

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Faculdade de Medicina

Programa de Pós-Graduação em Medicina Molecular

Erika de Oliveira Hansen Pôrto

**PERFIL DE BIOMARCADORES NO LÍQUIDO CEFALORRAQUIDIANO DE
IDOSOS SEM COMPROMETIMENTO COGNITIVO OBJETIVO E COM DOENÇA
DE ALZHEIMER - COMPROMETIMENTO COGNITIVO LEVE AMNÉSTICO E
DEMÊNCIA**

Belo Horizonte

2021

Erika de Oliveira Hansen

**PERFIL DE BIOMARCADORES NO LÍQUIDO CEFALORRAQUIDIANO DE
IDOSOS SEM COMPROMETIMENTO COGNITIVO OBJETIVO E COM DOENÇA
DE ALZHEIMER - COMPROMETIMENTO COGNITIVO LEVE AMNÉSICO E
DEMÊNCIA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Medicina Molecular da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito para a obtenção do título de mestre em Medicina.

Orientadora: Professora Dra. Maria Aparecida Camargos Bicalho.

Coorientador: Dra. Daniela Valadão Freitas Rosa.

Professor Dr. Bernardo de Mattos Viana

Belo Horizonte

2021

P853p Pôrto, Erika de Oliveira Hansen.
Perfil de biomarcadores no líquido cefalorraquidiano de idosos sem comprometimento cognitivo objetivo e com doença de Alzheimer - comprometimento cognitivo leve amnésico e demência [manuscrito]. / Erika de Oliveira Hansen Pôrto. - - Belo Horizonte: 2021.
114f.: il.
Orientador (a): Maria Aparecida Camargos Bicalho.
Coorientador (a): Bernardo de Mattos Viana.
Área de concentração: Medicina Molecular.
Dissertação (mestrado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. Doença de Alzheimer. 2. Biomarcadores. 3. Líquido Cefalorraquidiano. 4. Idoso. 5. Disfunção Cognitiva. 6. Dissertação Acadêmica. I. Bicalho, Maria Aparecida Camargos. II. Viana, Bernardo de Mattos. III. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. IV. Título.

NLM: QW 541



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA MOLECULAR

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

Às 08:00 horas do dia dezessete de junho de dois mil vinte e um, através da plataforma Lifesize, realizou-se a sessão pública para a defesa da Dissertação de **ERIKA DE OLIVEIRA HANSEN PÔRTO**, número de registro 2019662846, graduada no curso de MEDICINA, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em MEDICINA MOLECULAR. A presidência da sessão coube à professora Maria Aparecida Camargos Bicalho, orientadora. Inicialmente, a presidente fez a apresentação da Comissão Examinadora assim constituída: Maria Aparecida Camargos Bicalho - Orientadora (UFMG), Bernardo de Mattos Viana - Coorientador (UFMG), Débora Marques de Miranda (UFMG) e Breno Satler de Oliveira Diniz (Universidade de Connecticut). Em seguida, a candidata fez a apresentação do trabalho que constitui sua Dissertação de Mestrado, intitulada: **PERFIL DE BIOMARCADORES NO LÍQUIDO CEFALORRAQUIDIANO DE IDOSOS SEM COMPROMETIMENTO COGNITIVO OBJETIVO E COM DOENÇA DE ALZHEIMER - COMPROMETIMENTO COGNITIVO LEVE AMNÉSICO E DEMÊNCIA**. Seguiu-se a arguição pelos examinadores e logo após, a Comissão reuniu-se, sem a presença da candidata e do público e decidiu considerar aprovada a Dissertação de Mestrado. O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pela presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a presidente encerrou a sessão e lavrou a presente ata que, depois de lida, se aprovada, será assinada pela Comissão Examinadora.

Belo Horizonte, 17 de junho de 2021.

Assinatura dos membros da banca examinadora:



Documento assinado eletronicamente por **Debora Marques de Miranda**, Professora do Magistério Superior, em 21/06/2021, às 14:04, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Bernardo de Mattos Viana**, Professor do Magistério Superior, em 21/06/2021, às 14:12, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Breno Satler de Oliveira Diniz**, Usuário Externo, em 22/06/2021, às 11:46, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Maria Aparecida Camargos Bicalho**, Professora do Magistério Superior, em 22/06/2021, às 21:14, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador 0776784 e o código CRC 3EBB794A.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA MOLECULAR

FOLHA DE APROVAÇÃO

PERFIL DE BIOMARCADORES NO LÍQUIDO CEFALORRAQUIDIANO DE IDOSOS SEM COMPROMETIMENTO COGNITIVO OBJETIVO E COM DOENÇA DE ALZHEIMER - COMPROMETIMENTO COGNITIVO LEVE AMNÉSICO E DEMÊNCIA

ERIKA DE OLIVEIRA HANSEN PÔRTO

Dissertação de Mestrado defendida e aprovada, no dia dezessete de junho de dois mil vinte e um, pela Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação Medicina Molecular da Universidade Federal de Minas Gerais constituída pelos seguintes professores doutores:

Maria Aparecida Camargos Bicalho - Orientadora
UFMG

Bernardo de Mattos Viana - Coorientador
UFMG

Débora Marques de Miranda
UFMG

Breno Satler de Oliveira Diniz
Universidade de Connecticut

Belo Horizonte, 17 de junho de 2021.



Documento assinado eletronicamente por Breno Satler de Oliveira Diniz, Usuário Externo, em 22/03/2022, às 13:50, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Maria Aparecida Camargos Bicalho, Professora do Magistério Superior, em 22/03/2022, às 15:54, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Debora Marques de Miranda, Professora do Magistério Superior, em 22/03/2022, às 16:57, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Bernardo de Mattos Viana, Subchefe de departamento, em 06/05/2022, às 19:22, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador 1325423 e o código CRC 3CFF133B.

**TRABALHO REALIZADO COM O SUPORTE FINANCEIRO DAS SEGUINTE
INSTITUIÇÕES**

CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

Processos: 436735/2018-0; 309953/2018-9

CAPES – Coordenação de aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

FAPEMIG – Fundação de Amparo a Pesquisa de Minas Gerais

CDS - APQ-04706-10; APQ-02662-14

INCT-MM – Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Medicina Molecular

DEDICATÓRIA

Ao meu primeiro mestre e grande incentivador do estudo, meu Pai. À minha mãe, por toda a força e determinação. Por fim, a minha pequena e doce Luiza, que veio cheia de energia me tirar do lugar comum.

AGRADECIMENTOS

À professora Maria Aparecida Camargos Bicalho, pela orientação, pelo aprendizado, pelo carinho, pela gentileza. Por acreditar na ciência e batalhar pela pesquisa em geriatria. Por toda a parceria desde a graduação, por acreditar no meu potencial e saber incentivar no momento adequado. Por respeitar e acolher meu momento de vida pessoal. Você é muito mais do que uma orientadora.

Ao Professor Bernardo de Mattos Viana pela dedicação, responsabilidade e academicismo. Agradeço pelas palavras e atitudes de incentivo, pela escuta e leitura crítica, pela gentileza no trato.

À Natalia Dias, uma grata surpresa que muito contribuiu para o desenvolvimento e finalização desse trabalho.

À Dra. Daniela Valadão, pelo zelo, cuidado e acolhimento desde os anos de bancada de iniciação científica. Aos demais colaboradores do laboratório de medicina molecular, por todo apoio técnico.

Ao Dr. Marco Aurélio Fagundes pelo cuidado, gentileza, zelo e disponibilidade na realização das punções lombares dos pacientes sintomáticos. A Raquel, Juliana, Viviane e demais membros da equipe de enfermagem do ambulatório Jenny Faria, pelas trocas no dia a dia e todo apoio técnico para realização das punções.

Ao Dr. Thadeu Máximo, à Dra. Luciana Cota Laurentys e, em especial, ao Dr. Alexandre Mesquita Lentz Monteiro, além dos demais anestesistas que gentilmente coletaram e cuidaram do líquido dos pacientes durante a raquianestesia.

À Profa. Andrea Teixeira de Carvalho, Dra. Ana Carolina Campi Azevedo e demais colaboradores da Fiocruz, pelo envolvimento nos ensaios de Luminex.

Ao laboratório de Neurociências, pela parceria na realização dos ensaios ELISA.

À equipe de neuropsicologia, em especial Mônica Vieira, Lívia Pires e Rafaela Ávila, pelo apoio nas avaliações neuropsicológicas.

Ao grupo de pesquisa em “envelhecimento e doenças neurodegenerativas”, por se dedicar à ciência de forma tão amistosa e acolhedora. Em especial, a Ariane Flávia, incentivadora do início e parceira durante o processo; e a Carol Bolãos e Lorena Valu, pelo cuidado impecável com as amostras biológicas.

À minha família: meus pais, Jens Erik Hansen, por ser exemplo de dedicação; Juracy Maria de Oliveira Hansen, pela persistência; meus irmãos, Pedro Henrique de Oliveira Hansen, pela parceria, pelo companheirismo, pelo incentivo, por ter estendido os dois braços quando eu mais precisei; Rodrigo de Oliveira Hansen, pelo carinho, pelo acolhimento, pela minha doce afilhada Júlia, que muitas vezes trouxe luz a dias difíceis. Vocês são meu porto seguro. Amo vocês.

Ao meu marido, Luiz Alberto Bomjardim Pôrto, pela presença e companheirismo. Pelo nosso maior tesouro: Luiza Hansen Pôrto. Por você, minha filha, entender os momentos em que me ausentei para dedicar a este trabalho.

À minha rede de apoio: Inácia Menezes, David Anderson da Trindade e Fabiele Euzebio. Obrigada pelo suporte técnico, por assumir tarefas domésticas, por administrar minha ausência.

À Deus e à Maria Santíssima. Por renovar minha fé e esperança. Por me dar força para seguir em frente: “Senhor, fazei-me instrumento de vossa paz.” (Oração de São Francisco)

RESUMO

Introdução: Os biomarcadores da doença de Alzheimer (DA) são de grande relevância na pesquisa clínica, especialmente após a definição do sistema AT(N), em 2018. Possibilitam o diagnóstico precoce, o estadiamento da doença e são fundamentais para a pesquisa de drogas modificadoras da doença promissoras, monitorando sua resposta terapêutica. Entretanto, o alto custo e a baixa disponibilidade dos métodos mais conhecidos limitam seu uso em países de baixa e média renda. Neste contexto, metodologias semi-automatizadas, como Luminex, se destacam como técnicas custo-efetivas. Recentemente a Fujirebio (Europa) descontinuou a comercialização do principal kit Luminex disponível, o INNOBIA AlzBio3®, de forma que outros Kits, como o Millipore xMap® tendem à maior relevância. **Objetivo:** Em nosso estudo, avaliamos a acurácia diagnóstica do Millipore xMap® e propomos um ponto de corte para DA, usando como padrão de referência o ELISA INNOTEST®. **Métodos:** Foi realizado um estudo transversal, do tipo caso/controle, no período de março de 2015 e novembro de 2020. Trinta e cinco indivíduos com mais de 60 anos foram recrutados por critério clínico e submetidos a punção lombar, sendo 7 idosos com demência por DA (DDA), 17 com comprometimento cognitivo leve amnésico (CCLa) e 11 sem comprometimento cognitivo objetivo (sCCO). Os pacientes foram posteriormente classificados segundo critérios clínicos e biológicos. As concentrações dos biomarcadores do líquido cefalorraquidiano (LCR) para A β 42, p-Tau e t-Tau foram medidas pelo INNOTEST® e Millipore xMap® e, em seguida, as técnicas foram comparadas para avaliar a acurácia diagnóstica do novo teste e para definir um ponto de corte. **Resultados:** Houve concordância entre diagnóstico clínico e biológico para 77,8% dos pacientes, sendo 72,7% entre sCCO (e biomarcador negativo para DA) e 85,7% entre DDA (e biomarcador positivo para DA). Observamos uma boa correlação entre os testes Millipore xMap® e INNOTEST®. O Millipore xMap® mostrou uma boa acurácia para todos os biomarcadores, com a menor AUC de 0,808 (t-Tau) e a maior de 0,952 (A β 42). Os pontos de corte com melhor acurácia foram: 1012,98 pg/ml (A β 42), 64,54 pg/ml (p-tau), 3251,81 pg/ml (t-tau), 3.370 (t-Tau/A β 42) e 0,059 (p-Tau/A β 42). **Conclusão:** Mesmo com uma amostra pequena, o Millipore xMap® se mostrou um teste acurado em relação ao padrão de referência INNOTEST® e com custo significativamente inferior. Dessa forma, dada sua boa acurácia e custo-benefício, os testes Milliplex xMap® parecem uma ferramenta confiável e promissora, especialmente para países de baixa e média renda.

Palavras-chave: doença de Alzheimer, biomarcador, INNOTEST®, Millipore xMap®, Luminex, líquido cefalorraquidiano, A β 42, Tau.

ABSTRACT

Background: Alzheimer's disease (AD) biomarkers are of great relevance in clinical research, especially after the AT(N) framework publication. They enable early diagnosis, disease staging and research with new promising drugs, monitoring its therapeutic response. However, the high cost and low availability of the most well-known methods limits their use in low and middle-income countries. In this context, semi-automated methodologies, such Luminex, stand out as a cost-effective technique. Recently, Fujirebio (Europe) suspended the commercialization of the INNOBIA AlzBio3[®], that was the most used Luminex test. Therefore, others commercially available Luminex tests should be used, like Millipore xMap[®] (HNABTMAG-68K) (Millipore, Germany). **Objective:** In our study, we assessed the diagnostic accuracy of Millipore xMap[®] and propose a cutoff point for AD, based on INNOTEST[®]. **Methods:** We performed a cross-sectional, case/control study, between March 2015 and November 2020. Thirty-five individuals over 60 years old were recruited and submitted to lumbar puncture. Seven older adults had a clinical diagnosis of AD's dementia (ADD), 17 of amnesic mild cognitive impairment (aMCI) and 11 without objective cognitive impairment (control group - CG). Patients were classified according to clinical and biological criteria. Cerebrospinal fluid (CSF) biomarkers concentrations for A β 42, p-Tau and t-Tau were measured by INNOTEST[®] and Millipore xMap[®], and then the techniques were compared to assess the diagnostic accuracy of the new test and to define a cutoff. **Results:** There was agreement between clinical and biological diagnosis for 77,8% of patients, with 72,7% between CG (negative AD's biomarker) and 85.7% between ADD (positive AD's biomarker). Millipore xMap[®] measurements showed a robust accuracy for all biomarkers, with AUC higher than 0,808 (t-Tau), and the best for A β 42 (AUC=0,952). The most accurate cutoffs were found at 1012,98 pg/ml (A β 42), 64,54 pg/ml (p-tau), 3251,81 pg/ml (t-tau), 3,370 (t-Tau/A β 42) and 0,059 (p-Tau/A β 42). **Conclusion:** Despite the small sample, Millipore xMap[®] proved to be an accurate test in relation to the INNOTEST[®] gold standard and has a significant lower cost. Given its good accuracy and cost-effectiveness, Milliplex xMap[®] tests seem a reliable and promising tool, especially for low and middle-income countries.

Keywords: Alzheimer's disease, biomarker, INNOTEST[®], Millipore xMap[®] Luminex, cerebrospinal fluid, A β 42, Tau.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fisiopatologia da doença de Alzheimer	21
Figura 2 - Modelo representativo da teoria do “Alzheimer’s continuum”, proposto por Sperling em 2011.....	23
Figura 3 - Estágios sintomáticos da Doença de Alzheimer	28
Figura 4 - Evolução de modelos e conceitos no estudo da doença de Alzheimer	29
Figura 5 – Seleção de pacientes sem comprometimento cognitivo e funcional	40
Figura 6 – Fluxograma de seleção da amostra do estudo 1	50
Figura 7 - Boxplots dos biomarcadores medidos por ELISA e Luminex	58
Figura 8 - Distribuição da amostra segundo critérios biológicos e classificação clínica dos pacientes que apresentam critério biológico para DA.	60
Figura 9 - Boxplots dos biomarcadores por diagnóstico biológico	63
Figura 10 - Matriz de correlações de Pearson para biomarcadores medidos pelos métodos ELISA e Luminex.....	65
Figura 11 - Diagrama de dispersão dos biomarcadores por critério biológico.....	66
Figura 12 - Curvas ROC por biomarcador para Luminex.....	67
Figura 13 - Proposta de fluxograma diagnóstico para Doença de Alzheimer para utilização de novas drogas modificadoras de doença, tanto em pesquisas de fase III e IV como, futuramente, para uso em saúde pública.	75

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Critérios diagnósticos para Declínio Cognitivo Subjetivo.....	24
Quadro 2 - Critérios para Comprometimento cognitivo leve, segundo Petersen (2001)	25
Quadro 3 - Critérios diagnósticos para TNC Leve.....	26
Quadro 4 - Critérios diagnósticos para demência devido a Doença de Alzheimer	27
Quadro 5 - Estágios do Continuum Cognitivo, segundo NII-AA (2018)	28
Quadro 6 - Descrição do Sistema AT(N)	30
Quadro 7 - Classificação biológica segundo AT(N)	31
Quadro 8 - Classificação AT(N)(C), considerando biomarcadores e apresentação clínica. ...	32

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação dos pacientes segundo critérios clínico e biológico	55
Tabela 2 - Variáveis sociodemográficas segundo diagnóstico clínico.	56
Tabela 3 - Medidas de Biomarcadores por Luminex e ELISA, segundo diagnóstico clínico.	57
Tabela 4 - Comparações múltiplas entre os subgrupos, segundo critérios clínicos.....	59
Tabela 5 - Variáveis sociodemográficas segundo diagnóstico clínico	61
Tabela 6 - Medidas de Biomarcadores por ELISA e Luminex, segundo diagnóstico biológico.	62
Tabela 7 - Comparações múltiplas entre os subgrupos, segundo critérios biológicos	64
Tabela 8 – Ponto de corte para Luminex	68

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A β	Proteína β -amiloide
A β 40	Proteína β -amiloide com 40 aminoácidos
A β 42	Proteína β -amiloide com 42 aminoácidos
APOE	Alelo ϵ 4 do gene da Apolipoproteína E
APNA	Alterações patológicas não Alzheimer
AUC	Área sob a curva
AVE	Acidente vascular encefálico
BN	Biomarcador Normal
CCL	Comprometimento cognitivo leve
CCLa	Comprometimento cognitivo leve amnésico
cDA	<i>Continuum</i> da Doença de Alzheimer
CDR	Escala de Demência Clínica
CID-11	Classificação Internacional de Doenças
CTMM	Ciência e Tecnologia em Medicina Molecular
DA	Doença de Alzheimer
DAC	Doença Arterial Coronariana
DCS	Declínio Cognitivo Subjetivo
DDA	Demência por doença de Alzheimer
DM2	Diabetes <i>Mellitus</i> tipo 2
DMD	Drogas Modificadoras de Doença
DSM-5	Manual de Diagnóstico e Estatística de Transtornos Mentais
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática
ENF	Emaranhados neurofibrilares
GDS	Do inglês, <i>geriatric depressive scale</i> - Escala de depressão Geriátrica
HAS	Hipertensão Arterial Sistêmica
HF	História familiar
IJAF	Instituto Jenny de Andrade Faria
IMC	Índice de Massa Corpórea
LCR	Líquido Cefalorraquidiano
LRP1	Lipoproteína de baixa densidade

MEEM	Mini-Exame do Estado Mental
Millipore xMap®	<i>Human Amyloid Beta and Tau Magnetic Bead Panel</i> (HNABTMAG-68K)
NIA-AA	<i>National Institute on Aging and Alzheimer's Association</i>
NPI	Inventário Neuropsiquiátrico
p-Tau	Tau fosforilada
p-Tau ₁₈₁	Tau fosforilada na treonina 181
p-Tau ₂₁₇	Tau fosforilada na treonina 217
p-Tau ₂₃₁	Tau fosforilada na treonina 231
PET FDG	Tomografia por emissão de pósitrons com fluordesoxiglicose
PET-CT	Tomografia computadorizada por emissão de prótons
Pfeffer	Escala de Avaliação de Atividade de Vida Diária Instrumental
PL	Punção Lombar
RNM	Ressonância Nuclear Magnética
ROC	<i>Receiver Operating Characteristic</i>
sCCO	Sem comprometimento cognitivo objetivo
t-Tau	Tau total
TALE	Termo de Assentimento Livre e Esclarecido
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TNC Leve	Transtorno Neurocognitivo Leve
xMap	Luminex

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	18
1.1	DOENÇA DE ALZHEIMER – FISIOPATOLOGIA.....	19
1.2	ALTERAÇÕES SUBJETIVAS DE MEMÓRIA, COMPROMETIMENTO COGNITIVO LEVE E DEMÊNCIA DE ALZHEIMER	22
1.3	BIOMARCADORES E SISTEMA AT(N).....	29
1.4	BIOMARCADORES NO LCR.....	33
2	JUSTIFICATIVA	35
3	OBJETIVOS.....	36
3.1	OBJETIVO GERAL	36
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	36
4	METODOLOGIA.....	37
4.1	SELEÇÃO DE AMOSTRA	37
4.2	CRITÉRIOS DE INCLUSÃO	41
4.3	CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO	41
4.4	AVALIAÇÃO COGNITIVA	42
4.5	AVALIAÇÃO NEUROPSICOLÓGICA	47
4.6	Coleta de amostras biológicas:.....	47
4.6.1	Sangue periférico:	47
4.6.2	Líquido cefalorraquidiano	48
4.7	Procedimentos laboratoriais – LCR.....	49
4.7.1	Luminex – Millipore xMap®	50
4.7.2	ELISA – INNOTEST®.....	51
4.8	PROCEDIMENTO ESTATÍSTICO E DELINEAMENTO DO ESTUDO 1.....	52
5	RESULTADOS.....	54
5.1	RESULTADOS DO ESTUDO 1	54
5.1.1	Análise das variáveis segundo critério clínico	55
5.1.2	Análise das variáveis segundo critério biológico	59
5.1.3	Associação entre os biomarcadores medidos por Luminex e ELISA.....	64
5.1.4	Avaliação de acurácia e definição de ponto de corte	66
6	DISCUSSÃO	69
7	CONCLUSÃO.....	76
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77
	ANEXO 1 – CARTA DE APROVAÇÃO NO COMITE DE ÉTICA	86
	ANEXO 2 – TCLE E TALE	91
	ANEXO 3 – PROTOCOLO DE AVALIAÇÃO COGNITIVA	103
	ANEXO 4 – E-MAIL DE SUBMISSÃO DE MANUSCRITO.....	114

1 INTRODUÇÃO

O envelhecimento populacional é um processo mundial que reflete o sucesso da melhoria dos cuidados de saúde. Observa-se uma rápida transição demográfica com o aumento expressivo no número de idosos e o consequente aumento da expectativa de vida (KINSELLA; HE, 2009). No Brasil, seguindo a tendência mundial, a expectativa de vida aumentou de 45,5 anos, em 1945, para 76,6 anos em 2019, antes do início da pandemia do COVID-19 (IBGE, 2020). O aumento da população com mais de 60 anos tem contribuído significativamente para o aumento da prevalência de doenças crônicas, dentre elas, as doenças neurodegenerativas, sobretudo as demências. O envelhecimento é o principal fator de risco para demência, com mais de 90% dos casos após 65 anos. (ELAHI; MILLER, 2017)

Em 2018, mais de 50 milhões de pessoas tinham o diagnóstico de demência em todo o mundo. A expectativa é que este número dobre em 20 anos, atingindo 82 milhões de pessoas em 2030, e triplique para 152 milhões em 2050. Atribui-se grande parte deste incremento ao aumento, de forma alarmante, da prevalência de demência em países de baixa e média renda, com destaque para os países da América Latina. Apenas no cone sul da América Latina, estima-se um aumento de 77% no número de pessoas com demência nos próximos 20 anos, taxa muito superior ao esperado para Europa, em torno de 40%. Em 2050, 71% dos portadores de demência serão provenientes de países baixa e média renda, diferentemente da taxa de 60%, observada em 2010 (ALZHEIMER'S DISEASE INTERNATIONAL, 2013; LIVINGSTON *e cols.*, 2017; PATTERSON, 2018; WIMO *e cols.*, 2015).

Em 2015, foram gastos cerca de 818 bilhões no cuidado das demências em todo o mundo, o que representa cerca de 1,09% do PIB global. Entretanto, apenas cerca de 10% desse valor é utilizado por países de baixa e média renda. À medida que as taxas de incidência em toda a região aumentam, também aumentam os custos associados ao fornecimento de assistência e apoio à demência (PRINCE; WIMO; WINCLAD, 2013). A demência é reconhecida como um problema de saúde pública, uma das principais causas de declínio funcional e morbimortalidade entre os idosos (ALZHEIMER'S ASSOCIATION, 2021; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017).

A Doença de Alzheimer (DA), é principal causa de demência, contribuindo com cerca de 70% dos casos (LIVINGSTON e cols., 2017). No Brasil, estudo clínico-patológico, realizado por Suemoto e cols. (2017) demonstrou que a DA foi responsável por 50% dos casos de demência numa amostra da população de São Paulo. No entanto, a compreensão dos fatores relevantes para a elucidação dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento da demência é atualmente limitada, sobretudo nos países em desenvolvimento. Além disso, uma alta proporção de pessoas com demência nessas regiões carece de suporte clínico social. (PARRA e cols., 2018)

1.1 DOENÇA DE ALZHEIMER – FISIOPATOLOGIA

O conhecimento atual sobre a fisiopatologia da DA baseia-se principalmente no acúmulo de formas insolúveis da proteína β -amilóide ($A\beta$) e da agregação de proteína Tau em emaranhados neurofibrilares (MASTERS e cols., 2015). Entretanto, outras hipóteses, incluindo neuroinflamação, injúria vascular, estresse oxidativo e disfunção mitocondrial, buscam explicar a fisiopatologia da doença. (BLENNOW; DE LEON; ZETTERBERG, 2006; KNOPMAN, 2021).

A $A\beta$ é produzida pela clivagem intracelular sequencial da proteína precursora amiloide (APP), uma proteína transmembrana com funções na plasticidade sináptica, pelas enzimas β -secretase e γ -secretase. Nesse processo, é gerado peptídeos neurotóxicos de diferentes tamanhos, entre 36-43 aminoácidos que são liberados no meio extracelular, e se agregam em oligômeros. É importante ressaltar que os peptídeos apresentam características diferentes, sendo que aqueles com 42 aminoácidos ($A\beta_{42}$) são mais susceptíveis a agregação. A depuração dos oligômeros no meio extracelular ocorre através de astrócitos via proteína relacionada ao receptor de lipoproteína de baixa densidade (LRP1) ou mecanismos que envolvem a Apolipoproteína E (APOE). Entretanto, na DA ocorre um desequilíbrio entre a produção e a depuração de $A\beta$, resultando em formação de placas amilóides e lesão neuronal (MASTERS e cols., 2015; PATTERSON e cols., 2008).

Aproximadamente 30% dos indivíduos cognitivamente saudáveis podem apresentar placas senis à autopsia (JACK; HOLTZMAN, 2013). Esse fato levanta a importância de

processos concomitantes para o desenvolvimento de doença clínica, com destaque para os emaranhados neurofibrilares de proteína Tau.

A proteína Tau pertence a família de proteínas associadas aos microtúbulos de neurônios, estando presente também em outras células do organismo. A proteína Tau pode sofrer fosforilação e desfosforilação, processos necessários para a estabilização e reorganização do citoesqueleto. Quando a Tau sofre hiperfosforilação (Tau hiperfosforilada), ela torna-se insolúvel, e assim, perde afinidade pelos microtúbulos, desestabilizando-os e afetando o transporte axonal. Uma vez hiperfosforilada, a proteína Tau apresenta tendência a agregar-se em filamentos helicoidais emparelhados, que originarão os emaranhados neurofibrilares (ENF) intracelulares (QUERFURTH; LAFERLA, 2010).

As taupatias são as manifestações patológicas mais comuns em doenças neurodegenerativas, de forma que a diferenciação etiológica depende da isoforma específica de tau aumentada. Dessa forma, dizemos que a presença de Tau total (t-Tau) aumentada, ou seja, todas as isoformas de tau, independente do estado de fosforilação, sugere neurodegeneração, ao passo que a isoforma específica (tau fosforilada - p-Tau) ajuda a determinar a etiologia da doença. Por exemplo, na DA espera-se aumento da t-tau e das isoformas Tau fosforilada na treonina 181 (p-Tau₁₈₁), Tau fosforilada na treonina 217 (p-Tau₂₁₇), e Tau fosforilada na treonina 231 (p-Tau₂₃₁), ao passo que na doença de Creutzfeldt-Jakob observa-se um aumento significativo de t-Tau com p-Tau₁₈₁ normal. (MASTERS e cols., 2015)

Não se sabe ao certo se os dois processos, A β e ENF, ocorrem de forma independente ou correlacionadas (JACK; HOLTZMAN, 2013). Alguns autores sugerem que a A β impulse a formação dos ENF. Propõe-se que, sobretudo na doença de início tardio, a taupatia se desenvolva primeiro sem significado clínico, podendo ser caracterizada como uma alteração do envelhecimento. Entretanto, quando esse processo se associa a A β ocorre uma potencialização da disseminação da neurodegeneração que é a causa direta da apresentação clínica da DA (PRICE; MORRIS, 1999). Essa hipótese é reforçada por estudos longitudinais nos quais se avaliou a deposição de proteínas tau e amilóide através de neuroimagem funcional (PET-CT). Os dados mostraram que o acúmulo de A β precede a taupatia e, portanto, é proposto que haja uma correlação de causa e efeito entre o aumento da primeira com o aumento da segunda. Por outro lado, o acúmulo de ENF precede os sintomas cognitivos, ou seja, com a evolução da

neurodegeneração associada à taupatia observa-se o desenvolvimento de sintomas clínicos. (HANSEEUW e cols., 2019). A figura 1 ilustra a hipótese amiloide.

