suas regiões, contribuindo para severidade dos sintomas cognitivos e clínicos. Alterações estruturais como atrofia cerebral, principalmente atrofia do hipocampo, também são observadas na doença. Há crescente evidência de que a inflamação sistêmica, através de mediadores inflamatórios, como por exemplo, as citocinas, desempenha um papel importante na produção e regulação dessas proteínas (β A e Tau) presentes no líquido cefalorraquidiano (LCR). Existem vias de comunicação entre o cérebro e o sistema imune periférico que podem estar alteradas desde da fase pré-demencial, favorecendo ou não a progressão da doença, decorrente disso a inflamação sistêmica também tem sido associada com a cognição e morfologia cerebral. Nosso objetivo principal foi verificar a hipótese se a inflamação sistêmica pode ser associada com os principais biomarcadores da DA (proteínas do LCR e neuroimagem). Para isso, adquirimos imagens de ressonância magnética em 3T de 25 controles saudáveis, 45 pacientes com Comprometimento Cognitivo Leve amnésico (CCLa) e 28 pacientes com DA leve. Observamos que os pacientes com CCLa nos quais detectamos IL-12, TNF- α e IL-6 apresentaram aumento da CF das regiões da DMN; os pacientes do grupo DA nos quais detectamos IL-12, IL-6, IL-10 e TNF- α apresentaram maior volume do hipocampo, menos β A₁₋₄₂ e diminuição na CF da DMN. Nossos resultados podem indicar uma possível relação entre o perfil de inflamação sistêmica e os biomarcadores da DA.

Palavras-chave: Doença de Alzheimer; proteína β A; citocinas; inflamação sistêmica; biomarcadores

ABSTRACT

Dementia in Alzheimer's disease (AD) is a serious public health problem that tends to intensify, mainly due to the aging of the population. Regarding the clinical aspects of the disease, the first symptom usually observed is the difficulty in storing new information, affecting episodic memory, as the disease progresses, other cognitive functions are affected. The pathophysiology of AD is characterized by a series of neuropathological changes that include: senile plaques that contain excess extracellular deposits β -amyloid peptide ($A\beta$) and intracellular neurofibrillary tangles that contain hyperphosphorylated Tau protein (p-Tau), leading to a massive neuronal death, and functional abnormalities in neural network, such as in the Default Mode Network (DMN). The functional connectivity (FC) of DMN is altered in AD due to the accumulation of $A\beta$ in its regions, contributing to the severity of cognitive and clinical symptoms. Structural changes such as brain atrophy, especially hippocampal atrophy, are also seen in the disease. There is increasing evidence that systemic inflammation, through inflammatory mediators, such as cytokines, plays an important role in the production and regulation of these proteins (βA and Tau) present in cerebrospinal fluid (CSF). There are pathways of communication between the brain and the peripheral immune system that may be altered from the pre-dementia phase, favoring or not the progression of the disease, as a result of which systemic inflammation has also been associated with cerebral cognition and morphology. Our main objective was to verify the hypothesis that systemic inflammation may be associated with the main biomarkers of AD (CSF proteins and neuroimaging). For this, we acquired magnetic resonance imaging in 3T of 25 healthy controls, 45 amnesic Mild Cognitive Impairment (aMCI) and 28 patients with mild AD. We observed that patients with aMCI in whom we detected IL-12, TNF- α and IL-6 showed increased FC of the regions of the DMN; the patients in the mild AD group in which we detected IL-12, IL-6, IL-10 and TNF- α had higher hippocampal volume, less $A\beta_{1-42}$, and decreased FC in DMN. Our results may indicate a possible relationship between the systemic inflammation profile and the biomarkers of AD.

Key words: Alzheimer's disease; $A\beta$ protein; Cytokines; Systemic inflammation; Biomarkers

LISTA DE ABREVIACÕES

BHE – Barreira Hematoencefálica

BOLD – *blood oxygenation level dependent*, dependente do nível de oxigenação do sangue

CCLa – Comprometimento Cognitivo Leve amnésico

CF – Conectividade Funcional

DA – Doença de Alzheimer

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

FDG – Fluorine-18 fluorodeoxyglucose

FRONT – *prefrontal cortex*

IL-10 – interleucina 10

IL-12 – interleucina 12

IL-1 β – interleucina 1 β

IL-6 – interleucina 6

LCR – Líquido Cefalorraquidiano

LHIPPO – *left hippocampus*, hipocampo esquerdo

LPARIETO – *left parietal lobe*, lobo parietal esquerdo

LTEMP – *left temporal lobe*, lobo temporal esquerdo

PCC – *posterior cingulate cortex*, cortex do cíngulo posterior

PET – Tomografia por Emissão de Pósitron

PPA – Proteína Precursora de Amiloide

p-Tau – Tau-fosforilada

RHIPPO – *right hippocampus*, hipocampo direito

RM – Ressonância Magnética

RPARIETO – *right parietal lobe*, lobo parietal direito

rsfMRI – Ressonância Magnética funcional em repouso

RTEMP – *right temporal lobe*, lobo temporal direito

SPECT – Tomografia por Emissão de Fóton Único

TNF- α – fator de necrose tumoral alpha

t-Tau – Tau-total

βA – beta amiloide

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ilustração comparativa do cérebro de um indivíduo saudável e outro com Doença de Alzheimer, evidenciando as principais características morfológicas macroscópicas da doença. Fonte: <i>National Institute of Aging-</i> www.nia.nih.gov/alzheimers/scientific-images	17
Figura 2. Ilustração representando a via não-amiloidogênica, a protease conhecida como α -secretase, que cliva o APP de modo a liberar um fragmento extracelular. A parte que permanece integrada à membrana é processada posteriormente pela ação de uma segunda enzima, a γ -secretase, prevenindo a formação do peptídeo β A. Fonte: <i>National Institute of Aging-</i> www.nia.nih.gov/alzheimers/scientific-images	19
Figura 3. Ilustração representando a via amiloidogênica, onde APP é processado de maneira diferente; a β -secretase cliva o APP liberando um fragmento terminal mais extenso que, ao ser processado pela γ -secretase, forma o peptídeo β A. Fonte: <i>National Institute of Aging-</i> www.nia.nih.gov/alzheimers/scientificimages	19
Figura 4. Ilustração comparando um neurônio saudável com um neurônio desestabilizado devido à fosforilação anormal da proteína Tau, resultando em prejuízos estruturais, favorecendo a morte celular devido à formação de lesões intraneuronais. Fonte: <i>National Institute of Aging-</i> www.nia.nih.gov/alzheimers/scientificimages	20
Figura 5. Máscara das subregiões da DMN usada para sobrepor cada mapa estatístico e para calcular as medidas de conectividade funcional de cada indivíduo (Fig.1 – paper).....	31

LISTA DE TABELAS

Tabela I. Representação das principais funções de cada citocina abordada no trabalho. Representada em azul temos a IL-10, uma citocina anti-inflamatória e as outras em vermelho são citocinas pró-inflamatórias.....25

Tabela II. Representação do limite de detecção para cada citocina abordada no estudo, de acordo com o kit BD Cytometric Bead Array (CBA) Human Inflammatory Cytokines Kit.....29

Tabelas artigo:

Tabela 1: Dados demográficos, neuropsicológicos e biomarcadores líquidos de comparação entre os grupos47

Tabela 2: Dados significativos considerando as variáveis de neuroimagem entre os grupos controles, CCLa e DA leve48

Tabela 3: Comparações entre os grupos (DA leve, CCLa e Controles) em relação as citocinas48

Tabela 4: Diferenças significativas entre os sub-grupos detectado vs não-detectado do grupo CCLa49

Tabela 5: Diferenças significativas entre os sub-grupos detectado vs não-detectado do grupo DA leve50

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	15
1.1. A doença de Alzheimer.....	15
1.2. Fisiopatologia da DA.....	16
1.3. Biomarcadores.....	20
1.3.1. Marcadores de neuroimagem estrutural e funcional.....	21
1.3.2. Marcadores líquidos e prospecção de biomarcadores na DA.....	22
2. OBJETIVOS.....	26
2.1. Geral.....	26
2.2. Específicos.....	26
3. MÉTODOS.....	27
3.1. Sujeitos e Casuística.....	27
3.1.1. Critérios de Inclusão.....	27
3.1.2. Critérios de exclusão:.....	27
3.2. Avaliação clínica e neuropsicológica.....	28
3.3. Exames de LCR e sangue.....	28
3.3.1. Quantificação dos biomarcadores líquidos.....	28
3.3.2. Quantificação das citocinas séricas.....	29
3.4. Aquisição de imagens por Ressonância Magnética.....	29
3.5. Volume hipocampal.....	30
3.6. Análise Imagem Funcional.....	30
3.7. Análise Estatística.....	31
4. RESULTADOS.....	33
5. DISCUSSÃO GERAL.....	62
6. CONCLUSÃO.....	66
7. REFERÊNCIAS.....	67
8. ANEXO.....	74

1. INTRODUÇÃO

1.1. A doença de Alzheimer

A demência da doença de Alzheimer (DA) é um grave problema de saúde pública que tende a se intensificar devido, sobretudo, ao envelhecimento da população. Estima-se que, em todo o mundo, mais de 36 milhões de pessoas sofram desse tipo mais comum de demência. Essa prevalência dobra, em média, a cada cinco anos, passando de 1% aos 60 anos e chegando a mais de 40% da população com mais de 85 anos de idade (1). No Brasil, a doença alcança uma prevalência de 7,1% na população acima de 65 anos, dos quais 55,1% receberam diagnóstico clínico de demência na doença de Alzheimer (2). Outros estudos brasileiros (3-5) também mostram um aumento da incidência da demência na DA e de outras doenças típicas da terceira idade, ressaltando a importância de se estudar e buscar novas políticas de saúde pública, visando priorizar esta parcela da população brasileira para prevenir essas doenças neurológicas degenerativas e melhorar a qualidade de vida dessa população.

Nos EUA, a demência da DA representa a sexta causa de morte em indivíduos com 65 anos ou mais velhos. É a única doença entre as dez causas mais comuns de mortes que não podem ser prevenidas ou curadas. Ainda, considerando-se a última década, é a única dentre as dez que teve um aumento importante em sua taxa de mortalidade (6). Estima-se que 5,2 milhões de americanos idosos têm demência da DA, o que inclui 5 milhões de pessoas com 65 anos ou mais e cerca de 200.000 indivíduos com menos de 65 anos (7). Do ponto de vista econômico, uma intervenção que possa retardar o início dos sintomas da demência da DA em cinco anos, por exemplo, resultaria em uma diminuição de 57% no número de pacientes com demência da DA e diminuição da projeção de custos de cerca de 45% (8).

Quanto aos aspectos clínicos, o primeiro sintoma geralmente observado é a dificuldade em armazenar informações novas, afetando a memória episódica e, à medida que a doença progride, outras funções cognitivas são afetadas (como habilidades visuoespaciais, linguagem e funções executivas). Em muitos casos, os pacientes apresentam também sintomas neuropsiquiátricos como psicose, irritabilidade, apatia e depressão (1). Sob esse contexto, usa-se na perspectiva clínica e na pesquisa o conceito de Comprometimento Cognitivo Leve (CCL) em pacientes com uma ou mais alterações cognitivas objetivas, sem haver o comprometimento da independência nas atividades do cotidiano. 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, ambos podendo se subdividir em domínio único ou múltiplos domínios. O subtipo amnésico é o mais prevalente e faz referência aos indivíduos com comprometimento da memória episódica. O diagnóstico de CCL inclui: uma queixa cognitiva (mais comumente memória episódica), de preferência confirmada por uma pessoa que conviva com o paciente; um comprometimento cognitivo objetivo no qual o desempenho esteja abaixo do de outras pessoas da mesma idade e nível escolar; além de, como previamente dito, a preservação da capacidade de realizar atividades sócio funcionais diárias (9).

1.2. Fisiopatologia da DA

A fisiopatologia da DA é caracterizada por uma série de alterações neuropatológicas que incluem: atrofia cerebral, placas senis extracelulares que contêm depósitos de peptídeo β -amiloide (β A), emaranhados neurofibrilares intracelulares que contêm proteína Tau hiperfosforilada (p-Tau), maciça perda sináptica e morte neuronal observada nas regiões cerebrais responsáveis pelas funções cognitivas, como lobo frontal e lobos temporais, por exemplo. Há também depósitos de β A localizados nas paredes dos vasos sanguíneos, associados a uma variedade de diferentes tipos de placas senis, ativação de células da glia e inflamação (10). É reconhecido que a presença de depósitos de β A precede em anos ou mesmo décadas o surgimento da demência da DA (11). Mesmo na fase pré-clínica, já pode ser observada uma diminuição da concentração desse peptídeo no líquido cefalorraquidiano (LCR) dos pacientes (12). Em uma fase posterior, os marcadores de degeneração neuronal como aumento da proteína tau-total (t-Tau) e p-Tau também já podem ser demonstrados (13).

Em exames *post-mortem* de indivíduos com DA, seu cérebro apresenta algumas alterações morfológicas representadas pela **Figura 1**. Observa-se modesta atrofia do córtex frontotemporal associativo, alargamento simétrico dos ventrículos laterais e atrofia de hipocampo, considerado mais importante na diferenciação da DA de outras demências (14).

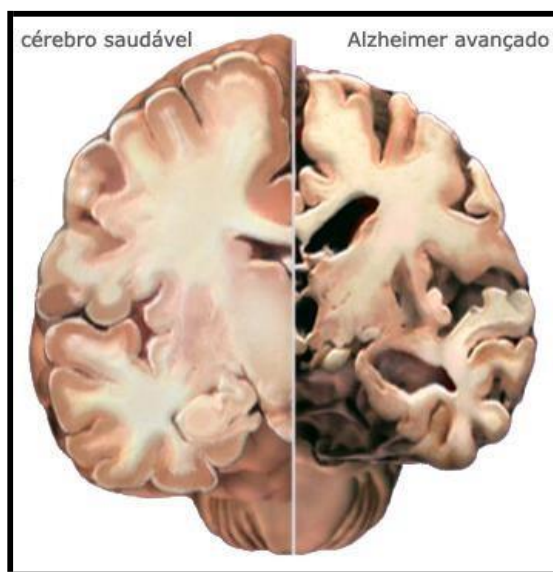


Figura 1. Ilustração comparativa do cérebro de um indivíduo saudável e outro com Doença de Alzheimer, evidenciando as principais características morfológicas macroscópicas da doença. Fonte: *National Institute of Aging*- www.nia.nih.gov/alzheimers/scientific-images

Diversas hipóteses foram formuladas para tentar explicar a origem da doença, dentre as quais a cascata amiloide e a hiperfosforilação da proteína Tau são as mais aceitas no meio científico. De acordo com a hipótese da cascata amiloide, o gene codificador da Proteína Precursora de Amiloide (PPA), localizado no braço longo do cromossomo 21, expressa uma das glicoproteínas mais abundantes do sistema nervoso central, pertencente à família de proteínas de membrana tipo I, sua fisiologia ainda não completamente compreendida, pode através da ação de enzimas proteolíticas levar a liberação do peptídeo β A (15). Na via mais comum, uma protease conhecida como α -secretase cliva a PPA de modo a liberar um fragmento extracelular. A parte que permanece integrada à membrana é processada posteriormente pela ação de uma segunda enzima, a γ -secretase, que libera a parte carboxil terminal da proteína para sua posterior degradação. Essa via é conhecida como via não-amiloidogênica, pois a ação da α -secretase previne a formação do peptídeo β A, e com isso impede formação de depósitos desse peptídeo. O subproduto formado dessa via é liberado para o meio extracelular e infere-se que tenha papel na neuroproteção e papel neurotrófico na formação de sinapses, esquema representado pela **Figura 2** (16). Em uma outra via, a via amiloidogênica, uma parte da PPA é processada de maneira diferente. Outra secretase, chamada β -secretase, cliva o PPA liberando um fragmento terminal mais extenso que, ao ser processado pela γ -secretase, libera o peptídeo β A (esquema representado pela **Figura 3**). Esse peptídeo tem solubilidade limitada e pode apresentar tamanhos variados e entre os mais abundantes no cérebro estão β A40 e β A42 (16, 17). Sob condições normais, 90% do peptídeo β A secretado é a isoforma β A40, sendo esta mais

solúvel. Em contraste, a β A42, que representa menos de 10% das isoformas secretadas, é altamente insolúvel e propensa à agregação (18, 19), podendo ser encontrada em estágios precoces da doença em cérebro de indivíduos com DA e Síndrome de Down (19).

Tanto na formação excessiva de placas neuríticas extracelulares como na formação de oligômeros solúveis, a proteína β A pode ser o principal desencadeador dos processos patológicos que levariam à disfunção sináptica e morte neuronal (19, 20). Acredita-se que tais oligômeros, ainda intracelulares, sejam capazes de estimular a clivagem de PPA pela via amiloidogênica e, quando liberados da célula, estimulem as células vizinhas a fazer o mesmo, aumentando o nível de β A. Os oligômeros solúveis de β A parecem estar diretamente envolvidos com a inibição da potencialização de longo prazo do hipocampo pela interação com receptores de membrana de neurônios, podendo corromper a plasticidade sináptica (21). Entretanto, muitos pesquisadores tentam falsear esta hipótese, já que a deposição de placas não prediz a severidade da doença (22, 23).

