

Universidade Federal de Minas Gerais

Faculdade de Medicina

Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Saúde do Adulto

Análise da relação entre citocinas, biomarcadores da doença de Alzheimer e declínio cognitivo no líquido cefalorraquidiano de uma amostra de pessoas idosas Brasileiras.

Ivonne Carolina Bolaños Burgos

Belo Horizonte

2024

Ivonne Carolina Bolaños Burgos

**Tese de Doutorado apresentada ao Programa de
Pós-graduação de Ciências Aplicadas à Saúde do Adulto
da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito
para obtenção de título de Doutora em Ciências Aplicadas
à Saúde do Adulto.**

Orientadora: Professora Dra. Maria Aparecida Camargos Bicalho

Coorientador: Professor Dr. Bernardo de Mattos Viana

Belo Horizonte

2024

Burgos, Ivonne Carolina Bolaños
B957a Análise da relação entre citocinas, biomarcadores da Doença de Alzheimer e declínio cognitivo no líquido cefalorraquidiano de uma amostra de pessoas idosas brasileiras [recurso eletrônico] / Ivonne Carolina Bolaños Burgos. -- Belo Horizonte: 2024.
117f.: il.
Formato: PDF.
Requisitos do Sistema: Adobe Digital Editions.

Orientadora: Maria Aparecida Camargos Bicalho
Coorientador: Bernardo de Mattos Viana.
Área de concentração: Ciências Aplicadas à Saúde do Adulto
Tese (doutorado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

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

Bibliotecário responsável: Monaliza Maria da Silveira Caires Lima CRB-6/1707



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS APLICADAS À SAÚDE DO ADULTO

ATA DE DEFESA DE TESE

Às 13h 30min do dia vinte de agosto de dois mil e vinte e quatro, SALA 614 E 618 - Auditório CETES, Faculdade de Medicina, Av. Prof. Alfredo Balena, 190, da Universidade Federal de Minas Gerais, realizou-se a sessão pública para a defesa da Tese de **IVONNE CAROLINA BOLAÑOS BURGOS**, número de registro **2020661114**, graduada no curso de BIOLOGIA, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutora em CIÊNCIAS APLICADAS À SAÚDE DO ADULTO. A presidência da sessão coube à professora Maria Aparecida Camargos Bicalho, Orientadora. Inicialmente, a presidente fez a apresentação da Comissão Examinadora assim constituída: **Profa. Maria Aparecida Camargos Bicalho - Orientadora (UFMG)**, **Prof. Bernardo de Mattos Viana - Coorientador (UFMG)**, **Profa. Karina Braga Gomes Borges (UFMG)**, **Prof. Marco Aurelio Romano Silva (UFMG)**, **Prof. Eduardo Rigon Zimmer (UFRGS)** e **Profa. Andréa Teixeira de Carvalho (FIOCRUZ)**. Em seguida, a candidata fez a apresentação do trabalho que constitui sua Tese de Doutorado, intitulada: "**Análise da relação entre citocinas, biomarcadores da doença de Alzheimer e declínio cognitivo no líquido cefalorraquidiano de uma amostra de pessoas idosas Brasileiras.**". 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 Tese de Doutorado. O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pelo presidente da Comissão. Conforme artigo 77 das Normas Gerais de Pós-Graduação da Universidade Federal de Minas Gerais, a defesa de tese será pública. A aluna e os membros da Comissão estão cientes e autorizaram a gravação da defesa, que ficará disponibilizada em acervo da Faculdade de Medicina. Nada mais havendo a tratar, o presidente encerrou a sessão e lavrou a presente ata que, depois de lida, se aprovada, será assinada pela Comissão Examinadora.

Belo Horizonte, 20 de agosto de 2024.