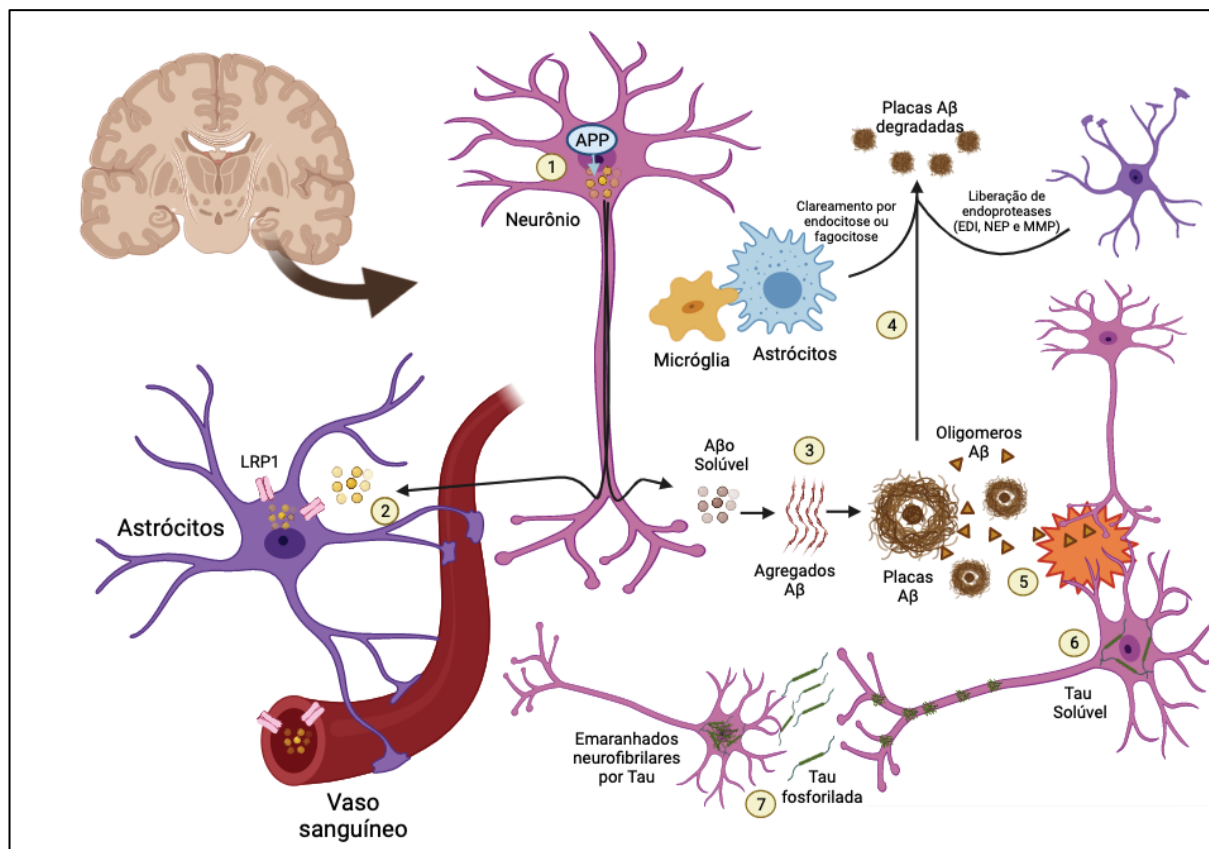


Figura 1 - Fisiopatologia da doença de Alzheimer

Vias que levam à formação de placas amiloides e emaranhados neurofibrilares pela hipótese amiloide. (1) A Proteína Precursora Amiloide (APP) é clivada em proteína Aβ (β-amiloide) e é liberada no meio extracelular como oligômeros solúveis (Aβ). (2) Esses oligômeros podem ser eliminados por mecanismos que envolvem APOE ou podem ser absorvidos por astrócitos por meio da LRP1 (Proteína relacionada ao receptor de lipoproteína de baixa densidade 1) (3) Aβ também podem se agregar no espaço extracelular para formar agregados fibrilares e placas Aβ. (4) As placas Aβ podem ser eliminadas por meio da degradação por fagocitose ou endocitose (em macrófagos e micróglia) ou por endoproteases de astrócitos (como a enzima de degradação da insulina (EDI), nepresilina (NEP) e metaloproteinase de matriz (MMP)) (5) No entanto, alguns oligômeros Aβ que se dissociam das placas Aβ podem não ser eliminados e são tóxicos para as sinapses adjacentes. (6) Dessa forma, induzem a agregação de Tau por mecanismos ainda desconhecidos. O dano neuronal ocorre a partir da hiperfosforilação da proteína tau e formação de emaranhados neurofibrilares, que se estendem por todo o neurônio. (7) A tau fosforilada pode ser liberada e absorvida por neurônios saudáveis, desencadeando dano neuronal.

Fonte: adaptado de Nat Rev Dis Primers. 2015;1:15056.

Por fim, outros mecanismos participam pelo menos parcialmente da fisiopatologia da DA, entre eles alterações do metabolismo de glicose e neuroinflamação. É importante ressaltar que evidências robustas apoiam o papel dos mecanismos inflamatórios na patogênese da doença de Alzheimer (HENEKA e cols., 2015; HENEKA; KUMMER; LATZ, 2014). A neuroinflamação é mediada por astrócitos e células da micróglia através de citocinas,

quimiocinas, complemento e estresse oxidativo. Estudos neuropatológicos apontam para a presença da micróglia ativada e mediadores relacionados à inflamação em cérebros com DA em estágios iniciais do sistema de Braak e Braak (1991), enquanto estudos genéticos mostram que vários genes que aumentam o risco de DA esporádica codificam fatores que regulam a depuração microglial de proteínas e reação inflamatória, como TREM2 e CD33 (GAUTHIER e cols., 2018). A hipótese inflamatória é extensa e complexa, sendo alguns dos mecanismos inflamatórios envolvidos na DA já previamente estudados por nosso grupo (GONÇALVES e cols., 2016; MARTINS e cols., 2012; TORRES e cols., 2014; TORRES e cols., 2012).

1.2 ALTERAÇÕES SUBJETIVAS DE MEMÓRIA, COMPROMETIMENTO COGNITIVO LEVE E DEMÊNCIA DE ALZHEIMER

A compreensão dos aspectos fisiopatológicos da doença sugere que as alterações cognitivas sejam a expressão clínica do processo neuropatológico subjacente. A doença de Alzheimer, dessa forma, se refere a alterações neuropatológicas, enquanto o declínio cognitivo subjetivo, o comprometimento cognitivo leve (CCL) e a demência por doença de Alzheimer (DDA) representam o espectro de sua apresentação clínica (MCKHANN e cols., 2011). Ademais, ainda transpondo o racional biológico, assim como as alterações neuropatológicas se desenvolvem de forma progressiva, a apresentação clínica da DA segue a sequência do normal à demência clinicamente estabelecida.

Dessa forma, postula-se que a DA segue uma trajetória em *continuum*, tanto neuropatológico quanto cognitivo. O conceito de “*Alzheimer’s continuum*” foi apresentado pela primeira vez por Sperling em 2011, a partir de um modelo hipotético clínico-patológico. Nesse modelo, a presença das alterações neuropatológicas precedem a apresentação clínica, que ocorre em 3 fases progressivamente: pré-clínica, CCL e demência. (Figura 2). (JACK e cols., 2011; SPERLING e cols., 2011)

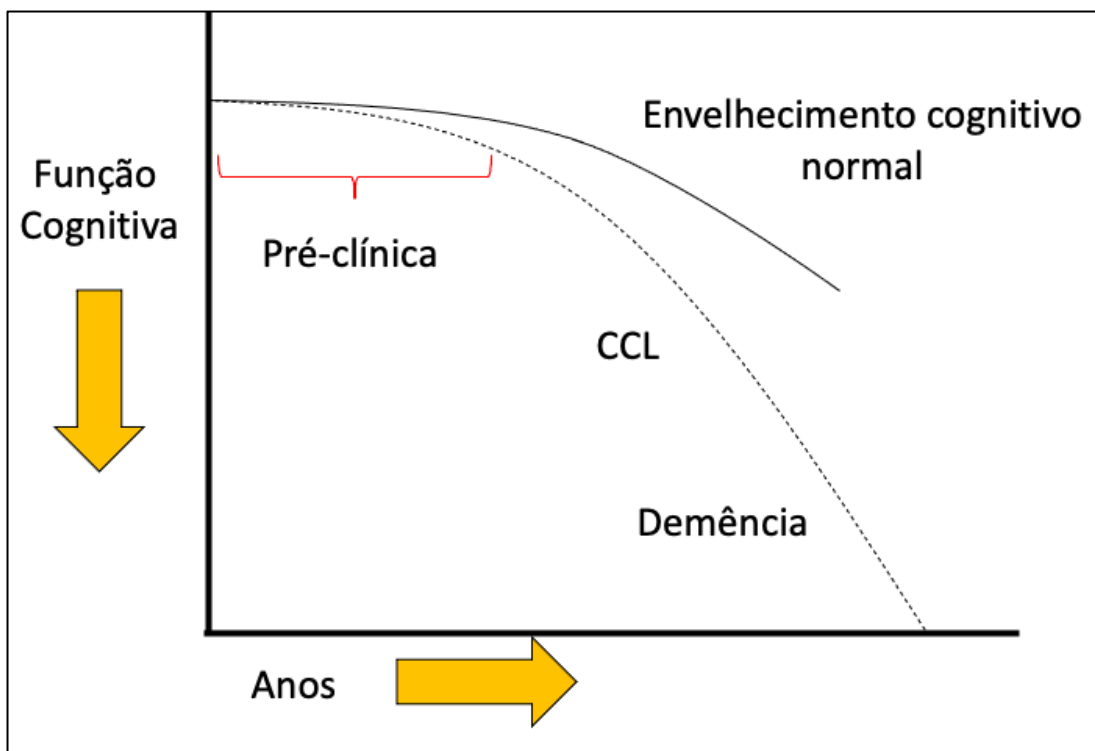


Figura 2 - Modelo representativo da teoria do “*Alzheimer’s continuum*”, proposto por Sperling em 2011. Segundo esse modelo, as alterações neuropatológicas já estão presentes mesmo antes do desenvolvimento de sintomas clínicos (CCL e Demência). CCL: comprometimento cognitivo leve. Fonte - adaptado de: R.A. Sperling et al. *Alzheimer’s & Dementia* 7 (2011) 280–292

Nesse modelo, os indivíduos do grupo DA pré-clínico compreendiam os pacientes que apresentassem biomarcador alterado, porém sem comprometimento cognitivo objetivo. Isto é, desde aqueles sem qualquer queixa cognitiva até os que já apresentavam algum comprometimento cognitivo, porém ainda sem critérios para CCL, ditos como “nem normal, nem CCL”. (SPERLING e cols., 2011).

A observação e o acompanhamento de pacientes que apresentavam queixas subjetivas de memória sem qualquer alteração em avaliação neuropsicológica ou prejuízo funcional levou ao surgimento do termo “declínio cognitivo subjetivo” (DCS). Esse termo foi proposto para ser usado em pesquisas e, portanto, não é uma categoria diagnóstica da CID-11 ou do DSM-5 (JESSEN e cols., 2020; JESSEN e cols., 2014). No quadro 1 seguem os critérios diagnósticos para DCS.

Quadro 1 - Critérios diagnósticos para Declínio Cognitivo Subjetivo.

Critérios diagnósticos para DCS (Jessen, 2014)
1. Declínio cognitivo persistente autorrelatado em comparação com um estado previamente normal e não relacionado a um evento agudo.
2. Desempenho normal, ajustado para idade, sexo e escolaridade, em testes cognitivos padronizados, que são usados para classificar comprometimento cognitivo leve (CCL)
1 e 2 devem estar presentes (obrigatório)
Critério de exclusão
1. Comprometimento cognitivo leve, DA prodrômica ou demência
2. Pode ser explicado por um transtorno mental* ou neurológico (além da DDA), outra doença, uso medicamentos ou outras substâncias
* Sintomas individuais de depressão ou ansiedade, que não atingem o limiar de um transtorno, não são considerados critérios de exclusão.

DCS: Declínio Cognitivo Subjetivo; DA: demência pela doença de Alzheimer; DDA: demência pela doença de Alzheimer. **Fonte:** JESSEN F. *Alzheimers Dement* 2014 Nov;10(6):844-52

Por outro lado, o CCL refere-se a indivíduos com prejuízos leves no desempenho cognitivo e cujos déficits não interferem na capacidade de ser independente nas atividades cotidianas e que não atendem aos critérios para o diagnóstico de demência. Este construto pode corresponder a uma fase de transição entre a ausência de comprometimento cognitivo e funcional objetivo e a demência.

No modelo inicial proposto por Petersen (2002) (quadro 2), o CCL é um termo amplo e heterogêneo (PETERSEN RC, 2001). Nesse contexto, sugere-se a subclassificação em CCL amnésico (CCLa) e não amnésico, de acordo com a presença e ausência de comprometimento da memória. Ademais, a presença de comprometimento amnésico associado a outros domínios cognitivos é classificado como CCLa múltiplos domínios, ao passo que a ausência de outros comprometimentos como único domínio. O autor sugere ainda que o CCLa, sobretudo único domínio, apresenta maior risco de progressão para DDA, ao passo que o tipo não amnésico pode ser o precursor de demências não Alzheimer, como demência por Corpos de Lewy ou degeneração lobar fronto-temporal (PETERSEN, 2016). Em uma metanálise de 2013 observou-se uma taxa de conversão anual mediana de 19% (WARD; TARDIFF; DYE; ARRIGHI, 2013).

Quadro 2 - Critérios para Comprometimento cognitivo leve, segundo Petersen (2001)

Critérios diagnósticos para Comprometimento Cognitivo Leve, segundo Petersen (2001)
Queixa de declínio da memória normalmente corroborada por informante
Déficit de memória objetiva, de acordo com idade e escolaridade
Função cognitiva geral preservada
Atividades de vida diária preservadas
Ausência de demência

Fonte: Petersen, RC. Arch Neurol, 2002. 58(12): 1985-92.

Em 2013, a Associação Americana de Psiquiatria, no DSM-5, reconhece um nível menos grave de prejuízo cognitivo e definem o conceito de Transtorno Neurocognitivo Leve (TNC Leve) (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2014). Basicamente, o TNC leve engloba os pacientes que apresentam comprometimento cognitivo leve, independente da subclassificação. Entretanto, no DSM-V, é possível especificar a etiologia do TNC leve, a partir de evidências neuropatológicas. Logo, pacientes que apresentem TNC leve com biomarcador positivo para doença de Alzheimer, são denominados como TNC leve devido a Doença de Alzheimer. No quadro 3 apresentamos os critérios diagnósticos de TNC Leve (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2014):

Por fim, a DDA, ou transtorno neurocognitivo maior secundário a doença de Alzheimer, segundo o DSM-5, abrange os indivíduos que apresentam evidência objetiva de importante declínio cognitivo associado à perda da capacidade de ser independente nas atividades cotidianas. Difere do grupo anterior principalmente pelo impacto funcional da doença no cotidiano. Os critérios de DDA provável mais usados ainda hoje são os propostos por Mckhann, em *guideline* do NIA-AA de 2011. São citados a seguir no quadro 4 (MCKHANN e cols., 2011).

Quadro 3 - Critérios diagnósticos para TNC Leve

Transtorno Neurocognitivo Leve Critérios diagnósticos segundo DSM-5
A. Evidências de declínio cognitivo leve, a partir de nível anterior de desempenho em um ou mais domínios cognitivos (atenção complexa, função executiva, aprendizagem e memória, linguagem, perceptomotor ou cognição social) com base em:
1. Preocupação do indivíduo, de um informante com conhecimento ou do clínico de que ocorreu declínio na função cognitiva;
2. Prejuízo leve no desempenho cognitivo, de preferência documentado por teste neuropsicológico padronizado ou, em sua falta, outra avaliação quantificada.
B. Os déficits cognitivos <u>não</u> interferem na capacidade de ser independente nas atividades cotidianas (i.e., estão preservadas atividades instrumentais complexas da vida diária, como pagar contas ou controlar medicamentos, mas pode haver necessidade de mais esforço, estratégias compensatórias ou acomodação).
C. Os déficits cognitivos não ocorrem exclusivamente no contexto de delirium.
D. Os déficits cognitivos não são mais bem explicados por outro transtorno mental (p. ex., transtorno depressivo maior, esquizofrenia).
Especificar: sem perturbação comportamental ou com perturbação comportamental.

Critérios diagnósticos para Transtorno Neurocognitivo Leve (TNC Leve), segundo DSM-5. **Fonte:** American Psychiatric Association. Manual diagnóstico e estatístico de transtornos mentais: DSM-5. 5.ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.

Em 2018, com o aprimoramento das pesquisas e do estudo dos biomarcadores, um novo *guideline* foi publicado pelo NIA-AA, consolidando as alterações neurocognitivas como um *continuum* e atualizando alguns conceitos. Jack et al (2018) propôs 2 modelos que se entrelaçam: o clínico e o biológico. Foi definido, então, o termo “*continuum* cognitivo”, no qual se classifica o status cognitivo do indivíduo, independente do biomarcador, em 3 estágios, que ocorrem de forma sequencial: cognição normal, comprometimento cognitivo leve e demência. (quadro 5).

Por outro lado, o termo *continuum* da Doença de Alzheimer (cDA) deve se restringir a pacientes que apresentem biomarcador amilóide positivo, como será explorado na próxima sessão. Nesse modelo, uma vez que exista evidência de alterações neuropatológicas sugestivas de DA, as alterações clínicas seguem uma escala numérica de 6 estágios. Esses estágios refletem a gravidade da DA de acordo com sintomas cognitivos (figura 3).

Quadro 4 - Critérios diagnósticos para demência devido a Doença de Alzheimer

Critérios diagnósticos para demência devido a doença de Alzheimer provável
1. Início insidioso (meses ou anos).
2. História clara ou observação de piora cognitiva.
3. Déficits cognitivos iniciais e mais proeminentes em uma das seguintes categorias:
a) Apresentação amnésica (deve haver outro domínio afetado).
b) Apresentação não-amnésica (deve haver outro domínio afetado). – Linguagem (lembranças de palavras). – Visual-espacial (cognição espacial, agnosia para objetos ou faces, simultaneoagnosia e alexia). – Funções executivas (alteração do raciocínio, julgamento e solução de problemas).
4. O diagnóstico de DDA provável não deve ser aplicado quando houver:
a) Evidência de doença cerebrovascular importante definida por história de AVE temporalmente relacionada ao início ou piora do comprometimento cognitivo; ou presença de infartos múltiplos ou extensos; ou lesões acentuadas na substância branca evidenciadas por exames de neuroimagem;
b) Características centrais de demência com corpos de Lewy (alucinações visuais, parkinsonismo e flutuação cognitiva);
c) Características proeminentes da variante comportamental da demência frontotemporal;
d) Características proeminentes de afasia progressiva primária manifestando-se como a variante semântica (também chamada demência semântica, com discurso fluente, anomia e dificuldades de memória semântica) ou como a variante não-fluente, com agramatismo importante;
e) Evidência de outra doença concomitante e ativa, neurológica ou não-neurológica, ou de uso de medicação que pode ter efeito substancial sobre a cognição

Critérios diagnósticos para demência na doença de Alzheimer, segundo Mckhann; DDA: demência pela doença de Alzheimer. **Fonte:** MCKHANN GM. *Alzheimers Dement* 2011;7(3):263-9.

Quadro 5 - Estágios do *Continuum Cognitivo*, segundo NII-AA (2018)

Estágios do “ <i>continuum cognitivo</i> ”	
Cognição normal	<ul style="list-style-type: none"> • Desempenho cognitivo dentro da faixa esperada para aquele indivíduo. Pode ser baseado em julgamento clínico e/ou desempenho do teste cognitivo • O Desempenho cognitivo pode estar alterado com base em normas populacionais, mas esta dentro da faixa esperada para aquele indivíduo. • Parte dos indivíduos sem déficit cognitivo pode relatar queixas cognitivas subjetivas e/ou demonstrar declínio sutil nos testes cognitivos.
Comprometimento cognitivo leve	<ul style="list-style-type: none"> • Desempenho cognitivo abaixo da faixa esperada para aquele indivíduo com base em todas as informações disponíveis. Isso pode ser baseado no julgamento clínico e /ou no desempenho do teste cognitivo (que pode ou não ser baseado em comparação com dados normativos com ou sem ajustes para a idade, educação, ocupação, sexo, etc.). • O desempenho cognitivo geralmente está na faixa alterada, com base nas normas de população, mas isso não é necessário, desde que o desempenho esteja abaixo da faixa esperada para aquele indivíduo. • Além de evidências de comprometimento cognitivo, evidências de declínio no desempenho cognitivo do basal também deve estar presente. Isso pode ser relatado pelo indivíduo ou por um observador (por exemplo, parceiro de estudo) ou observado pela mudança na avaliação cognitiva longitudinal ou por uma combinação delas. • Pode ser caracterizado por apresentações cognitivas que não são primariamente amnésticas. • Embora o comprometimento cognitivo seja o principal critério clínico, alterações do comportamento pode ser uma característica proeminente do quadro clínico inicial. • Realiza atividades da vida diária de forma independente, mas o déficit cognitivo pode resultar em impacto funcional detectável, mas leve nas atividades da vida diária avançadas, autorrelatadas ou corroboradas por terceiros.
Demência	<ul style="list-style-type: none"> • Prejuízo cognitivo progressivo substancial que afeta vários domínios e / ou sintomas comportamentais. Pode ser relatado pelo indivíduo ou por um observador (por exemplo, parceiro) ou observado por mudança na avaliação cognitiva longitudinal. • Comprometimento cognitivo e / ou sintomas comportamentais resultam em impacto funcional evidente na vida diária. Não é mais totalmente independente / requer assistência com as atividades da vida diária. Este é o principal fato que diferencia demência de CCL. • Pode ser subdividido em leve, moderado e grave

NII-AA: National Institute on Aging and Alzheimer’s Association; CCL: comprometimento cognitivo leve.

Fonte: JACK CR Jr. *Alzheimers Dement* 2018;14(4):535-562

Estágio 1	Estágio 2	Estágio 3	Estágio 4	Estágio 5	Estágio 6
Sem evidências objetiva ou subjetiva de declínio cognitivo e sem alterações de comportamento	Declínio cognitivo subjetivo ou sutil objetivo (ou ambos) e não preenche critérios para CCL; início recente de sintomas comportamentais podem ocorrer ou pode ser o sintoma predominante	Declínio cognitivo objetivo a nível de CCL, pode ocorrer leves déficits funcionais (AVD avançada), mas independência preservada.	Demência leve	Demência Moderada	Demência avançada

Figura 3 - Estágios sintomáticos da Doença de Alzheimer

Legenda: O esquema mostra os estágios sintomáticos da DA proposto pelo guideline de 2018 da NIA-AA. Esses estágios se aplicam apenas a pacientes que estão no *continuum* da DA, ou seja, que apresentem biomarcador amilóide positivo. As cores indicam a progressão do declínio cognitivo: da ausência de sintomas (verde) a presença de demência avançada (vermelho). NIA-AA= *National Institute of Aging-Alzheimer’s Association*; CCL= Comprometimento cognitivo leve. **Fonte:** adaptado de *Lancet Neuro*. 2020;19(3):271-278.

Esquemáticamente, podemos observar a evolução dos conceitos para o modelo proposto por Jack et al (2018), atualmente o mais aceito. (figura 4).

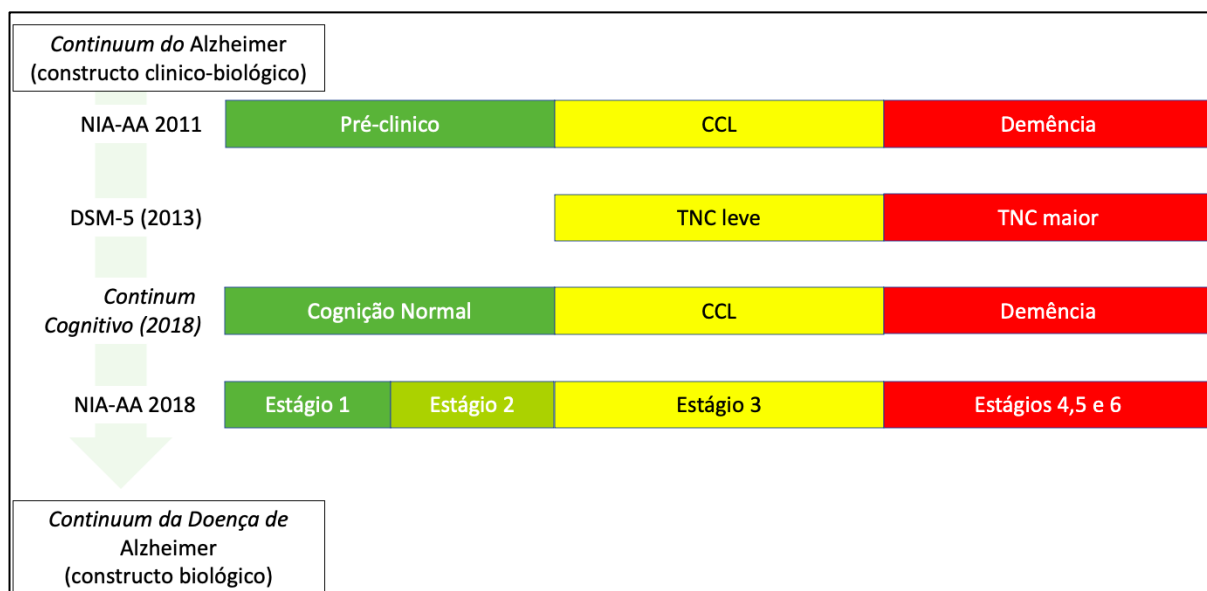


Figura 4 - Evolução de modelos e conceitos no estudo da doença de Alzheimer

Legenda: Na primeira linha, modelo proposto pelo NIA-AA em 2011 em que se postula o Continuum do Alzheimer como um constructo clínico-biológico. Nesse modelo, pode dividir a apresentação clínica em fase pré-clínica, CCL e Demência; Na segunda linha, modelo proposto pelo DSM-5 em que o comprometimento cognitivo leve é chamado de TNC leve, podendo ser especificado em “do tipo Alzheimer”, conforme biomarcador. O mesmo ocorre para demência. Na terceira linha, modelo proposto pelo NIA-AA (2018) do *continuum* cognitivo, onde a presença de biomarcadores não é considerada. Por fim, modelo em 6 estágios proposto pelo NIA-AA (2018) em que os estágios representam a classificação clínica da doença de Alzheimer, obrigatoriamente diagnosticada pela evidência de alteração biológica. Nesse contexto, o termo *continuum* da Doença de Alzheimer se refere a um constructo unicamente biológico. CCL: comprometimento cognitivo leve; TNC: transtorno neurocognitivo leve; NIA-AA: *National Institute on Aging and Alzheimer’s Association*; DSM-5: Manual de Diagnóstico e Estatística de Transtornos Mentais. **Fonte:** adaptado de Nat Rev Dis Primers. 2021;7:33.

1.3 BIOMARCADORES E SISTEMA AT(N)

Os sistemas classificatórios anteriores eram baseados na apresentação clínica. Entretanto para aplicação em pesquisa, desde 2018, propõem-se o diagnóstico biológico de DA mesmo sem a presença de sinais ou sintomas clínicos. Dessa forma, as recomendações para uso de biomarcadores em pesquisa publicadas pelo NIA-AA em 2018 consolidaram as análises de concentrações líquóricas de A β e Tau e a neuroimagem molecular e estrutural como os principais marcadores de DA. Trata-se de um sistema binário intitulado AT(N), em que os biomarcadores são agrupados em três grandes grupos, baseado no processo patológico: (A)

associado a agregados A β ; (T) marcador de taupatia; e (N), relacionada a neurodegeneração. Segundo esse sistema, o diagnóstico de DA com finalidade de pesquisa, não mais é baseado em manifestações clínicas (sinais e sintomas). Desta forma, a DA passa a ser um constructo biológico. (JACK e cols., 2018; JACK e cols., 2016).

A avaliação da amiloidopatia (A) pode ser realizada através de FDG PET: Tomografia por emissão de pósitrons (PET-CT) com marcador amilóide ou através da redução da concentração de A β 42 no líquido cefalorraquidiano (LCR). De forma semelhante, a avaliação de Taupatia (T) se dá através de PET-CT com marcador para Tau ou através do aumento da concentração de Tau fosforilada (p-Tau) no LCR. Por fim, a presença de neurodegeneração, ou injúria neuronal, será feita por neuroimagem estrutural (Ressonância nuclear magnética - RNM), PET de metabolismo - FDG PET: Tomografia por emissão de pósitrons com fluordesoxiglicose (FDG PET) ou ainda pela dosagem de Tau total (t-Tau) no LCR. O quadro 6 ilustra a classificação do sistema AT(N).

Quadro 6 - Descrição do Sistema AT(N)

Sistema AT(N)
A: Agregados A β ou estado patológico associado a amiloidopatia A β 42 no LCR ou relação A β 42/A β 40 no LCR PET-CT com marcador Amilóide
T: Agregados neurofibrilares ou estado patológico associado a taupatia p-Tau no LCR PET-CT com marcador Tau
(N) Neurodegeneração ou lesão neuronal RNM estrutural PET FDG t-Tau no LCR

Legenda: Descrição do sistema AT(N). A β : proteína β -amilóide; LCR: líquido cefalorraquidiano; PET-CT: Tomografia Computadorizada por Emissão de Pósitrons; p-Tau: proteína Tau fosforilada. RNM: ressonância nuclear magnética; FDG PET: Tomografia por emissão de pósitrons com fluordesoxiglicose; t-Tau: proteína Tau total. **Fonte:** JACK CR Jr. *Alzheimers Dement* 2018;14(4):535-562.

Baseado nesse sistema, o indivíduo pode ser agrupado em 3 perfis: biomarcador normal para DA, *continuum* da DA (cDA) e alterações patológicas não Alzheimer (APNA) (Quadro 7). Nota-se que esse sistema se baseia principalmente na presença de proteína A β , de forma que essa é considerada a “marca” da DA no indivíduo. Assim, podemos dizer que o “*continuum* da DA” é um termo abrangente, uma vez que inclui todos os indivíduos com evidência de

biomarcadores de A β , independente da presença de taupatia ou neurodegeneração, ao passo que o termo “Doença de Alzheimer” deve ser restrito a presença de patologia A β e Tau, independente de neurodegeneração e da apresentação clínica. (JACK e cols., 2018).

Quadro 7 - Classificação biológica segundo AT(N)

Perfil AT(N)	Categoria do Biomarcador	
A- T- (N) -	Biomarcador normal	
A+ T- (N) -	Alterações patológicas de Alzheimer	<i>continuum</i> da Doença de Alzheimer
A+ T+ (N) +	Doença de Alzheimer	
A+ T+ (N) -	Doença de Alzheimer	
A+ T- (N) +	Alzheimer e concomitante suspeita de alterações patológicas não Alzheimer	
A- T+ (N) -	Alterações patológicas não Alzheimer (APNA)	
A-T-(N) +	Alterações patológicas não Alzheimer (APNA)	
A-T+(N)+	Alterações patológicas não Alzheimer (APNA)	

Legenda: Classificação biológica conforme biomarcador, segundo sistema AT(N)

Fonte: JACK CR Jr. *Alzheimers Dement* 2018;14(4):535-562

É interessante ressaltar também que classificação AT(N) permite a definição biológica da doença além de medida de gravidade, sobretudo se associarmos a presença de sintomatologia clínica - AT(N)(C), e por isso o N fica em parênteses. A definição de “doença de Alzheimer” se baseia, então, na presença de A β positivo (define que pessoa se encontra no espectro da doença de Alzheimer – *Continuum* da DA) associado a p-Tau positivo, uma vez que é necessário a presença concomitante dos dois biomarcadores para o diagnóstico neuropatológico. Por outro lado, a presença de neurodegeneração e os sintomas cognitivos determinam a gravidade da doença, independente da patologia de base. O Quadro 8 ilustra a classificação AT(N)(C) (JACK e cols., 2018).

Quadro 8 - Classificação AT(N)(C), considerando biomarcadores e apresentação clínica.

Perfil de Biomarcadores	Sem alteração cognitiva	Comprometimento cognitivo leve	Demência
A-T-(N)-	Sem biomarcadores DA Sem alteração cognitiva	CCL e biomarcadores de DA sem alteração	Demência e biomarcadores de DA sem alteração
A+T-(N)-	Alterações patológicas da DA pré-clínica	Alterações patológicas da DA com CCL	Alterações patológicas da DA com Demência
A+T+(N)-	DA pré-clínica	Doença de Alzheimer com CCL (DA prodrômica)	Demência da Doença de Alzheimer
A+T+(N)+			
A+T-(N)+	Alterações patológicas concomitantes de DA e outras, sem alteração cognitiva	Alterações patológicas da DA concomitante a outra com CCL	Alterações patológicas da DA concomitante a outra com Demência
A-T+(N)-	Alterações patológicas não-DA sem alteração cognitiva	Alterações patológicas não-DA com CCL	Alterações patológicas não-DA com demência
A-T-(N)+			
A-T+(N)+			

DA: doença de Alzheimer; CCL: comprometimento cognitivo leve. **Fonte:** adaptado de JACK CR Jr. *Alzheimers Dement* 2018;14(4):535-562.

Por fim, os autores recomendam que estes biomarcadores sejam examinados em diferentes populações. Na população brasileira, apesar da alta prevalência de DDA, os estudos com biomarcadores ainda são escassos (COUTINHO e cols., 2020; RADANOVIC e cols., 2019; RIZZI e cols., 2018; WEILER e cols., 2018) e os mecanismos da DA precisam ser melhor investigados, considerando as características genéticas, sociodemográficas e clínicas distintas da população.

1.4 BIOMARCADORES NO LCR

Jack et al (JACK e cols., 2018) reconhecem que a principal limitação desse sistema é o alto custo e a metodologia invasiva usada na avaliação dos biomarcadores. Para países de baixa e média renda, como o Brasil, que apresentam maior aumento proporcional em número de portadores de demência, esse fator é ainda mais limitante (PRINCE; WIMO; GUERCHET, 2015). Considerando métodos menos invasivos, como PET-CT, é importante lembrar que a avaliação depende de aparelho específico, de alta tecnologia, além da disponibilidade dos marcadores específicos para a DA e de profissionais altamente qualificados. Trata-se, dessa forma, de tecnologia de alto custo e de difícil aplicabilidade.