Os mecanismos responsáveis pela neurotoxicidade do β A são complexos, mas existem evidências de que o aumento da atividade neuronal eleve a secreção de β A contido nas células. Fisiologicamente, imagina-se que a secreção de β A sirva como um sistema tamponante, evitando hiperexcitabilidade neuronal. Na doença, no entanto, o excesso desse peptídeo pode prejudicar a excitabilidade celular e comunicação na região de sinapses (24). Além disso, as placas de β A também parecem se envolver na quebra da homeostase intracelular do cálcio, potássio, indução de estresse oxidativo, bem como o favorecimento de vias apoptóticas (25). Embora o acúmulo excessivo dessas placas seja um dos principais marcadores anatomopatológicos da DA, não se sabe ao certo o que leva à alteração do metabolismo dessa proteína em pacientes com Alzheimer.

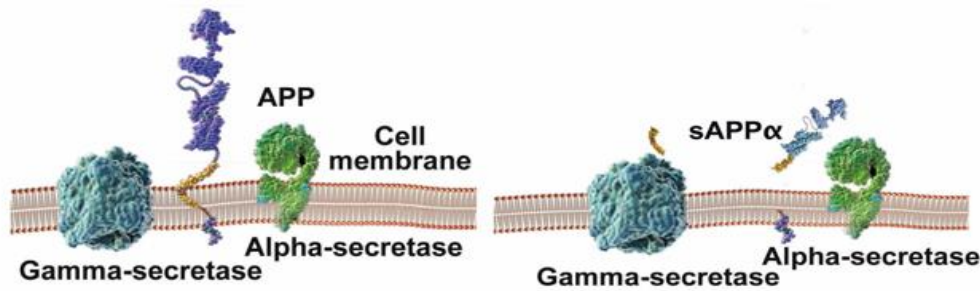


Figura 2. Ilustração representando a via não-amiloidogênica, a protease conhecida como α -secretase, cliva o PPA de modo a liberar um fragmento extracelular. A parte que permanece integrada à membrana é processada posteriormente pela ação de uma segunda enzima, a γ -secretase, prevenindo a formação do peptídeo β A. Fonte: *National Institute of Aging*- www.nia.nih.gov/alzheimers/scientific-images

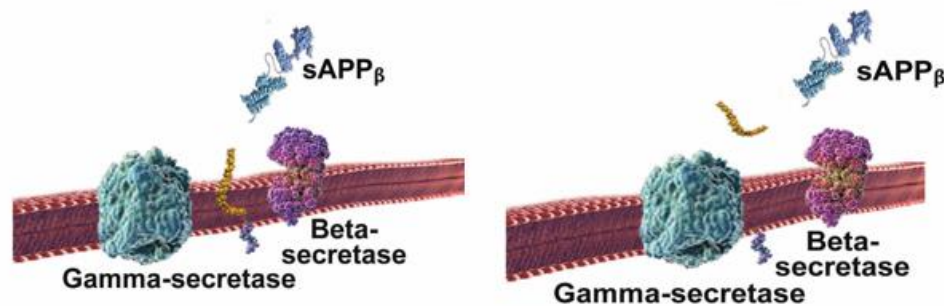


Figura 3. Ilustração representando a via amiloidogênica, o PPA é processado de maneira diferente, a β -secretase cliva o PPA liberando um fragmento terminal mais extenso, que ao ser processado pela γ -secretase, forma o peptídeo β A. Fonte: *National Institute of Aging*- www.nia.nih.gov/alzheimers/scientific-images

De acordo com a hipótese da hiperfosforilação da Tau, acredita-se que o primeiro evento da doença seja o aumento da atividade de suas proteínas quinases, enzimas que catalisam a fosforilação de outras proteínas, no caso a proteína Tau, levando assim ao aumento de sua fosforilação (26). A proteína Tau é componente essencial dos microtúbulos em estado polimerizado. A estabilidade do polímero depende da fosforilação, tornando-se mais instável quando mais fosforilada. Sendo assim, a hiperfosforilação da Tau relaciona-se com a diminuição da estabilidade do citoesqueleto, resultando em prejuízos estruturais e funcionais, favorecendo a morte celular devido à formação de lesões intraneuronais e na formação dos emaranhados neurofibrilares, processo representado pela **Figura 4** (26-28). A hipótese da

hiperfosforilação da Tau como evento primordial desencadeador da DA é corroborada pelos achados de Braak & Braak, 1999, nos quais a extensão das deposições de emaranhados neurofibrilares no tecido cerebral condiz com a progressão da severidade da doença (29). Entretanto, essa teoria também sofre críticas já que este tipo de inclusão está presente em outras patologias, comumente chamadas de tauopatias. Isso nos leva a crer que essas deposições de emaranhados neurofibrilares no tecido cerebral parecem mais consequência de outras alterações prévias do que a origem do problema. Atualmente, acredita-se que os dois processos fisiopatológicos acima estejam relacionados: oligômeros de β A podem induzir a hiperfosforilação de proteína tau, aumentando a presença de emaranhados neurofibrilares (16).

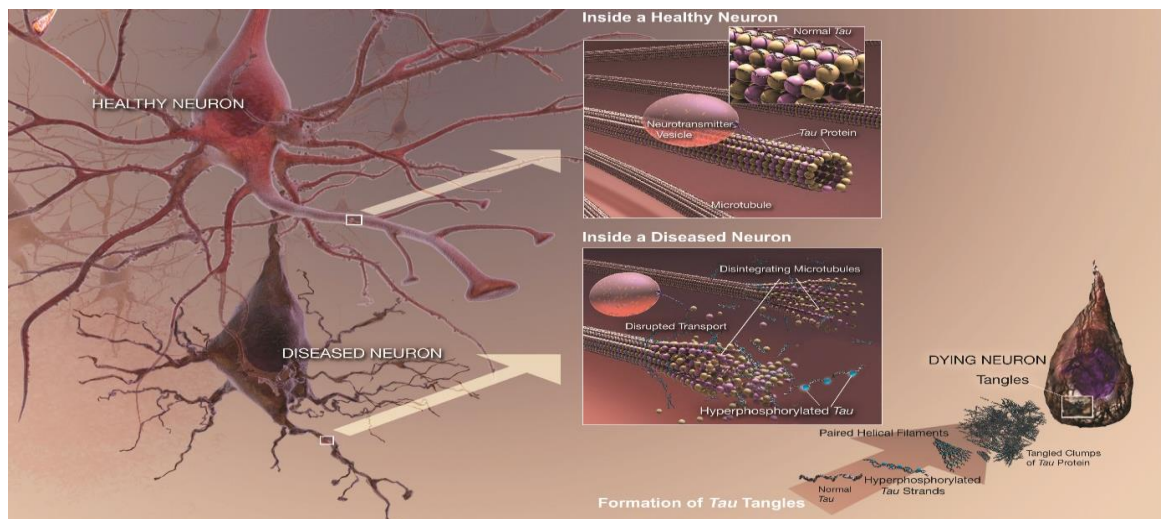


Figura 4. Ilustração comparando um neurônio saudável com um neurônio desestabilizado devido a fosforilação anormal da proteína Tau, resultando em prejuízos estruturais, favorecendo a morte celular devido à formação de lesões intraneuronais. Fonte: *National Institute of Aging*- www.nia.nih.gov/alzheimers/scientific-images

1.3. Biomarcadores

É de extrema importância encontrar marcadores que possam aprimorar o diagnóstico para DA já em fase prodrômica, pré-clínica ou prever a identificação de indivíduos normais com risco de desenvolver demência e até mesmo para a identificação dos CCLs com alto risco de conversão. Além disso, é importante também a prospecção de marcadores indicativos de processos ou progressão patológica, tornando possível até a diferenciação entre os tipos de patologias que afetam os pacientes com demência. São os chamados biomarcadores (30).

1.3.1. Marcadores de neuroimagem estrutural e funcional

Medidas estruturais de Ressonância Magnética (RM) têm demonstrado que perdas regionais de volume cerebral se correlacionam com outros processos patológicos da DA já conhecidos e podem ser usados como marcadores de diagnóstico ou mesmo de conversão para a DA, (31-34). Do ponto de vista macroscópico, a atrofia cerebral e a dilatação ventricular secundária são as maiores alterações observadas na DA (32, 35). O principal marcador radiológico da DA é a atrofia da região temporal medial, especificamente dos volumes do córtex entorrinal e dos hipocampos. As alterações da substância branca são comuns no idoso e podem sugerir comprometimento de pequenos vasos (leucoaraiose periventricular ou microangiopatia obstrutiva) (33).

Um estudo utilizando tomografia por emissão de pósitron (FDG-PET) analisou 22 pacientes com demência, com posterior análise histológica *post-mortem* do cérebro. Os autores mostraram que enquanto o critério clínico de provável DA apresentou uma especificidade de 100%, o mesmo mostrou baixa sensibilidade (63%). Por outro lado, a presença de hipometabolismo na região parieto-temporal bilateral pela PET mostrou sensibilidade de 93%, especificidade de 63% e acurácia de 82% (36). Com a tomografia por emissão de fóton único (SPECT) existem igualmente vários estudos mostrando tal correlação. Read *et al*, 1995, correlacionaram os resultados de SPECT em 27 pacientes portadores de demência com os resultados da autópsia e mostraram sensibilidade de 96%, contra 74% para o exame clínico (37). Contudo, existem estudos mostrando sensibilidades mais baixas do SPECT na detecção de padrões funcionais típicos. Buchpiguel *et al*, 1996, analisando 52 pacientes com diagnóstico de DA e 11 voluntários normais, mostraram sensibilidade de aproximadamente 70% e especificidade de 100% para o exame clínico (38).

Estudos recentes (39-42) têm mostrado que determinadas doenças neurodegenerativas causam danos a redes neuronais específicas, em especial na sua fase leve a moderada, provavelmente contribuindo para os sintomas cognitivos e clínicos (39, 43). As redes neuronais podem ser detectadas, dentre outras técnicas, pela Ressonância Magnética funcional em repouso (rsfMRI), onde detectamos correlações inter-regionais de flutuações do sinal BOLD (*blood oxygenation level dependent*). Essas correlações do sinal BOLD correspondem a um meio indireto de se avaliar a sincronia no funcionamento de diferentes áreas do cérebro. No caso da DA, o depósito de β A se dá predominantemente nas mesmas regiões que compõem a *Default Mode Network* (DMN – Rede de Modo Padrão) (44-48). A DMN é constituída por algumas áreas chaves como giro do cíngulo posterior, precúneo, córtex pré-frontal medial

anterior, formação hipocampal, entre outras. É uma rede que se “desativa” quando indivíduos realizam tarefas cognitivas como testes de atenção ou de memória operacional e se “ativa” quando indivíduos estão engajados em tarefas cognitivas de cunho interno (45).

Existe uma teoria que sugere que possa haver associação entre alterações na DMN e o depósito anômalo de proteína β A. Segundo essa teoria (“hipótese metabólica”) a alteração funcional da DMN precederia e até poderia causar as alterações patológicas típicas da doença. O hipometabolismo de glicose na DA, avaliado por FDG-PET, é outra evidência de alteração funcional da DMN. A conectividade funcional (CF) da DMN pode ser um possível candidato para um biomarcador. Um estudo que avaliou 22 pacientes com DA leve e 26 controles saudáveis, pareados quanto a idade e sexo, e que foram submetidos à rsfMRI para identificar a DMN, encontrou significativa diferença entre os pacientes com DA leve e os controles (49).

1.3.2. Marcadores líquóricos e prospecção de biomarcadores na DA

O entendimento da fisiopatologia da DA aumentou significativamente nos últimos 20 anos, o que exigiu uma revisão em 2011 dos critérios diagnósticos mais utilizados (50). Uma das mudanças mais importantes foi a incorporação de biomarcadores de neuroimagem e LCR (proteínas β A e Tau).

Para fins de pesquisa, o LCR é considerado o fluido ideal na busca de potenciais biomarcadores devido a sua troca direta de moléculas com o tecido cerebral (51). Estudos envolvendo a análise das proteínas β A e Tau no LCR obtiveram um aumento da especificidade e sensibilidade na relação entre pacientes com DA e controles, a maior parte desses estudos observaram uma diminuição da isoforma β A₁₋₄₂, aumento de proteína t-Tau e p-Tau em pacientes com DA (52). Os marcadores líquóricos também foram específicos o suficiente para identificar os pacientes com CCL com maior chance de conversão para DA (53). Porém, a punção lombar é um obstáculo por possuir natureza invasiva e por necessitar de um médico treinado, além dos custos elevados das análises (em muitos locais essa realidade ainda está distante, impossibilitando sua aplicação e incorporação na rotina dos diagnósticos).

Nesse sentido, os biomarcadores sanguíneos são vistos como a melhor e mais realista opção para a prática clínica. A venipuntura é uma técnica de custos baixos, de fácil execução, e permite performances repetidas se necessário. Também traz menos desconforto para o paciente e não necessita de um profissional altamente treinado. Muitos estudos evidenciaram que o sangue é capaz de refletir na periferia alterações cerebrais, apesar de ser uma matriz complexa,

estar em contato com todo o sistema fisiológico e não ter contato direto com o tecido cerebral (54-56). O soro, o plasma, as plaquetas e os leucócitos são as matrizes mais utilizadas no tecido periférico para a busca dos biomarcadores.

Há crescente evidência de que a inflamação sistêmica, através de mediadores inflamatórios, como por exemplo, as citocinas, desempenha um papel importante na produção e regulação dessas proteínas (β A e Tau) presentes no LCR (57). Uma sugestão é que essas proteínas ativem células da glia (microglia e astrócitos) incitando/estimulando resposta inflamatória e consequentemente liberação de neurotoxinas e citocinas, funcionando como um agente pró-inflamatório (58). Não se sabe, porém, se essas proteínas são causa ou efeito da neurodegeneração (57).

As citocinas podem ativar a microglia e astrócitos, que se tornam os principais agentes dos sinais neuroinflamatórios, causando desordens metabólicas neuronais e excitotoxicidade, que contribuem para a disfunção neuronal e deterioração cognitiva (59-61). A ativação dessas células pode ocorrer no início da doença, mesmo antes da deposição de β A (62). Além disso, o risco para a conversão de CCLa para a demência está aumentada em pacientes com elevadas concentrações de citocinas pró-inflamatórias e a diminuição das concentrações de citocinas anti-inflamatórias (63).

Níveis elevados de citocinas têm sido observados em cérebros de ratos transgênicos com DA em torno das placas de β A (64) bem como no LCR e no sangue periférico de pacientes com CCLa e DA (1, 65, 66). Além disso, exames *post mortem* em cérebros de pacientes com DA revelaram presença abundante de mediadores inflamatórios, como citocinas pró-inflamatórias, (IL-1 β , IL-6) e fator de necrose tumoral – alpha (TNF- α) (67), mostrando que os processos inflamatórios têm sido cada vez mais implicados na progressão da fisiopatologia da DA (68).

Na DA, observou-se que tanto as placas quanto os emaranhados são acompanhados de uma proeminente resposta inflamatória local e periférica (69, 70). Existem vias de comunicação entre o cérebro e o sistema imune periférico que podem estar alteradas na fase pré-demencial ou na demência da DA (57, 71). Estima-se, por exemplo, que pelo menos 500 mL de LCR seja absorvido por dia pelo sangue; no caso da DA, especificamente imagina-se que devido às lesões cerebrais características únicas da doença, como as proteínas presentes no LCR, possam passar para o tecido periférico através da barreira hematoencefálica (BHE) (72, 73). A BHE é uma das vias de comunicação entre o cérebro e o sistema imune periférico; em pacientes com DA, pode estar danificada devido ao acúmulo de β A nos vasos sanguíneos cerebrais, causando uma angiopatia amiloide cerebral e inflamação vascular associada,

alterando assim a comunicação entre o cérebro e o sistema imune periférico (71). Prostaglandinas que podem atravessar a BHE também podem alterar essa comunicação (74). As prostaglandinas causam uma maior permeabilidade capilar e também propriedades quimiotáticas, atraindo células como macrófagos especializados na fagocitose (75). Outra via possível é uma rota direta via nervo vago que se liga diretamente com outros órgãos do organismo e pode facilitar a comunicação entre o cérebro e sistema imunológico periférico (71). Estas vias de comunicação sugerem que a patologia pode ser acelerada ou induzida pela inflamação sistêmica (76, 77). Em um estudo mais recente, neurocientistas observaram em modelos animais uma conexão direta entre o cérebro e o sistema imunológico através do sistema linfático (78). Esses resultados sugerem que a hipótese de haver relação entre a inflamação e a progressão da doença, apesar de ser relativamente nova, é bastante consistente.

A inflamação periférica tem sido associada com a cognição e estrutura cerebral no envelhecimento, processo chamado "*inflammaging*" (79-81). Vários estudos observaram que os níveis de citocinas pró-inflamatórias (tanto periféricas quanto líquóricas) como, por exemplo IL-6, TNF- α e proteína C - reativa (PCR), estão associadas ao declínio cognitivo dos pacientes (59, 61). Nesse sentido, a presença de biomarcadores capazes de prever o declínio cognitivo seria de grande valia para o desenvolvimento de terapias preventivas. Pouco se sabe, entretanto, sobre a relação entre a inflamação periférica, estrutura e função do cérebro.

Embora muito se saiba sobre o papel da inflamação na DA, não é claro se a inflamação sistêmica está relacionada com os principais biomarcadores da DA. Assim, nesse trabalho, tivemos como objetivo investigar se a inflamação periférica pode estar associada com os principais biomarcadores da DA (βA_{1-42} , t-Tau, p-Tau, volume hipocampal e conectividade funcionas (CF) das regiões da DMN) em nossos pacientes. Optamos por estudar citocinas cuja relação com a DA já foi bem descritas, como as interleucinas: IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12, e o TNF- α . Conforme a **Tabela 1**, podemos observar a principal função de cada citocina estudada.