Diversos estudos que buscaram comparar a avaliação de biomarcadores de DA por PET-CT amilóide e LCR mostraram alta concordância entre os métodos (BLENNOW e cols., 2015; LANDAU e cols., 2013; PALMQVIST e cols., 2014). Alguns deles indicaram que os biomarcadores do LCR podem detectar alterações em β -amilóide antes do PET-CT (PALMQVIST; MATTSSON; HANSSON, 2016). Achados semelhantes podem ser encontrados para biomarcadores Tau, com associação moderada entre biomarcadores fluidos no LCR e os resultados do PET-CT (MATTSSON e cols., 2017). É importante destacar também que a punção lombar é um procedimento bem conhecido, seguro, acessível e de fácil realização. Nesse contexto, o uso de biomarcadores no LCR surge como uma alternativa viável e não menos acurada.

Várias técnicas foram estudadas para o processamento dos biomarcadores fluidos no LCR. Atualmente, as principais técnicas comercialmente disponíveis são o método não automatizado de ensaio imunoenzimático (ELISA), o semiautomatizado Luminex (xMAP) (OLSSON e cols., 2016) e os ensaios automatizados de última geração, imunensaio enzimático quimioluminescente (Lumipulse®, fujirebio, Europa) e imunensaio de eletroquimioluminescência (Elecsys®, Roche Diagnostics, Suíça) (BITTNER e cols., 2016; LEITÃO e cols., 2019). Apesar do surgimento de tecnologias inovadoras, a técnica mais utilizada em pesquisas ainda é o ELISA, principalmente o teste INNOTEST® (Fujirebio, Europa) (LEUZY e cols., 2021). Trata-se de uma técnica manual baseada em imunensaio enzimático em fase sólida em que se usa um anticorpo monoclonal para capturar

especificamente o biomarcador de interesse. Neste método, deve ser realizado um ensaio para cada biomarcador. (VEERABHADRAPPA e cols., 2020).

Por outro lado, o Luminex é um teste de múltiplos analitos, semiautomatizado, por meio do qual é possível detectar e quantificar simultaneamente todos os biomarcadores em uma mesma amostra (HERSKOVITS e cols., 2013), reduzindo erros de bancada. Apresenta ainda a vantagem de utilizar menor quantidade de amostra por ensaio e demandar menos tempo para processamento (KANG e cols., 2012). Além disso, estudos mostram que há uma redução da variabilidade intra e inter ensaio quando comparado ao ELISA por um custo consideravelmente menor e acurácia semelhante (FAGAN e cols., 2011; IRWIN e cols., 2012; LE BASTARD e cols., 2013; VEERABHADRAPPA e cols., 2020). Nesse contexto, o Luminex se destaca como uma boa opção.

O Luminex mais comumente usado em pesquisas é INNO-BIA AlzBio3® (Fujirebio, Europa). Entretanto o laboratório Fujirebio descontinuou sua comercialização em janeiro de 2021, tornando uma opção inviável para pesquisas futuras. Dessa forma, outros testes Luminex comercialmente disponíveis, como Millipore xMap® (HNABTMAG-68K) (Millipore, Alemanha) tendem a ganhar espaço no meio científico. Até onde sabemos, o Millipore xMap® foi pouco estudado como biomarcador de DA, de modo que carecem de estudos que avaliem a metodologia em diversos cenários de pesquisas clínicas.

2 JUSTIFICATIVA

A pesquisa de biomarcadores se justifica para o diagnóstico precoce da DA e para a investigação de mecanismos envolvidos na sua fisiopatologia, especialmente na nossa população, na qual estudos clínicos envolvendo biomarcadores ainda são escassos.

O diagnóstico clínico precoce da DA ainda é difícil, uma vez que a sintomatologia da doença é compartilhada por uma grande variedade de transtornos que refletem características neuropatológicas comuns. Por outro lado, só é possível estabelecer o diagnóstico nas fases pré-clínicas por meio de biomarcadores. Este fato torna de grande relevância estabelecer biomarcadores confiáveis que contribuam para definir o diagnóstico, estimar o risco, avaliar o estágio da doença e monitorar a progressão e a resposta terapêutica (DUBOIS e cols., 2021).

É importante ressaltar que a definição da DA como um construto biológico possibilitará a caracterização mais acurada e uma maior compreensão da sequência de eventos que levam ao comprometimento cognitivo associado com a doença, bem como de sua etiologia multifatorial. Esta definição também permitirá uma abordagem mais precisa dos estudos de intervenção terapêutica direcionando-os para alvos em vias específicas do processo de doença, além de permitir a seleção mais adequada dos participantes dos ensaios clínicos (JACK e cols., 2018; JACK e cols., 2016). Reforça-se, ainda, a existência de várias drogas modificadoras da doença (DMD) promissoras, desenvolvidas com base nos mecanismos moleculares, em fase II e III de ensaios clínicos randomizados. Para utilização destas DMD é necessário o estabelecimento do diagnóstico biológico da doença, bem como a avaliação evolutiva dos marcadores neurobiológicos da DA (CUMMINGS e cols., 2020; LOUREIRO e cols., 2020)

Por fim, o alto custo das metodologias atualmente disponíveis para avaliação de biomarcadores restringe seu uso em países de baixa e média renda, locais onde se espera maior prevalência da doença. Dessa forma, é de extrema importância explorar metodologias acessíveis e custo-efetivas, como o Millipore xMap®.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

- Avaliar o perfil de biomarcadores no líquido cefalorraquidiano em pacientes que apresentem CCLa e demência por DA e em idosos sem comprometimento cognitivo e funcional objetivo.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar a amostra de pacientes com CCLa e demência por DA quanto a dados sociodemográficos e clínicos, estudar as correlações entre variáveis clínicas e sociodemográficas e os biomarcadores líquóricos.

- Caracterizar as amostras de pacientes com biomarcador normal, *continuum* da doença de Alzheimer e alterações de biomarcadores não-Alzheimer quanto a dados sociodemográficos e clínicos, e estudar as correlações entre variáveis clínicas e sociodemográficas e os biomarcadores líquóricos.

- Avaliar a possível relação entre os marcadores A β 42, p-Tau, t-Tau no LCR de portadores de CCLa e DDA quando comparados a controles sem comprometimento cognitivo e funcional objetivo.

- Comparar e correlacionar as medidas líquóricas dos biomarcadores A β 42, p-Tau, t-Tau e suas razões, obtidos pela técnica ELISA e LUMINEX.

- Avaliar a acurácia diagnóstica do teste Millipore xMap (HNABTMAG-68K) em relação ao padrão de referênciade referência INNOTEST ELISA

- Definir um ponto de corte para o teste Millipore xMap para este grupo clínico (HNABTMAG-68K)

4 METODOLOGIA

O presente trabalho foi desenvolvido pelo grupo de pesquisas “Envelhecimento e doenças neurodegenerativas”, coordenado pela professora Maria Aparecida Camargos Bicalho, cujo objetivo é estudar os aspectos do envelhecimento fisiológico e patológico e os mecanismos de doença relacionados ao processo de envelhecimento na população brasileira. É importante ressaltar que o trabalho é desenvolvido em parceria com as seguintes instituições: Centro de Referência à Saúde do Idoso da UFMG Instituto Jenny de Andrade Faria (IJAF), Laboratório Ciência e Tecnologia em Medicina Molecular (CTMM), Hospital Odilon Behrens, Hospitais João XXIII e Maria Amélia Lins da Fundação Hospitalar do Estado de Minas Gerais FHEMIG, Hospital da Polícia Militar de Minas Gerais, Instituto René Rachou-Fiocruz e Laboratório de Neurociências da UFMG. Por fim, apresentaremos a metodologia usada para realização do “estudo 1”, manuscrito já submetido à revista *Frontiers in Psychiatry - section Aging Psychiatry*.

4.1 SELEÇÃO DE AMOSTRA

Entre março de 2015 e novembro de 2020 foram selecionados 81 pacientes, sendo 36 pacientes com diagnóstico clínico de DDA, 29 de CCLa e 16 pacientes sem comprometimento cognitivo ou funcional objetivo (sCCO). Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG sob o número n° CAAE 79354317.1.0000.5149 (anexo 1). Todos os participantes e seus acompanhantes/cuidadores assinaram o termo de assentimento livre e esclarecido (TALE) e o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (anexo 2), respectivamente, mesmo aqueles que posteriormente foram excluídos do trabalho. Para melhor compreensão, descreveremos a metodologia de seleção dos participantes em dois tempos: primeiro, aqueles com comprometimento cognitivo e, em segundo momento, os pacientes sem comprometimento cognitivo objetivo e funcional.

Os participantes do estudo que apresentavam comprometimento cognitivo (DDA e CCLa) foram provenientes do Centro de Referência à Saúde do Idoso da UFMG-Instituto Jenny

de Andrade Faria (IJAF). Os idosos foram encaminhados pela atenção primária da Prefeitura de Belo Horizonte ao IJAF, com demandas variadas e, foram submetidos a avaliação geriátrica multidimensional por médico geriatra treinado, para definição de plano de cuidados. Parte dos pacientes que apresentam suspeita clínica de comprometimento cognitivo foram convidados a participar do ambulatório de comprometimento cognitivo leve e demência do IJAF.

Os idosos que aceitaram participar do projeto de pesquisa foram submetidos à nova avaliação geriátrica, com foco em avaliação cognitiva, além de avaliação neuropsicológica. Foram realizados exames bioquímicos, hematológicos e sorológicos para pesquisa da etiologia do comprometimento cognitivo e avaliação de comorbidades: hemograma, ureia, creatinina, sódio, potássio, cálcio iônico, glicose em jejum, glicohemoglobina, colesterol total, frações e triglicérides, transaminases, fosfatase alcalina, GGT, TSH, VDRL, 25- OH-vitamina D, vitamina B12 e ácido fólico. Ademais, foram realizados exames de neuroimagem (Tomografia computadorizada do crânio e/ou ressonância nuclear magnética) com objetivo de excluir outras causas para o comprometimento cognitivo e corroborar com o diagnóstico etiológico de doença de Alzheimer.

Após a realização das avaliações geriátrica e neuropsicológica, dos exames laboratoriais e de neuroimagem, os casos foram discutidos em reunião entre as equipes de neuropsicologia e geriatria, para definição final do diagnóstico cognitivo seguindo os critérios estabelecidos por DSM-5 (2014) (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2014) para diagnóstico de CCL e de Mckhann e cols. (2011) para diagnóstico de demência secundário à DA. Uma vez definido o diagnóstico clínico, os pacientes foram convidados a realizar punção lombar (PL) para coleta de LCR e coleta de sangue periférico. Aqueles que aceitaram ser submetidos a todos os procedimentos foram incluídos no estudo. No período avaliado, foram coletados dados clínicos e material biológico de 65 pacientes, sendo 29 com CCLa e 36 com DDA.

Os indivíduos sem comprometimento cognitivo objetivo e funcional eram oriundos do Hospital Odilon Behrens, dos Hospitais João XXIII e Maria Amélia Lins, e do Hospital da Polícia Militar de Minas Gerais, onde foram submetidos a procedimentos cirúrgicos eletivos, por indicação da equipe médica assistente, sob raquianestesia, permitindo a coleta de líquido cefalorraquidiano para o estudo. O recrutamento aconteceu da seguinte maneira:

(1) os pesquisadores do grupo identificavam, conforme escala divulgada previamente pela equipe cirúrgica, pacientes potenciais para o estudo (idade superior a 60 anos e procedimentos eletivos ou semi-eletivos infra-abdominais – ex. artroplastia de joelho, fratura de quadril, histerectomia, hérnia inguinal).

(2) os pesquisadores realizavam uma entrevista rápida com o paciente ou responsável legal antes do procedimento cirúrgico, procurando identificar, durante processo de triagem, possíveis fatores de exclusão. Nesse momento não eram realizados testes cognitivos.

(3) o idoso era convidado a participar do estudo, sendo informado da coleta do LCR durante a realização de raquianestesia.

(4) O pesquisador apresentava e explicava o TCLE aos indivíduos que aceitavam participar do estudo e eram solicitadas assinaturas dos presentes.

(5) O anestesista, que já havia sido contatado quanto a possível indicação de coleta de LCR para pesquisa, era novamente contatado, informando quanto à anuência do paciente para coleta do material durante procedimento anestésico.

(6) Caso o procedimento anestésico ocorresse sem intercorrências, o LCR era coletado e entregue ao pesquisador.

(7) O pesquisador encaminhava o material ao laboratório de Ciência e Tecnologia em Medicina Molecular (CTMM) da Faculdade de Medicina da UFMG para processamento do Material.

(8) Os idosos ou seus familiares responsáveis eram contatados a fim de agendar avaliação clínica e cognitiva. Esse contato era feito no período superior a 20 dias após a realização do procedimento cirúrgico que permitiu a coleta do LCR, de modo a evitar interferência do processo de hospitalização na avaliação cognitiva e funcional.

(9) No ambulatório IJAF, os idosos eram submetidos ao mesmo protocolo clínico dos demais participantes da pesquisa, com avaliação geriátrica e neuropsicológica para a definição do diagnóstico cognitivo clínico.

(10) Os pacientes que não apresentam comprometimento cognitivo e funcional objetivo eram incluídos no estudo. Neste momento era coletado sangue periférico novamente.

Optamos por selecionar os pacientes pertencentes ao sCCO após realização de raquianestesia para procedimento cirúrgico eletivos ou semi-eletivos de forma a evitar procedimentos desnecessários em pacientes sem comprometimento cognitivo, tendo em vista as considerações éticas relativas à realização de procedimento com finalidade puramente de pesquisa. Foi coletado material biológico (líquor e sangue) de 32 indivíduos, entretanto apenas

16 pacientes foram incluídos na amostra (figura 5). Os demais apresentavam critérios de exclusão, identificados após coleta do material. Na próxima subseção são descritos os critérios de exclusão do estudo. Além disso, três indivíduos, inicialmente recrutados como sCCO, apresentavam CCLa à avaliação cognitiva objetiva (geriátrica e neuropsicológica) e foram avaliados como grupo CCLa. Não foi realizado cálculo de amostra para definição dos grupos, sendo incluídos os participantes que atendiam aos critérios descritos a seguir.

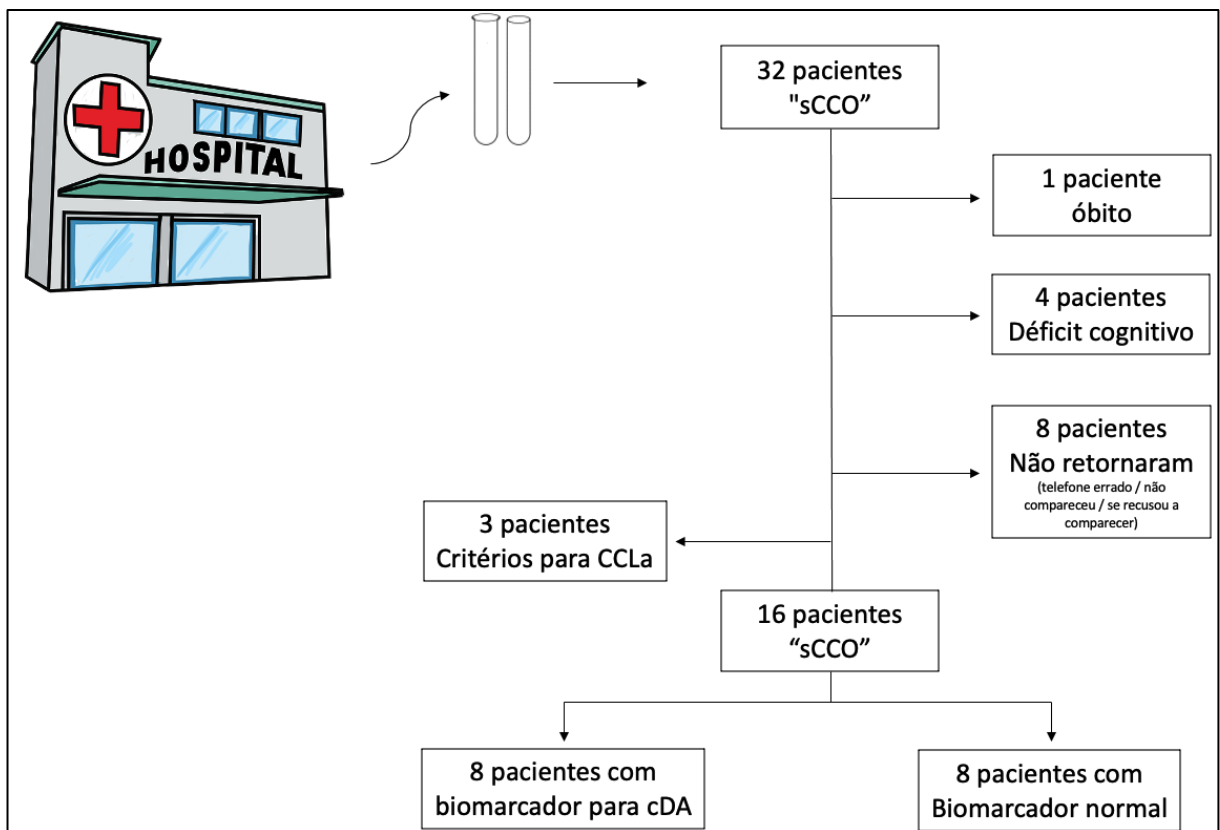


Figura 5 – Seleção de pacientes sem comprometimento cognitivo e funcional

Legenda: No fluxograma pode ser observado as perdas de pacientes do grupo sem comprometimento cognitivo objetivo. Por fim, o grupo é separado segundo classificação biológica avaliada por Luminex, usando os pontos de corte apurados pelo “estudo 1”. sCCO: sem comprometimento cognitivo objetivo; CCLa: comprometimento cognitivo leve amnésico; cDA: *Continuum* da Doença de Alzheimer. **Fonte:** próprio autor (2021)

Ressaltamos que para participação no estudo era essencial a assinatura do TCLE, pelo paciente e/ou acompanhante/cuidador. No caso de indivíduos portadores de demência, o participante assinava o Termo de Assentimento Livre e Esclarecido (TALE). Neste caso, o TCLE é assinado também pelo acompanhante/cuidador.

4.2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Idosos com idade igual ou superior a 60 anos, sem comprometimento cognitivo e funcional objetivo, com CCL amnésico único ou múltiplos domínios e com Demência de Alzheimer que aceitaram participar do projeto de pesquisa e assinaram o TCLE, e que não apresentaram nenhum dos critérios de exclusão apresentados a seguir.

4.3 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Os pacientes que apresentaram qualquer critério abaixo foram excluídos do estudo.

- a) Idade inferior a 60 anos;
- b) Incapacidade cognitiva por demência não-Alzheimer;
- c) Incapacidade cognitiva por transtorno depressivo maior;
- d) Portadores de transtornos mentais moderados a grave;
- e) Transtornos cerebrovasculares, hidrocefalia e massa intracraniana documentada por tomografia computadorizada ou RNM;
- f) Anormalidades no folato sérico e / ou vitamina B12, sorologia para sífilis ou níveis de hormônio tireoidiano;
- g) História de lesão cerebral traumática ou outra doença neurodegenerativa (por exemplo, doença de Parkinson);
- h) Doenças inflamatórias crônicas ou agudas;
- i) Doença neoplásica em atividade;
- j) Tratamento com anti-inflamatórios ou anticoagulantes;
- k) Portadores de distúrbios de coagulação ou osteoartrite grave da coluna lombar, suspeita de abscesso epidural espinhal, infecção de pele no local da PL, que contraindicassem o procedimento.
- l) Não comparecimento à consulta para aplicação de protocolo clínico estruturado.
- m) Recusa em assinar o TCLE.

4.4 AVALIAÇÃO COGNITIVA

Todos os pacientes foram submetidos a um mesmo protocolo de pesquisa estruturado (anexo 3). Inicialmente foi aplicado um questionário sobre aspectos sociodemográficos, avaliação da história clínica atual, progressa e familiar, caracterização das comorbidades, medicamentos em uso, hábitos de vida e detalhamento da queixa de esquecimento.

Os diagnósticos de hipertensão arterial sistêmica (HAS), Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2), dislipidemia, doença arterial coronariana (DAC) e acidente vascular encefálico (AVE) se basearam nos relatos do paciente e do acompanhante, nos relatórios médicos e no uso de medicamentos específicos para estas condições clínicas de saúde. Para evitar que estes diagnósticos fossem subestimados, também foram consultados os exames laboratoriais de glicemia de jejum, glicohemoglobina e colesterol total e frações, neuroimagem e eletrocardiograma, além da mensuração de pressão arterial, seguindo critérios diagnósticos reconhecidos internacionalmente (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2016; JAMES e cols., 2014; STONE e cols., 2014). Ressalta-se que a presença de AVE era um potencial fator de exclusão, sendo incluídos apenas aqueles que apresentassem lesões cerebrovasculares subcorticais sem repercussão clínica. O critério estabelecido de tabagismo foi ter fumado 100 ou mais cigarros durante a vida (SANTOS e cols., 2011). Optou-se por avaliar ex-tabagistas e tabagistas atuais em conjunto neste estudo.

O protocolo de avaliação cognitiva utilizado incluiu os seguintes instrumentos de avaliação: Mini Exame do Estado Mental (2003) , Teste de fluência verbal (1997), Lista de palavras CERAD (1989; 1998), Teste de Reconhecimento de figuras (1994), Teste do Relógio (1994), Inventário Neuro-psiquiátrico (1994), Escala de demência Clínica (1993), Avaliação funcional Pfeffer (1982), Critérios diagnósticos para depressão (DSM 5), Geriatric Depression Scale (GDS, 1999) e Versão brasileira da escala de Apatia (2010). Descreveremos sucintamente cada teste a seguir:

Mini-Exame do Estado Mental (MEEM)

O MEEM (FOLSTEIN; FOLSTEIN; MCHUGH, 1975) é o teste mais amplamente utilizado para triagem cognitiva, é considerado de rastreio e utilizado para avaliação da cognição geral dos participantes. É composto por 11 itens, com pontuação máxima de 30 pontos. Os itens avaliados são: orientação temporal, espacial, memória, atenção, linguagem, praxia, gnosis e função executiva. Utilizamos como ponto de corte, de acordo com escolaridade, de 18 pontos (para baixa escolaridade) e 26 pontos (para escolaridade maior ou igual a 8 anos), conforme Bertolucci e cols. (1994).

Lista de palavras CERAD

Esse teste foi utilizado para avaliação da memória episódica dos pacientes. Envolve a leitura de forma lenta e clara, de uma lista de 10 palavras e solicita-se ao examinado que repita, durante a leitura, uma a uma, de forma a garantir a compreensão de cada palavra. Repete-se o procedimento três vezes, solicitando que ele relate todas as palavras que se lembrar, independente da ordem, e cada tentativa. Ao final das três etapas o examinador insere uma tarefa distratora. Segue então, após cinco minutos, uma evocação de curto prazo e uma tarefa de reconhecimento. Os escores obtidos nas três tentativas devem ser de quatro, seis e sete/oito. Segundo BERTOLUCCI e cols. (2001) o ponto de corte para o somatório das três tentativas é 13 pontos. A evocação de cinco minutos deve ser de três/quatro palavras e o reconhecimento de sete pontos (BERTOLUCCI e cols., 2001; BERTOLUCCI e cols., 1998; MORRIS e cols., 1989).

Bateria cognitiva breve - Teste de figuras

É também um teste utilizado para avaliação de memória episódica. Nesse caso, envolve a apresentação de 10 figuras ao examinado, solicitando que identifique e nomeie cada uma. Após, segue-se uma evocação imediata seguido por uma nova apresentação dos estímulos e outra evocação mais duas vezes, de forma a garantir três evocações imediatas com objetivo de

aprendizagem. Ao final das três etapas, é inserida uma tarefa distratora e, posteriormente, sugere-se ao examinado que evoque as figuras apresentadas, seguindo de uma tarefa de reconhecimento. Os pontos de corte são: cinco pontos para memória incidental, seis pontos para memória imediata, cinco pontos para memória de evocação e oito pontos para a memória de reconhecimento (NITRINI e cols., 1994).

Teste do Relógio

Esse teste é muito conhecido, comumente adotado na fase de rastreio para demência. Na versão utilizada no presente estudo, é solicitado ao idoso que desenhe um relógio de ponteiros em um círculo pré-desenhado (10-12cm), com todos os números marcando 11 horas e 10 minutos. O teste não é cronometrado e pode ser repetido. Utilizou-se o escore proposto por (SHULMAN, 2000), com pontuação variando de zero a cinco pontos, com maior pontuação para o melhor desempenho.

Teste de fluência verbal

Esse teste tem por objetivo avaliar a memória semântica, função executiva e linguagem. É solicitado ao sujeito que enumere o máximo de animais ou frutas em um minuto cronometrado. Esse teste apresenta alta acurácia na avaliação cognitiva de idosos. A pontuação de corte depende da escolaridade do paciente, sendo esperado maior ou igual a nove animais ou frutas para analfabetos, e maior ou igual a 13 animais ou frutas para sujeitos que apresentem oito anos ou mais de escolaridade (NITRINI e cols., 1994).

Inventário Neuro-psiquiátrico (NPI)

O NPI (Cummings, 1994) é um instrumento utilizado para avaliar sintomas comportamentais comumente encontrados nas demências. Trata-se de um questionário que

compreende 10 itens de forma independente. Os sintomas incluem: delírios, alucinações, irritabilidade, desinibição, agitação, ansiedade, depressão, euforia, apatia e alterações psicomotoras. Cada item avaliado tem seu escore definido na multiplicação da pontuação baseada na frequência (zero a três) com a obtida com a gravidade do sintoma (zero a quatro pontos). Posteriormente a pontuação de cada item avaliado é somada e define-se o escore final. A pontuação máxima de 12 para cada comportamento. Quanto maior a pontuação, maior a gravidade dos sintomas comportamentais (CUMMINGS e cols., 1994).

Escala de demência Clínica (CDR)

A escala de demência clínica (do inglês, “*clinical dementia scale*”-CDR) desenvolvida por Morris (1993) tem por objetivo avaliar a gravidade da doença e identifica casos em que há dúvida no diagnóstico, avaliando o nível de comprometimento em seis categorias funcionais: memória, orientação, juízo e resolução de problemas, assuntos comunitários, atividades domésticas e hobbies, e cuidado pessoal. Cada categoria do CDR pode ser graduada em cinco níveis distintos: (0) saudável, (0,5) questionável, (1) leve, (2) moderado, (3) grave. O CDR foi traduzido e adaptado para o Brasil (MORRIS, 1993).

Avaliação funcional de Pfeffer

É um questionário que deve ser respondido pelo cuidador, cujo objetivo é avaliar as atividades instrumentais de vida diária instrumentais. É distribuído em 10 questões, cada uma com quatro gradações: Pontua-se “zero” se o paciente faz a tarefa sem dificuldade, “um” se faz com dificuldade, “dois” se necessita de auxílio para fazer a tarefa e “três” se é incapaz de realizar a tarefa. Ao final, soma-se cada questão, sendo que a pontuação total varia de 0-30. Permite também pontuar tarefas que nunca foram habituais ao paciente, questionando o cuidador sobre a capacidade do idoso de eventualmente realizar a tarefa em caso de necessidade. Pontuação maior ou igual a cinco sugere a presença de prejuízo funcional (PFEFFER e cols., 1982).

Crêterios diagnósticos para depressão (DSM 5)

Para o diagnóstico de depressão   necessário a presença de cinco ou mais dos seguintes sintomas durante duas semanas e representarem uma mudança em rela o ao funcionamento anterior.   obrigatório a presença de um dos dois primeiros cr terios – (1) humor deprimido na maior parte do dia, quase todos os dias; (2) interesse ou prazer acentuadamente diminuídos por quase todas as atividades na maior parte do dia, quase todos os dias; (3) perda ou ganho significativo de peso não intencional, ou diminui o ou aumento do apetite; (4) ins nia ou hipersonia quase todos os dias; (5) agita o ou retardo psicomotor quase todos os dias (observáveis por outros); (6) fadiga ou perda de energia quase todos os dias; (7) sentimento de inutilidade ou culpa, excessiva ou inadequada (que pode ser delirante), quase todos os dias; (8) capacidade diminuída de pensar ou concentrar-se, ou indecisão, quase todos os dias; (9) pensamentos de morte recorrentes, idea o suicida recorrente sem um plano específico, tentativa de suicídio ou plano específico (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2014).

Escala de depressão geriátrica

A escala de depressão geriátrica (do inglês, *geriatric depression scale- GDS*)   um dos instrumentos mais frequentemente utilizados para o rastreamento de depressão em idosos. Desenvolvida por Yesavage em 1983 (versão com 30 itens), e simplificada por Sheikh & Yesavage, em 1986 (versão com 15 itens). Ela é composta por perguntas fáceis de serem entendidas, tem pequena varia o nas possibilidades de respostas e pode ser auto aplicada (preenchimento de formulário) ou aplicada por um entrevistador treinado (preenchimento de questionário). O diagnóstico de depressão deve ser suspeitado em idosos com seis respostas positivas para depressão (ALMEIDA; ALMEIDA, 1999)

4.5 AVALIAÇÃO NEUROPSICOLÓGICA

A avaliação neuropsicológica tem por objetivo confirmar o diagnóstico cognitivo-funcional. É realizado conforme “Protocolo de avaliação neuropsicológica para investigação de CCL e demência em idosos de baixa escolaridade” (DE PAULA e cols., 2013). Nesse protocolo, de forma breve e estruturada, objetiva-se avaliar os seguintes domínios cognitivos comprometidos: aprendizagem e memória, atenção complexa, funções executivas, habilidades perceptomotoras e linguagem. Para isso, foram utilizados os seguintes testes:

- Escala de Avaliação de Demência Mattis: Trata-se de uma medida de avaliação do estado cognitivo geral.
- Teste de Aprendizagem Auditivo-Verbal de Rey (RAVLT): medida de memória episódica.
- Bateria de Avaliação Frontal (FAB): avalia déficits fronto-executivos.
- Versão Reduzida do Token Test: teste avaliação de linguagem.
- Fluência Verbal (FV) Semântica e Fonêmica: objetiva analisar a linguagem e função executiva.
- Span de Dígitos: avalia velocidade de processamento e memória de curto prazo
- Desenho do Relógio: avalia função visuoespacial e função executiva
- Construção com Palitos: avalia habilidades visuoespaciais
- Teste de Nomeação do Laboratório de Investigações Neuropsicológicas (TN-LIN): avaliação de linguagem

4.6 Coleta de amostras biológicas:

4.6.1 Sangue periférico:

A coleta de sangue periférica foi realizada por meio de técnica estéril, em sistema a vácuo totalmente descartável. Coletamos cerca de 15ml de sangue total em tubos contendo anticoagulante Heparina, citrato e EDTA. Após centrifugação de parte das amostras, o plasma

foi estocado a -80°C . Parte da amostra coletada em tubo com EDTA foi submetida a extração de DNA para posterior genotipagem. Ressalta-se que a coleta de sangue periférico faz parte do protocolo de pesquisa, entretanto esses dados não foram analisados no estudo 1, objetivo dessa dissertação.

4.6.2 Líquido cefalorraquidiano

A coleta de amostras de LCR foi realizada através de PL por médico anestesista experiente. Para os pacientes com comprometimento cognitivo, o procedimento foi previamente agendado conforme disponibilidade da equipe e do paciente. Antes da realização do procedimento foi realizada uma breve entrevista a fim de excluir condições inflamatórias agudas e condições clínicas que contraindicassem a realização do procedimento e, ainda, explicar o paciente todo o procedimento realizado. Os pacientes sem comprometimento cognitivo ou funcional objetivo foram submetidos a punção lombar durante procedimento de raquianestesia.

A PL foi realizada com técnica estéril, com o paciente em decúbito lateral ou sentado. A agulha de peridural tipo Quinck número 22 foi inserida no espaço subaracnóideo, no espaço intervertebral entre L3/L4 ou L4/L5, para coleta de 6 ml de LCR em tubos de polipropileno (ENGELBORGHES e cols., 2017). As amostras foram imediatamente transportadas para o laboratório, em um intervalo máximo de duas horas. O material foi processado por 15 minutos a 3.000g em uma centrífuga a 4°C e, a seguir, as amostras aliqüotadas em amostras menores e, a seguir, estocadas a -80°C até a realização das análises.

Embora a PL seja geralmente reconhecida como segura, traz alguns riscos. As complicações mais comuns são a dor lombar e a cefaléia pós-punção lombar. Esta geralmente ocorre entre 24 e 48 horas após o procedimento e tem ocorrência rara em idosos, com prevalência inferior a 20% em clínicas de memória (DUITS e cols., 2016). A cefaléia é autolimitada e o tratamento consiste em repouso, hidratação e analgesia simples. Complicações potencialmente graves podem ocorrer, como a infecção pós-PL, hematomas e trombose de seio venoso. A infecção e os sangramentos volumosos são raros, especialmente quando as

recomendações são cuidadosamente seguidas e o procedimento realizado por profissionais treinados (DUIITS e cols., 2016), conforme adotado no presente estudo.

Nesse trabalho, entre os pacientes submetidos ao procedimento, foi relatada cefaléia em três pacientes (mulheres, com idade inferior a 75 anos). Não foram observadas outras complicações.

4.7 Procedimentos laboratoriais – LCR

Foram determinadas as concentrações de A β 42, p-Tau, t-Tau, através do método de Luminex xMap, em todas as amostras de LCR selecionadas (n=81). Foi utilizado o *kit Human Amyloid Beta and Tau Magnetic Bead Panel*® (HNABTMAG-68K) - Millipore xMap® - (Millipore, Germany). Entretanto, não encontramos trabalhos que avaliassem acurácia diagnóstica do teste e sugerissem pontos de corte para esse kit. Nesse contexto, foi delineado o “estudo 1”, que é o produto central dessa dissertação.

De todos os 81 pacientes, 35 apresentavam medidas de biomarcadores tanto com Luminex como com ELISA (Figura 6). Então, a partir do ensaio ELISA – INNOTEST®, buscou-se avaliar a acurácia diagnóstica do kit, além de determinar pontos de corte de cada biomarcador e de suas relações. A seguir descreveremos brevemente ambas as tecnologias. Ressalta-se que no “estudo 1” foi incluído apenas uma parte da amostra. A avaliação dos biomarcadores dos 81 pacientes será fruto de outros estudos do grupo. O ensaio ELISA foi realizado em parceria com o laboratório de Neurociências – UFMG e o ensaio Luminex em parceria com Instituto René Rachou-Fiocruz.

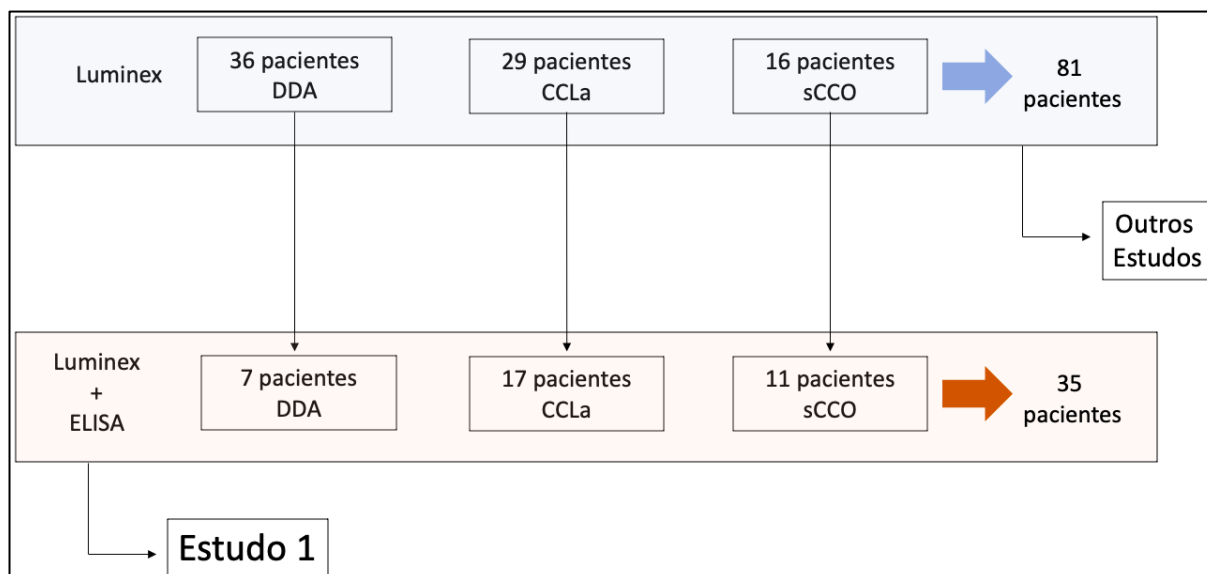


Figura 6 – Fluxograma de seleção da amostra do estudo 1

Legenda: DDA: Demência por Doença de Alzheimer; CCLa: Comprometimento cognitivo leve amnésico; sCCO: Grupo sem comprometimento cognitivo objetivo. **Fonte:** Próprio autor (2021)

4.7.1 Luminex – Millipore xMap®

Para as quantificações dos biomarcadores no LCR, utilizou-se a tecnologia Luminex Milliplex xMap® (Millipore, Alemanha) que permitiu a pesquisa dos respectivos analitos: A β 42, p-Tau e t-Tau.

Para a realização dos ensaios Luminex, utilizou-se as recomendações do fabricante. Inicialmente, descongelaram-se as amostras dos LCR (banho-maria a 37°C), homogeneizou (vórtex por 5 segundos) e centrifugou a 14.000g, por 5 minutos a temperatura ambiente.

Subsequentemente, adicionou-se 200 μ L de *Assay buffer* em cada poço da placa, selou-se e misturou-se em um agitador de placas por 10 minutos em temperatura ambiente (20-25°C). O *Assay buffer* foi decantado e removido a quantidade residual de todos os poços, invertendo a placa e batendo levemente em toalhas absorventes várias vezes. Após, foi adicionado, conforme cada poço previamente designado: 25 μ L de cada padrão aos “poços de padrão”; 25 μ L de *Assay buffer* (tampão de ensaio) aos “poços de fundo”; 25 μ L de amostras diluídas e centrifugadas aos “poços de amostras”; 25 μ L de anticorpos de detecção e 25 μ L de grânulos em

cada poço. A placa foi selada, embrulhada com papel alumínio e incubada durante a noite (16-20h), a temperatura ambiente (20-25°C) e sob agitação (300±50rpm).

No dia seguinte, todo o conteúdo do poço foi suavemente removido e a placa foi lavada por 3 vezes com 200 µL de *Wash Buffer*. A seguir, foi adicionado 50 µL da estreptavidina-ficoeritrina (SAPE) em cada poço. A placa foi selada, coberta por papel alumínio e incubou por 30 minutos em agitador (300±50rpm), temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Subsequentemente, procedeu-se a lavagem por 3 vezes com 200 µL de *Wash Buffer*. Ressuspendeu-se o *pellet* com adição de 100 µL de tampão de ensaio e homogeneizou-se as amostras por 10 minutos.

Determinou-se as intensidades médias de fluorescência por aquisição das amostras no equipamento Bio-Plex 200 (Bio-Rad Laboratories, California, EUA), utilizando-se o software Luminex xPONENT versão 3.1 (Merck Millipore, Massachusetts, EUA). As concentrações dos biomarcadores foram obtidas a partir da construção de curvas-padrão dos analitos (utilizando uma curva logística de ajuste de 5 parâmetros para transformar as intensidades médias de fluorescência em concentrações (pg/mL), utilizando-se o software Bio-Plex Manager™ versão 6.1 (Bio-Rad Laboratories, California, EUA).

4.7.2 ELISA – INNOTEST®

O imunoenensaio enzimático ELISA - INNOTEST® foi utilizado como teste de referência. Trata-se de um método manual, baseado em imunoenensaio enzimático de fase sólida no qual a proteína é capturada por um anticorpo monoclonal. Para quantificação dos biomarcadores Aβ42, p-Tau e t-Tau deve ser realizado 1 ensaio para cada biomarcador, utilizando kits específicos: INNOTEST® β-amiloide (1-42), INNOTEST® PHOSPHO-TAU (181P) e INNOTEST® hTAUAg (Fugirebio, Europe).

Para cada biomarcador, as amostras de LCR são adicionadas e incubadas com um anticorpo biotilado, e então este complexo antígeno-anticorpo é detectado. Após a adição da solução de trabalho do substrato, as amostras desenvolverão uma cor. A intensidade da cor é

uma medida da quantidade de proteína na amostra. Foi seguido a orientação do fabricante para realização dos ensaios.

Para o ponto de corte, utilizamos como referência os valores estabelecidos por Duits (DUITS e cols., 2014) e Mulder (MULDER e cols., 2010). Sabe-se que existe uma grande dificuldade em se determinar um único ponto de corte para os biomarcadores devido à grande variabilidade dos resultados intra e inter laboratório. Dessa forma, não há um consenso na literatura quanto a um valor absoluto.

A escolha do método neste trabalho baseou-se na consagração da literatura, sendo um dos mais citados. Definiu-se então como ponto de corte: $A\beta_{42} < 550 \text{ pg/ml}$, total tau (t-tau) $> 375 \text{ pg/ml}$, p-tau (p-tau) $> 52 \text{ pg/ml}$, relação t-tau/ $A\beta_{42} > 0,52$ e relação p-tau/ $A\beta_{42} > 0,08$.

4.8 PROCEDIMENTO ESTATÍSTICO E DELINEAMENTO DO ESTUDO 1

Os dados coletados foram computados em um banco de dados no programa Microsoft Excel[®]. Considerando a necessidade de avaliação da acurácia do teste Millipore xMap, foram selecionados, para o presente estudo dessa dissertação, apenas os pacientes que apresentavam medidas de biomarcadores ($A\beta_{42}$, p-tau, t-tau) com as 2 metodologias (ELISA e Luminex).

Dessa forma, foi delineado um estudo transversal, tipo caso controle, no qual foram incluídos 35 pacientes. Esses pacientes foram classificados e agrupados de 2 formas, de acordo com critérios clínico e biológico:

- Avaliação por critério clínico: conforme critérios diagnósticos já explorados, divididos em demência por doença de Alzheimer (DDA), Comprometimento cognitivo leve amnésico (CCLa) e sem comprometimento cognitivo objetivo (sCCO).
- Avaliação por critério biológico: definido a partir do sistema AT(N) em biomarcador normal, *continuum* da DA (Alzheimer's continuum) e APNA.

As análises foram realizadas pelos alunos do Projeto de Extensão CECiDa-LabEst – consultoria gratuita em Análise Estatística (Instituto de Ciências Exatas – Departamento de estatística – UFMG), sob orientação do Professor Aloisio Joaquim Freitas Ribeiro. Foi utilizado o software R (www.r-project.org) com seus pacotes, para análise estatística e construção de gráficos e figuras.

As diferenças sociodemográficas, de comorbidades e de biomarcadores entre os grupos clínicos e biológicos foram avaliadas por meio de testes de qui-quadrado (com valores de p escolhidos por simulação de Monte Carlo), ANOVA e testes de Kruskal-Wallis para variáveis não paramétricas. Para comparações múltiplas, foi aplicado o método de Turkey ou o teste de Nemenyi com aproximação de X ao quadrado. Analisamos as variáveis comparadas com base em critérios clínicos e biológicos. Foi realizada transformação logarítmica para os biomarcadores de LCR. Utilizou-se a correlação linear de Pearson para avaliar a força de associação entre os biomarcadores nos dois métodos.

Foram traçadas curvas *Receiver Operating Characteristic* (ROC) e as áreas sob a curva (AUCs) foram calculadas para cada biomarcador. Os pontos de corte do Luminex foram estabelecidos para a melhor combinação de sensibilidade e especificidade.

Também aplicamos as seguintes medidas de precisão: proporção de classificações corretas, índice de Youden e a distância do ponto de corte ao canto superior esquerdo da curva ROC.

5 RESULTADOS

Foram coletadas e selecionadas amostras de 81 pacientes entre março/2015 e novembro/2020. Trinta e seis (36) indivíduos apresentavam diagnóstico clínico de DDA, 29 de CCLa e 16 pacientes não apresentavam comprometimento cognitivo ou funcional objetivo. A média de idade foi de 74,03 (DP 6,18) anos com mediana 75 anos, e a média de escolaridade de 5,37 (DP 4,82) anos, mediana quatro anos. As mulheres foram a maioria, com 75,9% de participação na amostra geral.

Como já esclarecido previamente, durante o desenvolvimento desse trabalho foi identificada a necessidade de avaliar a acurácia e definir um ponto de corte do teste Millipore xMap®, para que pudéssemos proceder com a análises dos marcadores neuroinflamatórios. Dessa forma, a análise dos biomarcadores de todas as amostras não será escopo dessa dissertação. Apresentamos, a seguir, os resultados do estudo 1. Ressaltamos que os resultados dessa dissertação já foram submetidos a revista “*Frontiers Psychiatry*”, sessão *Aging Psychiatry* (tópico de pesquisa: *Cognitive Impairment and Inflammation in Old Age and the Role of Modifiable Risk Factors of Neurocognitive Disorders*) com o título de “*Millipore xMap® Luminex (HATMAG-68K): an accurate and cost-effective method for evaluating Alzheimer's biomarkers in cerebrospinal fluid*”. Até a defesa da presente dissertação os autores ainda aguardavam a resposta da revista (anexo 4 – e-mail de submissão).

5.1 RESULTADOS DO ESTUDO 1

Entre março/2015 e novembro/2020 foram selecionados 35 idosos, sendo 82,85% mulheres, com média de idade de 72,63 (DP 6,02) anos, e escolaridade média de 5,2 anos (DP 3,38). Do total de participantes, 42,85% relataram história familiar de DDA. Os participantes foram classificados de duas formas, primeiro seguindo critérios clínicos e, após medida de biomarcadores, seguindo critérios biológicos.

Para 77,8% (14) dos pacientes estudados houve concordância entre os dois critérios diagnósticos, como mostra a tabela 1. Dos 11 pacientes com diagnóstico clínico de sCCO, apenas três apresentavam biomarcador positivo para *continuum* da DA. Dos pacientes que apresentaram clínica de DDA, 85,7% (6) tinham também, alterações biológicas sugestivas de DA, uma vez que todos apresentavam marcador amilóide e taupatia positivo (A+T+N(+/-)). Dos pacientes classificados como CCLa, 29,4% (5) apresentavam biomarcador sugestivo de *continuum* da DA (Tabela 1).

Tabela 1 - Classificação dos pacientes segundo critérios clínico e biológico

Diagnostico biológico	Diagnóstico Clínico			
	sCCO	DDA	CCLa	Total
	N	N	N	N
Biomarcador Normal (N)	4	0	6	10
<i>Continuum</i> da DA (N)	3	6	5	14
APNA (N)	4	1	6	11
Total (N)	11	7	17	35

Legenda: sCCO: sem comprometimento cognitivo objetivo; DDA: demência na doença de Alzheimer; CCLa: comprometimento cognitivo leve amnésico; DA: Doença de Alzheimer; APNA: alterações patológicas não-Alzheimer; N: número.

5.1.1 Análise das variáveis segundo critério clínico

Entre os 35 participantes incluídos no estudo, sete pacientes apresentavam diagnóstico de DDA, 17 de CCLa e 11 sCCO. Não houve diferença significativa entre os subgrupos em relação a idade, escolaridade, IMC e sexo. Ademais, observamos que os grupos eram semelhantes em relação a comorbidades clínicas estudadas (HAS, DM, AVE, DAC, dislipidemia e tabagismo), observando diferença significativa apenas em relação a presença de sintomas depressivos. Por fim, ressalta-se que o grupo sCCO apresentou a menor pontuação no Pfeffer e maior do MEEM, corroborando com o diagnóstico. Os dados sociodemográficos e clínicos são apresentados na tabela 2.

Tabela 2 - Variáveis sociodemográficas segundo diagnóstico clínico.

Variáveis	Diagnóstico Clínico			p-valor
	sCCO	DDA	CCLa	
	N=11 (DP)	N=7 (DP)	N=17 (DP)	
Idade	70,82 (6,11)	77,0 (5,94)	72,0 (5,41)	0,084
Escolaridade	6,18 (4,07)	4,14 (2,04)	5,15 (3,34)	0,594*
IMC	28,88 (4,81)	25,04 (4,40)	28,37(5,12)	0,240
MEEM	26,18 (2,48)	19,29 (3,82)	22,76 (3,54)	0,002*
Pfeffer	0,44 (0,73)	8,71 (4,82)	3,23 (2,59)	<0,001*
Sexo feminino (%) **	90,90	57,14	88,23	0,178
HF de DDA (%)**	36,36	57,14	41,12	0,763
Tabagismo (%) **	81,82	57,14	47,06	0,215
AVE (%)**	18,18	14,28	5,89	0,808
DAC (%)**	18,18	0,00	17,64	0,682
Sintomas				
Depressivos (%)**	18,18	71,42	70,59	0,016
DM2 (%)**	45,45	0,00	52,94	0,061
Dislipidemia (%)**	63,63	42,85	52,94	0,739

Legenda: Em negrito, valor $p < 0,05$. * Para estas variáveis foi realizado o teste de Kruskal-Wallis. ** para estas variáveis foi realizado o teste Qui-Quadrado. sCCO: Grupo sem comprometimento cognitivo objetivo; DDA: demência na doença de Alzheimer; CCLa: comprometimento cognitivo leve amnésico; N: número; DP: Desvio Padrão; IMC: índice de massa corporal; MEEM: Mini-exame do estado mental; Pfeffer: Escala de avaliação de atividades de vida diária instrumentais; HF de DDA: História familiar de Demência na Doença de Alzheimer; AVE: Acidente Vascular encefálico; DAC: Doença arterial coronariana; DM2: Diabetes *Mellitus* tipo 2

Em relação ao resultado dos biomarcadores, observamos, para ambos os métodos, proporção de gravidade, com valores mais altos para A β 42 no grupo sCCO, intermediários no CCLa e mais baixos para DDA, porém sem significância estatística. Em relação a p-Tau, observou-se diferença significativa entre os grupos ($p=0,023$) para ambos os métodos, sendo que os pacientes do grupo DDA apresentaram valores maiores. Já para t-tau, os valores foram mais elevados no grupo DDA, com significância estatística no teste ELISA, ($p=0,025$), porém não no Luminex. Por fim, foi observada diferença entre os grupos no que se refere as relações p-Tau/A β 42 (ELISA: $p=0,004$ e Luminex: $p=0,017$) e t-tau/A β 42 para ELISA ($p=0,003$). Os dados estão apresentados na tabela 3. A figura 7 mostra a distribuição dos biomarcadores por categoria de diagnóstico clínico.

Tabela 3 - Medidas de Biomarcadores por Luminex e ELISA, segundo diagnóstico clínico.

Variáveis	Diagnóstico Clínico			p-valor
	sCCO	DDA	CCLa	
	N=11 (DP)	N=7 (DP)	N=17 (DP)	
A β 42 ELISA	759,09 (280,93)	517,31 (54,49)	740,79 (314,64)	0,111
A β 42 Luminex	1483,32 (692,25)	993,97 (756,84)	1195,14 (575,70)	0,148
p-Tau ELISA	57,29 (24,06)	88,28 (32,27)	51,90 (26,05)	0,018
p-Tau Luminex*	71,48 (32,33)	131,91 (46,07)	83,48 (52,60)	0,023
t-Tau ELISA	312,43 (129,43)	578,93 (227,31)	353,43 (212,64)	0,025
t-Tau Luminex	4028,15 (2817,22)	5125,86 (2072,83)	4231,68 (2737,00)	0,410
p-Tau/A β 42 ELISA	0,09 (0,05)	0,20 (0,10)	0,08 (0,05)	0,004
p-Tau/A β 42 Luminex	0,06 (0,06)	0,18 (0,12)	0,08 (0,07)	0,017
t-Tau/A β 42 ELISA	0,47 (0,28)	1,37 (0,77)	0,54 (0,39)	0,003
t-Tau/A β 42 Luminex	3,27 (3,19)	6,80 (3,81)	3,94 (2,65)	0,041

Legenda: Medidas de A β 42, p-Tau e t-Tau e suas relações, t-Tau/A β 42 e p-tau/A β 42 avaliados por Luminex e ELISA, segundo diagnóstico clínico. Medidas em pg/ml para A β 42, p-Tau e t-Tau. *Kruskal-Walis. Em negrito, valor $p < 0,05$. N: número; DP: desvio padrão; sCCO: Grupo sem comprometimento cognitivo objetivo; DDA: demência na doença de Alzheimer; CCLa: comprometimento cognitivo leve amnésico.

Uma vez identificadas diferenças significativas entre os subgrupos, foi aplicado o procedimento de comparações múltiplas pelo método de Turkey. Observou-se que as diferenças ocorreram principalmente, em relação ao grupo sCCO e DDA (tabela 4).

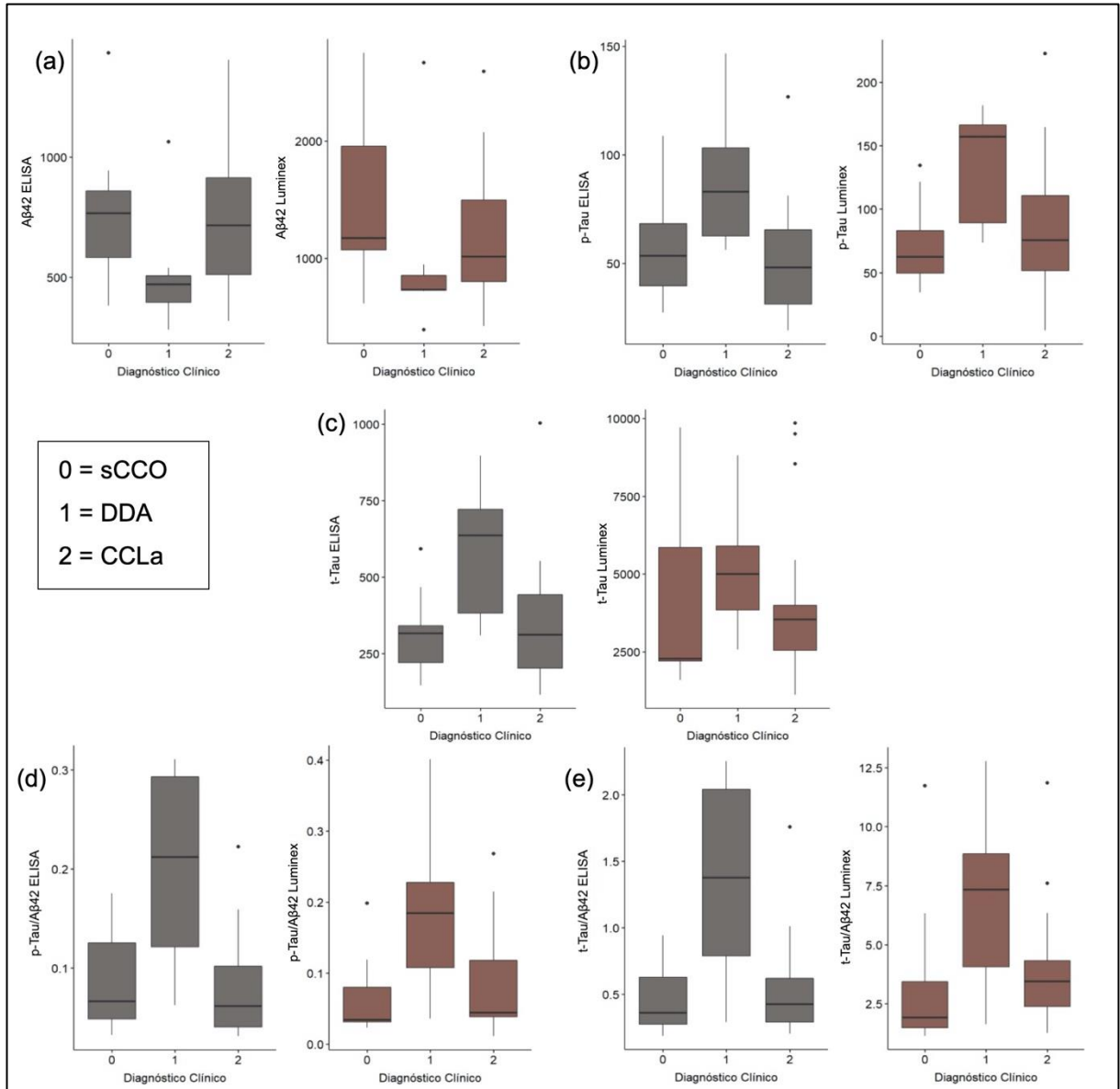


Figura 7 - Boxplots dos biomarcadores medidos por ELISA e Lumindex

Biomarcadores (a)Aβ42, (b)t-Tau, (c)p-Tau, (d)t-Tau/Aβ42 e (e)p-tau/Aβ42 medidas pelos testes ELISA e Lumindex por categoria de diagnóstico clínico. 0 = sem comprometimento cognitivo objetivo; 1= Demência na doença de Alzheimer; 2 = Comprometimento cognitivo leve amnésico. **Fonte:** próprio autor (2021)

Tabela 4 - Comparações múltiplas entre os subgrupos, segundo critérios clínicos

Variáveis	p-valores ajustados		
	sCCO-DDA	sCCO-CCLa	DDA-CCLa
MEEM	0,003	0,076	0,212
Pfeffer	0,001	0,125	0,064
t-Tau ELISA	0,033	0,954	0,036
p-Tau ELISA	0,093	0,707	0,013
p-Tau Luminex*	0,028	0,755	0,083
p-Tau/A β 42 ELISA	0,014	0,940	0,004
p-Tau/A β 42 Luminex	0,016	0,743	0,041
t-Tau/A β 42 ELISA	0,004	0,884	0,006
t-Tau/A β 42 Luminex	0,031	0,463	0,175

Comparações múltiplas pelo método de Turkey das variáveis em que se identificou significância estatística. *para pTau foi utilizado nemenyi test. sCCO: sem comprometimento cognitivo objetivo; DDA: demência na doença de Alzheimer; CCLa: comprometimento cognitivo leve amnésico; MEEM: Mini-exame do estado mental; Pfeffer: Escala de avaliação de atividades de vida diária instrumentais. Em negrito encontram-se os valores com significância estatística.

5.1.2 Análise das variáveis segundo critério biológico

A mesma amostra foi classificada levando em consideração os critérios biológicos, de forma que 10 pacientes apresentavam critérios para biomarcador normal (BN), 14 *continuum* da DA (cDA) e 11 para APNA. Entre aqueles do grupo cDA, 10 apresentavam critérios biológicos para DA (A+T+N(+/-) com a seguinte apresentação clínica: 6 com DDA, 2 com CCLa e 2 sCCO (figura 8).

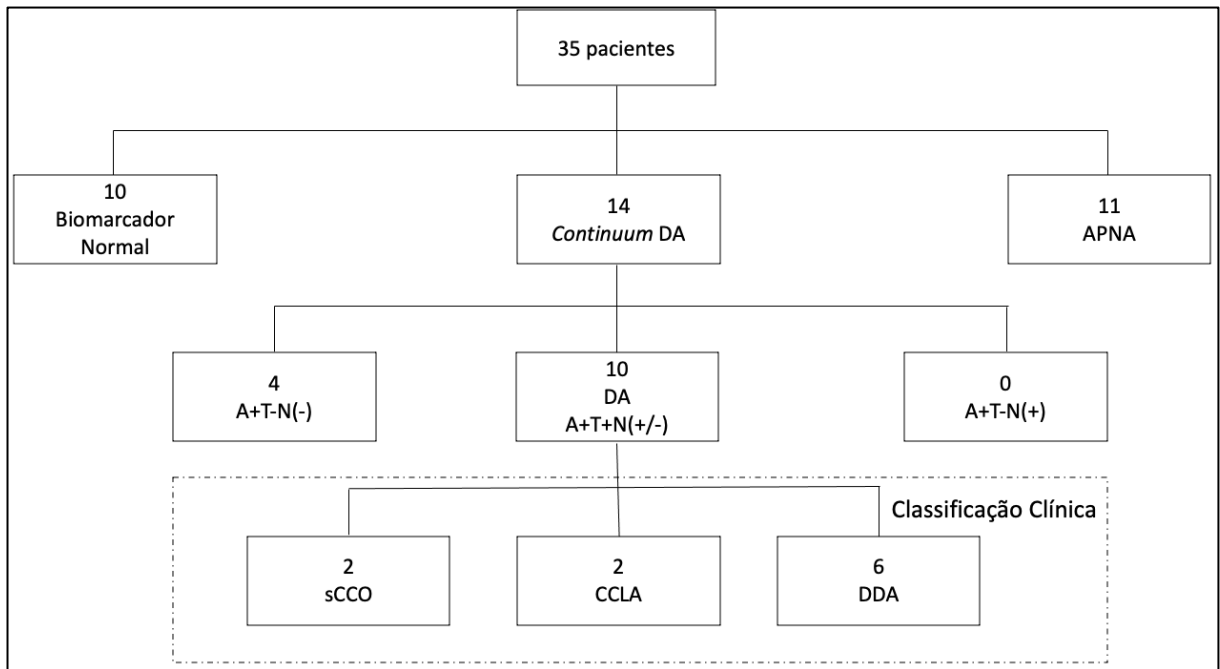


Figura 8 - Distribuição da amostra segundo critérios biológicos e classificação clínica dos pacientes que apresentam critério biológico para DA.

Legenda: *continuum* DA: *Continuum* da doença de Alzheimer; APNA: alterações patológicas não Alzheimer; DA: doença de Alzheimer; sCCO: sem comprometimento cognitivo objetivo; CCLA: comprometimento cognitivo leve amnésico; DDA: demência por Doença de Alzheimer. O retângulo tracejado indica a classificação clínica dos pacientes que apresentaram classificação biológica de doença de Alzheimer. **Fonte:** Próprio autor (2021)

Não houve diferença significativa entre os subgrupos em relação a idade, escolaridade, IMC e sexo. Ademais, observamos que os grupos eram semelhantes em relação a comorbidades clínicas estudadas (HAS, DM, AVE, DAC, dislipidemia e tabagismo), mesmo para os sintomas depressivos. Por fim, ressalta-se que o sCCO apresentou a menor pontuação no Pfeiffer e maior do MEEM, apesar de não ter sido observada significância estatística. Os dados sociodemográficos e clínicos são apresentados na tabela 5.

Tabela 5 - Variáveis sociodemográficas segundo diagnóstico clínico

Variáveis	Diagnóstico Biológico			p-valor
	BN	cDA	APNA	
	N=10 (DP)	N=14 (DP)	N=11 (DP)	
Idade	70,82 (6,11)	74,14 (5,86)	72,09 (6,82)	0,458
Escolaridade	6,18 (4,07)	4,96 (4,35)	6,27 (3,29)	0,286*
IMC	28,88 (4,81)	26,70 (4,24)	27,03 (4,95)	0,156
MEEM	26,18 (2,48)	21,71 (4,55)	24,09 (3,94)	0,240*
Pfeffer	0,44 (0,73)	4,62 (5,28)	3,33 (3,77)	0,690*
Sexo Feminino (%)**	90,90	78,57	90,90	0,723
HF de DDA (%)**	36,36	50,00	36,36	0,835
Tabagismo (%)**	81,82	57,14	63,64	0,108
AVE (%)**	20,00	14,28	0,00	0,440
DAC (%)**	20,00	14,28	9,09	0,509
Sintomas				
Depressivos (%)**	60,00	57,14	54,54	0,826
DM2 (%)**	50,00	28,57	45,45	0,583
Dislipidemia (%)**	60,00	42,85	63,63	0,619

Legenda: *Kruskal-Wallis.** Qui-Quadrado. BN: biomarcador normal; cDA: *continuum* da Doença de Alzheimer; APNA: Alterações patológicas não Alzheimer. N= número DP: Desvio Padrão; IMC: índice de massa corporal; MEEM: Mini-exame do estado mental; Pfeffer: Escala de avaliação de atividades de vida diária instrumentais; HF de DDA: História familiar de Demência por Doença de Alzheimer. AVE: Acidente Vascular encefálico. DAC: Doença arterial coronariana. DM2: Diabetes *Mellitus* tipo 2

Em relação a medida de biomarcadores, observamos valores significativamente diferentes para todos os marcadores biológicos entre os grupos, em ambas as metodologias. Para A β 42, os valores eram mais baixos no grupo DDA tanto para ELISA quanto para Luminex. Em relação a p-Tau, os valores do grupo APNA foram mais altos para ELISA e Luminex, assim como ocorreu para t-Tau por ELISA. Por fim, foi observada diferença entre os grupos no que se refere as relações p-Tau/A β 42 (ELISA: $p < 0,001$ e Luminex: $p = 0,019$) e t-tau/a β 42 (ELISA: $p < 0,001$ e Luminex: $p = 0,002$). Os dados estão apresentados na tabela 6. A figura 9 mostra a distribuição dos biomarcadores por categoria de diagnóstico biológico.