Tabela I. Representação das principais funções de cada citocina abordada no trabalho. Representada em azul temos a IL-10, uma citocina anti-inflamatória e as outras em vermelho são citocinas pró-inflamatórias.

CITOCINA	FUNÇÕES
IL-1 β	• estimulação de células CD4+ • proliferação e ativação de linfócitos B, neutrófilos, monócitos/macrófagos • aumenta atividades quimiotáticas e fagocitárias (Dinarello CA, 1999)
IL-6	• maior mediador de fase aguda da inflamação (Heinrich PC, <i>et al.</i>, 1990)
IL-10	• inibe a síntese de outras citocinas (Thompson-Snipes L, <i>et al.</i>, 1991)
IL-12	• estimula células NK • aumenta a síntese de IFN-g em linfócitos periféricos (Chan SH, <i>et al.</i>, 1991)
TNF- α	• inibe e mata células tumorais • estimula a resposta de inflamação e outras citocinas • Ações compartilhadas com a IL-1 (Mackay F, <i>et al.</i>, 1993)

2. OBJETIVOS

2.1. *Geral*

Verificar se a inflamação sistêmica pode estar associada com os principais biomarcadores da DA.

2.2. *Específicos*

- Verificar se há diferença no percentual de detecção de cada citocina sérica (IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12, TNF- α) entre os grupos CCLa, demência da DA leve e Controles.
- Comparar a CF das regiões da DMN entre os três grupos (CCLa, demência da DA leve e Controles).
- Comparar o volume hipocampal entre os três grupos (CCLa, demência da DA leve e Controles).
- Comparamos o nível de β A₁₋₄₂, t-Tau e p-Tau no LCR de pacientes com CCLa e demência da DA leve.
- Verificar se a detecção das citocinas pode estar associada com os principais biomarcadores da DA (volume do hipocampo, conectividade funcional da DMN e biomarcadores no líquido).

3. MÉTODOS

3.1. *Sujeitos e Casuística*

Noventa e oito indivíduos, acompanhados no ambulatório de Neuropsicologia e Demência do Hospital de Clínicas da Unicamp, com mais de 60 anos de idade, foram incluídos no estudo. 28 foram diagnosticados com demência da DA leve (18 mulheres/10 homens), 45 com CCLa (32 mulheres/13 homens) e 25 controles saudáveis (16 mulheres/9 homens).

3.1.1. *Critérios de Inclusão*

Pacientes com DA:

- Critérios do NIA e *Alzheimer's Association* para DA (82);
- Possuir escore de 0,5 ou 1 na Escala Clínica de Demência (*Clinical Dementia Rating* - CDR) (83).

Pacientes com CCLa:

- Critérios do NIA e *Alzheimer's Association* para CCL (9);
- Possuir escore de 0,5 na CDR (com o escore de memória obrigatoriamente 0,5).

Apresentar evidência de fisiopatologia da DA (atrofia hipocampal, foi considerado atrofia medidas abaixo de 20% da média em relação ao grupo controle (84), e/ou diminuição de βA_{1-42} (< 416 pg/mL), e/ou diminuição da relação βA_{1-42} /p-Tau (< 9.53 pg/mL) (85).

Controles:

- Desempenho cognitivo normal para idade e escolaridade
- Possuir escore de 0 na CDR
- Apresentar pontuação normal no Miniexame do Estado Mental (MEEM) (86), considerando idade e educação (87).

3.1.2. *Critérios de exclusão:*

Para todos os participantes, os critérios de exclusão foram:

- Não exibir outras alterações neurológicas ou doenças psiquiátricas;
- Uso de drogas sedativas nas 24 horas antecedentes à avaliação neuropsicológica;

- Antecedente de exposição crônica a substâncias neurotóxicas;
- Escore isquêmico de Hachinski > 4 (88);
- Escala de Fazekas = 2 ou 3 (89);
- Doença sistêmica descompensada;
- Uso crônico e agudo de drogas anti-inflamatórias.

3.2. Avaliação clínica e neuropsicológica

Todos os sujeitos foram submetidos a uma avaliação neuropsicológica abrangente (conforme abaixo), com testes cognitivos, funcionais e escalas neuropsiquiátricas feita por neuropsicólogos, para avaliar:

Atividades funcionais, cognição global e desempenho neuropsicológico em diferentes modalidades: MEEM, CDR, Inventário Neuropsiquiátrico (NPI) (90), Avaliação de Atividades de Vida diária de Pfeffer (91, 92); *Memória de trabalho/atenção:* Subtestes Dígito Ordem Direto e Indireto da Escala de Inteligência Wechsler Abreviada para Adultos (WASI); *Memória Episódica:* Teste de Aprendizado auditivo-verbal de Rey (RAVLT) (93). *Funções executivas:* Teste de Trilhas A (TMT-A) e B (TMT-B) (94); Stroop Teste (95), Teste do Relógio (96). *Linguagem:* Teste de Nomeação de Boston (97); Fluência verbal categórica e fonêmica (94); *Habilidades visuoespaciais:* Teste de percepção visuoespacial do Luria's Neuropsychological Investigation (LNI) (98); Cópia da Figura Complexa de Rey (99).

3.3. Exames de LCR e sangue

As análises foram realizadas pelo próprio laboratório de coleta do Hospital das Clínicas. Analisamos o hemograma, perfil lipídico, glicemia, vitamina B12, ácido fólico, hormônios tireoidianos, sorologia para sífilis, função renal e eletrólitos.

Foi coletado uma amostra (10 ml) de sangue venoso, centrifugamos a 1.500 rpm para separação do soro e armazenamos a -80°C em tubos de polipropileno. O LCR coletado (4 ml) foi também centrifugado a 700 rpm e armazenado a -80 °C. Ambas as coletas aconteceram no mesmo dia, no período da manhã e em jejum devido à análise sanguínea.

3.3.1. Quantificação dos biomarcadores líquóricos

A quantificação das proteínas t-Tau, p-Tau, β A 40 e β A 42 foram realizadas através dos kits INNOTESTR h TAU Ag, INNOTESTR PHOSPHO-TAU (181P) e INNOTEST® β -

AMYLOID (1-42) (Fujirebio), respectivamente. Estes testes são ensaios imunoenzimáticos (ELISA) em que as proteínas são capturadas por anticorpos monoclonais específicos. Os testes foram feitos no Laboratório de Neurociências LIM-27 do Instituto de Psiquiatria da Faculdade de Medicina da USP, sob supervisão do Prof. Dr. Orestes Forlenza.

3.3.2. *Quantificação das citocinas séricas*

O kit usado nas análises do soro sanguíneo foi o BD Cytometric Bead Array (CBA) Human Inflammatory Cytokines Kit, que apresenta anticorpos contra as seguintes citocinas: IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF- α e IL-12. Através do kit multiplex, as citocinas são detectadas diretamente no imunoensaio, pois formam complexos com anticorpos específicos para cada citocina, fizemos duplicatas. Uma vez que estes anticorpos estão ligados a um fluorocromo – a Ficoeritrina – o complexo citocina-anticorpo pode ser detectado por um citômetro de fluxo, o qual também avalia a intensidade da fluorescência de cada complexo. Os resultados foram analisados com auxílio do software FCAP Array™. O limite de detecção do kit é comparável ao ELISA convencional, mas devido à complexidade e cinética de estar medindo várias citocinas ao mesmo tempo, o limite real de detecção em um dado experimento pode variar, limites descritos na **Tabela 2**. Para fazermos a aplicação do kit, usamos o laboratório de Imunologia do Instituto Biológico da Unicamp e, para quantificação das citocinas e uso do citômetro de fluxo, usamos o Laboratório Central de Tecnologias de Alto Desempenho em Ciências da Vida (LaCTAD) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

Tabela II. Representação do limite de detecção para cada citocina abordada no estudo, de acordo com o kit BD Cytometric Bead Array (CBA) Human Inflammatory Cytokines Kit.

Citocina	Limite de Detecção
IL-1 β	7,2 pg/ml
IL-6	2,5 pg/ml
IL-10	3,3 pg/ml
TNF- α	3,7 pg/ml
IL-12p70	1,9 pg/ml

3.4. *Aquisição de imagens por Ressonância Magnética*

Os exames de RM foram realizados em um aparelho de 3T (Achieva-Intera PHILIPS®). O seguinte protocolo foi aplicado a cada sujeito:

- 1) RM estrutural (T1-3D) para análise volumétrica e de espessura de estruturas cerebrais: Imagem volumétrica ponderadas em T1: gradiente eco com voxels isotrópicos de 1mm, adquiridos no plano sagital (1mm de espessura; *flip angle*, 8°; TR, 7.1 ms; TE, 3,2 ms; matriz, 240x240; e FOV, 240x240x180);
- 2) RM funcional em repouso: FOV 240x240x120; voxel size 3x3x3 TE= 30 ms, TR =2000 ms; sem *gap* com 180 volumes (ou 6 minutos de aquisição). Todos os sujeitos foram instruídos a permanecerem de olhos fechados e mexerem a cabeça o mínimo possível durante o exame. O tempo total de escaneamento foi de 40 minutos.

3.5. *Volume hipocampal*

A volumetria hipocampal foi determinada usando o software FreeSurfer (versão 5.3) (<https://surfer.nmr.mgh.harvard.edu>), as medidas foram realizadas de acordo com o protocolo sugerido por Fischl e Dale (100). Foram processadas todas as imagens volumétricas em T1 de alta resolução, as imagens foram corrigidas para inomogeneidades do campo magnético e é feita a remoção de tecido não cerebral (skullstrip). Em seguida, há a segmentação dos voxels em substância cinzenta, substância branca e LCR. Para calcular o volume de GM para as estruturas subcorticais: é feito a identificação das estruturas e uma segmentação Bayesiana é feita para garantir que as marcações estão correspondidas no local correto (101). Foi considerado atrofia hipocampal medidas abaixo de 20% da média em relação ao grupo controle (84).

3.6. *Análise Imagem Funcional*

Foi realizada a análise da conectividade funcional (CF) usando o programa UF²C (<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/>). As imagens funcionais 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), regredidas linearmente (6 parâmetros de movimento além de sinais globais médios de substância branca e do líquido).

Para identificar a DMN de cada voluntário, foi posicionada uma semente cúbica (1cm³) no córtex cingulado posterior (PCC) (MNI 0 -51 21), sendo que as séries temporais dentre os voxels incluídos na substância cinzenta do sujeito foram consideradas para a médias. A série

temporal média foi usada para realizar testes de correlação de Pearson com todos os voxels de substância cinzenta, gerando mapas de correlação individuais.

Estimou-se um mapa médio da DMN, usando os resultados dos indivíduos do grupo controle. O mapa de média foi binarizado excluindo todos os voxels com correlação média de pontuação inferior a 0,2 e sequencialmente parcelados em regiões com voxels contínuos (*clusters*), resultando em oito imagens das regiões da DMN: o córtex pré-frontal (FRONT), PCC, lobo parietal esquerdo (LPARIETO), lobo parietal direito (RPARIETO), lobo temporal direito (RTEMP), lobo temporal esquerdo (LTEMP), hipocampo esquerdo (LHIPPO) e hipocampo direito (RHIPPO), representadas pela **Figura 5**. As oito imagens foram aplicadas em cada voluntário (Controles, CCLa e DA), extraíndo assim um valor médio de conectividade para cada região de cada sujeito. Os valores médios foram convertidos para z-score (transformação de Fischer) e finalmente usados para análises estatísticas.

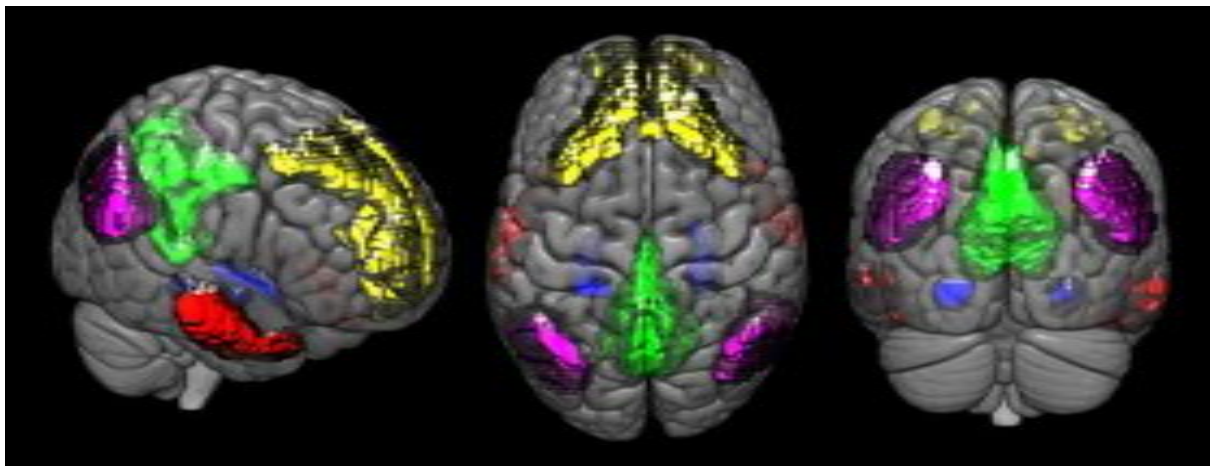


Figura 5. Máscara das subregiões da DMN usada para sobrepor cada mapa estatístico e para calcular as medidas de conectividade funcional de cada indivíduo, em amarelo: o córtex pré-frontal (FRONT); em verde: o PCC; em rosa: lobo parietal esquerdo (LPARIETO) e lobo parietal direito (RPARIETO); em vermelho: lobo temporal direito (RTEMP) e lobo temporal esquerdo (LTEMP); em azul: hipocampo esquerdo (LHIPPO) e hipocampo direito (RHIPPO)

3.7. Análise Estatística

Primeiro, realizamos o teste de Kolmogorov-Smirnov para testar a normalidade. Quando os dados seguiram uma distribuição normal, realizamos testes paramétricos. Caso contrário, utilizamos testes não paramétricos. Todas as variáveis (citocinas, CF das subpartes da DMN, volume hipocampal e biomarcadores líquóricos) foram comparadas entre os grupos.

Como a concentração da maioria das citocinas ficou abaixo do limite inferior de detecção em um grande número de indivíduos (ou porque os níveis eram muito baixos ou porque estas moléculas não foram produzidas), optou-se por considerar essa variável como categórica e comparamos os grupos considerando "detectado *versus* não detectado".

Comparamos os biomarcadores da DA (βA_{1-42} , t-Tau, p-Tau, volume do hipocampo e as medidas de CF das regiões da DMN) considerando os subgrupos "detectado *versus* não detectados" de citocinas. Os resultados foram considerados significativos quando o valor $p < 0,05$, corrigido para comparações múltiplas.

4. RESULTADOS

Resultados apresentados na forma de artigo submetido ao jornal *Neurobiology of Aging*:

Systemic inflammation and Alzheimer's disease biomarkers

Elsevier Editorial System(tm) for
Neurobiology of Aging

Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: Systemic inflammation and Alzheimer's disease biomarkers

Article Type: Regular Article

Section/Category: Alzheimer's Disease & Other Dementias

Keywords: Immunological mechanisms, Alzheimer's pathology, Alzheimer's biomarkers, functional connectivity, cytokines

Corresponding Author: Miss. Thamires Magalhaes,

Corresponding Author's Institution: Universidade Estadual de Campinas - Unicamp

First Author: Thamires Magalhaes

Order of Authors: Thamires Magalhaes; Marina Weiler; Camila Teixeira; Thaís Hayata; Adriel Moraes; Vinícius Boldrini; Leonilda dos Santos; Brunno Campos; Thiago de Rezende; Orestes Forlenza; Leda Talib; Fernando Cendes; Márcio Balthazar

Manuscript Region of Origin: BRAZIL

Abstract: There is increasing evidence suggesting that Alzheimer's disease (AD) pathogenesis is associated with immunological mechanisms, mostly due to an inflammatory response that exacerbates AD pathology. In addition to this, the risk for conversion from amnestic mild cognitive impairment (aMCI) to AD dementia is increased in patients with elevated concentrations of pro-inflammatory cytokines. Our main objective was to verify the hypothesis that serum levels of cytokines could be associated with the main AD biomarkers (CSF A β 1-42 and tau, hippocampal volume and Default Mode Network functional connectivity). For that, we acquired 3T imaging from 25 healthy controls, 45 aMCI and 28 mild AD patients. Blood samples were collected from controls, aMCI and mild AD patients; CSF sample was collected from aMCI and AD patients. aMCI with detected specific cytokines presented stronger connectivity in some DMN regions; whereas mild AD presented larger hippocampal volume but weaker connectivity in some DMN regions when compared to non-detected patient's group. Our findings may indicate a possible relationship between inflammation profile and the AD biomarkers.

Systemic inflammation and Alzheimer's disease biomarkers

T. N. C. Magalhães^a, M. Weiler^a, C.V. L. Teixeira^a, T. Hayata^a, A. S. Moraes^c, V. O. Boldrini^c, L. M. dos Santos^c, B. M. de Campos^a, T. J. R. de Rezende^a, O. V. Forlenza^d, L. L. Talib^d, F. Cendes^a, M. L. F. Balthazar^{a, b*}.