Tabela 6 - Medidas de Biomarcadores por ELISA e Luminex, segundo diagnóstico biológico.

Variáveis	Diagnóstico biológico			p-valor
	BN	cDA	APNA	
	N=10 (DP)	N=14 (DP)	N=11 (DP)	
A β 42 ELISA	947,89 (245,20)	426,10 (85,26)	829,12 (240,47)	<0,001
A β 42 Luminex	1506,10 (584,88)	739,14 (180,66)	1652,98 (710,06)	<0,001
p-Tau ELISA	38,64 (6,73)	67,51 (35,74)	72,92 (23,39)	0,007
p-Tau Luminex*	58,09 (14,06)	99,54 (56,75)	104,93 (51,67)	0,043
t-Tau ELISA	251,30 (67,16)	422,63 (249,17)	460,70 (207,33)	0,038
t-Tau Luminex	2790,35 (792,89)	4269,01 (2680,45)	5859,96 (2708,46)	0,021
p-Tau/A β 42 ELISA	0,04 (0,01)	0,16 (0,09)	0,10 (0,05)	<0,001
p-Tau/A β 42 Luminex	0,04 (0,02)	0,14 (0,10)	0,09 (0,08)	0,019
tTau/A β 42 ELISA	0,27 (0,08)	1,02 (0,66)	0,63 (0,43)	<0,001
tTau/A β 42 Luminex	2,01 (0,76)	5,97 (3,59)	4,27 (3,06)	0,002

Legenda: Medidas de A β 42, p-Tau e t-Tau e suas relações, t-Tau/A β 42 e p-tau/A β 42, avaliados por Luminex e ELISA, segundo diagnóstico biológico. Medidas em pg/ml para A β 42, p-Tau e t-Tau. *Kruskal-Wallis. Em negrito, valor $p < 0,05$. BN: biomarcador normal; cDA: *continuum* da Doença de Alzheimer; APNA: alterações patológicas não Alzheimer; N=número; DP: desvio padrão; Em negrito encontram-se os valores com significância estatística.

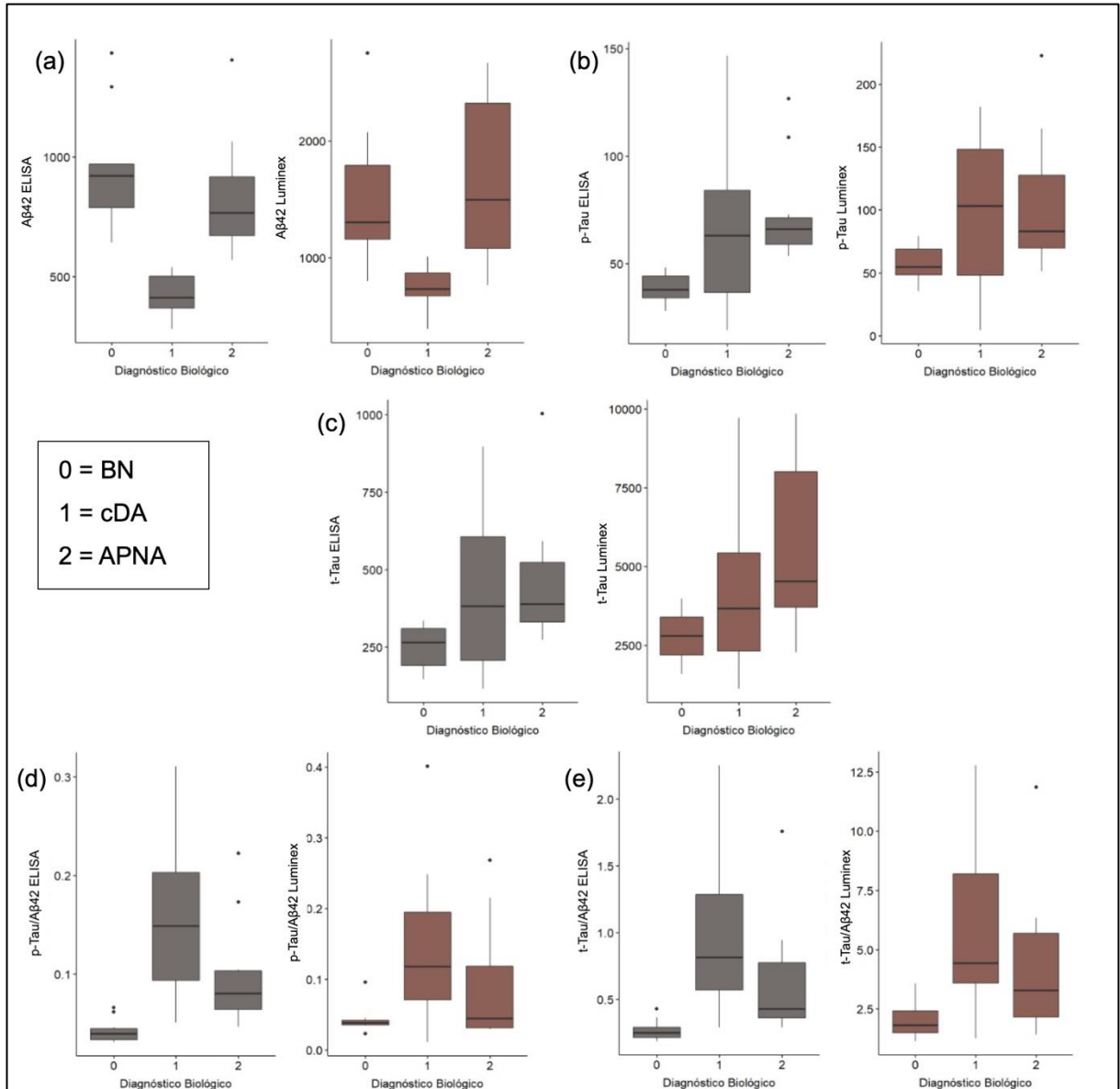


Figura 9 - Boxplots dos biomarcadores por diagnóstico biológico

Legenda: Biomarcadores (a)A β 42, (b)t-Tau, (c)p-Tau, (d)p-Tau/A β 42 e (e)t-tau/A β 42 medidas pelos testes ELISA e Luminex por categoria de diagnóstico biológico. A β 42, t-Tau e p-Tau em pg/ml. BN: Biomarcador normal; cDA: *continuum* da Doença de Alzheimer; APNA: Alterações patológicas não Alzheimer.

Fonte: Próprio autor (2021)

Uma vez identificadas diferenças significativas entre os subgrupos, foi aplicado o procedimento de comparações múltiplas pelo método de Turkey. Observou-se que as diferenças ocorreram principalmente, em relação ao grupo Biomarcador Normal (BN) e cDA, conforme demonstrado pela tabela 7.

Tabela 7 - Comparações múltiplas entre os subgrupos, segundo critérios biológicos

Variáveis	p-valores ajustados		
	BN-cDA	BN-APNA	cDA-APNA
A β 42 ELISA	<0,001	0,380	<0,001
A β 42 Luminex	<0,001	0,911	<0,001
p-Tau ELISA	0,175	0,032	0,583
p-Tau Luminex*	0,444	0,017	0,155
t-Tau ELISA	0,049	0,006	0,518
t-Tau Luminex	0,042	0,039	0,989
p-Tau/A β 42 ELISA	<0,001	0,003	0,051
p-Tau/A β 42 Luminex	0,015	0,384	0,254
t-Tau/A β 42 ELISA	<0,001	0,013	0,103
t-Tau/A β 42 Luminex	0,002	0,065	0,343

Legenda: Comparações múltiplas pelo método de Turkey das variáveis em que se identificou significância estatística, segundo critérios biológicos. A β 42, p-Tau e t-Tau em pg/ml. Em negrito, valor $p < 0,05$. BN: Biomarcador Normal; cDA: *continuum* da Doença de Alzheimer; APNA: Alterações patológicas não Alzheimer.

5.1.3 Associação entre os biomarcadores medidos por Luminex e ELISA

A avaliação da correlação entre as duas metodologias foi medida através da correlação de Pearson (Figura 10). O mesmo padrão de correlação interna foi encontrado, sendo melhor para o ELISA. Observamos, ainda, forte correlação para um mesmo biomarcador entre os dois testes, com a menor correlação observada para t-Tau (0,66) e a maiores correlações para p-tau (0,88) e p-tau/A β 42 (0,86).

	A β 42- ELISA																	
A β 42- ELISA	1																	
p-Tau ELISA	-0,25	1																
t-Tau ELISA	-0,21	0,94	1															
p-Tau/A β 42-ELISA	-0,63	0,85	0,81	1														
t-Tau/A β 42-ELISA	-0,57	0,81	0,86	0,97	1													
A β 42- xMap	0,83	-0,16	-0,21	-0,51	-0,5	1												
p-Tau xMap	-0,3	0,88	0,9	0,81	0,82	-0,27	1											
t-Tau xMap	0,02	0,7	0,66	0,48	0,47	0,12	0,53	1										
p-Tau /A β 42- xMap	-0,55	0,69	0,74	0,86	0,89	-0,56	0,86	0,31	1									
t-Tau /A β 42- xMap	-0,5	0,72	0,75	0,82	0,84	-0,49	0,69	0,71	0,77	1								

Figura 10 - Matriz de correlações de Pearson para biomarcadores medidos pelos métodos ELISA e Luminex

Em amarelo, correlações internas para ELISA, em verde, correlações internas para Luminex. Em vermelho, correlação entre os 2 testes para um mesmo biomarcador. xMap: Luminex. **Fonte:** Próprio autor (2021)

As fortes correlações entre os valores de um mesmo biomarcador medido pelos dois métodos, ELISA e Luminex, são também evidenciadas nos diagramas de dispersão apresentados na figura 11. Em cada gráfico, a linha horizontal corresponde ao ponto de corte do marcador na escala ELISA e a linha vertical ao ponto de corte obtido na escala Luminex. Os pontos de corte para os marcadores na escala Luminex foram obtidos a partir da construção da curva ROC, usando como padrão de referência de referência teste ELISA, como detalhado na seção seguinte.

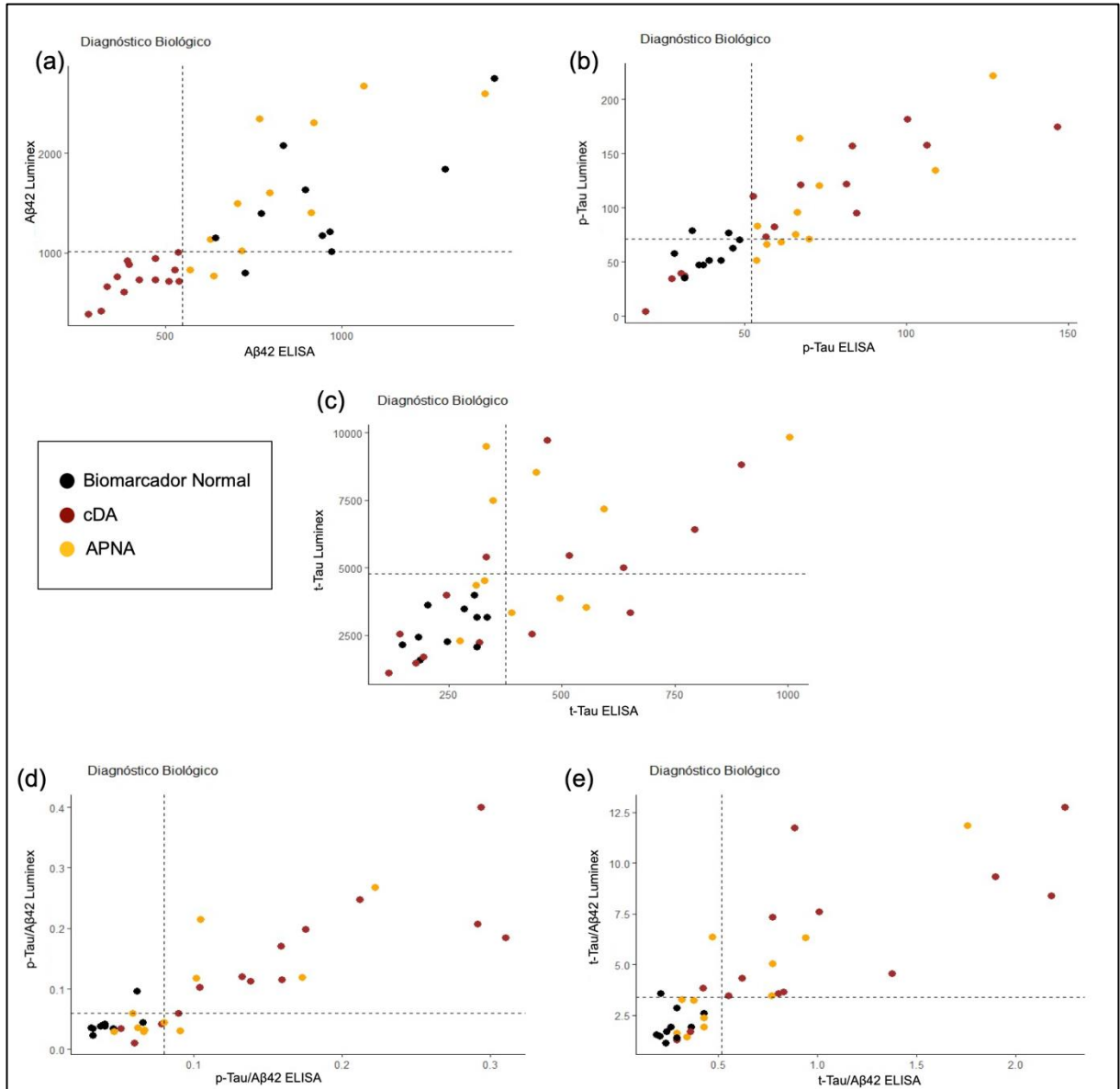


Figura 11 - Diagrama de dispersão dos biomarcadores por critério biológico

Diagrama de dispersão dos biomarcadores (a)A β 42, (b)p-Tau, (c)t-Tau, (d)p-Tau/A β 42 e (e)t-Tau/A β 42 medidas pelos testes ELISA e Luminex, segundo critério biológico, com identificação dos pontos de corte. A β 42, p-Tau, t-Tau em pg/ml. cDA: *continuum* da Doença de Alzheimer. APNA: Alterações patológicas não Alzheimer.

Fonte: Próprio autor (2021)

5.1.4 Avaliação de acurácia e definição de ponto de corte

Para cada biomarcador medido pela metodologia Luminex foi construída a curva ROC. Como já detalhado, foram consideradas como padrão de referência as medidas realizadas pelo método ELISA, como pontos de corte definidos por Duits et al (DUITS; TEUNISSEN; BOUWMAN; VISSER *et al.*, 2014).

A análise da curva ROC usando Luminex (Millipore xMap®) mostrou boa acurácia diagnóstica para todos os biomarcadores (figura 12). A maior área sob a curva foi de 0,952 para A β 42 (sensibilidade=100% e especificidade=85,7%) no ponto de corte ideal de 1012,98 pg/ml. Esse corte foi determinado pelo melhor índice de Youden e pela distância até o canto superior esquerdo da curva ROC e, portanto, maximizou a proporção de classificações corretas (Tabela 8). Apenas o corte de t-Tau não atendeu a ambos os critérios. Nesse caso, consideramos o ponto de corte de 3251,80 pg/ml, com base no índice de Youden, por apresentar a melhor sensibilidade.

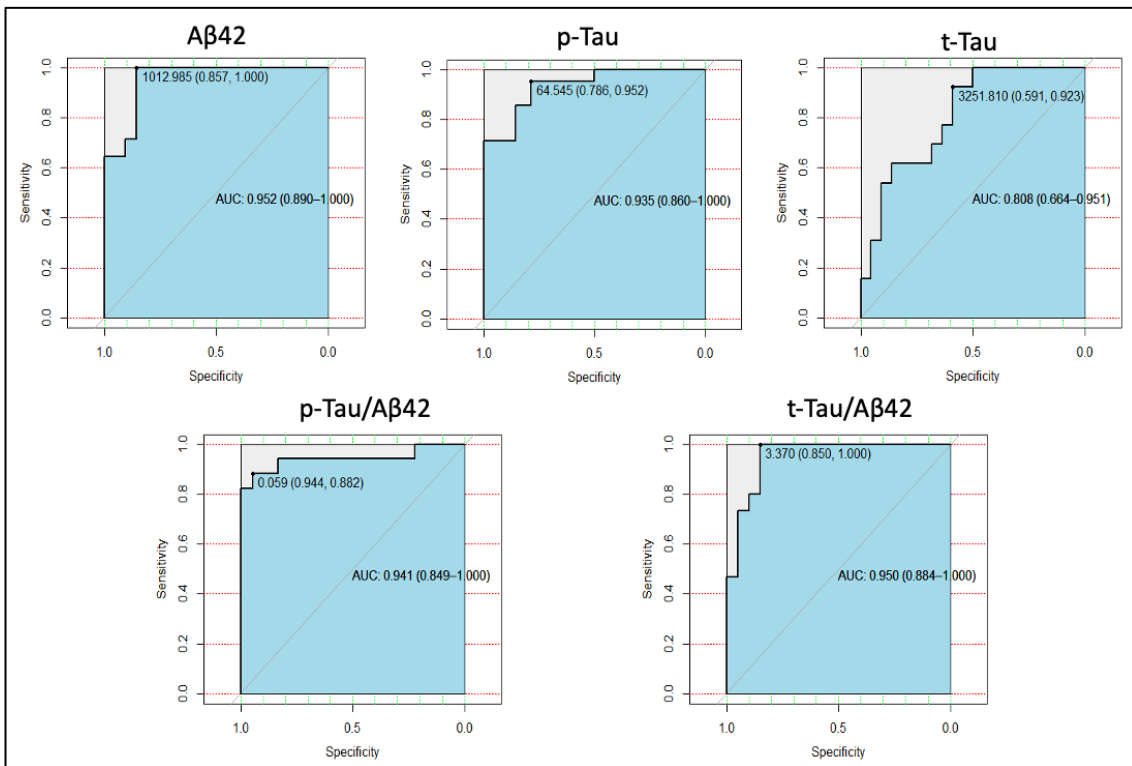


Figura 12 - Curvas ROC por biomarcador para Luminex.

Curvas Roc para A β 42, p-Tau, t-Tau, p-Tau/A β 42 e tTau/A β 42 de Luminex (Millipore xMap®), comparado com o padrão de referência de referência ELISA (INNOTEST®). AUC: área sob a curva. (especificidade, sensibilidade). **Fonte:** Próprio autor (2021)

Tabela 8 – Ponto de corte para Luminex

Biomarcador	Ponto de corte	Sensibilidade	Especificidade	Proporção de classificações corretas	Estatística de Youden	Distância ao topo esquerdo	AUC
A β 42	1012,98 pg/ml	1,000	0,857	0,914	1,857	0,020	0,952
p-Tau	64,54 pg/ml	0,952	0,786	0,886	1,738	0,048	0,935
t-Tau	3251,81 pg/ml	0,923	0,591	0,714	1,514	0,174	0,808
p-Tau/A β 42	0,0595	0,882	0,944	0,914	1,827	0,017	0,941
t-Tau/A β 42	3,370	1,000	0,850	0,914	1,850	0,022	0,950

LEGENDA: Ponto de corte para A β 42, t-Tau, p-Tau, t-Tau/A β 42 e p-Tau/A β 42, em pg/ml, para Luminex (Millipore xMap®), com respectivos valores de sensibilidade, especificidade, medida de precisão e AUC (área sob a curva ROC).

6 DISCUSSÃO

No presente estudo, avaliamos o sistema de classificação AT(N) em uma amostra de idosos sem comprometimento cognitivo objetivo (sCCO) e com doença de Alzheimer (CCLa e DDA), utilizando o Millipore xMap®, um kit luminex pouco explorado na literatura. Observamos que o Millipore xMap® é um teste diagnóstico preciso e apresenta alta concordância com os resultados do INNOTEST®, considerado neste estudo como padrão de referência. Além disso, na amostra estudada, o teste foi capaz de discriminar corretamente entre DDA e idosos sem comprometimento cognitivo objetivo, embora não possa diferenciar DDA de pacientes com CCLa. Ressalta-se que os biomarcadores devem ser usados em combinação, conforme sugerido pelo sistema AT(N).

Em 2018, ocasião da divulgação do guideline proposto pela NIA-AA, os autores reforçaram a importância de testar o sistema AT(N) em diferentes populações (JACK e cols., 2018). Desde então, vários grupos de pesquisa têm aplicado o sistema visando caracterizar biologicamente as coortes de clínicas de memória. Em nosso estudo, observamos concordância entre a classificação clínica e biológica em 77,8% dos indivíduos. Entre os pacientes sCCO, 72,7% não apresentavam marcador amilóide (A-), sendo 36,3% com perfil de biomarcador normal (A-T-N-) e 36,3% de APNA (A-T(+/-)N(+/-)), corroborando com estudos prévios (BURNHAM e cols., 2016; INGALA e cols., 2021). Entre os pacientes com diagnóstico clínico de DDA, também observamos perfil similar a estudos recentes, de modo que 85,7% apresentavam biomarcador positivo (A+T+N(+/-)) para DA (BURNHAM e cols., 2019; CARANDINI e cols., 2019). Já entre os pacientes com critérios clínicos para CCLa, apenas 29% apresentavam biomarcador positivo para *continuum* DA. Essa proporção é menor do que a encontrada em outras coortes de clínicas de memória. (GRØNTVEDT e cols., 2020).

Reforça-se também que Jack et al (2018) não define detalhes ou recomendações específicas para implementação do sistema, e sugere que baterias cognitivas e pontos de corte sejam individualizados pelo grupo de pesquisa, com valores que melhor ajustem à amostra estudada. (JACK e cols., 2018). Dessa forma, o sistema AT(N) não discrimina a metodologia usada para definição de cada categoria, deixando em aberto o “padrão de referência”.

No que se refere a dosagem de biomarcadores no LCR, apesar do desenvolvimento de metodologias modernas, a técnica mais comumente utilizada em pesquisa ainda é o ELISA, sobretudo em países de baixa e média renda (LEUZY e cols., 2021). Por outro lado, o Luminex, um método semi-automatizado e de custo inferior, é uma alternativa interessante, uma vez que estudos prévios mostraram boa correlação com ELISA (FAGAN e cols., 2011; IRWIN e col., 2012; LE BASTARD e cols., 2013). Entretanto, é importante ressaltar que os valores absolutos de biomarcadores medidos pelos métodos são diferentes (BLENNOW e cols., 2015). Os valores encontrados pelo luminex, medido por INNOBIA AlzBio3®, são bem inferiores aos observados por ELISA, usando o kit INNOTEST® (SHAW e cols., 2009) apesar de Olsson e cols., al (2005) sugerir uma relação entre eles.

No presente estudo, observamos valores absolutos mais elevados em todos os biomarcadores para Milliplex xMap®, em relação ao INNOBIA AlzBio3® e INNOTEST®. Vale ressaltar que as medições de cada biomarcador no teste em estudo seguiram a tendência esperada: redução de A β 42 e aumento de t-Tau e p-Tau em pacientes com DDA em relação ao SCCO. Os trabalhos encontrados na literatura com o kit em análise não reportaram o valor absoluto dos biomarcadores, apresentando seus dados como medidas relativas (MOUSSA e cols., 2017; PETERS VAN TON e cols., 2020). Ademais, as medidas de correlação entre INNOTEST® e Millipore xMAP® mostraram padrão semelhante de correlação interna (entre biomarcadores diferentes em um mesmo teste) e uma forte correlação entre os testes (o mesmo biomarcador avaliado por testes diferentes), o que reforça a consistência de nossos resultados.

É importante ressaltar que ainda não há consenso entre os níveis de biomarcadores e valores de corte na literatura. Observa-se uma grande diferença entre os níveis medidos em diversos estudos, o que pode ser resultado de uma série de fatores. Os principais fatores pré-analíticos relatados são a seleção de pacientes, a PL, o manuseio e o armazenamento das amostras. Já entre os fatores analíticos se destacam as diferenças nos protocolos para processamento das amostras. Por outro lado, os fatores pós-analíticos incluem a organização de dados e interpretação de resultados. Por fim os fatores associados ao ensaio, como variação entre lotes e dentro de um mesmo lote, também são fonte de variabilidade de resultados. (MATTSSON e cols., 2013).

Para facilitar o uso mundial de biomarcadores, em 2009 foi criado o Programa internacional de controle de qualidade de biomarcadores de DA no LCR (*Alzheimer's*

Association Quality Control Program). O objetivo principal do programa é monitorar as variações analíticas na medida de A β e tau no LCR, além de tentar padronizar as técnicas de PL e o manuseio da amostra (MATTSSON e cols., 2011). Em 2013, o grupo publicou um relatório para reportar os dados encontrados até aquele momento. Foi incluído testes como ELISA, Luminex e MSD (*Meso Scale Discovery*), e foram reportadas variações que chegaram a 35%, tanto inter ensaio quanto inter laboratório (MATTSSON e cols., 2013). A nova geração de métodos automatizados (Lumipulse[®] e Elecsys[®]) parece reduzir essas variações para menos de 10%. Entretanto, ainda é necessário aumentar o número de estudos com as tecnologias (LEITÃO e cols., 2019). Dessa forma, a presença de grande variabilidade de resultados, mesmo com estabelecimento de protocolos laboratoriais robustos, limita a definição de um ponto de corte universal e o consequente uso na prática clínica (FORLENZA e cols., 2015; PAIS e cols., 2020).

Além disso, vale lembrar que mais de 10% dos indivíduos sem comprometimento cognitivo podem ter biomarcadores positivos para a doença de Alzheimer, sobretudo após 60 anos (SHAW e cols., 2018). Uma coorte de indivíduos sem comprometimento cognitivo demonstrou que 42% das pessoas com mais de cinquenta anos apresentaram A β 42 no LCR anormal, particularmente naqueles que apresentavam o alelo ϵ 4 do gene da Apolipoproteína E (APOE). Ademais, as medidas de t-Tau e p-Tau aumentaram a partir da sexta década de vida, independente da presença de APOE4. Assim, espera-se que a frequência de ambos os biomarcadores positivos (amilóide e neurodegeneração) acometa mais de 25% dos indivíduos aos 85 anos (TOLEDO e cols., 2015). Considerando a presença de biomarcadores aumentados (para p-Tau e t-tau) e reduzidos (para A β 42) associado ao envelhecimento, mesmo em indivíduos sem comprometimento cognitivo, alguns autores sugerem um ponto de corte ajustado para idade (SJÖGREN e cols., 2001). Por outro lado, Toledo et al (2015) argumentaram que essas mudanças provavelmente representam um aumento na frequência da DA pré-clínica e, portanto, consideraram que o ponto de corte não deva ser ajustado para idade. Por fim, a *Alzheimer's Biomarkers Standardization Initiative* (ABSI) sugere o uso de uma "zona cinza", definida como um incremento de 10% do valor de corte no caso de t-Tau e p-Tau ou um decréscimo de 10% de A β 42 (MOLINUEVO e cols., 2014). Entretanto, até o momento, não há recomendação robusta para qualquer ajuste de valores de ponto de corte.

As dificuldades em definir um ponto de corte universal, associado ao conhecimento de que o uso de combinações de biomarcadores é superior a avaliação individual no diagnóstico

de DA, levaram ao surgimento de fórmulas matemáticas. Alguns autores sugeriram modelos complexos (HULSTAERT e cols., 1999; MULDER e cols., 2010), baseado em algoritmos e regressões, enquanto outros sugeriram uma relação simples entre dois biomarcadores. Duits e col. (2014), exploraram as diversas combinações estudadas e observaram que o uso das razões tTau/A β 42 e p-Tau/A β 42, para ensaios de ELISA, são tão boas quanto fórmulas de regressão complexas. Essas relações tentam reduzir problemas associados a diferenças individuais no processamento amilóide, na concentração total ou mesmo questões pré e pós analíticas, sobretudo em valores limítrofes. Por exemplo, pacientes com A β 42 reduzidas, mas ainda superior ao ponto de corte, mas com tau total aumentada, podem apresentar relação tTau/A β 42 patológica, corroborando com a impressão de DA. Dessa forma, os autores sugerem a aplicação da relação t-Tau/A β 42 para diferenciar pacientes com DA de outras demências (DUITS e cols., 2014).

Ademais, outros estudos exploraram as combinações de biomarcadores e mostraram que as relações poderiam ser usadas não apenas para o diagnóstico diferencial de demência, mas também para identificar indivíduos portadores de CCLa que se converterão para demência (DE SOUZA e cols., 2011; SANTANGELO e cols., 2020). É importante lembrar também o papel da relação A β 42/40 no diagnóstico da DA. Sabendo da formação de oligômeros de diferentes tamanhos, na busca de maximizar a acurácia do diagnóstico diferencial da DA, pesquisadores observaram que a relação proteína β -amilóide com 42 aminoácidos/ Proteína β -amilóide com 40 aminoácidos (A β 42/40) é superior a medida de A β 42 ou outro biomarcador isoladamente. Portanto, recomendam a dosagem de A β 40 para definição da relação (HANSSON e cols., 2019; LEWCZUK e cols., 2020). Nesse contexto, atualmente os ensaios diagnósticos têm incluído esse marcador para definição da relação A β 42/40. No presente estudo não foi avaliado o marcador Proteína β -amilóide com 40 aminoácidos (A β 40) uma vez que, a ocasião do delineamento do projeto e compra de materiais, as evidências ainda não eram robustas, dessa forma, não estava incluído no teste em estudo. O kit Millipore xMap® HATMAG-68K atualmente disponível já inclui esse biomacardor em sua composição.

Em nosso estudo, observamos que apenas as relações p-Tau/A β 42 e t-tau/A β 42 apresentaram medidas com diferenças significativas entre os grupos clínicos DDA e sCCO, para ambos os métodos. Ademais, encontramos os seguintes pontos de corte dos biomarcadores para Millipore xMap® em relação ao INNOTEST®: menor que 1012pg/ml (S:1,00 e E:0,857) para A β 42; maior que 64,54pg/ml (S0,95 E:0,78) para p-Tau, maior que 3251,81pg/ml (s:0,92

e:0,591) para t-Tau, maior que 0,0595 (S0,88 E:0,94) para p-Tau/A β 42 e maior que 3,37 (S: 1,0; E:0,85) para t-Tau/A β 42. Observamos que a medida de A β 42 isolada mostrou alta sensibilidade (100%), ou seja, baixo índice de falso negativos em relação ao padrão de referênciade referência. Já a relação pTau/A β 42 apresentou a maior especificidade (94%) para o diagnóstico de DA em relação ao INNOTEST, ou seja, baixo índice de falsos positivos. Dessa forma, corroborando com a literatura, nossos resultados reforçam a hipótese de que o uso combinado de biomarcadores é superior a avaliação individual para definir o diagnóstico de DA, usando o teste Millipore xMap[®] na população estudada. Entretanto, acreditamos que mais estudos são necessários para reproduzir e validar esse resultado.

Encontramos uma associação entre sintomas depressivos e cognitivos (DDA e CCLa) no grupo de diagnóstico clínico. No entanto, não o observamos quando avaliados os grupos segundo critérios biológicos. Os sintomas neuropsiquiátricos são comuns nas síndromes demenciais e frequentemente precedem os sintomas cognitivos (WISE e cols., 2019). Uma meta-análise estimou que a depressão afeta quase 30% das pessoas com CCL, com maior prevalência em clínicas de memória (ISMAIL e cols., 2017). Alguns estudos sugerirem que os sintomas depressivos na idade avançada aumentem o risco de demência, podendo ser uma característica prodrômica da DDA (SINGH-MANOUX e cols., 2017). Ademais, outros estudos demonstraram uma relação entre sintomas depressivos e deposição de A β , sugerindo que a presença de muitos sintomas neuropsiquiátricos estão associados a deposição de A β e declínio cognitivo a longo prazo, em indivíduos com comprometimento cognitivo (NG e cols., 2021). Entretanto, ainda não há consenso na literatura (DONOVAN e cols., 2015).

A principal limitação deste estudo é o tamanho da amostra. Não realizamos cálculo amostral, sendo esse estudo realizado com amostra de conveniência. Entretanto, outro estudo na literatura, com desenho semelhante, apresentou tamanho de amostra similar (HERSKOVITS e cols., 2013). Outro ponto de discussão se refere ao padrão de referênciade referência utilizado. Ainda não há consenso na literatura quanto a um verdadeiro padrão ouro *in vivo* para DA, sendo o diagnóstico *post mortem* ainda reconhecido como padrão ouro (LANTERO RODRIGUEZ e cols., 2020). Em nosso estudo, dentre os métodos atualmente disponíveis, consideramos o ELISA INNOTEST[®] como padrão de referênciade referência devido a vasta utilização em pesquisas e por sua alta correlação com PET-CT e com resultados histopatológicos (BLENNOW e cols., 2015; LEUZY e cols., 2021). No entanto, alguns pesquisadores consideraram o PET-CT amilóide como o padrão de referência para a determinação do ponto

de corte de biomarcadores do LCR (CAMPBELL e cols., 2021; WILLEMSE e cols., 2021), uma vez que atualmente é o único método aprovado pela FDA (*Food and Drug Administration*) para uso clínico no diagnóstico biológico da DA (YANG; RIEVES; GANLEY, 2012). Dessa forma, acreditamos que novos estudos, com diferentes padrões ouro, são necessários para validar nossos achados.

Por fim, é importante ressaltar que a incidência e prevalência da demência devem aumentar em países de baixa e média renda, especialmente na América Latina (PARRA e cols., 2018). Portanto, há uma necessidade de testes de biomarcadores acessíveis e custo-efetivos para a DA nesses países. Em cotação realizada no 1º semestre de 2021 pelo nosso grupo, a avaliação dos marcadores A β 42, pTau e t-tau pelo INNOTEST® se mostrou 4,5 vezes mais cara do que pelo Millipore xMap®. Além disso, a tecnologia Luminex tem um processamento semiautomático e múltiplo, analisando proteínas A β e Tau na mesma amostra. Portanto, isso pode representar uma vantagem de escalabilidade do Luminex em um teste de mais baixo custo. Embora não seja o teste de biomarcador padrão de referência para DA, pode representar uma opção interessante e custo-efetiva para pesquisa em saúde pública.

Com o advento de DMD, a definição do diagnóstico biológico será obrigatória para início da terapêutica (CUMMINGS e cols., 2020; LOUREIRO e cols, 2020). Em termos de saúde pública, ou mesmo em estudos clínicos de fase III e IV, o gasto para implementação de novas drogas pode ser um fator limitante, uma vez que o custo total inclui, não apenas o valor do medicamento específico, mas também a avaliação clínica especializada (geriatra, neurologista, psiquiatra e, eventualmente, neuropsicólogo), avaliação biológica (biomarcadores por LCR, PET-CT e RNM), além de medidas de monitoramento de resposta terapêutica. Nesse contexto, pode ser pensando um algoritmo: utiliza-se um teste de alta sensibilidade, boa especificidade com custo e metodologia acessível e, caso positivo, pode ser realizado um teste padrão de referência para a confirmação diagnóstico em casos duvidosos (alta sensibilidade, alta especificidade, mas custo e metodologia limitante). Assim, o Luminex poderia ser usado como teste inicial e, para confirmação de casos duvidosos, segue-se com outras metodologias com melhor especificidade, seja através do LCR já coletado (ELISA, Elecsys®, Lumipulse®) ou via PET-CT. Nos pacientes que apresentam clínica muito sugestiva de DA, o luminex seria suficiente, uma vez que a probabilidade pré-teste é alta. Ressaltamos que para implementação de tal algoritmo é necessário replicar esse estudo em amostras maiores e em diferentes populações. Vejamos uma hipótese de algoritmo:

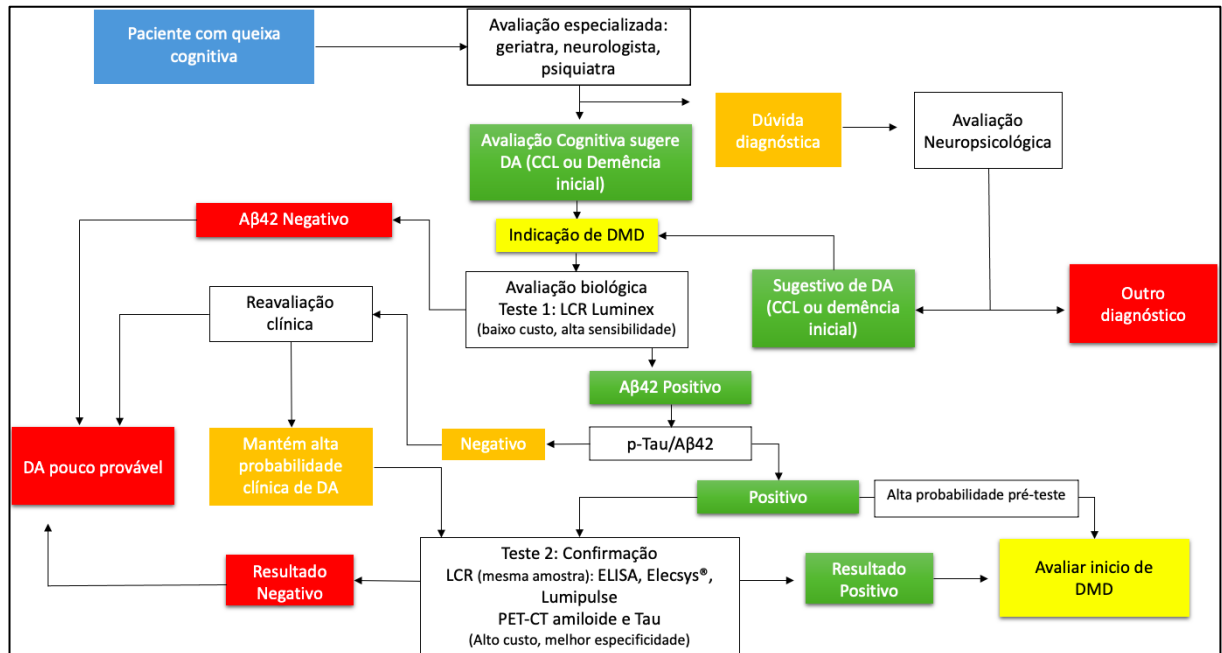


Figura 13 - Proposta de fluxograma diagnóstico para Doença de Alzheimer para utilização de novas drogas modificadoras de doença, tanto em pesquisas de fase III e IV como, futuramente, para uso em saúde pública. .

Legenda: DMD: drogas modificadoras de doença CCL: comprometimento cognitivo leve. DA: Doença de Alzheimer; LCR: Líquido Cefalorraquidiano. PET-CT: Tomografia por emissão de pósitrons. **Fonte:** Próprio autor (2021)

7 CONCLUSÃO

O estudo de biomarcadores da doença de Alzheimer é extremamente relevante e deve ser incentivado, haja vista o envelhecimento populacional com conseqüente aumento da prevalência da doença. Ademais, o uso de biomarcadores possivelmente possibilitará o diagnóstico precoce, a estimativa de riscos de conversão e a avaliação dos estágios da doença. Por fim, com o advento de fármacos modificadores de doença, eles serão fundamentais para a indicação do tratamento, monitoramento e avaliação de resposta terapêutica.

Dessa forma, o presente estudo mostrou que o teste Millipore xMap® apresenta boa acurácia diagnóstica em relação ao padrão de referência considerado, o INNOTEST®, em uma amostra de idosos brasileiros. O Luminex é um método semiautomatizado que permite a realização de várias análises em uma mesma placa, de forma a reduzir o volume de amostra, reduzir a mão de obra e tempo de operacionalização e ainda, a minimizar erros laboratoriais, por um custo muito mais baixo. É importante ressaltar também que recentemente o laboratório Fujirebio (Europa) descontinuou a comercialização do kit INNO-BIA AlzBio3®, o qual era o kit xMAP mais estudado até o momento, de forma que o Millipore xMAP® passa a ser uma excelente alternativa para a tecnologia Luminex.

Em nossa busca na literatura, não encontramos outros estudos que buscaram validar o uso desse kit da metodologia Luminex. Considerando a acurácia diagnóstica, acreditamos que o uso do Millipore xMap® é adequado para investigação de marcadores biológicos da doença de Alzheimer. Porém, é importante a replicação do resultado em uma amostra maior assim como em outras populações e cenários.

Portanto, devido a acurácia, ao custo efetividade e a disponibilidade, o teste em estudo é uma boa alternativa para avaliação de biomarcadores da DA, sobretudo para países de baixa e média renda.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, O.; ALMEIDA, S. Reliability of the Brazilian version of the abbreviated form of Geriatric Depression Scale (GDS) short form. **Arq Neuropsiquiatr**, 57, n. 2B, 1999 Jun 1999.

ALZHEIMER'S ASSOCIATION. 2021 Alzheimer's disease facts and figures. **Alzheimers Dement**, 17, n. 3, 2021 Mar 2021.

ALZHEIMER'S DISEASE INTERNATIONAL. **Dementia in the Americas: Current and future cost and prevalence of Alzheimer's disease and other dementias**. 2013/10/01 2013. Disponível em: <https://www.alzint.org/u/dementia-in-the-americas-ENGLISH.pdf>.

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. **Manual diagnóstico e estatístico de transtornos mentais: DSM-5**. 5 ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Classification and Diagnosis of Diabetes. **Diabetes care**, 39 Suppl 1, 2016 Jan 2016.

BRAAK, H; BRAAK, E. Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. **Acta neuropathologica**, 82, n. 4, 1991 1991.

BERTOLUCCI, P.; BRUCKI, S.; CAMPACCI, S.; JULIANO, Y. The Mini-Mental State Examination in a general population: impact of educational status. **Arq Neuropsiquiatr**, 52, n. 1, 1994 Mar 1994.

BERTOLUCCI, P.; OKAMOTO, I.; BRUCKI, S.; SIVIERO, M. *et al.* Applicability of the CERAD neuropsychological battery to Brazilian elderly. **Arq Neuropsiquiatr**, 59, n. 3-A, 2001 Sep 2001.

BERTOLUCCI, P. H. F.; OKAMOTO, I. H.; TONIOLO NETO, J.; RAMOS, L. R. *et al.* Desempenho da população brasileira na bateria neuropsicológica do Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease (CERAD). **Rev. psiquiatr. clín.**, 2, 25, p. 80-83, 1998.

BITTNER, T.; ZETTERBERG, H.; TEUNISSEN, C.; OSTLUND, R. *et al.* Technical performance of a novel, fully automated electrochemiluminescence immunoassay for the quantitation of β -amyloid (1-42) in human cerebrospinal fluid. **Alzheimers Dement**, 12, n. 5, 2016 May 2016.

BLENNOW, K.; DE LEON, M.; ZETTERBERG, H. Alzheimer's disease. **Lancet (London, England)**, 368, n. 9533, 07/29/2006 2006.

BLENNOW, K.; DUBOIS, B.; FAGAN, A.; P, L. *et al.* Clinical utility of cerebrospinal fluid biomarkers in the diagnosis of early Alzheimer's disease. **Alzheimers Dement.**, 11, n. 1, 2015 Jan 2015.

BLENNOW, K.; MATTSSON, N.; SCHÖLL, M.; HANSSON, O. *et al.* Amyloid biomarkers in Alzheimer's disease. **Trends in pharmacological sciences**, 36, n. 5, 2015 May 2015.

BURNHAM, S.; BOURGEAT, P.; DORÉ, V.; SAVAGE, G. *et al.* Clinical and cognitive trajectories in cognitively healthy elderly individuals with suspected non-Alzheimer's disease

pathophysiology (SNAP) or Alzheimer's disease pathology: a longitudinal study. **Lancet Neurol**, 15, n. 10, 2016 Sep 2016.

BURNHAM, S.; COLOMA, P.; LI, Q.; COLLINS, S. *et al.* Application of the NIA-AA Research Framework: Towards a Biological Definition of Alzheimer's Disease Using Cerebrospinal Fluid Biomarkers in the AIBL Study. **J Prev Alzheimers Dis**, 6, n. 4, 2019 2019.

CARANDINI, T.; ARIGHI, A.; SACCHI, L.; FUMAGALLI, G. *et al.* Testing the 2018 NIA-AA research framework in a retrospective large cohort of patients with cognitive impairment: from biological biomarkers to clinical syndromes. **Alzheimers Res Ther**, 11, n. 1, 10/15/2019 2019.

COUTINHO, A.; BUSATTO, G.; DE GOBBI PORTO, F.; DE PAULA FARIA, D. *et al.* Brain PET amyloid and neurodegeneration biomarkers in the context of the 2018 NIA-AA research framework: an individual approach exploring clinical-biomarker mismatches and sociodemographic parameters. **Eur J Nucl Med Mol Imaging**, 47, n. 11, 2020 Oct 2020.

CUMMINGS, J.; LEE, G.; RITTER, A.; SABBAGH, M. *et al.* Alzheimer's disease drug development pipeline: 2020. **Alzheimers Dement (N Y)**, 6, n. 1, 07/16/2020 2020.

CUMMINGS, J.; MEGA, M.; GRAY, K.; ROSENBERG-THOMPSON, S. *et al.* The Neuropsychiatric Inventory: comprehensive assessment of psychopathology in dementia. **Neurology**, 44, n. 12, 1994 Dec 1994.

DE PAULA, J.; BERTOLA, L.; ÁVILA, R.; MOREIRA, L. *et al.* Clinical applicability and cutoff values for an unstructured neuropsychological assessment protocol for older adults with low formal education. **PloS one**, 8, n. 9, 09/16/2013 2013.

DE SOUZA, L.; LAMARI, F.; BELLIARD, S.; JARDEL, C. *et al.* Cerebrospinal fluid biomarkers in the differential diagnosis of Alzheimer's disease from other cortical dementias. **Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry**, 82, n. 3, 2011 Mar 2011.

DONOVAN, N.; HSU, D.; DAGLEY, A.; SCHULTZ, A. *et al.* Depressive Symptoms and Biomarkers of Alzheimer's Disease in Cognitively Normal Older Adults. **Journal of Alzheimer's disease : JAD**, 46, n. 1, 2015 2015.

DUBOIS, B.; VILLAIN, N.; FRISONI, G.; RABINOVICI, G. *et al.* Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: recommendations of the International Working Group. **Lancet Neurol**, 20, n. 6, 2021 Jun 2021.

DUIITS, F.; MARTINEZ-LAGE, P.; PAQUET, C.; ENGELBORGHES, S. *et al.* Performance and complications of lumbar puncture in memory clinics: Results of the multicenter lumbar puncture feasibility study. **Alzheimers Dement**, 12, n. 2, 2016 Feb 2016.

DUIITS, F.; TEUNISSEN, C.; BOUWMAN, F.; VISSER, P. *et al.* The cerebrospinal fluid "Alzheimer profile": easily said, but what does it mean? **Alzheimers Dement**, 10, n. 6, 2014 Nov 2014.

ELAHI, F.; MILLER, B. A clinicopathological approach to the diagnosis of dementia. **Nature reviews. Neurology**, 13, n. 8, 2017 Aug 2017.

ENGELBORGHES, S.; NIEMANTSVERDRIET, E.; STRUYFS, H.; BLENNOW, K. *et al.* Consensus guidelines for lumbar puncture in patients with neurological diseases. **Alzheimers Dement (Amst)**, 8,2017.

FAGAN, A. M.; SHAW, L. M.; XIONG, C.; VANDERSTICHELE, H. *et al.* Comparison of Analytical Platforms for Cerebrospinal Fluid Measures of β -Amyloid 1-42, Total tau, and P-tau181 for Identifying Alzheimer Disease Amyloid Plaque Pathology. **Archives of Neurology**, 68, n. 9, p. 1137-1144, 2011.

FOLSTEIN, M.; FOLSTEIN, S.; MCHUGH, P. "Mini-mental state". A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. **Journal of psychiatric research**, 12, n. 3, 1975 Nov 1975.

FORLENZA, O.; RADANOVIC, M.; TALIB, L.; APRAHAMIAN, I. *et al.* Cerebrospinal fluid biomarkers in Alzheimer's disease: Diagnostic accuracy and prediction of dementia. **Alzheimers Dement (Amst)**, 1, n. 4, 10/03/2015 2015.

GAUTHIER, S.; ZHANG, H.; NG, K. P.; PASCOAL, T. A. *et al.* Impact of the biological definition of Alzheimer's disease using amyloid, tau and neurodegeneration (ATN): what about the role of vascular changes, inflammation, Lewy body pathology? **Translational Neurodegeneration**, 7, n. 1, p. 1-7, 2018-05-31 2018. ReviewPaper.

GONÇALVES, G.; DUARTE, R.; CAMPOS, F. M. F.; DE FÁTIMA OLIVEIRA SILVA, I. *et al.* Elevated platelet microparticles levels are associated with lipidic oxidation and inflammatory profiles in Alzheimer's disease. **European Geriatric Medicine**, 2016. journalArticle.

GRØNTVEDT, G.; LAURIDSEN, C.; BERGE, G.; WHITE, L. *et al.* The Amyloid, Tau, and Neurodegeneration (A/T/N) Classification Applied to a Clinical Research Cohort with Long-Term Follow-Up. **Journal of Alzheimer's disease : JAD**, 74, n. 3, 2020 2020.

HANSEEUW, B.; BETENSKY, R.; JACOBS, H.; SCHULTZ, A. *et al.* Association of Amyloid and Tau With Cognition in Preclinical Alzheimer Disease: A Longitudinal Study. **JAMA neurology**, 76, n. 8, 08/01/2019 2019.

HANSSON, O.; LEHMANN, S.; OTTO, M.; ZETTERBERG, H. *et al.* Advantages and disadvantages of the use of the CSF Amyloid β (A β) 42/40 ratio in the diagnosis of Alzheimer's Disease. **Alzheimers res ther**, 11, n. 1, 04/22/2019 2019.

HENEKA, M.; CARSON, M.; EL KHOURY, J.; LANDRETH, G. *et al.* Neuroinflammation in Alzheimer's disease. **Lancet Neurol**, 14, n. 4, 2015 Apr 2015.

HENEKA, M.; KUMMER, M.; LATZ, E. Innate immune activation in neurodegenerative disease. **Nat Rev Immunol**, 14, n. 7, 2014.

HERSKOVITS, A.; LOCASCIO, J.; PESKIND, E.; LI, G. *et al.* A Luminex assay detects amyloid β oligomers in Alzheimer's disease cerebrospinal fluid. **PloS one**, 8, n. 7, 2013.

HULSTAERT, F.; BLENNOW, K.; IVANOIU, A.; SCHOONDERWALDT, H. *et al.* Improved discrimination of AD patients using beta-amyloid(1-42) and tau levels in CSF. **Neurology**, 52, n. 8, 05/12/1999 1999.

IBGE. **Tábua completa de mortalidade para o Brasil: análises e tabelas**. 2020. Disponível em: <https://biblioteca.ibge.gov.br/index.php/biblioteca-catalogo?view=detalhes&id=73097>.

INGALA, S.; DE BOER, C.; MASSELINK, L.; VERGARI, I. *et al.* Application of the ATN classification scheme in a population without dementia: Findings from the EPAD cohort. **Alzheimers Dement**, 04/03/2021 2021.

IRWIN, D. J.; MCMILLAN, C. T.; TOLEDO, J. B.; ARNOLD, S. E. *et al.* Comparison of Cerebrospinal Fluid Levels of Tau and A β 1-42 in Alzheimer Disease and Frontotemporal Degeneration Using 2 Analytical Platforms. **Archives of Neurology**, 69, n. 8, p. 1018-1025, 2012.

ISMAIL, Z.; FISCHER, C. E.; HOGAN, D. B.; MILLIKIN, C. P. *et al.* Prevalence of Depression in Patients With Mild Cognitive Impairment: A Systematic Review and Meta-analysis. **JAMA Psychiatry**, 74, n. 1, p. 58-67, 2017.

JACK, C.; ALBERT, M.; KNOPMAN, D.; MCKHANN, G. *et al.* Introduction to the recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. **Alzheimers Dement**, 7, n. 3, 2011.

JACK, C.; BENNETT, D.; BLENNOW, K.; CARRILLO, M. *et al.* NIA-AA Research Framework: Toward a biological definition of Alzheimer's disease. **Alzheimers Dement**, 14, n. 4, 2018.

JACK, C.; BENNETT, D.; BLENNOW, K.; CARRILLO, M. *et al.* A/T/N: An unbiased descriptive classification scheme for Alzheimer disease biomarkers. **Neurology**, 87, n. 5, 2016.

JACK, C.; HOLTZMAN, D. Biomarker modeling of Alzheimer's disease. **Neuron**, 80, n. 6, 2013.

JAMES, P.; OPARIL, S.; CARTER, B.; CUSHMAN, W. *et al.* 2014 evidence-based guideline for the management of high blood pressure in adults: report from the panel members appointed to the Eighth Joint National Committee (JNC 8). **JAMA**, 311, n. 5, 2014.

JESSEN, F.; AMARIGLIO, R.; BUCKLEY, R.; VAN DER FLIER, W. *et al.* The characterisation of subjective cognitive decline. **Lancet Neurol**, 19, n. 3, 2020.

JESSEN, F.; AMARIGLIO, R.; VAN BOXTEL, M.; BRETELER, M. *et al.* A conceptual framework for research on subjective cognitive decline in preclinical Alzheimer's disease. **Alzheimers Dement**, 10, n. 6, 2014.

KANG, J.; VANDERSTICHELE, H.; TROJANOWSKI, J.; SHAW, L. Simultaneous analysis of cerebrospinal fluid biomarkers using microsphere-based xMAP multiplex technology for early detection of Alzheimer's disease. **Methods (San Diego, Calif.)**, 56, n. 4, 2012.

KINSELLA, K.; HE, W. An Aging World: 2008 International Population Reports. OFFICE, U. S. G. P. Washington, DC 2009.

KNOPMAN, D., AMIEVA, H , PETERSEN RS, *et al.* **Alzheimer disease**. Nat Rev Dis Primers. p.33. 2021.

LANDAU, S.; LU, M.; JOSHI, A.; PONTECORVO, M. *et al.* Comparing positron emission tomography imaging and cerebrospinal fluid measurements of β -amyloid. **Annals of neurology**, 74, n. 6, 2013 Dec 2013.

LANTERO RODRIGUEZ, J.; KARIKARI, T.; SUÁREZ-CALVET, M.; TROAKES, C. *et al.* Plasma p-tau181 accurately predicts Alzheimer's disease pathology at least 8 years prior to post-mortem and improves the clinical characterisation of cognitive decline. **Acta neuropathologica**, 140, n. 3, 2020 Sep 2020.

LE BASTARD, N.; COART, E.; VANDERSTICHELE, H.; VANMECHELEN, E. *et al.* Comparison of two analytical platforms for the clinical qualification of Alzheimer's disease biomarkers in pathologically-confirmed dementia. **Journal of Alzheimer's disease : JAD**, 33, n. 1, 2013.

LEITÃO, M.; SILVA-SPÍNOLA, A.; SANTANA, I.; V, O. *et al.* Clinical validation of the Lumipulse G cerebrospinal fluid assays for routine diagnosis of Alzheimer's disease. **Alzheimer's research & therapy**, 11, n. 1, 2019.

LEUZY, A.; ASHTON, N.; MATTSSON-CARLGREN, N.; DODICH, A. *et al.* 2020 update on the clinical validity of cerebrospinal fluid amyloid, tau, and phospho-tau as biomarkers for Alzheimer's disease in the context of a structured 5-phase development framework. **European journal of nuclear medicine and molecular imaging**, 2021.

LEWCZUK, P.; ŁUKASZEWICZ-ZAJĄC, M.; MROCZKO, P.; KORNHUBER, J. Clinical significance of fluid biomarkers in Alzheimer's Disease. **Pharmacol Rep**, 72, n. 3, 2020.

LIVINGSTON, G.; SOMMERLAD, A.; ORGETA, V.; COSTAFREDA, S. *et al.* Dementia prevention, intervention, and care. **Lancet**, 390, n. 10113, p. 26773-22734, 2017.

LOUREIRO, J.; PAIS, M.; STELLA, F.; RADANOVIC, M. *et al.* Passive anti-amyloid immunotherapy for Alzheimer's disease. **Curr Opin Psychiatry**, 33, n. 3, 2020.

MARTINS, L.; ROCHA, N.; TORRES, K.; DOS SANTOS, R. *et al.* Disease-specific expression of the serotonin-receptor 5-HT_{2C} in natural killer cells in Alzheimer's dementia. **J Neuroimmunol**, 251, n. 1-2, 2012.

MASTERS, C.; BATEMAN, R.; BLENNOW, K.; ROWE, C. *et al.* Alzheimer's disease. **Nature Reviews Disease Primers**, 1, n. 1, p. 1-18, 2015.

MATTSSON, N.; ANDREASSON, U.; PERSSON, S.; ARAI, H. *et al.* The Alzheimer's Association external quality control program for cerebrospinal fluid biomarkers. **Alzheimer's dementia**, 7, n. 4, 2011.

MATTSSON, N.; ANDREASSON, U.; PERSSON, S.; CARRILLO, M. *et al.* CSF biomarker variability in the Alzheimer's Association quality control program. **Alzheimers & dement.**, 9, n. 3, 2013.

MATTSSON, N.; SCHÖLL, M.; STRANDBERG, O.; SMITH, R. *et al.* 18 F-AV-1451 and CSF T-tau and P-tau as biomarkers in Alzheimer's disease. **EMBO molecular medicine**, 9, n. 9, 2017.

MCKHANN, G.; KNOPMAN, D.; CHERTKOW, H.; HYMAN, B. *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.**, 7, n. 3, 2011.

MOLINUEVO, J.; BLENNOW, K.; DUBOIS, B.; ENGELBORGHES, S. *et al.* The clinical use of cerebrospinal fluid biomarker testing for Alzheimer's disease diagnosis: a consensus paper from the Alzheimer's Biomarkers Standardization Initiative. **Alzheimers & dement.**, 10, n. 6, 2014 Nov 2014.

MORRIS, J. The Clinical Dementia Rating (CDR): current version and scoring rules. **Neurology**, 43, n. 11, 1993 Nov 1993.

MORRIS, J.; HEYMAN, A.; MOHS, R.; HUGHES, J. *et al.* The Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease (CERAD). Part I. Clinical and neuropsychological assessment of Alzheimer's disease. **Neurology**, 39, n. 9, 1989 Sep 1989.

MOUSSA, C.; HEBRON, M.; HUANG, X.; AHN, J. *et al.* Resveratrol regulates neuroinflammation and induces adaptive immunity in Alzheimer's disease. **J Neuroinflammation**, 14, n. 1, 2017.

CAMPBELL, MR.; ASHRAFZADEH-KIAN, S.; PETERSEN, RC. MIELKE, MM. e cols., P-tau/A β 42 and A β 42/40 ratios in CSF are equally predictive of amyloid PET status. **Alzheimers Dement (Amst)**, 13, n. 1, 2021.

MULDER, C.; VERWEY, N.; VAN DER FLIER, W.; BOUWMAN, F. *et al.* Amyloid-beta(1-42), total tau, and phosphorylated tau as cerebrospinal fluid biomarkers for the diagnosis of Alzheimer disease. **Clinical chemistry**, 56, n. 2, 2010.

NG, K.; CHIEW, H.; ROSA-NETO, P.; KANDIAH, N. *et al.* Associations of AT(N) biomarkers with neuropsychiatric symptoms in preclinical Alzheimer's disease and cognitively unimpaired individuals. **Translational neurodegeneration**, 10, n. 1, 2021.

NITRINI, R.; LEFÈVRE, B.; MATHIAS, S.; CARAMELLI, P. *et al.* Neuropsychological tests of simple application for diagnosing dementia. **Arq Neuropsiquiatr**, 52, n. 4, 1994.

OLSSON, A.; VANDERSTICHELE, H.; ANDREASEN, N.; DE MEYER, G. *et al.* Simultaneous Measurement of β -Amyloid(1-42), Total Tau, and Phosphorylated Tau (Thr181) in Cerebrospinal Fluid by the xMAP Technology. **Clinical Chemistry**, 51, n. 2, p. 336-345, 2005.

OLSSON, B.; LAUTNER, R.; ANDREASSON, U.; ÖHRFELT, A. *et al.* CSF and blood biomarkers for the diagnosis of Alzheimer's disease: a systematic review and meta-analysis. **The Lancet. Neurology**, 15, n. 7, 2016.

PAIS, M.; MARTINEZ, L.; RIBEIRO, O.; LOUREIRO, J. *et al.* Early diagnosis and treatment of Alzheimer's disease: new definitions and challenges. **Revista brasileira de psiquiatria (Sao Paulo, Brazil : 1999)**, 42, n. 4, 2020.

PALMQVIST, S.; MATTSSON, N.; HANSSON, O. Cerebrospinal fluid analysis detects cerebral amyloid- β accumulation earlier than positron emission tomography. **Brain : a journal of neurology**, 139, n. Pt 4, 2016.

PALMQVIST, S.; ZETTERBERG, H.; BLENNOW, K.; VESTBERG, S. *et al.* Accuracy of brain amyloid detection in clinical practice using cerebrospinal fluid β -amyloid 42: a cross-validation study against amyloid positron emission tomography. **JAMA neurology**, 71, n. 10, 2014.

PARRA, M.; BAEZ, S.; ALLEGRI, R.; NITRINI, R. *et al.* Dementia in Latin America: Assessing the present and envisioning the future. **Neurology**, 90, n. 5, 2018.

PATTERSON, C. World Alzheimer report 2018: the state of the art of dementia research: new frontiers. **Alzheimer's Disease International**, 2018.

PATTERSON, C.; FEIGHTNER, J.; GARCIA, A.; HSIUNG, G. *et al.* Diagnosis and treatment of dementia: 1. Risk assessment and primary prevention of Alzheimer disease. **CMAJ**, 178, n. 5, 2008.

PETERS VAN TON, A.; VERBEEK, M.; ALKEMA, W.; PICKKERS, P. *et al.* Downregulation of synapse-associated protein expression and loss of homeostatic microglial control in cerebrospinal fluid of infectious patients with delirium and patients with Alzheimer's disease. **Brain Behav Immun**, 89, 2020.

PETERSEN, R. Mild Cognitive Impairment. **Continuum (Minneapolis, Minn)**, 22, n. 2 Dementia, 2016 Apr 2016.

PETERSEN RC, D. R., KURZ A, MOHS RC, MORRIS JC, RABINS PV, RITCHIE K, ROSSOR M, THAL L, WINBLAD B. **Current concepts in mild cognitive impairment.** Arch Neurol. p.1985-1992. 2001.

PFEFFER, R.; KUROSAKI, T.; HARRAH, C.; CHANCE, J. *et al.* Measurement of functional activities in older adults in the community. **Journal of gerontology**, 37, n. 3, 1982.

PRICE, J.; MORRIS, J. Tangles and plaques in nondemented aging and "preclinical" Alzheimer's disease. **Annals of neurology**, 45, n. 3, 1999.