^aNeuroimaging Laboratory, Department of Neurology, University of Campinas (Unicamp), 13083-888 Campinas, SP, Brazil

^bUnit for Neuropsychology and Neurolinguistics, Department of Neurology, University of Campinas (Unicamp), 13083-888 Campinas, SP, Brazil

^cNeuroimmunology Unit, Department of Genetics, Evolution and Bioagents, University of Campinas (UNICAMP), 13083-862 Campinas, SP, Brazil

^dLaboratory of Neuroscience (LIM-27), Department and Institute of Psychiatry, Faculty of Medicine, University of Sao Paulo (USP), 05403-010 Sao Paulo, SP, Brazil

*Corresponding author:

Marcio L. F. Balthazar

Department of Neurology, University of Campinas (UNICAMP)

Cidade Universitária,

Campinas-SP, Brazil, 13083-970,

E-mail: mbalth@unicamp.br

+55 (19) 3521-9217

ABSTRACT

There is increasing evidence suggesting that Alzheimer's disease (AD) pathogenesis is associated with immunological mechanisms, mostly due to an inflammatory response that exacerbates AD pathology. In addition to this, the risk for conversion from amnesic mild cognitive impairment (aMCI) to AD dementia is increased in patients with elevated concentrations of pro-inflammatory cytokines. Our main objective was to verify the hypothesis that serum levels of cytokines could be associated with the main AD biomarkers (CSF A β ₁₋₄₂ and tau, hippocampal volume and Default Mode Network functional connectivity). For that, we acquired 3T imaging from 25 healthy controls, 45 aMCI and 28 mild AD patients. Blood samples were collected from controls, aMCI and mild AD patients; CSF sample was collected from aMCI and AD patients. aMCI with detected specific cytokines presented stronger connectivity in some DMN regions; whereas mild AD presented larger hippocampal volume but weaker connectivity in some DMN regions when compared to non-detected patient's group. Our findings may indicate a possible relationship between inflammation profile and the AD biomarkers.

Keywords: Immunological mechanisms, Alzheimer's pathology, Alzheimer's biomarkers, functional connectivity, cytokines

1. Introduction

Alzheimer's disease (AD), the most common neurodegenerative disease, is pathologically characterized by the excessive extracellular deposition of amyloid-beta ($A\beta_{1-42}$) and by the intracellular accumulation of the hyper-phosphorylated tau (p-tau) protein, among other causes (Huang and Mucke, 2012). Increasingly, evidence suggesting that AD pathogenesis is associated with immunological mechanisms, as well as chronic inflammation is coming to light (Mayeux *et al.*, 1993; Akiyama *et al.*, 2000; Heneka *et al.*, 2006; Holmes *et al.*, 2009).

Elevated levels of cytokines, such as *tumor necrosis factor – alpha* (TNF- α) and interleukins (ILs) have been observed in AD in the brains of transgenic mice around the $A\beta_{1-42}$ plaques (Johnston *et al.*, 2011) and have also been detected in the cerebrospinal fluid (CSF) and peripheral blood of AD and amnesic mild cognitive impairment (aMCI) patients (Di Rosa *et al.*, 2006; Bossu *et al.*, 2008; Rubio-Perez and Morillas-Ruiz, 2012). These cytokines can activate microglia and astrocytes that become the major effectors of neuroinflammatory signals, causing neuronal metabolic disorders and excitotoxicity, which contribute to neuronal dysfunction and also to cognitive deterioration (Jankowsky and Patterson, 1999; DeLeo and Yezierski, 2001; Gemma and Bickford, 2007). In transgenic mice models, glial cell activation has been shown to occur early in aMCI and AD cases, even before $A\beta_{1-42}$ deposition (Kummer *et al.*, 2014). In addition, the risk of conversion to AD dementia is increased in aMCI subjects with elevated concentrations of pro-inflammatory and lowered concentrations of anti-inflammatory cytokines (Tarkowski *et al.*, 2003).

One of the current hypotheses that explain the involvement of inflammation in the pathophysiology of AD proposes that the neuritic plaques work as pro-inflammatory

agents, stimulating the proliferation and activation of microglia and astrocytes (Bhamra and Ashton, 2012). This is supported by authors who claim that the possible stimulation of microglia (Johnston *et al.*, 2011) by neuritic plaques, neurofibrillary tangles (McGeer *et al.*, 1996) and by neuronal stress (Wyss-Coray and Rogers, 2012) promotes increased microglia phagocytic activity and the secretion of pro and anti-inflammatory cytokines, in an attempt to reduce the neuritic plaques (Bhamra and Ashton, 2012). This stimulus, in turn, causes oxidative stress and consequent dysfunction and neuronal death, and is well documented in AD cases (Holmes *et al.*, 2009).

Neuroinflammation can also be induced by systemic influences (factors from outside the central nervous system), such as systemic or peripheral inflammation. For example, the blood-brain barrier (BBB) in AD can be damaged due to A β ₁₋₄₂ accumulation within brain blood vessels (cerebral amyloid angiopathy) and associated vascular inflammation, which could impact on communication between the brain and the peripheral immune system (Takeda *et al.*, 2014). These factors suggest that AD pathology could be accelerated through such systemic factors (Li *et al.*, 2011; Sudduth *et al.*, 2013). Although much is known about the role of neuroinflammation in AD, it is unclear if systemic inflammation affects the main pathophysiological processes of the disease.

In this study, we sought to investigate if peripheral cytokines have an effect on the main biomarkers of the disease, such as CSF concentrations of A β ₁₋₄₂ and tau proteins, as well as the structural and functional changes of the brain in patients with mild AD and aMCI due to AD. We compared the serum production of IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12 and TNF- α in subjects that presented mild AD, aMCI and normal aging and then verified if AD biomarkers (CSF levels of A β ₁₋₄₂, total (t-tau) and p-tau; hippocampal

volumes (HV); and functional connectivity (FC) measurements of the Default Mode Network (DMN)) differs between detectable vs non-detected cytokines in controls, aMCI and mild AD patients.

2. Material and methods

2.1. Subjects

Ninety-eight subjects, older than 50 years of age were enrolled in this study, 28 were diagnosed mild AD, 45 were with aMCI and 25 healthy controls were also included. The diagnosis of probable dementia due to AD fulfilled the criteria set out by the National Institute of Aging and Alzheimer's Association (NIA/AA) (McKhann, 2011) and all AD patients had a Clinical Dementia Rating (CDR) (Morris, 1993) score of 0.5 or 1. aMCI patients were diagnosed using the core criteria of the NIA/AA for MCI (Albert *et al.*, 2011) and had pathophysiological evidence of AD (characterized by low $A\beta_{1-42}$ (< 416 pg/mL) and/or low $A\beta_{1-42}/p\text{-tau}$ (< 9.53) and/or hippocampal atrophy). We considered hippocampal atrophy measurements 20% below the average of the control group (either in the right or left hippocampus), due to the higher risk of conversion to AD (Devanand *et al.*, 2007). All aMCI participants had a CDR score of 0.5 (with an obligatory memory score of 0.5). CDR was performed by way of a semi-structured interview.

Controls were identified as being cognitively normal: they did not exhibit any neurological or psychiatric disorders nor did they require psychoactive medication; demonstrated normal performances in the Mini Mental State Examination (MMSE), when considering age and education (Brucki *et al.*, 2003); and their structural images

were normal. The control group had no memory complaints, performed normal on neuropsychological tests and had a CDR score of zero.

Exclusion criteria for all subjects included: a history of chronic inflammatory diseases, chronic use of anti-inflammatory drugs, other neurological or psychiatric diseases or having suffered a head trauma that resulted in a loss of consciousness, use of sedative drugs in the 24 hours preceding the neuropsychological assessment, drug or alcohol addiction, prior chronic exposure to neurotoxic substances, Fazekas Scale (Fazekas *et al.*, 1987) = 2 or 3 and a Hachinski ischemic score (Hachinski *et al.*, 2006) > 4. The Medical Research Ethics Committee of UNICAMP Hospital approved this study, and written informed consent (either from the subjects or from their responsible caretakers, if incapable) was obtained from all participants before the commencement of the study, in accordance with the Declaration of Helsinki. Pre-diagnostic procedures also comprised of laboratory tests including Vitamin B12, folate and thyroid hormones.

2.2. Neuropsychological, functional and neuropsychiatric assessment

An experienced neuropsychologist, with no knowledge of the biomarker data, performed the neuropsychological evaluations. Global cognitive status was measured by MMSE (Folstein *et al.*, 1975); episodic memory by the Rey Auditory Verbal Learning Test - RAVLT (subitems encoding, delayed recall - A7, and recognition - RC-FP) (Malloy-Diniz *et al.*, 2007); attention/working memory by forward digit span (FDS) and backward digit span (BDS); for visual perception, we used the following tests: subtests of Luria's Neuropsychological Investigation (LNI)(Christensen, 1975), using items G12, G13, G14 and G17 (from Raven's test), one item for mental rotation of figures (Ratcliff, 1979), and a copy of the Rey-Osterrieth Complex Figure Test (Osterrieth, 1944). For

executive functions we used the Trail Making Test A (TMT-A), and Trail Making Test B (TMT-B) (Reitan, 1958), the Stroop test (congruent – Stroop C, and incongruent – Stroop I) (Stroop, 1935) and also the Clock Drawing Test (CDT) (Osterrieth, 1944). Language tests included the Boston Naming Test (BNT) (Kaplan *et al.*, 1983), SVF: semantic verbal fluency - SVF for category (animals), and PVF: phonological verbal fluency for letters - (items beginning with F, A and S for 1 minute for each letter) (Christensen and Guilford 1959); neuropsychiatric symptoms were evaluated by neuropsychiatric inventory (NPI) (Cummings, 1997). Functional performance was measured by CDR and by the Pfeffer functional activities questionnaire (Morris, 1993).

2.3. Blood and CSF sample Collection and Handling

Peripheral blood samples were collected from the three groups: control, aMCI patients and AD patients. The sample was centrifuged at 2500 rpm for 10 minutes to separate serum, and was then subsequently aliquoted in to 1 ml Eppendorf microtubes and stored at -80°C until the time of analysis. CSF samples were collected form only the aMCI and AD patient groups by lumbar puncture and subsequently stored in 1 ml polypropylene tubes. After, the samples were centrifuged at 700 rpm for ten minutes and stored at -80°C until the time of analysis.

2.3.1. Performing immunoassays

2.3.1.1. Quantification of AD biomarkers

Dosages of A β ₁₋₄₂, t-Tau and p-Tau were prepared with amyloid- β INNOTEST® kits (1-42), h-TAU INNOTEST® Ag and INNOTEST® Phospho-tau (181P) (Fujirebio), respectively, a multiplex microsphere-based xMAP platform that allows the simultaneous analysis of the three biomarkers. After prewetting the filter plate with a wash buffer, a suspension of microsphere carrying the corresponding capturing

antibodies (AT120, AT270, and 4D7A3 for t-Tau, p-Tau and A β ₁₋₄₂, respectively) was added to the plate. A mixture of biotinylated detection monoclonal antibodies, designed to detect specifically one of the capturing antibodies, and 75 μ L of CSF or standards were added to the plate and incubated overnight in the dark. Next, the plate was washed and a detection conjugate (phycoerythrin-labeled streptavidin) was added and incubated for 1 hour at room temperature. The plate was washed and after the addition of a reading solution (phosphate buffer saline) the assay was analyzed on a Luminex 100IS platform (Luminex, Austin, TX, USA). Standard curves were constructed for each biomarker using a sigmoidal curve fitting method, and the mean fluorescence values for the duplicate CSF samples were used to determine the concentration of A β ₁₋₄₂, t-Tau and p-Tau.

2.3.1.2. Quantification of inflammatory biomarkers

Flow cytometry, a technique based on fluorescent microparticles that are bound covalently to the antibodies, was used for the quantitation of inflammatory markers. We used a BD Cytometric Bead Array (CBA) Human Cytokines inflammatory kit in the analysis, which shows antibodies that work against the following cytokines: IL-1 β , IL-6, TNF- α , IL-12p70 (pro-inflammatory) and IL-10 (anti-inflammatory).

The quantification of these five cytokines is possible from a single blood sample. The cytokines are detected directly on the immunoassay since they form complexes with antibodies which are specific for each cytokine. Since these antibodies are linked to a fluorochrome-phycoerythrin - the cytokine-antibody complex can be detected by a flow cytometer, which also evaluates the fluorescence intensity of each compound. Subsequently the results are analyzed using the FCAP ArrayTM software.

2.4. Image acquisition

All MR images were acquired on a Philips® Achieva 3.0T MRI scanner. The following protocol was applied to each subject: a) sagittal high-resolution T1-weighted (isotropic voxels of 1 mm³, TR/TE = 7/3.2 ms, FOV = 240×240mm, 180 slices); b) echo planar images (EPI), TR/TE = 2000/30 ms, FOV = 240×240, isotropic voxels set to 3 mm³, no gap with a total scan time of 6 minutes, resulting in 180 dynamics (full brain volumes) with 40 axial slices each. All participants were instructed to keep their eyes closed, relax, move as little as possible, and to not fall asleep. We provided foam pads to the patients to reduce head movements and scanner noise.

2.5. *Functional imaging analyses*

We performed the FC analysis using the UF²C toolbox (<http://www.lni.hc.unicamp.br/app/uf2c/>) that runs within MATLAB platform (2014b, The Math Works, Inc. USA) with SPM12 (<http://www.fil.ion.ucl.ac.uk/spm/>). The preprocessing was based on functional MRIs dynamics realignment (using mean image as reference), image co-registration (fMRI mean image with T1 WI), spatial normalization (MNI-152), smoothing (kernel of 6x6x6 mm³ at FWHM) and T1 WI tissue segmentation and normalization (MNI-152). Additionally, we regressed out six head motion parameters (three rotational and three translational) as well as white matter (WM) and CSF average signals. Finally, we removed linear trends and band-pass filtered (0.008-0.1 Hz) the time-series.

To identify the DMN of each volunteer, we positioned a cubic seed (1cm³ ratio) on the posterior cingulate cortex (PCC, MNI 0 -51 21), and the average time series between voxels that were included on the subject's grey matter were considered. The final average time series were used to perform Pearson's correlation tests with all grey matter-masked voxels, this generated individual correlation maps.

We then estimated an average DMN map, using the correlation maps of all 25 controls. The average map was then binarized, excluding all voxels with a correlation score lower than 0.2 and sequentially divided by supra-threshold clusters (parceled into regions with continuous voxels) resulting in eight DMN ROIs: the prefrontal cortex (FRONT), medial parietal cortex (PCC), left parietal lobe (LPARIETO), right parietal lobe (RPARIETO), right temporal lobe (RTEMP), left temporal lobe (LTEMP), left hippocampus (LHIPPO) and right hippocampus (RHIPPO)(**Fig. 1**). The eight DMN ROIs were used to mask each individual's r-score map, from which we extracted an average connectivity value for each of the eight regions. The average values were converted to z-scores (Fischer's z-transformation) that were used for statistical analysis.

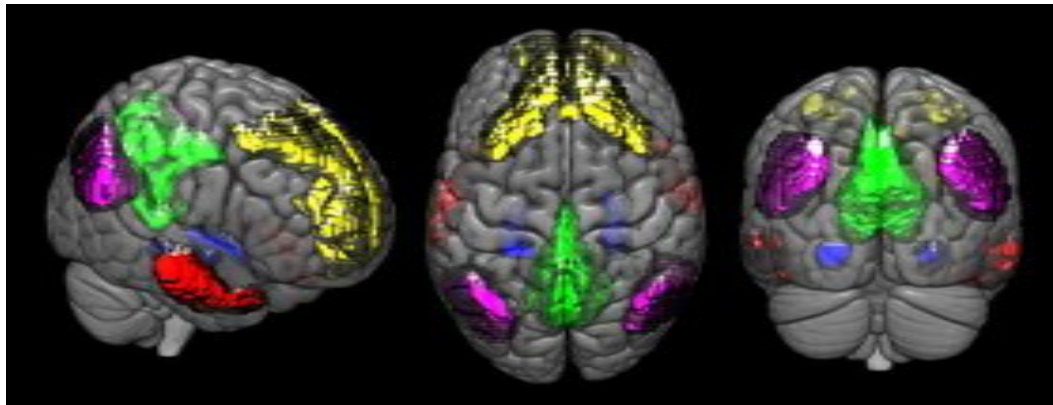


Fig. 1: DMN sub regions mask used to overlap each statistical map and to calculate the functional connectivity measures. Yellow corresponds to the medial prefrontal cortex (FRONT); green corresponds to the posterior cingulate cortex (PCC); red corresponds to the right (RTEMP) and left temporal lobes (LTEMP); blue corresponds to the right (RHIPPO) and left hippocampus (LHIPPO); and pink corresponds to the right (RPARIETO) and left parietal lobe (LPARIETO).

2.6. Hippocampal volume

FreeSurfer software v.5.3. (<https://surfer.nmr.mgh.harvard.edu>) (Fischl *et al.*, 2002) was used for cortical surface reconstruction and for the anatomical segmentation of MRI brain scans. We processed all high-resolution T1-weighted MR volumetric images through the default FreeSurfer processing stages to perform non-linear registration (warping) from the original space to the MNI305 space (standard space), cortical and subcortical segmentations, and cortical thickness measurements. For each subject, grey matter, white matter, and noncortical structures a triangular mesh was segmented and used to measure the distance from the pial surface to the grey/white matter boundary for each hemisphere (Dale *et al.*, 1999; Fischl and Dale, 2000; Fischl *et al.*, 2002). We visually confirmed the accuracy of warping the T1-weighted MR volumetric images to the standard space. Macroscopic artifacts affected none of the T1-weighted volumes of the participants. For all analyses, a Gaussian filter with a 10 mm full width at half maximum was used for smoothing the surface. Individual structure's volumes were computed from labeled voxels and normalized to the total intracranial volume.