PRINCE, M.; WIMO, A.; GUERCHET, M. World Alzheimer Report 2015: The global impact of dementia: An analysis of prevalence, incidence, cost and trends. Disponível em: <https://www.alzint.org/u/WorldAlzheimerReport2015.pdf>.

PRINCE, M.; WIMO, A.; WINCLAD, B., JONSSON, L. Dementia in the Americas: Current and future cost and prevalence of Alzheimer's disease and other dementias. Disponível em: <https://www.alzint.org/u/dementia-in-the-americas-ENGLISH.pdf>.

QUERFURTH, H.; LAFERLA, F. Alzheimer's disease. **N Engl J Med**, 362, n. 4, 2010.

RADANOVIC, M.; OSHIRO, C.; FREITAS, T.; TALIB, L. *et al.* Correlation between CSF biomarkers of Alzheimer's disease and global cognition in a psychogeriatric clinic cohort. **Braz J Psychiatry**, 41, n. 6, 2019.

RIZZI, L.; MARIA PORTAL, M.; BATISTA, C.; MISSIAGGIA, L. *et al.* CSF A β 1-42, but not p-Tau 181, differentiates aMCI from SCI. **Brain Res**, 1678, 2018.

SANTANGELO, R.; MASSERINI, F.; AGOSTA, F.; SALA, A. *et al.* CSF p-tau/A β 42 ratio and brain FDG-PET may reliably detect MCI "imminent" converters to AD. **European journal of nuclear medicine and molecular imaging**, 47, n. 13, 2020.

SANTOS, J.; SILVEIRA, D.; OLIVEIRA, D.; CAIAFFA, W. Instruments used to evaluate smoking habits: a systematic review. **Cien Saude Colet**, 16, n. 12, 2011.

SHAW, L.; ARIAS, J.; BLENNOW, K.; GALASKO, D. *et al.* Appropriate use criteria for lumbar puncture and cerebrospinal fluid testing in the diagnosis of Alzheimer's disease. **Alzheimers & dement.**, 14, n. 11, 2018.

SHAW, L.; VANDERSTICHELE, H.; KNAPIK-CZAJKA, M.; CLARK, C. *et al.* Cerebrospinal fluid biomarker signature in Alzheimer's disease neuroimaging initiative subjects. **Annals of neurology**, 65, n. 4, 2009.

SHULMAN, K. Clock-drawing: is it the ideal cognitive screening test? **Int J Geriatr Psychiatry**, 15, n. 6, 2000.

SINGH-MANOUX, A.; DUGRAVOT, A.; FOURNIER, A.; ABELL, J. *et al.* Trajectories of Depressive Symptoms Before Diagnosis of Dementia: A 28-Year Follow-up Study. **JAMA Psychiatry**, 74, n. 7, p. 712-718, 2017.

SJÖGREN, M.; VANDERSTICHELE, H.; AGREN, H.; ZACHRISSON, O. *et al.* Tau and Abeta42 in cerebrospinal fluid from healthy adults 21-93 years of age: establishment of reference values. **Clinical chemistry**, 47, n. 10, 2001 Oct 2001.

SPERLING, R.; AISEN, P.; BECKETT, L.; BENNETT, D. *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.**, 7, n. 3, 2011 May 2011.

STONE, N.; ROBINSON, J.; LICHTENSTEIN, A.; BAIREY MERZ, C. *et al.* 2013 ACC/AHA guideline on the treatment of blood cholesterol to reduce atherosclerotic cardiovascular risk in adults: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. **J Am Coll Cardiol**, 63, n. 25 Pt B, 07/01/2014 2014.

SUEMOTO CK; FERRETTI-REBUSTINI RE; RODRIGUEZ RD; LEITE RE *et al.* Neuropathological diagnoses and clinical correlates in older adults in Brazil: A cross-sectional study. **PLoS medicine**, 14, n. 3, 03/28/2017 2017.

TOLEDO, J. B.; ZETTERBERG, H.; VAN HARTEN, A. C.; GLODZIK, L. *et al.* Alzheimer's disease cerebrospinal fluid biomarker in cognitively normal subjects. **Brain**, 138, n. 9, p. 2701-2715, 2015.

TORRES, K.; LIMA, G.; FIAMONCINI, C.; REZENDE, V. *et al.* Increased frequency of cluster of differentiation 14 (CD14+) monocytes expressing interleukin 1 beta (IL-1 β) in Alzheimer's disease patients and intermediate levels in late-onset depression patients. **Int J Geriatr Psychiatry**, 29, n. 2, 2014 Feb 2014.

TORRES, K.; SANTOS, R.; DE LIMA, G.; FERREIRA, R. *et al.* Decreased expression of CCL3 in monocytes and CCR5 in lymphocytes from frontotemporal dementia as compared with Alzheimer's disease patients. **J Neuropsychiatry Clin Neurosci**, 24, n. 3, Summer 2012 2012.

VEERABHADRAPPA, B.; DELABY, C.; HIRTZ, C.; VIALARET, J. *et al.* Detection of amyloid beta peptides in body fluids for the diagnosis of alzheimer's disease: Where do we stand? **Critical reviews in clinical laboratory sciences**, 57, n. 2, 2020 Mar 2020.

WARD, A.; TARDIFF, S.; DYE, C.; ARRIGHI, H. Rate of conversion from prodromal Alzheimer's disease to Alzheimer's dementia: a systematic review of the literature. **Dement Geriatr Cogn Dis Extra**, 3, n. 1, 09/28/2013 2013.

WEILER, M.; CASSEB, R.; DE CAMPOS, B.; DE LIGO TEIXEIRA, C. *et al.* Cognitive Reserve Relates to Functional Network Efficiency in Alzheimer's Disease. **Front Aging Neurosci**, 10, 08/21/2018 2018.

WILLEMSE, E.; TIJMS, B.; VAN BERCKEL, B.; LE BASTARD, N. *et al.* Comparing CSF amyloid-beta biomarker ratios for two automated immunoassays, Elecsys and Lumipulse, with amyloid PET status. **Alzheimers & dement. (Amster)**, 13, n. 1, 05/01/2021 2021.

WIMO, A.; ALI, G.-C.; GUERCHET, M.; PRINCE, M. *et al.* World Alzheimer Report 2015: The global impact of dementia: An analysis of prevalence, incidence, cost and trends. 2015/09/21 2015.

WISE, E.; ROSENBERG, P.; LYKETSOS, C.; LEOUTSAKOS, J. Time course of neuropsychiatric symptoms and cognitive diagnosis in National Alzheimer's Coordinating Centers volunteers. **Alzheimers & dement. (Amsterdam, Netherlands)**, 11, 04/18/2019 2019.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global action plan on the public health response to dementia 2017 - 2025**. Geneva: 2017. ISBN : 978-92-4-151348-7. 52 p.

YANG, L.; RIEVES, D.; GANLEY, C. Brain amyloid imaging--FDA approval of florbetapir F18 injection. **The New England journal of medicine**, 367, n. 10, 2012.

ANEXO 1 – CARTA DE APROVAÇÃO NO COMITE DE ÉTICA

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
MINAS GERAIS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Estudo da participação fúngica nos mecanismos da doença de Alzheimer por meio do estudo de biomarcadores no líquido cefalorraquidiano e no sangue periférico

Pesquisador: MARIA APARECIDA CAMARGOS BICALHO

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 79354317.1.0000.5149

Instituição Proponente: Faculdade de Medicina da UFMG

Patrocinador Principal: Universidade Federal de Minas Gerais
FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE MINAS GERAIS

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.502.119

Apresentação do Projeto:

Trata-se de estudo transversal, tipo caso-controle, envolvendo 40 idosos em acompanhamento ambulatorial no serviço de geriatria no Instituto Jenny Andrade de Faria de Atenção ao Idoso da UFMG, portadores de comprometimento cognitivo leve amnésico. O estudo visa avaliar a participação da infecção por fungos patogênicos nos mecanismos neuroinflamatórios associados com os processos neurodegenerativos da DA em amostra de idosos altamente miscigenada.

Segundo o projeto, as síndromes demências constituem um grupo com características distintas, sendo a demência por doença de Alzheimer (DA) a forma mais comum de demência caracterizada pelo acometimento predominante da memória. Já o comprometimento cognitivo leve (CCL) é uma condição com sintomatologia intermediária

entre as alterações cognitivas determinadas pela idade e a sintomatologia da demência. Os mecanismos determinantes do desenvolvimento da DA ainda não se encontram completamente esclarecidos. Além disso, o diagnóstico precoce ainda é difícil, uma vez que a sintomatologia da doença é compartilhada por uma variedade de transtornos que refletem características neuropatológicas comuns, o que torna de grande relevância estabelecer biomarcadores confiáveis para o diagnóstico e avaliação da resposta terapêutica.

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad SI 2006

Bairro: Unidade Administrativa II **CEP:** 31.270-901

UF: MG **Município:** BELO HORIZONTE

Telefone: (51)3409-4592

E-mail: coep@prpq.ufmg.br

Continuação do Parecer: 2.502.119

Objetivo da Pesquisa:

Foram definidos no projeto:

Objetivo Primário: -Avaliar a presença de DNA fúngico em amostras de LCR e, possíveis associações com marcadores neuroinflamatórios no LCR e sangue periférico em pacientes idosos com comprometimento cognitivo leve.

Objetivos Secundários: -Avaliar a concentração das proteínas Tau e β -amilóide em amostras de LCR de pacientes portadores de comprometimento cognitivo leve (CCL) amnésico e doença de Alzheimer (DA) e em controles sem comprometimento cognitivo ou funcional. -Avaliar a concentração de marcadores neuroinflamatórios em amostras de LCR de pacientes portadores de CCL amnésico e DA e em controles sem comprometimento cognitivo ou funcional. -Estabelecer correlações entre os diversos entre a infecção fúngica no SNC e os níveis de concentração das proteínas Tau e β -amilóide no LCR de pacientes com CCL amnésico e DA. -Avaliar a possibilidade de relação entre as concentrações líquóricas dos marcadores inflamatórios de pacientes com CCL amnésico em relação a DA. Avaliar a possibilidade de relação entre as concentrações líquóricas proteínas Tau e β -amilóide de pacientes com CCL amnésico em relação a DA. - Estudar possíveis correlações entre as concentrações líquóricas e séricas de proteínas Tau e β -amilóide de pacientes com CCL amnésico, DA e controles sem comprometimento cognitivo ou funcional. - Estudar as correlações entre variáveis clínicas e sociodemográficas e os biomarcadores no LCR de pacientes com CCL amnésico, DA e controles sem comprometimento cognitivo ou funcional.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

No TCLE informa: "Os possíveis benefícios da pesquisa irão auxiliar em medidas futuras que favoreçam o diagnóstico precoce e a descoberta de novos alvos terapêuticos para a Doença de Alzheimer. Os riscos inerentes ao procedimento de coleta do líquido cefalorraquidiano consistem em dor local, sangramento, hematoma, infecção, fistula (vazamento temporário de líquido da coluna para pele) locais além de dor de cabeça. Estes riscos são minimizados pelo exame cuidadoso e exclusão de pacientes de risco para complicações, além da realização por profissional treinado e experiente na realização do procedimento. A coleta de sangue pode determinar dor local e hematomas, minimizados pelo uso de material adequado para coleta nesta população, realizada por profissional treinado e com técnica adequada. Possíveis constrangimentos existentes durante as entrevistas e os procedimentos de punção serão minimizados pelos componentes do grupo de pesquisa. Os pesquisadores estarão acessíveis (nos telefones descritos abaixo) e disponíveis para identificação e tratar qualquer complicação. Os participantes serão devidamente orientados com relação às medidas para evitar complicações, como posicionamento adequado,

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2ª Adm. 2006

Bairro: Unidade Administrativa II CEP: 31.270-901

UF: MG Município: BELO HORIZONTE

Telefone: (31)3409-4592

E-mail: coep@prpq.ufmg.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
MINAS GERAIS



Continuação do Parecer: 2.502.119

higienização, uso de analgésicos e ingestão de líquidos e cuidados locais. Caso ocorra alguma complicação, o senhor (a) será encaminhado (a) para a avaliação e conduta de nossa equipe médica para que as medidas cabíveis sejam tomadas.”

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Projeto exequível, bem estruturado e de impacto na saúde do idoso, atendendo os requisitos éticos.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram apresentados:

- Projeto no formato da plataforma Brasil e detalhado.
- Carta de anuência institucional da FHEMIG.
- Cronograma para o desenvolvimento da pesquisa.
- Anuência e parecer consubstanciado do chefe do Serviço de Geriatria do Hospital das Clínicas.
- Carta de anuência do Instituto René Rachou.
- Carta de anuência institucional do Hospital Metropolitano Odilon Behrens.
- Declaração de recebimento do Projeto pela Gerência de Ensino e Pesquisa do Hospital das Clínicas/UFMG
- EBSERH.
- Parecer consubstanciado e aprovado pela chefia do Depto. de Clínica Médica da Faculdade de Medicina.
- TCLE e TALE.
- Folha de rosto devidamente preenchida e assinada pela direção da Faculdade de Medicina.
- Parecer consubstanciado e com anuência da Clínica Médica do Hospital das Clínicas/UFMG.

Foram atendidas as pendências do parecer do comitê referentes ao TALE e ao TCLE.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sou, S.M.J. favorável à aprovação do projeto.

Tendo em vista a legislação vigente (Resolução CNS 466/12), o COEP-UFMG recomenda aos Pesquisadores: comunicar toda e qualquer alteração do projeto e do termo de consentimento via emenda na Plataforma Brasil, informar imediatamente qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento da pesquisa (via documental encaminhada em papel), apresentar na forma de notificação relatórios parciais do andamento do mesmo a cada 06 (seis) meses e ao término da pesquisa encaminhar a este Comitê um sumário dos resultados do projeto (relatório final).

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad SI 2006

Bairro: Unidade Administrativa II CEP: 31.270-901

UF: MG Município: BELO HORIZONTE

Telefone: (31)3409-4592

E-mail: coep@prpq.ufmg.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
MINAS GERAIS



Continuação do Parecer: 2.502.119

Considerações Finais a critério do CEP:

Tendo em vista a legislação vigente (Resolução CNS 466/12), o COEP-UFMG recomenda aos Pesquisadores: comunicar toda e qualquer alteração do projeto e do termo de consentimento via emenda na Plataforma Brasil, informar imediatamente qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento da pesquisa (via documental encaminhada em papel), apresentar na forma de notificação relatórios parciais do andamento do mesmo a cada 06 (seis) meses e ao término da pesquisa encaminhar a este Comitê um sumário dos resultados do projeto (relatório final).

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1005053.pdf	08/02/2018 00:26:19		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLECORRIGIDO.pdf	08/02/2018 00:22:40	MARIA APARECIDA CAMARGOS BICALHO	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TALEcorrigido.pdf	08/02/2018 00:22:17	MARIA APARECIDA CAMARGOS BICALHO	Aceito
Brochura Pesquisa	brochurapesquisa.pdf	08/02/2018 00:21:55	MARIA APARECIDA CAMARGOS BICALHO	Aceito
Outros	CARTARESPOSTA.pdf	20/12/2017 16:21:21	MARIA APARECIDA CAMARGOS BICALHO	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	COEP.pdf	20/12/2017 16:19:52	MARIA APARECIDA CAMARGOS BICALHO	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TALE.pdf	20/12/2017 16:19:17	MARIA APARECIDA CAMARGOS BICALHO	Aceito
Declaração de Pesquisadores	doolucianacota.pdf	01/10/2017 00:06:42	MARIA APARECIDA CAMARGOS BICALHO	Aceito
Cronograma	Cronogramaprojeto.pdf	01/10/2017 00:02:30	MARIA APARECIDA CAMARGOS BICALHO	Aceito
Declaração de Instituição e	Parecergeriatria.pdf	01/10/2017 00:02:04	MARIA APARECIDA CAMARGOS	Aceito

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad SI 2006
 Bairro: Unidade Administrativa II CEP: 31.270-901
 UF: MG Município: BELO HORIZONTE
 Telefone: (31)3409-4592

E-mail: coep@prpq.ufmg.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
MINAS GERAIS



Continuação do Parecer: 2.502.119

Infraestrutura	Parecergeriatria.pdf	01/10/2017 00:02:04	BICALHO	Aceito
Declaração de Pesquisadores	docfiocruz.pdf	01/10/2017 00:00:22	MARIA APARECIDA CAMARGOS BICALHO	Aceito
Declaração de Pesquisadores	docHOB.pdf	30/09/2017 23:59:40	MARIA APARECIDA CAMARGOS BICALHO	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	docGEPE.pdf	30/09/2017 23:58:54	MARIA APARECIDA CAMARGOS BICALHO	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	parecerCLM.pdf	30/09/2017 23:58:10	MARIA APARECIDA CAMARGOS BICALHO	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	30/09/2017 23:54:59	MARIA APARECIDA CAMARGOS BICALHO	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	docclinicamedicahc.pdf	30/09/2017 23:51:59	MARIA APARECIDA CAMARGOS BICALHO	Aceito
Folha de Rosto	folhaderostoCOEP.pdf	28/09/2017 18:39:43	MARIA APARECIDA CAMARGOS BICALHO	Aceito
Outros	793543171aprovacaoassinada.pdf	20/02/2018 13:58:52	Vivian Resende	Aceito
Outros	793543171parecerassinado.pdf	20/02/2018 13:59:01	Vivian Resende	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

BELO HORIZONTE, 20 de Fevereiro de 2018

Assinado por:
Vivian Resende
(Coordenador)

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad SI 2006

Bairro: Unidade Administrativa II CEP: 31.270-901

UF: MG Município: BELO HORIZONTE

Telefone: (31)3409-4592

E-mail: coep@prpq.ufmg.br

ANEXO 2 – TCLE E TALE

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA IDOSOS SEM COMPROMETIMENTO DA COGNIÇÃO

O Sr (a) está sendo convidado (a) para participar da pesquisa “ESTUDO DA PARTICIPAÇÃO DA INFECÇÃO FÚNGICA NOS MECANISMOS DA DOENÇA DE ALZHEIMER POR MEIO DO ESTUDO DE BIOMARCADORES NO LÍQUIDO CEFALORRAQUIDIANO E NO SANGUE PERIFÉRICO”, que pretende avaliar as condições relacionadas ao quadro psiquiátrico e neurológico dos idosos.

No Brasil observamos um crescimento importante da população idosa, que é mais susceptível a alterações da cognição (conjunto de funções cerebrais como memória, linguagem, planejamento de atividades, dentre outras) determinadas pelo envelhecimento normal e por alterações patológicas secundárias a demência. A doença de Alzheimer é a principal causa de demência e é responsável por perda da capacidade para exercer as atividades habituais e alterações da cognição e do comportamento. Apesar do grande impacto na sociedade, os mecanismos desta doença ainda não são completamente conhecidos e, conseqüentemente, não existe tratamento capaz de evitar a progressão da doença. Os possíveis benefícios da pesquisa irão auxiliar em medidas futuras que favoreçam o diagnóstico precoce e a descoberta de novos alvos terapêuticos para a doença de Alzheimer.

Caso o Sr (a) concorde em participar deste estudo, será necessário responder um questionário aplicado por um profissional previamente treinado, com duração de aproximadamente de 01 hora e 30 minutos e, será coletado cerca de 6 ml de líquido cefalorraquidiano (“líquido que banha o cérebro”) e 15 ml de sangue periférico para análises biológicas necessárias para a pesquisa. O líquido cefalorraquidiano será coletado durante o procedimento anestésico para realização da cirurgia que o médico do (a) Sr (a) indicou. Trata-se de uma raquianestesia realizada através da punção com agulha na coluna lombar.

Os riscos inerentes ao procedimento de coleta do líquido cefalorraquidiano consistem em dor local, sangramento, hematoma, infecção, fístula (vazamento temporário de líquido da coluna para pele) locais, além de dor de cabeça.

Estes riscos são minimizados pelo exame cuidadoso e exclusão de pacientes com risco para complicações, além da realização por profissional experiente para realização do mesmo. A coleta de sangue pode determinar dor local e hematomas,

minimizados pelo uso de material adequado para esta população, coleta realizada por profissional treinado e com técnica adequada.

Possíveis constrangimentos existentes durante as entrevistas serão minimizados pelos pesquisadores do nosso grupo, que estarão disponíveis para esclarecimento de quaisquer dúvidas, antes, durante e após o término do estudo e publicação dos resultados.

A sua participação é voluntária e, portanto, não implica em dano material, físico ou moral, assim como também não resulta em qualquer benefício material. A não participação na pesquisa não acarreta prejuízo no acompanhamento pela equipe de saúde.

Fica assegurado o direito do participante de se retirar da pesquisa a qualquer momento, sem que haja qualquer dano ou repressão por parte dos pesquisadores. As informações coletadas terão um caráter confidencial, ou seja, seu nome não será divulgado em nenhuma hipótese. Se no transcorrer da pesquisa tiver alguma dúvida ou por qualquer outro motivo necessitar de orientações, poderá procurar um dos pesquisadores.

O resultado desta pesquisa será divulgado em artigo de revista científica, sem identificação dos participantes. Você não terá nenhuma despesa, sendo de responsabilidade dos pesquisadores os gastos com impressão, cópias ou com qualquer outra eventualidade. Os gastos porventura existentes com transporte serão ressarcidos pelos pesquisadores.

Lembramos que:

- Sua participação neste estudo é muito importante e voluntária.
- Os dados gerados pelos questionários serão tratados em conformidade com a Resolução 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde.
- Toda pesquisa pode gerar riscos para os sujeitos envolvidos. Apesar dos cuidados, efeitos indesejáveis são possíveis de ocorrer em qualquer pesquisa.

Você receberá uma cópia deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, onde consta o telefone e endereço do pesquisador responsável que pode esclarecer dúvidas sobre esta pesquisa agora ou a qualquer momento.

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais, que poderá ser contatado em caso de dúvidas éticas pelo telefone 31 3409-4592 ou endereço Av. Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha. Unidade Administrativa II, 2º andar.

Baseado neste termo, eu, _____
 aceito participar da pesquisa “ESTUDO DA PARTICIPAÇÃO DA INFECÇÃO FÚNGICA NOS MECANISMOS DA DOENÇA DE ALZHEIMER POR MEIO DO ESTUDO DE BIOMARCADORES NO LÍQUIDO CEFALORRAQUIDIANO E NO SANGUE PERIFÉRICO”, de acordo com as informações acima expostas.

Declaro que li as informações contidas neste termo e fui esclarecido sobre a minha participação no estudo. Dou meu consentimento de livre e de espontânea vontade para participar do mesmo.

Nome legível do participante/Assinatura Data: ___/___/___.

Assinatura do participante _____.



Impressão dactiloscópica (caso o participante não consiga escrever).

Eu, _____ (nome/assinatura do pesquisador), declaro que forneci todas as informações referentes ao projeto ao participante e/ou responsável.

Assinatura do coordenador do projeto -Dra. Maria Aparecida Camargos Bicalho macbicalho@gmail.com. Tel: (31) 3226-2386/(31)98478-8629.

Pesquisadores:

1. Maria Aparecida Camargos Bicalho-UFMG.T:31-98478- 8629; macbicalho@gmail.com
2. Marco Aurélio Romano Silva- UFMG. T: 3409- 8000; romanosilva@gmail.com
3. Luiz Armando Cunha de Marco-UFMG. T: 3409-8000; luiz.dmarco@gmail.com
4. Débora Marques de Miranda – UFMG. T: (31) 35426252; debora.m.miranda@gmail.com
5. Edgar Nunes de Moraes –UFMG. T: (31) 99115-7141. edgarnmoraes@gmail.com
6. Andréa Teixeira de Carvalho - Instituto René Rachou - Fiocruz Minas (31); 988014345. andreat@minas.fiocruz.br
7. Daniela Valadão Freitas Rosa –UFMG. T: (31) 98511-3008; danielavaladao@gmail.com
8. Marco Túlio Gualberto Cintra-UFMG. T: (31) 9636-6108; marcotuliocintra@gmail.com
9. Ariane Flávia Lage- UFMG. T:(31) 99170679; arianeflavia@gmail.com

10. Rafaela Teixeira Àvila- UFMG. T: (31) 8875-9183; rafaelatavila@gmail.com
11. Mônica Vieira Costa – UFMG. T: (31) 98696-8290; monicavie@gmail.com
12. Thadeu Alves Máximo- HOSPITAL ODILON BEHERS. T: (31)98851-1553; thadeumaximo@gmail.com
13. Luciana de Souza Cota Carvalho Laurentys – FHEMIG. T: (31) 98821-7852; lulucota@gmail.com
14. Marco Aurélio Fagundes Angelo. FHEMIG. T: (31) 984788629.
15. Gesiane Thamire Tolentino Araújo – UFMG. T: 31-99182-7140; tolintinogesiane@gmail.com
16. Erika de Oliveira Hansen – HC/UFMG T 31 98839 1201 – erikaohansen@gmail.com

Conselho de ética em Pesquisa UFMG (COEP-UFMG): Av. Antônio Carlos, 6627, Pampulha - Belo Horizonte-MG-CEP:31270-901. Unidade Administrativa II - 2º Andar - Sala: 2005 Telefone:(031)3409-4592.E-mail:coep@prpq.ufmg.br. Horário atendimento: 9:00 às 11:00 e 14:00 às 16:00.

Hospital Odilon Behrens Rua Formiga, 50 – Bairro São Cristóvão, Belo Horizonte - MG, 31110-430. Comitê de Ética em Pesquisa do HMOB – Telefone: (31) 3277-6120. E-mail: cephob@gmail.com.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA RESPONSÁVEIS POR IDOSOS COM COMPROMETIMENTO COGNITIVO

Você está sendo convidado, como responsável por _____, a participar da pesquisa “ESTUDO DA PARTICIPAÇÃO DA INFECÇÃO FÚNGICA NOS MECANISMOS DA DOENÇA DE ALZHEIMER POR MEIO DO ESTUDO DE BIOMARCADORES NO LÍQUIDO CEFALORRAQUIDIANO E NO SANGUE PERIFÉRICO”, que pretende avaliar as condições relacionadas ao quadro psiquiátrico e neurológico dos idosos atendidos no Instituto Jenny de Andrade Faria de Atenção ao Idoso do Hospital das Clínicas da UFMG.

No Brasil observamos um crescimento importante da população idosa, mais susceptível a alterações da cognição (conjunto de funções cerebrais como memória, linguagem, planejamento de atividades, dentre outras) determinadas pelo envelhecimento normal e por alterações patológicas secundárias a demência. A doença de Alzheimer é a principal causa de demência e é responsável por perda de capacidade para exercer as atividades habituais, alterações da cognição e do comportamento. Apesar do grande impacto na sociedade, os mecanismos da doença ainda não são completamente conhecidos e, conseqüentemente, não existe tratamento capaz de evitar a progressão da doença.

O presente estudo visa avaliar a presença de micro-organismos (fungos) em amostras do líquido cefalorraquidiano (“líquido que banha o cérebro”) em pacientes portadores de demência causada pela doença de Alzheimer, de Comprometimento Cognitivo Leve (fase da doença que antecede os sintomas de demência) e, em idosos sem alterações da cognição. Caso você permita a participação do idoso sob sua responsabilidade, será necessário responder um questionário aplicado por um profissional previamente treinado, com duração de aproximadamente de 01 hora e 30 minutos, e será coletado cerca de 6 mL de líquido cefalorraquidiano, e 15 mL de sangue periférico para análises biológicas necessárias para a pesquisa, os possíveis benefícios da pesquisa poderão auxiliar em medidas futuras que favoreçam o diagnóstico precoce e a descoberta de novos alvos terapêuticos para a doença.

Os riscos inerentes ao procedimento de coleta do líquido cefalorraquidiano consistem em dor local, sangramento, hematoma, infecção, fístula (vazamento

temporário de líquido para pele), além de dor de cabeça. Estes riscos são minimizados pela exclusão de pacientes com risco para complicações, além da realização por profissional experiente para realização do mesmo. A coleta de sangue pode determinar dor local e hematomas, minimizados pela realização por profissional treinado e com técnica adequada e pelo uso de material adequado para esta população.

Possíveis constrangimentos existentes durante as entrevistas e os procedimentos de punção serão minimizados pelos pesquisadores do nosso grupo. Os mesmos estarão acessíveis (nos telefones descritos abaixo) e disponíveis para identificação e tratar qualquer complicação.

A participação do idoso é voluntária e não implica em dano material, físico ou moral, assim como também não resulta em qualquer benefício material. A não participação na pesquisa não acarreta prejuízo no acompanhamento pela equipe de saúde. Fica assegurado o direito do participante de se retirar da pesquisa a qualquer momento, sem que haja qualquer dano ou repressão.

As informações coletadas terão um caráter confidencial, ou seja, nome do participante não será divulgado em nenhuma hipótese.

O resultado desta pesquisa será divulgado em artigo de revista científica. Você não terá nenhuma despesa, sendo de responsabilidade dos pesquisadores os gastos com impressão, cópias ou com qualquer outra eventualidade. Os gastos porventura existentes com transporte serão ressarcidos pelos pesquisadores.

Lembramos que:

- A participação do idoso neste estudo é muito importante e voluntária.
- Os dados gerados pelos questionários serão tratados em conformidade com a Resolução 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde.
- Toda pesquisa pode gerar riscos para os sujeitos envolvidos. Apesar dos cuidados, efeitos indesejáveis são possíveis de ocorrer em qualquer pesquisa.

Através deste documento fica assegurado o direito do (a) Sr. (a) _____ que terá todos os esclarecimentos

relativos à pesquisa, garantidos, incluindo os métodos utilizados.

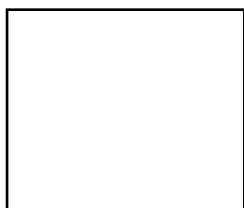
Você receberá uma cópia deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, onde consta o telefone e endereço do pesquisador responsável que pode esclarecer dúvidas sobre esta pesquisa agora ou em qualquer momento

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais, que poderá ser contatado em caso de dúvidas éticas pelo telefone 31 3409-4592 ou endereço Av. Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha. Unidade Administrativa II, 2º andar.

Baseado neste termo, eu, _____ responsável pelo (a) Sr (a) _____ aceito participar da pesquisa “ESTUDO DA PARTICIPAÇÃO DA INFECÇÃO FÚNGICA NOS MECANISMOS DA DOENÇA DE ALZHEIMER POR MEIO DO ESTUDO DE BIOMARCADORES NO LÍQUIDO CEFALORRAQUIDIANO E NO SANGUE PERIFÉRICO”, de acordo com as informações acima expostas.

Declaro que li as informações contidas neste termo e fui esclarecido sobre a participação do idoso sob minha responsabilidade no estudo. Dou meu consentimento de livre e de espontânea vontade.

Nome legível do responsável/Assinatura Data:___/___/___.



Impressão dactiloscópica (caso não consiga escrever)

Eu, _____(nome do pesquisador), declaro que forneci todas as informações referentes ao projeto ao participante e/ou responsável.

Nome/assinatura do pesquisador. Data:___/___/___.

Nome /assinatura do coordenador do projeto – Dra Maria Aparecida Camargos Bicalho – macbicalho@gmail.com Tel: (31) 3226- 2386/(31)98478-8629

Belo Horizonte, _____ de _____ de 20____

Pesquisadores:

1. Maria Aparecida Camargos Bicalho-UFMG.T:31-98478- 8629; macbicalho@gmail.com
2. Marco Aurélio Romano Silva- UFMG. T: 3409- 8000; romanosilva@gmail.com
3. Luiz Armando Cunha de Marco-UFMG. T: 3409-8000; luiz.dmarco@gmail.com
4. Débora Marques de Miranda – UFMG. T: (31) 35426252; debora.m.miranda@gmail.com

5. Edgar Nunes de Moraes –UFMG. T: (31) 99115-7141. edgarnmoraes@gmail.com
6. Andréa Teixeira de Carvalho - Instituto René Rachou - Fiocruz Minas (31); 988014345. andreat@minas.fiocruz.br
7. Daniela Valadão Freitas Rosa –UFMG. T: (31) 98511-3008; danielavaladao@gmail.com
8. Marco Túlio Gualberto Cintra-UFMG. T: (31) 9636-6108; marcotuliocintra@gmail.com
9. Ariane Flávia Lage- UFMG. T:(31) 99170679; arianeflavia@gmail.com
10. Rafaela Teixeira Àvila- UFMG. T: (31) 8875-9183; rafaelatavila@gmail.com
11. Mônica Vieira Costa – UFMG. T: (31) 98696-8290; monicavie@gmail.com
12. Thadeu Alves Máximo- HOSPITAL ODILON BEHERS. T: (31)98851-1553; thadeumaximo@gmail.com
13. Luciana de Souza Cota Carvalho Laurentys – FHEMIG. T: (31) 98821-7852; lulucota@gmail.com
14. Marco Aurélio Fagundes Angelo. FHEMIG. T: (31) 984788629.
15. Gesiane Thamire Tolentino Araújo – UFMG. T: 31-99182-7140; tolentinogesiane@gmail.com
16. Erika de Oliveira Hansen – HC/UFMG T. 31 98839 1202

Conselho de ética em Pesquisa UFMG (COEP-UFMG): Av. Antônio Carlos, 6627, Pampulha - Belo Horizonte-MG-CEP:31270-901. Unidade Administrativa II - 2º Andar - Sala: 2005 Telefone:(031)3409-4592.E-mail:coep@prpq.ufmg.br. Horário atendimento: 9:00 às 11:00 e 14:00 às 16:00.

Hospital Odilon Behrens Rua Formiga, 50 – Bairro São Cristóvão, Belo Horizonte - MG, 31110-430. Comitê de Ética em Pesquisa do HMOB – Telefone: (31) 3277-6120. E-mail: cephob@gmail.com.

TERMO DE ASSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado (a) (a) para participar como voluntário da pesquisa “ESTUDO DA PARTICIPAÇÃO DA INFECÇÃO FÚNGICA NOS MECANISMOS DA DOENÇA DE ALZHEIMER POR MEIO DO ESTUDO DE BIOMARCADORES NO LÍQUIDO CEFALORRAQUIDIANO E NO SANGUE PERIFÉRICO”. Nesta pesquisa pretendemos avaliar condições relacionadas ao quadro neurológico de idosos atendidos no Instituto Jenny de Andrade Faria de Atenção ao Idoso do Hospital das Clínicas da UFMG.

No Brasil existe um importante crescimento da população idosa. Os idosos estão mais predispostos a alterações da memória, linguagem, organização e planejamento de atividades. Estas alterações podem fazer parte do envelhecimento normal e de doenças como o Alzheimer. Apesar do grande impacto desta doença, ainda temos muito o que aprender sobre ela para ajudar na descoberta de um tratamento eficaz que evite a progressão da doença.

Neste estudo pretendemos avaliar a presença de micro-organismos (fungos) em amostras do “líquido que banha o cérebro” de pacientes portadores de Doença de Alzheimer, nas fases muito iniciais e mais avançadas e, também, em pessoas sem a doença (coletados pelo anestesista durante raquianestesia para cirurgia). Caso você autorize sua participação, será necessário responder um questionário, com duração de aproximadamente de 01 hora e 30 minutos, aplicado por profissional da nossa equipe de trabalho. Será coletado em torno de 6ml do “líquido que banha o cérebro” e 15ml de sangue. A coleta do “líquido que banha o cérebro” será realizada pela introdução de uma agulha na região da coluna, após anestesia local.

Os possíveis benefícios da pesquisa são auxiliar na definição do diagnóstico precoce e na descoberta de novos alvos terapêuticos para a doença de Alzheimer. Os riscos inerentes ao procedimento de coleta do líquido que banha o “cérebro” consistem em dor local, sangramento, hematoma, infecção, vazamento temporário de líquido para a pele, além de dor de cabeça.

Estes riscos são minimizados pelo exame cuidadoso e exclusão de pacientes que tenham risco para complicações, além da realização por profissional treinado e experiente. A coleta de sangue pode determinar dor local e hematomas. Estes riscos podem ser reduzidos, pelo uso de material adequado e coleta realizada por profissional treinado e com técnica adequada.

Possíveis constrangimentos existentes durante as entrevistas serão minimizados pelos pesquisadores do nosso grupo, que estarão disponíveis para esclarecimento de quaisquer dúvidas, antes, durante e após o término do estudo e publicação dos resultados. Caso o Sr (a) apresente algum efeito adverso resultante do procedimento de punção lombar ou pela coleta de sangue periférico, ou mesmo necessite esclarecer dúvidas clínicas eventuais, estamos a disposição através da pesquisadora e médica Maria Aparecida Camargos Bicalho pelo telefone (31) 98478-8629 a qualquer momento. Os demais pesquisadores também estão disponíveis para identificação e tratar qualquer complicação, através dos telefones descritos no final desse termo.

Para participar desta pesquisa, o Sr (a) deverá autorizar e assinar este termo de assentimento. O Sr (a) estará livre para participar ou recusar-se, poderá retirar o consentimento ou interromper a sua participação a qualquer momento. Sua participação é voluntária e a recusa em participar não acarretará qualquer penalidade ou modificação em seu tratamento. Você não será identificado em respeito à privacidade e ao caráter confidencial das informações.

O Sr (a) não terá nenhuma despesa, sendo de responsabilidade dos pesquisadores os gastos com impressão, cópias ou com qualquer outro gasto. Os gastos porventura existentes com transporte serão ressarcidos pelos pesquisadores. Se no transcorrer da pesquisa tiver alguma dúvida, ou por qualquer outro motivo necessitar de orientações, poderá procurar um dos pesquisadores.

Lembramos que:

- A sua participação neste estudo é muito importante e voluntária.
- Os dados serão tratados de acordo com Resolução do Conselho Nacional de Saúde.
- Toda pesquisa pode gerar riscos para os sujeitos envolvidos. Apesar dos cuidados, efeitos indesejáveis são possíveis de ocorrer em qualquer pesquisa. Diante de qualquer desconforto, sua participação poderá ser interrompida, sem maiores prejuízos.
- Caso o Sr (a) sofra algum dano associado diretamente a participação na pesquisa, será assegurado o direito a indenização como previsto na legislação.
- Você não terá nenhum gasto ou pagamento com sua participação.

Você receberá uma cópia deste Termo de Consentimento Livre Esclarecido, onde consta o telefone e endereço do pesquisador responsável que pode esclarecer dúvidas sobre esta pesquisa agora em qualquer momento.

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais, que poderá ser contatado em caso de dúvidas éticas pelo telefone 31 3409-4592 ou endereço Av. Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha. Unidade Administrativa II, 2º andar.

Eu, _____, fui informado (a) dos objetivos da presente pesquisa, de maneira clara e detalhada e esclareci minhas dúvidas. Sei que a qualquer momento poderei solicitar novas informações e, o meu responsável poderá modificar a decisão de participar se assim o desejar. Tendo o consentimento do meu responsável já assinado, declaro estar de acordo em participar dessa pesquisa. Recebi o termo de assentimento e me foi dada a oportunidade de ler e esclarecer as minhas dúvidas.

Declaro que li as informações contidas neste termo e fui esclarecido sobre minha participação no estudo. Dou meu assentimento de livre e de espontânea vontade para minha participação.

Nome legível do participante/Assinatura Data: ___/___/___.

Assinatura do participante _____.



Impressão dactiloscópica (caso o participante não consiga escrever).

Eu, _____(nome/assinatura do pesquisador), declaro que forneci todas as informações referentes ao projeto ao participante e/ou responsável.

Assinatura do coordenador do projeto -Dra. Maria Aparecida Camargos Bicalho
macbicalho@gmail.com. Tel: (31) 3226-2386/(31)98478-8629.

Pesquisadores:

17. Maria Aparecida Camargos Bicalho-UFMG.T:31-98478- 8629;
macbicalho@gmail.com
18. Marco Aurélio Romano Silva- UFMG. T: 3409- 8000; romanosilva@gmail.com
19. Luiz Armando Cunha de Marco-UFMG. T: 3409-8000; luiz.dmarco@gmail.com
20. Débora Marques de Miranda – UFMG. T: (31) 35426252;
debora.m.miranda@gmail.com
21. Edgar Nunes de Moraes –UFMG. T: (31) 99115-7141.
edgarnmoraes@gmail.com
22. Andréa Teixeira de Carvalho - Instituto René Rachou - Fiocruz Minas (31);
988014345. andreat@minas.fiocruz.br
23. Daniela Valadão Freitas Rosa –UFMG. T: (31) 98511-3008;
danielavaladao@gmail.com
24. Marco Túlio Gualberto Cintra-UFMG. T: (31) 9636-6108;
marcotuliocintra@gmail.com
25. Ariane Flávia Lage- UFMG. T:(31) 99170679; arianeflavia@gmail.com
26. Rafaela Teixeira Àvila- UFMG. T: (31) 8875-9183; rafaelatavila@gmail.com
27. Mônica Vieira Costa – UFMG. T: (31) 98696-8290; monicavie@gmail.com
28. Thadeu Alves Máximo- Hospital Odilon Behrens. T: (31)98851-1553;
thadeumaximo@gmail.com
29. Luciana de Souza Cota Carvalho Laurentys – FHEMIG. T: (31) 98821-7852;
lulucota@gmail.com
30. Marco Aurélio Fagundes Angelo. FHEMIG. T: (31) 984788629.
31. Gesiane Thamire Tolentino Araújo – UFMG - T: 31-99182-7140;
tolentinogesiane@gmail.com
32. Erika de Oliveira Hansen – UFMG – T: (31) 988391201 –
erikaohansen@gmail.com

Conselho de ética em Pesquisa UFMG (COEP-UFMG): Av. Antônio Carlos, 6627, Pampulha - Belo Horizonte-MG-CEP:31270-901. Unidade Administrativa II - 2º Andar - Sala: 2005 Telefone:(031)3409-4592.E-mail:coep@prpq.ufmg.br. Horário atendimento: 9:00 às 11:00 e 14:00 às 16:00.

Hospital Odilon Behrens Rua Formiga, 50 – Bairro São Cristóvão, Belo Horizonte - MG, 31110-430. Comitê de Ética em Pesquisa do HMOB – Telefone: (31) 3277-6120. E-mail: cephob@gmail.com.

ANEXO 3 – PROTOCOLO DE AVALIAÇÃO COGNITIVA

PERFIL DE BIOMARCADORES NO LÍQUIDO CEFALORRAQUIDIANO DE IDOSOS SEM COMPROMETIMENTO COGNITIVO OBJETIVO E COM DOENÇA DE ALZHEIMER - COMPROMETIMENTO COGNITIVO LEVE AMNÉSTICO E DEMÊNCIA

IDENTIFICAÇÃO

Nome: _____ Data: _____

Sexo: M () F () Reg: Nome da mãe: _____

DN: _____ Idade: _____ Escolaridade: _____

Institucionalizado: () Não () Sim Cor Pele: _____

Profissão: _____ Aposentado: S () N () Quando: _____

Telefones: _____ Centro Saúde: _____

Endereço: _____

Cuidadores: _____ Idade do cuidador: _____

() cônjuge () Filho () Outros parentes () Sem parentesco

Quantos dias por semana passa com o paciente: _____

Tempo gasto com o paciente (diário): _____

Médico Assistente: _____ Estado civil: _____

Tabagismo: _____ Duração Anos: _____ N Cigarros/Dia: _____

Etilismo: _____ Duração Anos: _____ Tipo-Quantidade/Dia: _____

Peso: _____ Altura: _____ IMC: _____ Circ panturrilha: _____

DIAGNÓSTICOS CLÍNICOS

HISTÓRIA PREGRESSA TRANSTORNOS NEUROPSIQUIÁTRICOS:

- DEPRESSÃO: S () _____ N () NA ()
- OUTROS TRANSTORNOS NP: S () _____ N () NA ()
- DHEG: S () _____ N () NA ()

HISTORIA FAMILIAR:

- DEPRESSÃO: S () _____ N () NA ()
- DEMÊNCIA/TIPO: S () _____ N () NA ()
- OUTROS TRANSTORNOS NP: S () _____ N () NA ()
- DAC: S () _____ N () NA ()

Medicações em uso	

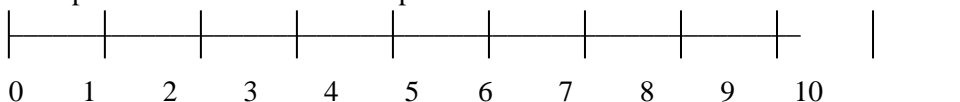
AVALIAÇÃO COGNITIVA**INÍCIO E EVOLUÇÃO DO COMPROMETIMENTO COGNITIVO.**

Data de início dos sintomas: _____

Anotar detalhadamente as queixas relacionadas ao declínio cognitivo:

OUTRAS INFORMAÇÕES RELEVANTES:

Marcar na régua abaixo a pontuação que o paciente atribui a sua memória e, posteriormente, a nota dada pelo familiar a memória do paciente:



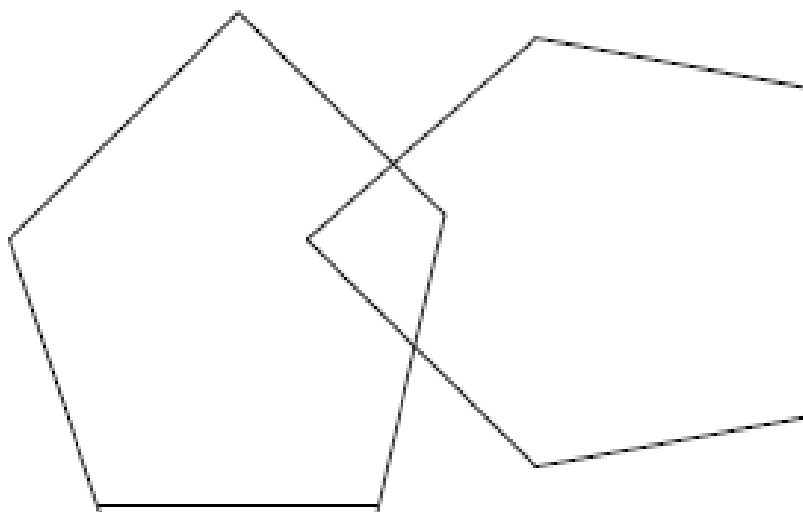
Ocorreu alteração da funcionalidade após início dos sintomas? __ sim __ não

INÍCIO E EVOLUÇÃO DO COMPROMETIMENTO COGNITIVO:**AVALIAÇÃO OBJETIVA**

MINI-EXAME DO ESTADO MENTAL

Mini-Mental de Folstein (1975), adaptado por Brucki <i>et al</i> (2003)		
Orientação Temporal (05 pontos) <i>Dê um ponto para cada item</i>	<i>Ano</i>	
	<i>Mês</i>	
	<i>Dia do mês</i>	
	<i>Dia da semana</i>	
	<i>Semestre/Hora aproximada</i>	
Orientação Espacial (05 pontos) <i>Dê um ponto para cada item</i>	<i>Estado</i>	
	<i>Cidade</i>	
	<i>Bairro ou nome de rua próxima</i>	
	<i>Local geral: que local é este aqui (apontando ao redor num sentido mais amplo: hospital, casa de repouso, própria casa)</i>	
	<i>Andar ou local específico: em que local nós estamos (consultório, dormitório, sala, apontando para o chão)</i>	
Registro (3 pontos)	<i>Repetir: GELO, LEÃO e PLANTA</i>	
Atenção e Cálculo (5 pts) <i>Dê 1 ponto para cada acerto</i>	<i>Subtrair $100 - 7 = 93 - 7 = 86 - 7 = 79 - 7 = 72 - 7 = 65$</i>	
	<i>Soletrar inversamente a palavra MUNDO=ODNUM</i>	
Memória de Evocação (3 pts)	<i>Quais os três objetos perguntados anteriormente?</i>	
Nomear dois objetos (2 pts)	<i>Relógio e caneta</i>	
Repetir (1 ponto)	<i>“NEM AQUI, NEM ALI, NEM LÁ”</i>	
Comando de estágios (3 pontos)	<i>“Apanhe esta folha de papel com a mão direita, dobre-a ao meio e coloque-a no chão”</i>	
Escrever 1 frase completa (1 pt)	<i>“Escreva alguma frase que tenha começo, meio e fim”</i>	
Ler e executar (1 ponto)	<i>FECHE SEUS OLHOS</i>	
Copiar diagrama (1 ponto)	<i>Copiar dois pentágonos com interseção</i>	
PONTUAÇÃO FINAL (escore = 0 a 30 pontos)		

FECHE SEUS OLHOS



LISTA DE PALAVRAS DO CERAD (MORRIS *et al*, 1989; BERTOLUCCI *et al*, 1998)

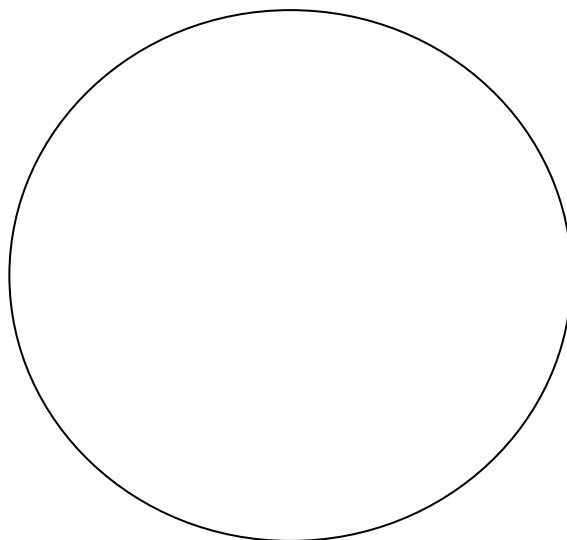
LISTA DE PALAVRAS DO CERAD	DATA (Score)				
Tentativa 1					
Tentativa 2					
Tentativa 3					
Evocação de 5 minutos					
Reconhecimento de Palavras					

Lista de Palavras para Fixação e Recordação					
1ª tentativa	Ordem	2ª tentativa	Ordem	3ª tentativa	Ordem
Manteiga		Praia		Cabana	
Braço		Braço		Bilhete	
Praia		Cabana		Poste	
Carta		Manteiga		Rainha	
Rainha		Poste		Motor	
Cabana		Motor		Carta	
Poste		Erva		Erva	
Bilhete		Rainha		Braço	
Erva		Bilhete		Manteiga	
Motor		Carta		Praia	
Score					

Lista de Reconhecimento de Palavras		
Igreja	Rainha	Café
Cabana	Manteiga	Chinelo
Dólar	Poste	Braço
Aldeia	Praia	Corda
Cinco	Bilhete	Carta
Tropa	Hotel	Erva
Montanha	Motor	
Score:		

TESTE DO RELÓGIO

Pontuação:



TESTE DE RECONHECIMENTO DE FIGURAS

RECONHECIMENTO DE FIGURAS	DATA (Escore)
Percepção Visual Correta	
Nomeação Correta	
Memória Incidental <i>Esconda as figuras e pergunte: “que figuras eu acabei de lhe mostrar?”</i>	
Memória Imediata 1 <i>Mostre as figuras novamente durante 30 segundos dizendo: “Olhe bem e procure memorizar esta figuras”</i>	
Memória Imediata 2 <i>Mostre a figuras novamente durante 30 segundos dizendo: “Olhe bem e procure memorizar esta figuras”</i>	
Evocação de 5 Minutos	
Reconhecimento de figuras	

FLUÊNCIA VERBAL

Categoria	Pontuação
Animais	
Frutas	

CLINICAL DEMENTIA RATING (CDR)

CDR (sum of boxes) =

Função	Nenhum 0	Questionável 0,5	Leve 1	Moderado 2	Grave 3
Memória	NÃO há perda de memória ou esquecimento leve e inconstante	Esquecimento leve mas consistente. Esquecimento “benigno”. Lembrança parcial dos eventos.	Perda moderada da memória para eventos recentes, interferindo com as atividades do cotidiano.	Perda grave da memória. Apenas material altamente conhecido continua preservado. Informações novas são rapidamente perdidas.	Perda grave da memória. Apenas resquícios de memória estão presentes.
Orientação	Completamente orientado	Completamente orientado, exceto pela presença de discretas dificuldades nas relações temporais.	Dificuldade grave nas relações temporais. Orientado no espaço. Pode apresentar desorientação geográfica.	relações temporais. Usualmente desorientado no tempo e frequentemente no espaço.	Orientado somente quanto à pessoa.
Julgamento e resolução de problemas	Resolve problemas do dia-a-dia e lida bem com negócios e finanças. Julgamento é bom em relação ao seu performance anterior	Comprometimento discreto na capacidade de resolução de problemas, Similaridades e diferenças.	Dificuldade moderada na resolução de problemas, Similaridades e diferenças. Julgamento social usualmente mantido	Comprometimento grave na resolução de problemas, Similaridades e diferenças. Julgamento social usualmente comprometido.	Completamente incapaz de emitir julgamento e resolver problemas.
AVDI's comunitárias	Independente para os níveis usuais de trabalho, compras e participação em grupos sociais e voluntários.	Comprometimento leve	Incapaz de funcionar independente, embora ainda consiga realizar algumas. Apresenta-se normal no contato casual.	Completamente incapaz de funcionar adequadamente fora do domicílio, apesar de NÃO aparentar.	Completamente incapaz de funcionar adequadamente fora do domicílio. Aparenta estar muito comprometido para tais funções.
AVDI's domiciliares (tarefas domésticas)	Vida doméstica, hobbies e interesses intelectuais preservados.	Comprometimento leve	Comprometimento leve mas já estabelecido. Incapaz de realizar tarefas, hobbies ou atividades mais difíceis.	Apenas tarefas Simples estão preservadas. Interesses bastante restrito.	Completamente incapaz
AVD's básicas	Independente no autocuidado	Independente no autocuidado	Necessita de ajuda	Requer assistência para vestir-se, higiene e cuidado pessoal.	Requer assistência completa no cuidado pessoal. Presença de incontinência.

Inventário Neuropsiquiátrico (NPI)

Frequência

- (1) Ocasional - Menos de uma vez por semana
- (2) Comum - Cerca de uma vez por semana
- (3) Frequente - Várias vezes por semana, mas menos que todos os dias
- (4) Muito frequente - Uma vez por dia ou mais

Gravidade

- (1) Leve - Comportamento está presente causa pouco desgaste ao paciente e cuidador;
- (2) Moderada - Causa mais incômodo ao paciente, mas pode ser contornado pelo cuidador;
- (3) Acentuada - O comportamento é bastante desgastante para o paciente, e não pode ser contornado pelo cuidador.

Items

A – Delírios: O paciente acredita em coisas que você sabe não serem reais? Por exemplo, insiste que alguém está tentando fazer-lhe mal ou roubá-lo? Afirma que seus parentes não são quem dizem ser ou que a casa onde mora não é a sua? Não estou me referindo apenas à desconfiança; estou interessado em verificar se o paciente está convencido que estas coisas estão acontecendo em ele.

Sim Não N/A

B – Alucinações: O paciente vê ou ouve coisas? Parece ver, ouvir ou sentir coisas que não estão presentes? Por esta pergunta não estamos nos referindo apenas a coisas erradas em que o paciente acredita, como afirmar que alguém que morreu ainda está vivo. Ao contrário, queremos saber se ele realmente ouve sons ou vê coisas que não estão presentes.

Sim Não N/A

C – Agitação/Agressividade: O paciente não obedece ou não deixa que os outros o ajudem a fazer as coisas? O paciente fica contrariado quando você tenta cuidar dele ou ajudá-lo?

Sim Não N/A

D – Disforia/Depressão: O paciente parece triste ou deprimido? Diz sentir-se triste ou deprimido?

Sim Não N/A

E – Ansiedade: O paciente fica nervoso, preocupado, ou assustado sem motivo aparente? Parece muito tenso e inquieto? Tem medo de ficar longe de ti?

Sim Não N/A

F – Euforia/Elação: O paciente fica muito animado ou feliz mesmo sem motivo aparente? Não quero dizer que ele não fica alegre quando vê amigos, ganha presentes ou está com sua família. Quero saber se o paciente apresenta um bom-humor exagerado ou acha graça de coisas não engraçadas.

Sim Não N/A

G – Apatia/Indiferença: O paciente perdeu o interesse pelo mundo ao seu redor? Não quer mais fazer as coisas ou lhe falta ânimo para começar outras atividades? É difícil fazer com que ele converse ou ajude nos trabalhos da casa? Anda meio parado ou parece não estar nem aí para as coisas?

Sim Não N/A

	S	N
1. O paciente parece menos espontâneo e ativo do que o normal?		
2. O paciente tem puxado menos conversa do que antes?		
3. O paciente está menos carinhoso ou emotivo do que o normal?		
4. O paciente tem contribuído menos para as atividades domésticas rotineiras?		
5. O paciente parece menos interessado na vida e nos planos dos outros?		
6. O paciente perdeu o interesse pelos amigos e parentes?		
7. O paciente está menos entusiasmado em relação aos seus interesses habituais?		
8. O paciente exibe algum outro sinal de que não liga em fazer coisas novas?		

Intensidade

Leve: apatia com pouca interferência na rotina; apenas ligeiramente diferente do seu jeito de ser habitual; o paciente corresponde a incentivos de engajamento em atividades novas

Moderada: apatia muito evidente; pode ser vencida por persuasão e incentivo do acompanhante; responde espontaneamente apenas a acontecimentos intensos, como visitas de parentes chegados ou membros da família

Acentuada: apatia muito evidente; deixa de responder a qualquer tipo de encorajamento ou a eventos externos

Desgaste: Qual o grau de desgaste emocional que lhe causa este comportamento?

- | | |
|-----------|------------------------------|
| 0 Nenhum | 3 Moderado |
| 1 Mínimo | 4 Acentuado |
| 2 Pequeno | 5 Muito acentuado ou extremo |

H – Desinibição: O paciente faz as coisas sem pensar no que está fazendo? Faz ou diz coisas que não deveriam ser feitas ou ditas em público? Faz coisas que deixam você ou os outros com vergonha dele?

Sim Não N/A

I – Irritabilidade: O paciente fica irritado e se incomoda com facilidade? O paciente parece que é de lua? Está de saco cheio? Não nos referimos à tristeza por não conseguir se lembrar das coisas ou por não conseguir fazer o que sempre fez; queremos saber se o paciente tem andado mais de mau-humor ou irritado, não tem mais paciência, ou tem tido chilikues frequentes.

Sim Não N/A

J – Comportamento motor aberrante: O paciente fica andando de um lado para o outro, faz coisas repetidas como abrir e fechar gavetas ou armários, mexe nas coisas ao seu redor várias vezes ou fica dando nós em fios e cordões?

Sim Não N/A

K – Comportamento noturno: Tem sido difícil para o paciente pegar no sono (não considere se apenas levanta uma ou duas vezes à noite para ir ao banheiro e logo volta para dormir)? Fica de pé à noite? Anda de um lado para o outro, à noite? Se veste ou não te deixa dormir à noite?

Sim Não N/A

L – Apetite/Alterações alimentares: O paciente apresentou alguma mudança no apetite, no peso ou manias na alimentação (considere NA se estiver incapacitado e precisar ser alimentado)? Ele mudou seus gostos quanto à comida?

() Sim () Não () N/A

Inventário Neuropsiquiátrico (INP)

Item	NA	Aus	Freq	Int	F x i	Desgaste
Delírios						
Alucinações						
Agitação						
Depressão/disforia						
Ansiedade						
Euforia/elação						
Apatia/indiferença						
Desinibição						
Irritabilidade/labilidade						
Comportamento motor aberrante						
Comportamentos noturnos						
Apetite/alterações alimentares						

Universidade da Califórnia, Los Angeles (UCLA)

DSM V

	SIM	NÃO
1. Você se sente frequentemente triste ou deprimido		
2. Interesse ou prazer acentuadamente diminuídos		
3. Perda ou ganho significativo de peso, ou diminuição ou aumento do apetite		
4. Insônia ou hipersonia		
5. Agitação ou retardo psicomotor		
6. Fadiga ou perda de energia		
7. Sentimento de inutilidade ou culpa excessiva ou inadequada		
8. Capacidade diminuída de pensar ou concentrar-se		
9. Pensamento recorrentes de morte, ideação suicida recorrente		
SCORE:		
Duração da sintomatologia:		


ESCALA GERIÁTRICA DE DEPRESSÃO(GDS-15 E GDS-5) : Almeida,1999
(escolha a opção que mais se assemelha ao que você está sentindo nas Últimas semanas)

Você está basicamente satisfeito com sua vida	Sim	NÃO	
Você se aborrece com frequência	SIM	Não	
Você se sente inútil nas atuais circunstâncias?	SIM	Não	
Você prefere ficar em casa a sair e fazer coisas novas	SIM	Não	
Sente que sua situação não tem saída	SIM	Não	
Você tem medo que algum mal vá te acontecer?		SIM	Não
Você acha que sua situação é sem esperanças?	SIM	Não	
Você acha maravilhoso estar vivo?	Sim	NÃO	
Você sente que sua vida está vazia?	SIM	Não	
Você sente que a maioria das pessoas está melhor que você?	SIM	Não	
Você se sente com mais problemas de memória do que a maioria?	SIM	Não	
Você deixou muitos de seus interesses e atividades?	SIM	Não	
Você se sente de bom humor a maior parte do tempo?	Sim	NÃO	
Você se sente cheio de energia?		Sim	NÃO
Você se sente feliz a maior parte do tempo?	Sim	NÃO	

PONTUAÇÃO:

Avaliação das Atividades de Vida Diária, segundo Pfeffer:						
0. Normal	0. Nunca o fez, mas poderia fazê-lo					
1. Faz, com dificuldade	1. Nunca o fez e agora teria dificuldade					
2. Necessita de ajuda						
3. Não é capaz						
	0	1	2	3	0	1
Ele (Ela) é capaz de preparar uma comida?						
Ele (Ela) manuseia seu próprio dinheiro?						
Ele (Ela) é capaz de manusear seus próprios remédios?						
Ele (Ela) é capaz de comprar roupas, comida, coisas para casa sozinho?						
Ele (Ela) é capaz de esquentar a água para o café e apagar o fogo?						
Ele (Ela) é capaz de manter-se em dia com as atualidades, com os acontecimentos da comunidade ou da vizinhança?						
Ele (Ela) é capaz de prestar atenção, entender e discutir um programa de rádio ou televisão, um jornal ou uma revista?						
Ele (Ela) é capaz de lembrar-se de compromissos, acontecimentos, familiares, feriados?						
Ele (Ela) é capaz de passear pela vizinhança e encontrar o caminho de volta para casa?						

ANEXO 4 – E-MAIL DE SUBMISSÃO DE MANUSCRITO

De: **Frontiers in Psychiatry** psychiatry.editorial.office@frontiersin.org 

Assunto: Your manuscript submission - 716686

Data: 28 de maio de 2021 22:35

Para: Erika De Oliveira Hansen erikaohansen@gmail.com

Dear Dr Hansen

We are pleased to inform you that we have received the manuscript "Millipore xMap Luminex (HATMAG-68K): an accurate and cost-effective method for evaluating Alzheimer's biomarkers in cerebrospinal fluid" to be considered for publication in Frontiers in Psychiatry, section Aging Psychiatry.

You can access the review forum and track the progress of your manuscript using the following link:
<https://www.frontiersin.org/Journal/MySubmission.aspx?stage=100>

Your manuscript is now in the initial validation stage to determine its suitability for peer review. Should your manuscript be sent out for peer review, you will receive a notification once we receive the reports from reviewers and the interactive review forum is activated. You will then be able to read the review reports and exchange directly with the reviewers in the interactive review forum as well as submit a revised manuscript, if appropriate. If the required number of reviewers endorse your manuscript in the Independent Review stage, their tabs will be closed and the manuscript will be forwarded to the Review Finalized stage, where you will be able to interact with the handling editor via the Editor tab.

Best Regards,

Frontiers in Psychiatry Editorial Office

Frontiers | Editorial Office - Collaborative Peer Review Team
www.frontiersin.org
Avenue du Tribunal Fédéral 34, 1005 Lausanne, Switzerland
Office T 41 21 510 17 90

For technical issues, please contact our IT Helpdesk (support@frontiersin.org) or visit our Frontiers Help Center (zendesk.frontiersin.org/hc/en-us)