2.7. Statistical analysis

We used IBM's SPSS software (version 21, SPSS Inc., Chicago, IL, USA) for statistical analysis. We first performed the Kolmogorov–Smirnov to test for normality. All variables ($A\beta_{1-42}$, p-tau, t-tau, HV, FC, cytokine levels, neuropsychological and demographic data) were compared between the groups. When data followed a normal distribution, we performed parametric tests; otherwise, we used non-parametric tests.

Initially, we aimed to compare the levels of cytokines between the groups as continuous variables. However, because the majority of cytokines were under the

lower limit of detection in a large number of subjects (either because the levels were very low or because these cytokines were not detected) we opted to consider this variable as categorical and compared the groups considering cytokine "detection" vs "non-detection" (i.e., we subdivided each of the three groups into these two groups, resulting in the following subgroups: controls detected vs controls non-detected, aMCI detected vs aMCI non-detected, mild AD detected vs mild AD non-detected). In the same way, we compared $A\beta_{1-42}$, t-tau p-tau, HV and DMN FC measurements considering cytokine detection vs non-detection. We opted to use the term "detection" rather than "production" because our method is not able to affirm with certainty that these cytokines were not produced at levels below the detection limit. Results were considered significant when $p < 0.05$, Bonferroni corrected for multiple comparisons.

3. Results

3.1. *Demographics, neuropsychological and CSF data*

There were significant differences in the ages and education in mild AD patients in comparison with controls and also in education in aMCI subjects in comparisons with controls. There was no difference concerning sex. AD patients performed worse in all tests, which included episodic memory, attention and working memory, visuospatial skills, executive functions and language. aMCI patients performed worse than the controls in most tests, this indicates that most of these patients could be classified as multiple-domain amnesic MCI. There were no significant differences between AD and aMCI in relation to $A\beta_{1-42}$ and p-tau. Only t-tau was significantly different between aMCI and AD (**Table 1**).

Table 1. Descriptive and group comparison of demographic, neuropsychological and CSF biomarker control data, aMCI and mild AD patients.

	CONTROLS	aMCI	MILD AD
Age	68.76 (4.98)	70.51 (6.84)	73.17 (7.08) ^{a*}
Education (in years)	13 (5.04)	7.8 (4.99) ^{a***}	7.71 (5.37) ^{a***}
Sex (female/male)	16/9	32/13	18/10
CDR	0	0.5	1.0 ^{a***,b***}
CDRSB	0 (0)	0.85 (0.94) ^{a*}	3.96 (0.96) ^{a***,b***}
PFEFFER	0.10 (0.31)	2.28 (2.27) ^{a*}	12.81 (3.86) ^{a***,b***}
MMSE	28.48 (1.63)	26.53 (2.58) ^{a*}	21.32 (4.53) ^{a***}
RAVLT-encod	43.88 (8.61)	29.88 (7.95) ^{a***}	21.32 (6.75) ^{a***,b***}
A7	8.88 (2.68)	4.35 (2.47) ^{a***}	1.25 (1.64) ^{a***,b***}
RC-FP	12.24 (3.44)	6.86 (4.96) ^{a***}	-1.71 (5.53) ^{a***,b***}
FDS	5.04 (1.05)	4.37 (1.02) ^{a*}	4.03 (0.96) ^{a**}
BDS	4.28 (1.06)	3.40 (1.07) ^{a**}	2.71 (1.04) ^{a***,b*}
Stroop C - Time	43.04 (13.01)	51.70 (21.30)	68.59 (52.45) ^{a*}
Stroop C - Errors	0.04 (0.20)	0.09 (0.36)	0.59 (1.82)
Stroop I -Time	99.16 (20.94)	139 (50.08) ^{a**}	190.43 (65.92) ^{a***,b***}
Stroop I -Errors	3.64 (3.72)	7.46 (7.53)	15.56 (12.73) ^{a***,b***}
CVF	18.72 (4.50)	13.6 (4.01) ^{a***}	9.85 (3.67) ^{a***,b***}
F.A.S	36.56 (10.01)	25.75 (9.41) ^{a***}	23.17 (13.48) ^{a***,b***}
LNI	18.28 (1.51)	16.48 (5.03)	13.82 (4.36) ^{a***,b*}
CDT	8.44 (2.16)	7.91 (2.08)	6.53 (2.51) ^{a**,b*}
Rey Copy	33.68 (3.92)	27.02 (9.47) ^{a*}	21.78 (12.24) ^{a***}
TMT-A	58.60 (24.60)	93.97 (52.49) ^{a***}	158.26 (86.32) ^{a***,b***}
TMT-B	101.38 (53.33)	178.51 (88.77) ^{a***}	251.52 (78.79) ^{a***,b***}
BNT	55.80 (4.39)	50.06 (7.87) ^{a**}	40.42 (12.34) ^{a***,b***}
NPI	0 (0)	5.33 (5.71)	12.36 (12.85) ^{a***,b**}
CSF biomarkers (pg/mL)			
t-tau	N/E	81.90 (44.59)	153.42 (69.45) ^{b***}
p-tau	N/E	37.55 (18.48)	53.84 (28.34)
Aβ₁₋₄₂	N/E	366.62 (137.59)	317.67 (107.32)

Note: CDR: Clinical Dementia Rating, CDRSB: Clinical Dementia Rating Sum of Boxes; MMSE: Mini Mental State Examination; RAVLT: Rey Auditory-Verbal Learning Test (encod = encoding items, A7 = delayed recall; RC-FP = correct recognition minus false positives); FDS: forward digit span; BDS: backward digit span; Stroop C: Stroop Test congruent; Stroop I: Stroop Test incongruent; CVF: category verbal fluency (number of animals in 1 minute); F, A, S: Verbal Fluency; LNI: visuospatial ability Items of Luria's Neuropsychological Investigation; CDT: Clock Drawing Test; TMT-A: Trail Making Test A; TMT-B: Trail Making Test B; BNT: Boston Naming Test; NPI: Neuropsychiatric Inventory; t-tau: total-tau; p-tau: phosphorylated-tau; N/A: not evaluated.

Statistical analysis: ANOVA with Bonferroni post hoc test.

a: different from controls

b: different from aMCI

* p < 0.05

** p < 0.01

*** p < 0.001

3.2. Neuroimaging data

Considering all neuroimaging variables of the study (HV and subparts of DMN FC), we found significant differences between groups in HV (mild AD < aMCI and controls) and FC of the RTEMP (aMCI < controls) (**Table 2**).

Table 2. Statistical significant differences regarding neuroimaging variables between controls, aMCI and mild AD patients.

	CONTROLS	aMCI	MILD AD
Left Hippocampus volume (%)	0.0277 (0.0036)	0.0261 (0.0065)	0.0208 (0.0037) ^{a***,b***}
Right Hippocampus volume (%)	0.0298 (0.0041)	0.0277 (0.0068)	0.0209 (0.0044) ^{a***,b***}
RTEMP FC	0.395 (0.059)	0.353 (0.063) ^{a*}	0.363 (0.076)

Note: Mean (standard deviation). Statistical analysis: Anova with Bonferroni post hoc test. RTEMP FC: right temporal lobe functional connectivity.

% of hippocampal volume in relation to total intracranial volume

a: different from controls

b: different from aMCI

* $p < 0.05$

*** $p < 0.001$

3.3. Cytokines

Table 3: Descriptive and group comparison of peripheral cytokines in controls, aMCI and mild AD patients.

	CONTROLS	aMCI	MILD AD
IL-1β	1.57 $\pm$ 1.11 (79.16%)	0.85 $\pm$ 1.9 (26.82%) ^{a***a^{ooo}}	0 $\pm$ 1.59 (32.14%) ^{a**a^{ooo}}
IL-6	2.38 $\pm$ 4.02 (100%)	3.22 $\pm$ 4.78 (68.29%) ^{a^{ooo}}	3.08 $\pm$ 11.89 (71.42%) ^{a^{ooo}}
IL-10	0.2 $\pm$ 1.29 (75%)	1.15 $\pm$ 1.88 (51.21%) ^{a^o}	0 $\pm$ 1.48 (42.85%) ^{a^{oo}}
IL-12	0 $\pm$ 0.73 (12.5%)	0.63 $\pm$ 1.43 (25%)	0 $\pm$ 0.96 (25%)
TNF-α	0 $\pm$ 8.2 (45.83%)	2.79 $\pm$ 5.52 (26.82%)	0 $\pm$ 3.62 (32.14%)

Note: Mean $\pm$ standard deviation (frequency of detection in each group). Statistical analysis: Kruskal-Wallis test for mean differences and Chi Square test for frequency comparison.

a: different from controls

** $p < 0.01$ for mean differences

*** $p < 0.001$ for mean differences

^o $p < 0.05$ for frequency comparison

^{oo} $p < 0.01$ for frequency comparison

^{ooo} $p < 0.001$ for frequency comparison

3.4. Subgroups differences

We evaluated if there were differences in the variables of the study (CSF biomarkers, HV and DMN FC) considering whether or not there was cytokine detection (subdividing the three groups into two subgroups: detected vs non-detected). Regarding controls, we did not find differences between detected *versus* non-detected for any variable.

aMCI with detected IL-6, IL-12 and TNF- α showed an increased FC in the following subparts of the DMN: LPARIETO and LTEMP, in relation to non-detected, according to **Table 4**. In mild AD patients, we found the opposite pattern: patients with detected IL-10, IL-12 and TNF- α showed a decreased FC in subparts of DMN: LHIPPO, LTEMP, RHIPPO and RTEMP, in relation to non-detected. AD patients with detected IL-10 showed decreased CSF levels of A β_{1-42} in the results. In the AD group we also found that HV was different in detected *versus* non-detected ILs (IL-6, IL-10 e IL-12) (**Table 5**).

Table 4. Statistically significant differences between detected vs non-detected subgroups within the aMCI group.

Variable	Subgroup	Mean (SD) of Variable	P
LPARIETO FC	IL-12 non-detected	0.392(0.067)	0.014
	IL-12 detected	0.446(0.073)	
	TNF- α non-detected	0.397(0.068)	0.034
	TNF- α detected	0.444(0.075)	
LTEMP FC	IL-6 non-detected	0.322(0.060)	0.03
	IL-6 detected	0.373(0.069)	

Note: Statistical analysis: Mann-Whitney test. LPARIETO FC: left parietal lobe functional connectivity; LTEMP FC: left temporal lobe functional connectivity.

Table 5. Statistically significant differences between detected vs non-detected subgroups within mild AD group.

Variable	Subgroup	Mean (SD) of Variable	P
LHIPPO FC	IL-12 non-detected	0.364(0.106)	0.015
	IL-12 detected	0.288(0.041)	
LTEMP FC	IL-12 non-detected	0.351(0.082)	0.042
	IL-12 detected	0.275(0.030)	
LHIPPO FC	TNF- α non-detected	0.387(0.069)	0.006
	TNF- α detected	0.269(0.115)	
RHIPPO FC	TNF- α non-detected	0.361(0.121)	0.023
	TNF- α detected	0.291(0.046)	
RTEMP FC	TNF- α non-detected	0.388(0.075)	0.016
	TNF- α detected	0.309(0.042)	
LHIPPO FC	IL-10 non-detected	0.373(0.118)	0.008
	IL-10 detected	0.306(0.034)	
RHIPPO FC	IL-10 non-detected	0.362(0.127)	0.027
	IL-10 detected	0.296(0.037)	
Aβ₁₋₄₂ (pg/mL)	IL-10 non-detected	355.92(95.74)	0.046
	IL-10 detected	273.05(106.35)	
Left Hippocampus volume (%)	IL-12 non-detected	0.198 (0.0299)	0.028
	IL-12 detected	0.243 (0.0437)	
	IL-6 non-detected	0.179 (0.0219)	0.006
	IL-6 detected	0.220 (0.0369)	
	IL-10 non-detected	0.193 (0.0299)	0.009
	IL-10 detected	0.233 (0.0378)	
Right Hippocampus volume (%)	IL-6 non-detected	0.174 (0.0406)	0.015
	IL-6 detected	0.222 (0.0388)	

Note: Statistical analysis: Mann-Whitney test. LHIPPO FC: left hippocampal lobe functional connectivity; LTEMP FC: left temporal lobe functional connectivity; RHIPPO FC: right hippocampal lobe functional connectivity; RTEMP FC: right temporal lobe functional connectivity; A β ₁₋₄₂: amyloid- β 1-42.

4. Discussion

In this study, our main objective was to verify if there were differences in AD biomarkers (CSF, HV and DMN FC) when considering the detection or non-detection of serum cytokines (IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12 and TNF- α) in patients with aMCI, mild AD and in normal controls. First, mild AD had smaller hippocampal volumes than the aMCI

and control groups; and aMCI showed decreased FC values in the RTEMP of DMN than compared to the mild AD and controls. Then, we evaluated intragroup differences considering the detection or non-detection of serum cytokines: mild AD patients with detection of IL-6, IL-10 e IL-12 presented larger HV; aMCI patients with detection of IL-6, IL-12 and TNF- α showed increased FC in subparts of DMN in relation to non-detected. In mild AD patients, we found the opposite pattern: patients with detection of IL-10, IL-12 and TNF- α showed decreased FC in subparts of DMN in relation to the non-detected patients.

Unexpectedly, we found that mild AD patients with detected pro-inflammatory ILs, such as IL-6 and IL-12 had larger HV. Several studies have shown that these ILs are related to the pathophysiology of AD (Erta *et al.*, 2012; Vom Berg *et al.*, 2012), mainly because the excessive accumulation of neuritic plaques composed of A β ₁₋₄₂ stimulates the secretion of these ILs. IL-6 can stimulate the synthesis of the A β ₁₋₄₂ precursor protein (Altstiel and Sperber, 1991; Ringheim *et al.*, 1998) and some authors suggest the involvement of IL-6 in the phosphorylation of tau proteins through the activation of microglia (Castell *et al.*, 1989, Quintanilla *et al.*, 2004). On the contrary, studies with transgenic AD mouse models mostly show a beneficial role of IL-6, in principle due to the presence of massive gliosis that attenuate A β ₁₋₄₂ peptide deposition and enhanced plaque clearance (Chakrabarty *et al.*, 2010). IL-6 also has a notorious role in adult neurogenesis (Bauer *et al.*, 2007; Deverman and Patterson, 2009), and may promote sprouting and the functional recovery of hippocampus cultures (Hakkoum *et al.*, 2007). These hypotheses may partly explain our findings of greater HV values in IL-6 producers in mild AD.

Although the role of IL-12 in AD has not been extensively studied, this IL can be induced in peripheral monocytes following stimulation with A β ₁₋₄₂ and other agents

found on neuritic plaques (Rota *et al.*, 2006) and we detected this IL in 25% of our AD patients. In addition, IL-12 polymorphisms are related to susceptibility in developing late-onset AD (Zhu *et al.*, 2014). Vom Berg *et al.*(2012) found that the microglial cells in the brains of AD models for mice expressed high levels of IL-12 and the inhibition of IL-12 p40 signaling significantly reduced the concentration of soluble A β ₁₋₄₂ species and reversed cognitive deficits in aging transgenic mice. However, Ma *et al.*, (2015) discussed a negative feedback mechanism concerning IL-12, probably by inducing IL-10 production, an anti-inflammatory IL. For example, repeated administration of IL-12 in cancer patients could contribute to an increase in the immunosuppressive properties of the tumor by the induction of IL-10 (Ma *et al.*, 2015). Our results showed that mild AD patients from whom we detected IL-12 and IL-10 have a larger HV but decreased hippocampal FC. This larger HV might indicate a protective role of the anti-inflammatory IL-10. However, the same patients showed decreased CSF levels of A β ₁₋₄₂ and decreased FC in hippocampi, which indicates greater impairment than non-detected. These findings could imply that IL-10 detection starts when the pathology has still not affected the hippocampal anatomy, but only earlier markers of the disease such as A β ₁₋₄₂ and FC. This interaction mechanism between IL-12 and IL-10 could be investigated in future studies and may help to explain these apparently contradictory results.

Concerning the detection of TNF- α , we did not find differences in the proportion of serum levels between the three groups. However, considering TNF- α detection *versus* non-detection, aMCI and mild AD patients presented the opposite pattern of FC. While mild AD patients with detected TNF- α showed decreased FC in both hippocampi, aMCI subjects with detected TNF- α presented increased FC in the parietal subpart of DMN. TNF- α is the prototype of a pro-inflammatory cytokine because it can

initiate an activation cascade of other cytokines and trophic factors (McDermott, 2001) and is also secreted in higher amounts by microglia in AD patients (Rogers and Lue, 2001). In addition, other authors (Perry *et al.*, 2001; Yamamoto *et al.*, 2007) observed an increased expression of TNF- α around amyloid plaques in human and animal brain models. Holmes *et al.* (2009) showed that AD patients who presented acute systemic infections with elevations in TNF- α serum have accelerated rates of cognitive decline.

In relation to IL-1 β , we found that aMCI and AD groups presented a significantly lower proportion of detection when compared to the controls. Some authors (Rivera-Escalera *et al.*, 2014) showed that IL-1 β is an important mediator of neuritic plaque clearance in mouse brains. In addition, transgenic expression of IL-1 β in APP/PS1 mice led to robust neuroinflammation and the reduction of amyloid plaque pathology (Shaftel *et al.*, 2007; Ghosh *et al.*, 2013). Some authors (Heneka and O'Banion, 2007) however, emphasized the importance of IL-1 β while promoting the processing and synthesis of amyloid precursor protein (APP) which increases the secretion of A β ₁₋₄₂ peptides in extracellular space and, therefore, the accumulation of neuritic plaque in the brains of AD subjects. We did not find any difference in IL-1 β detection when considering the proposed biomarkers of this study.

Several neuron networks are altered in AD (Greicius *et al.*, 2004; Agosta *et al.*, 2012; Xia *et al.*, 2014), probably contributing to cognitive and clinical symptoms (Balthazar *et al.*, 2014; Weiler *et al.*, 2014), but the most widely reported is the DMN, which overlaps anatomically with amyloid plaque deposition in AD (Matthews *et al.*, 2013). The most accepted mechanism of the disruption of metabolism and atrophy in DMN structures is A β ₁₋₄₂ deposition (Villain *et al.*, 2008). However, other pathophysiological mechanisms, such as inflammation, may also have an important role and have been studied much less. Our findings may indicate a possible

relationship between the detection of some cytokines and subparts of DMN FC in mild AD and aMCI patients. As far as we know, this is the first study to show changes in the subparts of DMN FC considering the detection of cytokines in the AD spectrum. Furthermore, we found an opposite pattern in the FC measures between AD and aMCI with regards to the detected cytokines: while aMCI patients had an increased FC in some subparts of DMN, mild AD patients presented a decreased FC in some subparts of DMN. We are tempted to speculate that in aMCI, there must exist a mechanism that could compensate for the initial inflammatory alterations by the increasing FC. AD patients, in a more evolved disease phase, would not be able to properly perform this compensatory mechanism, thus presenting a decrease in DMN FC.

Our study has limitations. First, the relatively small number of inter and intra group subjects, since, according to some authors (Dugue *et al.*, 1996; Wadhwa and Thorpe, 1998), large populations are necessary to detect significant changes in the quantification of cytokines. Second, although we have used a solid method to detect the concentration of cytokines (flow cytometry), most of them were not detected. It may be technically difficult to measure cytokines from blood samples because of low serum concentrations and the degradation of these proteins by plasma proteases. In addition, assay interference may occur because of the huge amount of matrix proteins found in blood (Scheltens *et al.*, 2016). Despite these limitations, the present study has the merit to combine the main AD biomarkers - such as HV, DMN FC and CSF proteins, with systemic inflammation data. Our findings may indicate a possible relationship between inflammation and subparts of DMN FC in subjects with mild AD and aMCI. Further studies are needed to better understand the complex relations between AD biomarkers, specifically with regard to inflammation and brain alterations in the AD spectrum.

5. Acknowledgments

The study was supported by CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) and FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – grant# 2011/17092-0).

6. References

- 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.
- Akiyama H, Barger S, Barnum S, Bradt B, Bauer J, Cole GM, *et al.* Inflammation and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. United States; 2000. p. 383-421.
- 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*. United States: 2011 The Alzheimer's Association; 2011. p. 270-9.
- Altstiel LD, Sperber K. Cytokines in Alzheimer's disease. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 1991; 15(4): 481-95.
- 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.
- Bauer S, Kerr BJ, Patterson PH. The neuropoietic cytokine family in development, plasticity, disease and injury. *Nat Rev Neurosci* 2007; 8(3): 221-32.
- Bhamra MS, Ashton NJ. Finding a pathological diagnosis for Alzheimer's disease: are inflammatory molecules the answer? *Electrophoresis* 2012; 33(24): 3598-607.

- Bossu P, Ciaramella A, Salani F, Bizzoni F, Varsi E, Di Iulio F, *et al.* Interleukin-18 produced by peripheral blood cells is increased in Alzheimer's disease and correlates with cognitive impairment. *Brain Behav Immun* 2008; 22(4): 487-92.
- 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.
- Chakrabarty P, Jansen-West K, Beccard A, Ceballos-Diaz C, Levites Y, Verbeeck C, *et al.* Massive gliosis induced by interleukin-6 suppresses Abeta deposition in vivo: evidence against inflammation as a driving force for amyloid deposition. *Faseb j* 2010; 24(2): 548-59.
- Christensen A-L. Luria's Neuropsychological Investigation, Manual and Test Material. 4th ed ed. Copenhagen: Munksgaard; 1975.
- Christensen P, Guilford J. Manual for the Christensen Guilford Fluency Tests. (2nd ed.). Beverly Hills, California: Sheridan Supply; 1959.
- Cummings JL. The Neuropsychiatric Inventory: assessing psychopathology in dementia patients. *Neurology* 1997; 48(5 Suppl 6): S10-6.
- Dale AM, Fischl B, Sereno MI. Cortical surface-based analysis. I. Segmentation and surface reconstruction. *Neuroimage* 1999; 9(2): 179-94.
- DeLeo JA, Yeziarski RP. The role of neuroinflammation and neuroimmune activation in persistent pain. *Pain* 2001; 90(1-2): 1-6.
- 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*. United States; 2007. p. 828-36.
- Deverman BE, Patterson PH. Cytokines and CNS development. *Neuron* 2009; 64(1): 61-78.
- Di Rosa M, Dell'Ombra N, Zambito AM, Malaguarnera M, Nicoletti F, Malaguarnera L. Chitotriosidase and inflammatory mediator levels in Alzheimer's disease and cerebrovascular dementia. *Eur J Neurosci* 2006; 23(10): 2648-56.
- Dugue B, Leppanen E, Grasbeck R. Preanalytical factors and the measurement of cytokines in human subjects. *Int J Clin Lab Res* 1996; 26(2): 99-105.

Erta M, Quintana A, Hidalgo J. Interleukin-6, a major cytokine in the central nervous system. *Int J Biol Sci* 2012; 8(9): 1254-66.

Fazekas F, Chawluk J, Alavi A, Hurtig H, Zimmerman R. MRI signal abnormalities at 1.5 T in Alzheimer's dementia and normal aging. *AJNR Am J Neuroradiol* 1987; 421–426: 421–6.

Fischl B, Dale AM. Measuring the thickness of the human cerebral cortex from magnetic resonance images. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97(20): 11050-5.

Fischl B, Salat DH, Busa E, Albert M, Dieterich M, Haselgrove C, *et al.* Whole brain segmentation: automated labeling of neuroanatomical structures in the human brain. *Neuron* 2002; 33(3): 341-55.

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. England*; 1975. p. 189-98.

Gemma C, Bickford PC. Interleukin-1beta and caspase-1: players in the regulation of age-related cognitive dysfunction. *Rev Neurosci* 2007; 18(2): 137-48.

Ghosh S, Wu MD, Shafteel SS, Kyrkanides S, LaFerla FM, Olschowka JA, *et al.* Sustained interleukin-1beta overexpression exacerbates tau pathology despite reduced amyloid burden in an Alzheimer's mouse model. *J Neurosci* 2013; 33(11): 5053-64.

Greicius MD, Srivastava G, Reiss AL, Menon V. Default-mode network activity distinguishes Alzheimer's disease from healthy aging: evidence from functional MRI. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101(13): 4637-42.

Hachinski V, Iadecola C, Petersen RC, Breteler MM, Nyenhuis DL, Black SE, *et al.* National Institute of Neurological Disorders and Stroke-Canadian Stroke Network. *Stroke* 2006; 37(9): 2220-41.

Hakkoum D, Stoppini L, Muller D. Interleukin-6 promotes sprouting and functional recovery in lesioned organotypic hippocampal slice cultures. *J Neurochem* 2007; 100(3): 747-57.

Heneka MT, O'Banion MK. Inflammatory processes in Alzheimer's disease. *J Neuroimmunol* 2007; 184(1-2): 69-91.

- Heneka MT, Ramanathan M, Jacobs AH, Dumitrescu-Ozimek L, Bilkei-Gorzo A, Debeir T, *et al.* Locus ceruleus degeneration promotes Alzheimer pathogenesis in amyloid precursor protein 23 transgenic mice. *J Neurosci* 2006; 26(5): 1343-54.
- Holmes C, Cunningham C, Zotova E, Woolford J, Dean C, Kerr S, *et al.* Systemic inflammation and disease progression in Alzheimer disease. *Neurology* 2009; 73(10): 768-74.
- Huang Y, Mucke L. Alzheimer mechanisms and therapeutic strategies. *Cell*. United States: 2012 Elsevier Inc; 2012. p. 1204-22.
- Jankowsky JL, Patterson PH. Cytokine and growth factor involvement in long-term potentiation. *Mol Cell Neurosci* 1999; 14(6): 273-86.
- Johnston H, Boutin H, Allan SM. Assessing the contribution of inflammation in models of Alzheimer's disease. *Biochem Soc Trans* 2011; 39(4): 886-90.
- Kaplan E, Goodglass H, Weintraub S. The Boston Naming Test (2nd ed.) Philadelphia: Lea & Febiger; 1983.
- Kummer MP, Hammerschmidt T, Martinez A, Terwel D, Eichele G, Witten A, *et al.* Ear2 deletion causes early memory and learning deficits in APP/PS1 mice. *J Neurosci* 2014; 34(26): 8845-54.
- Li C, Zhao R, Gao K, Wei Z, Yin MY, Lau LT, *et al.* Astrocytes: implications for neuroinflammatory pathogenesis of Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res* 2011; 8(1): 67-80.
- Ma X, Yan W, Zheng H, Du Q, Zhang L, Ban Y, *et al.* Regulation of IL-10 and IL-12 production and function in macrophages and dendritic cells. *F1000Res* 2015; 4.
- Malloy-Diniz LF, Lasmar VA, Gazinelli Lde S, Fuentes D, Salgado JV. The Rey Auditory-Verbal Learning Test: applicability for the Brazilian elderly. *Rev Bras Psiquiatr* 2007; 29(4): 324-9.
- Matthews PM, Filippini N, Douaud G. Brain structural and functional connectivity and the progression of neuropathology in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 2013; 33 Suppl 1: S163-72.
- Mayeux R, Ottman R, Tang MX, Noboa-Bauza L, Marder K, Gurland B, *et al.* Genetic susceptibility and head injury as risk factors for Alzheimer's disease among

community-dwelling elderly persons and their first-degree relatives. *Ann Neurol* 1993; 33(5): 494-501.

McDermott MF. TNF and TNFR biology in health and disease. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 2001; 47(4): 619-35.

McGeer PL, Schulzer M, McGeer EG. Arthritis and anti-inflammatory agents as possible protective factors for Alzheimer's disease: a review of 17 epidemiologic studies. *Neurology* 1996; 47(2): 425-32.

McKhann GM. Changing concepts of Alzheimer disease. *JAMA*. United States; 2011. p. 2458-9.

Morris JC. The Clinical Dementia Rating (CDR): current version and scoring rules. *Neurology* 1993; 43(11): 2412-4.

Osterrieth P. The test of copying a complex figure: A contribution to the study of perception and memory *Arch Psychol* 1944; 30: 206 –356.

Perry RT, Collins JS, Wiener H, Acton R, Go RC. The role of TNF and its receptors in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 2001; 22(6): 873-83.

Ratcliff G. Spatial thought, mental rotation and the right cerebral hemisphere. *Neuropsychologia* 1979; 17(1): 49-54.

Reitan R. Validity of the Trail Making Test as an indicator of organic brain damage. *Percept Mot Skills* 1958; 8: 271–6.

Ringheim GE, Szczepanik AM, Petko W, Burgher KL, Zhu SZ, Chao CC. Enhancement of beta-amyloid precursor protein transcription and expression by the soluble interleukin-6 receptor/interleukin-6 complex. *Brain Res Mol Brain Res* 1998; 55(1): 35-44.

Rivera-Escalera F, Matousek SB, Ghosh S, Olschowka JA, O'Banion MK. Interleukin-1beta mediated amyloid plaque clearance is independent of CCR2 signaling in the APP/PS1 mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis* 2014; 69: 124-33.

Rogers J, Lue LF. Microglial chemotaxis, activation, and phagocytosis of amyloid beta-peptide as linked phenomena in Alzheimer's disease. *Neurochem Int* 2001; 39(5-6): 333-40.

- Rota E, Bellone G, Rocca P, Bergamasco B, Emanuelli G, Ferrero P. Increased intrathecal TGF-beta1, but not IL-12, IFN-gamma and IL-10 levels in Alzheimer's disease patients. *Neurol Sci* 2006; 27(1): 33-9.
- Rubio-Perez JM, Morillas-Ruiz JM. A review: inflammatory process in Alzheimer's disease, role of cytokines. *ScientificWorldJournal* 2012; 2012: 756357.
- Scheltens P, Blennow K, Breteler MM, de Strooper B, Frisoni GB, Salloway S, *et al.* Alzheimer's disease. *Lancet* 2016.
- Shaftel SS, Carlson TJ, Olschowka JA, Kyrkanides S, Matousek SB, O'Banion MK. Chronic interleukin-1beta expression in mouse brain leads to leukocyte infiltration and neutrophil-independent blood brain barrier permeability without overt neurodegeneration. *J Neurosci* 2007; 27(35): 9301-9.
- Stroop J. Studies of interference in serial verbal reactions. *Journal of Experimental Psychology* 1935; 18: 643–62.
- Sudduth TL, Schmitt FA, Nelson PT, Wilcock DM. Neuroinflammatory phenotype in early Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 2013; 34(4): 1051-9.
- Takeda S, Sato N, Morishita R. Systemic inflammation, blood-brain barrier vulnerability and cognitive/non-cognitive symptoms in Alzheimer disease: relevance to pathogenesis and therapy. *Front Aging Neurosci* 2014; 6.
- Tarkowski E, Andreasen N, Tarkowski A, Blennow K. Intrathecal inflammation precedes development of Alzheimer's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2003; 74(9): 1200-5.
- Villain N, Desgranges B, Viader F, de la Sayette V, Mezenge F, Landeau B, *et al.* Relationships between hippocampal atrophy, white matter disruption, and gray matter hypometabolism in Alzheimer's disease. *J Neurosci* 2008; 28(24): 6174-81.
- Vom Berg J, Prokop S, Miller KR, Obst J, Kalin RE, Lopategui-Cabezas I, *et al.* Inhibition of IL-12/IL-23 signaling reduces Alzheimer's disease-like pathology and cognitive decline. *Nat Med* 2012; 18(12): 1812-9.
- Wadhwa M, Thorpe R. Cytokine immunoassays: recommendations for standardisation, calibration and validation. *J Immunol Methods* 1998; 219(1-2): 1-5.

Weiler M, Fukuda A, Massabki LH, Lopes TM, Franco AR, Damasceno BP, *et al.* Default mode, executive function, and language functional connectivity networks are compromised in mild Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res* 2014; 11(3): 274-82.

Wyss-Coray T, Rogers J. Inflammation in Alzheimer disease-a brief review of the basic science and clinical literature. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2012; 2(1): a006346.

Xia M, Wang Z, Dai Z, Liang X, Song H, Shu N, *et al.* Differentially disrupted functional connectivity in posteromedial cortical subregions in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 2014; 39(3): 527-43.

Yamamoto M, Kiyota T, Horiba M, Buescher JL, Walsh SM, Gendelman HE, *et al.* Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha regulate amyloid-beta plaque deposition and beta-secretase expression in Swedish mutant APP transgenic mice. *Am J Pathol* 2007; 170(2): 680-92.

Zhu XC, Tan L, Jiang T, Tan MS, Zhang W, Yu JT. Association of IL-12A and IL-12B polymorphisms with Alzheimer's disease susceptibility in a Han Chinese population. *J Neuroimmunol* 2014; 274(1-2): 180-4.

5. DISCUSSÃO GERAL

Esse estudo se baseou na hipótese de que a inflamação sistêmica pode estar relacionada com os principais biomarcadores da DA (58, 69). Discutimos as vias de comunicação que podem ligar o cérebro e o sistema imunológico periférico (71, 75), assim como a relação entre os processos, mas não sabemos se a inflamação sistêmica é causa ou consequência da progressão e declínio cognitivo da doença. Inesperadamente, encontramos alguns resultados onde citocinas pró-inflamatórias se comportaram de maneira positiva, como no caso da IL-6, IL-12 e TNF- α e a citocina anti-inflamatória IL-10 apresentou-se associada com o nível diminuído de βA_{1-42} no LCR, mostrando que os pacientes com DA leve com detecção dessa citocina tem mais βA_{1-42} concentrada no cérebro.

Buscando entender esses resultados, encontramos na literatura estudos e experimentos que mostram que as citocinas, mesmo as pró-inflamatórias podem ter efeitos benéficos (102-105), em determinado nível, pois influenciam a atividade, a diferenciação, a proliferação e a sobrevivência das células imunológicas, assim como regulam a produção e a atividade de outras citocinas, mantendo a homeostase necessária para um organismo (106).

A sinalização das citocinas abordadas nesse estudo estimularia uma resposta imune periférica gerando a ativação e diferenciação de linfócitos, principalmente os linfócitos T, estes se diferenciam de acordo com sua função: citotóxicas (CD8) ou auxiliares (CD4), por exemplo. Os subtipos CD4 ajudam ou induzem a resposta imune (chamado de T *helper* ou Th) (107, 108). Os linfócitos Th se diferenciam em: Th-1, que media funções associadas com citotoxicidade e reações inflamatórias locais e Th-2, que mediam a estimulação, proliferação de células B e produção de anticorpos. Assim, estas células liberam mais citocinas pró-inflamatórias e/ou anti-inflamatórias, exacerbando e progredindo a doença (107). Monsonego e Weiner, 2003, detectaram grandes quantidades de células T reativas periféricas em torno das placas de βA em pacientes com DA, trabalharam com imunoterapia nesses pacientes e em modelos animais, encontrando efeitos benéficos e adversos (109).

As citocinas são mediadores necessários para conduzir a resposta inflamatória aos locais de infecção e lesão, no caso da DA, uma lesão neuronal causada pelas placas senis contendo βA e pelos emaranhados neurofibrilares (55). No entanto, a produção excessiva de citocinas pró-inflamatórias a partir da lesão pode manifestar-se sistemicamente com instabilidade hemodinâmica ou distúrbios metabólicos. Após lesões, a resposta exacerbada e persistente de citocinas pode contribuir para mais lesões no órgão-alvo, levando a piora do quadro patológico e progressão da doença (106, 110). Como não sabemos se a neuroinflamação é causa da

inflamação sistêmica, podemos dizer também que o indivíduo com uma inflamação crônica poderia induzir essas lesões neurais antes mesmo do surgimento das placas e dos emaranhados.

O estudo de Chakrabarty *et al* (2010), realizado em modelos animais, mostrou um papel benéfico da IL-6, onde sua expressão atenuou a deposição de βA e regulou os mercados fagocíticos da glia *in vivo*, e aumentou a ação fagocítica da micróglia em agregados de βA *in vitro* (104). A IL-6 mostrou também ter um papel na neurogênese (111, 112), promovendo a germinação e recuperação funcional após lesão das culturas de células do hipocampo *in vitro* de modelos animais (113). Esses estudos podem explicar em parte nossos resultados envolvendo a detecção de IL-6: o hipocampo está mais preservado nos nossos pacientes com demência da DA leve, enquanto os pacientes com CCLa apresentaram aumento da CF.

Outro estudo corroborando nossos resultados, foi o estudo de Ma *et al*, 2015, que relacionou a IL-12 e IL-10. A IL-12 pode induzir a produção de IL-10, citocina anti-inflamatória. No estudo, a administração repetida de IL-12 em doentes com câncer poderia contribuir para aumentar as propriedades imunossupressoras do tumor por meio da indução de IL-10 (114). Os nossos pacientes com DA leve com detecção dessas citocinas apresentaram um maior volume hipocampal, mas a CF na região do hipocampo diminuiu. Este volume do hipocampo maior pode indicar um papel protetor da IL-10, podendo explicar um possível envolvimento com a IL-12. No entanto, os pacientes com demência da DA leve IL-10 + apresentaram diminuição dos níveis de βA_{1-42} no LCR e diminuição da CF na região do hipocampo, o que indica mais danos do que os IL 10 -. Estes resultados poderiam implicar que o início da produção de IL-10 ocorre quando a patologia ainda não afetou anatomicamente o hipocampo. Este mecanismo de interação entre IL-12 e IL-10 poderia ser investigado em estudos futuros.

Embora o papel da IL-12 na doença de Alzheimer não tenha sido extensivamente estudado, esta IL pode ser produzida em monócitos periféricos devido a estimulação de βA (115). A IL-12 é uma citocina heterodímera (p70) formada por subunidade p35 ou IL-12A e p40 ou IL-12B. Os polimorfismos de IL-12 estão relacionados com a susceptibilidade para o desenvolvimento de DA esporádica. Zhu *et al*. (2014), por exemplo, em um estudo com um grande número amostral, verificou relação entre as subunidades de IL-12 com risco genético em pacientes com DA e controles. Observaram que os pacientes que apresentaram a subunidade IL-12B ou p40 mostraram uma maior susceptibilidade de desenvolver a doença (105). Vom Berg *et al*. (2012) verificaram que a micróglia em modelo de ratos transgênicos com DA, expressaram níveis elevados de IL-12 p70 e inibição de IL-12 p40 o que reduziu significativamente a concentração

de βA , revertendo déficits cognitivos (116). Isso pode explicar em partes nossos achados, aparentemente benéficos em relação a IL-12 nos nossos pacientes, já que no artigo trabalhamos com a sua forma heterodimera (p70).

Como vimos também, descrito no artigo, no que diz respeito à detecção de TNF- α , não encontramos diferenças na proporção dos níveis séricos entre os três grupos. No entanto, considerando os pacientes que detectamos TNF- α *versus* os que não detectamos, os grupos CCLa e DA apresentaram um padrão oposto da CF. Enquanto pacientes com DA que detectamos TNF- α tiveram diminuição na CF, o grupo CCLa apresentou aumento na CF. O TNF- α é uma citocina pró-inflamatória, que pode iniciar uma cascata de ativação de outras citocinas e fatores tróficos (117). Pode ser secretada em quantidades mais elevadas pela micróglia na DA (118). Outros autores (119-121) observaram um aumento na expressão de TNF- α em torno de placas amiloides no cérebro de humanos e de modelos animais. O TNF- α pode regular a β -secretase que por sua vez regula a produção de βA (120), uma possível explicação do porquê que nos nossos pacientes com CCLa mostraram um aumento da conectividade, talvez um mecanismo de compensação, evitando a progressão da doença. Já nos pacientes com DA leve que apresentaram elevações de TNF- α no soro, uma inflamação a longo prazo causaria o declínio cognitivo (121).

Ressaltando então, não é claro se a inflamação sistêmica afeta os principais processos fisiopatológicos da doença e também se as citocinas podem ser utilizadas como biomarcadores potenciais periféricos da doença. Não seria também um único mediador, mas um conjunto de agentes inflamatórios que determinarão a prevalência de efeitos deletérios ou benéficos durante a evolução da DA, pois os mecanismos inflamatórios são altamente interativos e quase nunca ocorrem isoladamente uns dos outros.

Nosso estudo tem limitações, primeiro, o número relativamente pequeno de indivíduos inter e intra grupos, uma vez que, segundo alguns autores, grandes populações são necessárias para detectar mudanças significativas na quantificação de citocinas. Em segundo lugar, embora se tenha usado um método sólido para detectar a concentração de citocinas a citometria de fluxo, a maior parte delas não foram detectadas, talvez porque elas não foram produzidas pelos indivíduos ou talvez pela sensibilidade do kit. Pode ser tecnicamente difícil a medição de citocinas no sangue por causa de baixas concentrações séricas e a rápida degradação destas proteínas por proteases de plasma. Além disso, a interferência no ensaio pode ocorrer por causa da enorme quantidade de proteínas da matriz no sangue (122). Apesar das limitações, o presente estudo tem o mérito de combinar os principais biomarcadores de DA com inflamação sistêmica.

Podemos especular que o cérebro dos indivíduos com CCLa estaria compensando as alterações inflamatórias iniciais, aumentando a conectividade. O cérebro dos pacientes com DA, numa fase de doença mais evoluída, não seria capaz de realizar corretamente este mecanismo de compensação, apresentando, assim, uma diminuição da CF.

6. CONCLUSÃO

Encontramos possíveis relações entre a inflamação e os principais biomarcadores da DA. Tanto quanto sabemos, este é o primeiro estudo a mostrar mudanças na CF considerando a detecção de citocinas no espectro de DA. Além disso, encontramos um padrão oposto nas medidas de CF entre os pacientes com DA e com CCLa nos quais detectamos a presença de citocinas: enquanto o grupo CCLa teve um aumento da CF, os pacientes com DA leve tiveram diminuição da CF.

7. REFERÊNCIAS

1. Di Rosa M, Dell'Ombra N, Zambito AM, Malaguarnera M, Nicoletti F, Malaguarnera L. Chitotriosidase and inflammatory mediator levels in Alzheimer's disease and cerebrovascular dementia. *Eur J Neurosci*. 2006;23(10):2648-56.
2. Herrera E, Jr., Caramelli P, Silveira AS, Nitrini R. Epidemiologic survey of dementia in a community-dwelling Brazilian population. *Alzheimer Dis Assoc Disord*. 2002;16(2):103-8.
3. Caramelli P, Barbosa MT, Sakurai E, Dos Santos EL, Beato RG, Machado JC, et al. The Pieta study: epidemiological investigation on successful brain aging in Caete (MG), Brazil. Methods and baseline cohort characteristics. *Arq Neuropsiquiatr*. 2011;69(4):579-84.
4. Barbosa MT, Caramelli P, Maia DP, Cunningham MC, Guerra HL, Lima-Costa MF, et al. Parkinsonism and Parkinson's disease in the elderly: a community-based survey in Brazil (the Bambui study). *Mov Disord*. 2006;21(6):800-8.
5. Blay SL, Andreoli SB, Fillenbaum GG, Gastal FL. Depression morbidity in later life: prevalence and correlates in a developing country. *Am J Geriatr Psychiatry*. 2007;15(9):790-9.
6. Xu J, Kochanek KD, Murphy SL, Tejada-Vera B. Deaths: final data for 2007. *Natl Vital Stat Rep*. 2010;58(19):1-19.
7. Hebert LE, Weuve J, Scherr PA, Evans DA. Alzheimer disease in the United States (2010-2050) estimated using the 2010 census. *Neurology*. 2013;80(19):1778-83.
8. 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.
9. 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.
10. Selkoe DJ. Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol Rev*. 2001;81(2):741-66.
11. Fagan AM, Mintun MA, Mach RH, Lee SY, Dence CS, Shah AR, et al. Inverse relation between in vivo amyloid imaging load and cerebrospinal fluid Abeta42 in humans. *Ann Neurol*. 2006;59(3):512-9.
12. Jack CR, Jr., Knopman DS, Jagust WJ, Shaw LM, Aisen PS, Weiner MW, et al. Hypothetical model of dynamic biomarkers of the Alzheimer's pathological cascade. *Lancet Neurol*. 2010;9(1):119-28.
13. Hansson O, Zetterberg H, Buchhave P, Londos E, Blennow K, Minthon L. Association between CSF biomarkers and incipient Alzheimer's disease in patients with mild cognitive impairment: a follow-up study. *Lancet Neurol*. 2006;5(3):228-34.
14. Perl DP. Neuropathology of Alzheimer's disease. *Mt Sinai J Med*. 2010;77(1):32-42.
15. Di Luca M, Colciaghi F, Pastorino L, Borroni B, Padovani A, Cattabeni F. Platelets as a peripheral district where to study pathogenetic mechanisms of alzheimer disease: the case of amyloid precursor protein. *Eur J Pharmacol*. 2000;405(1-3):277-83.
16. LaFerla FM, Green KN, Oddo S. Intracellular amyloid-beta in Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci*. 2007;8(7):499-509.
17. Hemming ML, Selkoe DJ. Amyloid beta-protein is degraded by cellular angiotensin-converting enzyme (ACE) and elevated by an ACE inhibitor. *J Biol Chem*. 2005;280(45):37644-50.

18. Zhang Y, McLaughlin R, Goodyer C, LeBlanc A. Selective cytotoxicity of intracellular amyloid beta peptide 1-42 through p53 and Bax in cultured primary human neurons. *J Cell Biol.* 2002;156(3):519-29.
19. Hardy J, Selkoe DJ. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science.* 2002;297(5580):353-6.
20. 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.
21. Walsh DM, Selkoe DJ. A beta oligomers - a decade of discovery. *J Neurochem.* 2007;101(5):1172-84.
22. Zhu X, Avila J, Perry G, Smith MA. Treating the lesions, not the disease. *Am J Pathol.* 2007;170(5):1457-9.
23. Duyckaerts C, Delatour B, Potier MC. Classification and basic pathology of Alzheimer disease. *Acta Neuropathol.* 2009;118(1):5-36.
24. Kamenetz F, Tomita T, Hsieh H, Seabrook G, Borchelt D, Iwatsubo T, et al. APP processing and synaptic function. *Neuron.* 2003;37(6):925-37.
25. Blennow K, de Leon MJ, Zetterberg H. Alzheimer's disease. *Lancet.* 2006;368(9533):387-403.
26. Lindwall G, Cole RD. Phosphorylation affects the ability of tau protein to promote microtubule assembly. *J Biol Chem.* 1984;259(8):5301-5.
27. Kosik KS. The molecular and cellular biology of tau. *Brain Pathol.* 1993;3(1):39-43.
28. Cleveland DW, Hoffman PN. Neuronal and glial cytoskeletons. *Curr Opin Neurobiol.* 1991;1(3):346-53.
29. 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.
30. Lovestone S, Francis P, Kloszewska I, Mecocci P, Simmons A, Soininen H, et al. AddNeuroMed--the European collaboration for the discovery of novel biomarkers for Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci.* 2009;1180:36-46.
31. Apostolova LG, Mosconi L, Thompson PM, Green AE, Hwang KS, Ramirez A, et al. Subregional hippocampal atrophy predicts Alzheimer's dementia in the cognitively normal. *Neurobiol Aging.* 2010;31(7):1077-88.
32. Nestor SM, Rupsingh R, Borrie M, Smith M, Accomazzi V, Wells JL, et al. Ventricular enlargement as a possible measure of Alzheimer's disease progression validated using the Alzheimer's disease neuroimaging initiative database. *Brain.* 2008;131(Pt 9):2443-54.
33. Desikan RS, Cabral HJ, Hess CP, Dillon WP, Glastonbury CM, Weiner MW, et al. Automated MRI measures identify individuals with mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Brain.* 2009;132(Pt 8):2048-57.
34. 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.
35. Frisoni GB, Fox NC, Jack CR, Jr., Scheltens P, Thompson PM. The clinical use of structural MRI in Alzheimer disease. *Nat Rev Neurol.* 2010;6(2):67-77.
36. Hoffman JM, Welsh-Bohmer KA, Hanson M, Crain B, Hulette C, Earl N, et al. FDG PET imaging in patients with pathologically verified dementia. *J Nucl Med.* 2000;41(11):1920-8.
37. Read SL, Miller BL, Mena I, Kim R, Itabashi H, Darby A. SPECT in dementia: clinical and pathological correlation. *J Am Geriatr Soc.* 1995;43(11):1243-7.
38. Buchpiguel CA, Mathias SC, Itaya LY, Barros NG, Portela LA, Freitas JM, et al. Brain SPECT in dementia. A clinical-scintigraphic correlation. *Arq Neuropsiquiatr.* 1996;54(3):375-83.

39. Weiler M, Fukuda A, Massabki LH, Lopes TM, Franco AR, Damasceno BP, et al. Default mode, executive function, and language functional connectivity networks are compromised in mild Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res.* 2014;11(3):274-82.
40. Greicius MD, Srivastava G, Reiss AL, Menon V. Default-mode network activity distinguishes Alzheimer's disease from healthy aging: evidence from functional MRI. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(13):4637-42.
41. 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.
42. Xia M, Wang Z, Dai Z, Liang X, Song H, Shu N, et al. Differentially disrupted functional connectivity in posteromedial cortical subregions in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis.* 2014;39(3):527-43.
43. 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.
44. Fox MD, Raichle ME. Spontaneous fluctuations in brain activity observed with functional magnetic resonance imaging. *Nat Rev Neurosci.* 2007;8(9):700-11.
45. Deshpande G, Santhanam P, Hu X. Instantaneous and causal connectivity in resting state brain networks derived from functional MRI data. *Neuroimage.* 2011;54(2):1043-52.
46. van den Heuvel MP, Hulshoff Pol HE. Exploring the brain network: a review on resting-state fMRI functional connectivity. *Eur Neuropsychopharmacol.* 2010;20(8):519-34.
47. Villain N, Desgranges B, Viader F, de la Sayette V, Mezenge F, Landeau B, et al. Relationships between hippocampal atrophy, white matter disruption, and gray matter hypometabolism in Alzheimer's disease. *J Neurosci.* 2008;28(24):6174-81.
48. Matthews PM, Filippini N, Douaud G. Brain structural and functional connectivity and the progression of neuropathology in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis.* 2013;33 Suppl 1:S163-72.
49. 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.
50. Andersson JLR, Jenkinson M, Smith S. Non-linear registration, aka Spatial normalisation. FMRIB technical report TR07JA1 [Internet]. 2007.
51. Reiber H, Peter JB. Cerebrospinal fluid analysis: disease-related data patterns and evaluation programs. *J Neurol Sci.* 2001;184(2):101-22.
52. Craig-Schapiro R, Fagan AM, Holtzman DM. Biomarkers of Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis.* 2009;35(2):128-40.
53. Hampel H, Burger K, Teipel SJ, Bokde AL, Zetterberg H, Blennow K. Core candidate neurochemical and imaging biomarkers of Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement.* 2008;4(1):38-48.
54. Song F, Poljak A, Smythe GA, Sachdev P. Plasma biomarkers for mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Brain Res Rev.* 2009;61(2):69-80.
55. Allan SM, Rothwell NJ. Inflammation in central nervous system injury. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2003;358(1438):1669-77.
56. Fiala M, Zhang L, Gan X, Sherry B, Taub D, Graves MC, et al. Amyloid-beta induces chemokine secretion and monocyte migration across a human blood--brain barrier model. *Mol Med.* 1998;4(7):480-9.
57. Eikelenboom P, Veerhuis R, Scheper W, Rozemuller AJ, van Gool WA, Hoozemans JJ. The significance of neuroinflammation in understanding Alzheimer's disease. *J Neural Transm.* 2006;113(11):1685-95.

58. Bhamra MS, Ashton NJ. Finding a pathological diagnosis for Alzheimer's disease: are inflammatory molecules the answer? *Electrophoresis*. 2012;33(24):3598-607.
59. Jankowsky JL, Patterson PH. Cytokine and growth factor involvement in long-term potentiation. *Mol Cell Neurosci*. 1999;14(6):273-86.
60. DeLeo JA, Yeziarski RP. The role of neuroinflammation and neuroimmune activation in persistent pain. *Pain*. 2001;90(1-2):1-6.
61. Gemma C, Bickford PC. Interleukin-1beta and caspase-1: players in the regulation of age-related cognitive dysfunction. *Rev Neurosci*. 2007;18(2):137-48.
62. Kummer MP, Hammerschmidt T, Martinez A, Terwel D, Eichele G, Witten A, et al. Ear2 deletion causes early memory and learning deficits in APP/PS1 mice. *J Neurosci*. 2014;34(26):8845-54.
63. Tarkowski E, Andreasen N, Tarkowski A, Blennow K. Intrathecal inflammation precedes development of Alzheimer's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2003;74(9):1200-5.
64. Johnston H, Boutin H, Allan SM. Assessing the contribution of inflammation in models of Alzheimer's disease. *Biochem Soc Trans*. 2011;39(4):886-90.
65. Bossu P, Ciarabella A, Salani F, Bizzoni F, Varsi E, Di Iulio F, et al. Interleukin-18 produced by peripheral blood cells is increased in Alzheimer's disease and correlates with cognitive impairment. *Brain Behav Immun*. 2008;22(4):487-92.
66. Rubio-Perez JM, Morillas-Ruiz JM. A review: inflammatory process in Alzheimer's disease, role of cytokines. *ScientificWorldJournal*. 2012;2012:756357.
67. Walker DG, Dalsing-Hernandez JE, Campbell NA, Lue LF. Decreased expression of CD200 and CD200 receptor in Alzheimer's disease: a potential mechanism leading to chronic inflammation. *Exp Neurol*. 215. United States2009. p. 5-19.
68. Heneka MT, O'Banion MK. Inflammatory processes in Alzheimer's disease. *J Neuroimmunol*. 2007;184(1-2):69-91.
69. Akiyama H, Barger S, Barnum S, Bradt B, Bauer J, Cole GM, et al. Inflammation and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 21. United States2000. p. 383-421.
70. McGeer PL, Schulzer M, McGeer EG. Arthritis and anti-inflammatory agents as possible protective factors for Alzheimer's disease: a review of 17 epidemiologic studies. *Neurology*. 1996;47(2):425-32.
71. Takeda S, Sato N, Morishita R. Systemic inflammation, blood-brain barrier vulnerability and cognitive/non-cognitive symptoms in Alzheimer disease: relevance to pathogenesis and therapy. *Front Aging Neurosci*. 2014;6.
72. Sommer C, Kress M. Recent findings on how proinflammatory cytokines cause pain: peripheral mechanisms in inflammatory and neuropathic hyperalgesia. *Neurosci Lett*. 2004;361(1-3):184-7.
73. Zipser BD, Johanson CE, Gonzalez L, Berzin TM, Tavares R, Hulette CM, et al. Microvascular injury and blood-brain barrier leakage in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 2007;28(7):977-86.
74. Banks WA. Characteristics of compounds that cross the blood-brain barrier. *BMC Neurol*. 2009;9 Suppl 1:S3.
75. Banks WA. Blood-brain barrier as a regulatory interface. *Forum Nutr*. 2010;63:102-10.
76. Li C, Zhao R, Gao K, Wei Z, Yin MY, Lau LT, et al. Astrocytes: implications for neuroinflammatory pathogenesis of Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res*. 2011;8(1):67-80.
77. Sudduth TL, Schmitt FA, Nelson PT, Wilcock DM. Neuroinflammatory phenotype in early Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 2013;34(4):1051-9.

78. Louveau A, Smirnov I, Keyes TJ, Eccles JD, Rouhani SJ, Peske JD, et al. Corrigendum: Structural and functional features of central nervous system lymphatic vessels. *Nature*. 533. England 2016. p. 278.
79. Franceschi C, Capri M, Monti D, Giunta S, Olivieri F, Sevini F, et al. Inflammaging and anti-inflammaging: a systemic perspective on aging and longevity emerged from studies in humans. *Mech Ageing Dev*. 2007;128(1):92-105.
80. Giunta B, Fernandez F, Nikolic WV, Obregon D, Rrapo E, Town T, et al. Inflammaging as a prodrome to Alzheimer's disease. *J Neuroinflammation*. 2008;5:51.
81. Dev SI, Moore RC, Soontornniyomkij B, Achim CL, Jeste DV, Eyler LT. Peripheral inflammation related to lower fMRI activation during a working memory task and resting functional connectivity among older adults: a preliminary study. *Int J Geriatr Psychiatry*. 2016.
82. 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.
83. Morris JC. The Clinical Dementia Rating (CDR): current version and scoring rules. *Neurology*. 1993;43(11):2412-4.
84. 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*. 68. United States 2007. p. 828-36.
85. 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.
86. 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.
87. 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.
88. 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.
89. 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.
90. Cummings JL. The Neuropsychiatric Inventory: assessing psychopathology in dementia patients. *Neurology*. 1997;48(5 Suppl 6):S10-6.
91. Pfeffer RI, Kurosaki TT, Harrah CH, Jr., Chance JM, Filos S. Measurement of functional activities in older adults in the community. *J Gerontol*. 1982;37(3):323-9.
92. Planas AM, Chamorro A. Regulatory T cells protect the brain after stroke. *Nat Med*. 15. United States 2009. p. 138-9.
93. 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.
94. Fagan AM, Head D, Shah AR, Marcus D, Mintun M, Morris JC, et al. Decreased cerebrospinal fluid Abeta(42) correlates with brain atrophy in cognitively normal elderly. *Ann Neurol*. 2009;65(2):176-83.
95. Jun G, Naj AC, Beecham GW, Wang LS, Buross J, Gallins PJ, et al. Meta-analysis confirms CR1, CLU, and PICALM as Alzheimer disease risk loci and reveals interactions with APOE genotypes. *Arch Neurol*. 2010;67(12):1473-84.

96. Frenkel D, Huang Z, Maron R, Koldzic DN, Hancock WW, Moskowitz MA, et al. Nasal vaccination with myelin oligodendrocyte glycoprotein reduces stroke size by inducing IL-10-producing CD4+ T cells. *J Immunol.* 2003;171(12):6549-55.
97. Kaplan E, Goodglass H, Weintraub S. The Boston Naming Test. In: Febiger L, editor. 2nd edition ed. Philadelphia 1983.
98. Christensen A-L. Luria's Neuropsychological Investigation, Manual and Test Material. 4th ed ed. Copenhagen: Munksgaard; 1975.
99. Murphy PM, Baggiolini M, Charo IF, Hebert CA, Horuk R, Matsushima K, et al. International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors. *Arch Psychol Pharmacol Rev.* 2000;52(1):145-76.
100. Fischl B, Dale AM. Measuring the thickness of the human cerebral cortex from magnetic resonance images. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97(20):11050-5.
101. Cerasa A, Messina D, Nicoletti G, Novellino F, Lanza P, Condino F, et al. Cerebellar atrophy in essential tremor using an automated segmentation method. *AJNR Am J Neuroradiol.* 2009;30(6):1240-3.
102. Azizi G, Mirshafiey A. The potential role of proinflammatory and antiinflammatory cytokines in Alzheimer disease pathogenesis. *Immunopharmacol Immunotoxicol.* 2012;34(6):881-95.
103. Das S, Basu A. Inflammation: a new candidate in modulating adult neurogenesis. *J Neurosci Res.* 2008;86(6):1199-208.
104. Chakrabarty P, Jansen-West K, Beccard A, Ceballos-Diaz C, Levites Y, Verbeeck C, et al. Massive gliosis induced by interleukin-6 suppresses Abeta deposition in vivo: evidence against inflammation as a driving force for amyloid deposition. *Faseb j.* 2010;24(2):548-59.
105. Zhu XC, Tan L, Jiang T, Tan MS, Zhang W, Yu JT. Association of IL-12A and IL-12B polymorphisms with Alzheimer's disease susceptibility in a Han Chinese population. *J Neuroimmunol.* 2014;274(1-2):180-4.
106. Lin E, Calvano SE, Lowry SF. Inflammatory cytokines and cell response in surgery. *Surgery.* 2000;127(2):117-26.
107. Germain RN. T-cell development and the CD4-CD8 lineage decision. *Nat Rev Immunol.* 2002;2(5):309-22.
108. MacDonald HR, Radtke F, Wilson A. T cell fate specification and alphabeta/gammadelta lineage commitment. *Curr Opin Immunol.* 2001;13(2):219-24.
109. Monsonogo A, Weiner HL. Immunotherapeutic approaches to Alzheimer's disease. *Science.* 2003;302(5646):834-8.
110. Zhang JM, An J. Cytokines, inflammation, and pain. *Int Anesthesiol Clin.* 2007;45(2):27-37.
111. Bauer S, Kerr BJ, Patterson PH. The neuropoietic cytokine family in development, plasticity, disease and injury. *Nat Rev Neurosci.* 2007;8(3):221-32.
112. Deverman BE, Patterson PH. Cytokines and CNS development. *Neuron.* 2009;64(1):61-78.
113. Hakkoum D, Stoppini L, Muller D. Interleukin-6 promotes sprouting and functional recovery in lesioned organotypic hippocampal slice cultures. *J Neurochem.* 2007;100(3):747-57.
114. Ma X, Yan W, Zheng H, Du Q, Zhang L, Ban Y, et al. Regulation of IL-10 and IL-12 production and function in macrophages and dendritic cells. *F1000Res.* 2015;4.
115. Rota E, Bellone G, Rocca P, Bergamasco B, Emanuelli G, Ferrero P. Increased intrathecal TGF-beta1, but not IL-12, IFN-gamma and IL-10 levels in Alzheimer's disease patients. *Neurol Sci.* 2006;27(1):33-9.

116. Vom Berg J, Prokop S, Miller KR, Obst J, Kalin RE, Lopategui-Cabezas I, et al. Inhibition of IL-12/IL-23 signaling reduces Alzheimer's disease-like pathology and cognitive decline. *Nat Med*. 2012;18(12):1812-9.
117. McDermott MF. TNF and TNFR biology in health and disease. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*. 2001;47(4):619-35.
118. Rogers J, Lue LF. Microglial chemotaxis, activation, and phagocytosis of amyloid beta-peptide as linked phenomena in Alzheimer's disease. *Neurochem Int*. 2001;39(5-6):333-40.
119. Perry RT, Collins JS, Wiener H, Acton R, Go RC. The role of TNF and its receptors in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 2001;22(6):873-83.
120. Yamamoto M, Kiyota T, Horiba M, Buescher JL, Walsh SM, Gendelman HE, et al. Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha regulate amyloid-beta plaque deposition and beta-secretase expression in Swedish mutant APP transgenic mice. *Am J Pathol*. 2007;170(2):680-92.
121. Holmes C, Cunningham C, Zotova E, Woolford J, Dean C, Kerr S, et al. Systemic inflammation and disease progression in Alzheimer disease. *Neurology*. 2009;73(10):768-74.
122. Scheltens P, Blennow K, Breteler MM, de Strooper B, Frisoni GB, Salloway S, et al. Alzheimer's disease. *Lancet*. 2016.

8. ANEXO

FACULDADE DE CIENCIAS
MEDICAS - UNICAMP
(CAMPUS CAMPINAS)



**PARECER
CEP**

CONSUBSTANCIADO

DO

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Biomarcadores na doença de Alzheimer e Comprometimento Cognitivo Leve: estudo de métodos de Ressonância Magnética funcional e marcadores líquidos e plasmáticos

Pesquisador: Marcio Luiz Figueredo Balthazar

Área Temática: Área 1. Genética Humana.
(Trata-se de pesquisa envolvendo genética humana não contemplada acima.);

Versão: 2

CAAE: 09634412.5.0000.5404

Instituição Proponente: Hospital de Clínicas - UNICAMP

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 188.021

Data da Relatoria: 19/12/2012

Apresentação do Projeto:

O pesquisador esclarece que a doença de Alzheimer (DA) é uma das condições clínicas que mais têm aumentado sua prevalência, sobretudo pelo envelhecimento da população. É também, dentre as doenças mais prevalentes, aquela que não tem prevenção efetiva ou tratamento eficaz. Assim, um dos aspectos mais relevantes em relação à pesquisa da DA é o desenvolvimento de biomarcadores que possam caracterizar esta doença de forma precoce, visando um melhor manejo com os fármacos atuais e com a perspectiva de surgimento de novas drogas que possam interferir na sua história natural. Os critérios mais recentes para diagnóstico da DA (NIA- Alzheimer's Association 2011) já incluem alguns biomarcadores, o que torna imperativo o seu estudo em nosso país. A Ressonância Magnética funcional é um método com alto potencial para tornar-se um biomarcador de imagem, com a utilização do método sem tarefa cognitiva (conectividade funcional intrínseca), no qual é possível identificar a integridade de conexão de determinadas redes neurofuncionais. Pretende-se correlacionar este método com neuroimagem estrutural (volumetria, morfometria baseada em voxels, tratografia, espessura cortical). Todos estes dados

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

Bairro: Barão Geraldo

CEP: 13.083-887

UF: SP

Município: CAMPINAS

Telefone: (19)3521-8936

Fax: (19)3521-7187

E-mail: cep@fcm.unicamp.br

**FACULDADE DE CIENCIAS
MEDICAS - UNICAMP
(CAMPUS CAMPINAS)**



serão avaliados em conjunto com variáveis cognitivas, neuropsiquiátricas e funcionais. Este projeto caracteriza uma nova linha de pesquisa em nossa Instituição e pode contribuir de forma importante para a criação de uma rede nacional de neuroimagem na DA nos moldes da ADNI, que existe nos EUA, Europa e Japão.

Objetivo da Pesquisa:

(1) Comparar a dosagem em LCR de β A40, β A42 e proteína t-tau e p-tau, assim como a razão entre elas, em pacientes com demência na DA - fase leve, pacientes com CCLa ;(2) Comparar a dosagem em plasma e LCR de IL-1, IL-6, IL-10, IL-12, IL-18, a-TNF, α 1-antiquimotripsina e TGF β em pacientes com DDA leve e pacientes com CCLa. Compararemos também a dosagem plasmática em idosos normais APOE4 + e APOE4 -;(3) Verificar se há correlação entre os dados dos itens (1) e (2) com o desempenho cognitivo, neuropsiquiátrico e funcional nos grupos, considerando o Mini-Exame do Estado Mental (MEEM), o Teste de Aprendizado Auditivo-Verbal de Rey (TAAVR), o inventário neuropsiquiátrico e a Escala Clínica de Demência;(4) Comparar os grupos quanto aos dados de RM estrutural (densidade de substância cinzenta e espessura cortical) e funcional em espaço nativo (grau de conectividade funcional intrínseca da Default Mode Network e Salience Network); (5) Desenvolver algoritmos que levem em conta os dados neuropsicológicos (memória episódica), de neuroimagem e biomarcadores em LCR e plasma visando classificar os indivíduos de forma automatizada dentro de cada grupo.(6) Acompanhar longitudinalmente o padrão de conectividade funcional da DMN e a dosagem das provas inflamatórias em plasma nos idosos normais APOE4+ e CCLa, repetindo o exame de RMf e plasma a cada 6 meses.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os exames propostos neste projeto são seguros e utilizados de forma rotineira na prática clínica neurológica. Os desconfortos previstos compreendem a punção lombar (realizada com anestesia local por profissional treinado e devidamente habilitado), o exame de ressonância magnética (ruído intermitente durante os primeiros 15 minutos) e a coleta de sangue para os estudos bioquímicos e de genética molecular. Não haverá benefícios diretos aos sujeitos de pesquisa, sendo que o estudo deverá resultar em benefícios sociais pela construção do conhecimento como um todo.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O projeto tem financiamento FAPESP (modalidade JP), para início em Abril de 2013. Tem potencial para trazer benefícios futuros aos pacientes portadores de doença de Alzheimer.

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

Bairro: Barão Geraldo

CEP: 13.083-887

UF: SP

Município: CAMPINAS

Telefone: (19)3521-8936

Fax: (19)3521-7187

E-mail: cep@fcm.unicamp.br

**FACULDADE DE CIENCIAS
MEDICAS - UNICAMP
(CAMPUS CAMPINAS)**



Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O projeto de pesquisa gerado pela Plataforma Brasil contém todos os itens adequadamente preenchidos, incluindo cronograma e orçamento detalhado, citando como fonte de financiamento da FAPESP.

A folha de rosto foi assinada pelo pesquisador principal e pelo responsável da proponente (superintendente do HC/Unicamp), complementada por carta de esclarecimento da FAPESP no que se refere ao "patrocinador" do estudo. Foram apresentados dois modelos de TCLE, um aos pacientes e outro aos indivíduos controle, com detalhamento do estudo. As recomendações do parecer consubstanciado foram atendidas

Recomendações:

1. Lembramos que o TCLE deve ser elaborado em duas vias, sendo uma retida pelo sujeito da pesquisa ou por seu representante legal e uma arquivada pelo pesquisador (resolução 196/96 CNS/MS, artigo IV.2 *cd*).
2. Se o TCLE tiver mais de uma página, o sujeito de pesquisa ou seu representante, quando for o caso, e o pesquisador responsável deverão rubricar todas as folhas desse documento, apondo suas assinaturas na última página do referido termo (Carta Circular nº. 003/2011/CONEP/CNS).

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovado após resposta a pendências.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

CAMPINAS, 23 de
Janeiro de 2013

Assinador por:
Carlos Eduardo Steiner
(Coordenador)

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

Bairro: Barão Geraldo

UF: SP

Município: CAMPINAS

CEP: 13.083-887

Telefone: (19)3521-8936

Fax: (19)3521-7187

E-mail: cep@fcm.unicamp.br