Assinatura dos membros da banca examinadora:



Documento assinado eletronicamente por **Karina Braga Gomes Borges, Professora do Magistério Superior**, em 23/08/2024, às 07:50, 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 26/08/2024, às 21:26, 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 30/08/2024, às 17:34, 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 **Marco Aurelio Romano Silva, Professor do Magistério Superior**, em 12/09/2024, às 15:40, 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 **Andréa Teixeira de Carvalho, Usuário Externo**, em 26/09/2024, às 07:46, 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 **Eduardo Rigon Zimmer, Usuário Externo**, em 01/10/2024, às 11:08, 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?](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0)

[acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **3421377** e o código CRC **23521D66**.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Reitor

Profa. Sandra Regina Goulart Almeida

Vice-Reitor

Prof. Alessandro Fernandes Moreira

Pró-Reitor de Pós-Graduação

Prof. Eduardo Soares Neves Silva

Pró-Reitor de Pesquisa

Prof. Fernando Marcos dos Reis

FACULDADE DE MEDICINA

Diretor:

Profa. Alamanda Kfoury Pereira

Vice-Diretor da Faculdade de Medicina

Profa. Cristina Gonçalves Alvim

Chefe do Departamento de Clínica Médica

Prof. Márcio Weissheimer Lauria

CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO

Coordenador do Centro de Pós-Graduação

Profa. Luciana Costa Faria

Subcoordenador do Centro de Pós-Graduação

Profa. Gilda Aparecida Ferreira

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

CNPq: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

FAPEMIG: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais

CAPES: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

Dedico este trabalho a minha família, meu avô Roberto Bolaños (*in memoriam*) que padeceu com demência, a todas as pessoas que sofrem da doença de Alzheimer, suas famílias e a todos os alunos que poderei educar e guiar com os conhecimentos adquiridos durante esta caminhada.

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter-me guiado até aqui, pela sua fiel companhia diária, por ter enfrentado comigo cada momento, pela maravilhosa providência de cada pessoa que participou desta caminhada e a Nossa Senhora que como uma boa mãe cuidou de mim de tão bela forma. A todos meus amigos do céu pelo suporte e inspirações.

À minha orientadora, professora Maria Aparecida, por me abrir as portas para realizar meu sonho, pela oportunidade de aprender e crescer profissionalmente a seu lado. Pelos múltiplos ensinamentos e pela grande paciência para ensinar. Em especial por me incentivar e me dar liberdade de conviver com os pacientes.

A meu coorientador, professor Bernardo, pelos ensinamentos, acompanhamento, direção e incentivo durante toda essa caminhada.

Aos meu Pais, Eyder e Consuelo, pelo apoio, companhia, ânimo, sorrisos, orações e especialmente pelo grandiosíssimo amor, uma das maiores fontes que me sustentaram durante todos esses anos.

À minha irmã Daniela, pelo grande apoio em cada circunstância, pelo ânimo e por cuidar dos nossos meus pais enquanto eu cumpria com o meu sonho.

Ao Neurotec-R, em especial aos professores Marco Aurelio Romano-Silva, professora Débora Marques e ao professor Luiz Armando por abrir as portas do laboratório, me permitir aprender desenvolver e conseguir fazer toda a parte experimental do meu trabalho.

À Daniela Valadão, por toda a acolhida, pelos conhecimentos compartilhados durante essa caminhada, principalmente, pelo senso de organização, planejamento e cuidado no laboratório.

Aos professores Aloisio e Lourdes, por todo o suporte na análise estatística, por todos os conhecimentos compartilhados e sobretudo, pela paciência para me ensinar.

À professora Andréa Texeira, por me permitir participar nos experimentos com a técnica de Luminex.

Ao professor Igor, pela grande contribuição na coleta de líquido, possibilitando a viabilidade deste trabalho.

À Nathalia Dias e Érika Hansen, pela parceria no recrutamento de pacientes, coleta de amostras, amizade e suporte durante este trabalho.

A todos os meus companheiros de laboratório, em especial, Nathalia, Ana Caroline, Eduardo, Bianca, pela acolhida e momentos compartilhados.

À minha querida amiga Gabriela Engelmann, pela maravilhosa amizade, braços abertos, mãos dispostas, momentos compartilhados e em especial, pela amável companhia até o último momento desta caminhada.

A todos meus colegas do grupo pesquisa COG-AGING, em especial, Bruna Fulgêncio, Marcilene, Fabiana Cintra, pela parceria, conhecimentos e momentos juntos.

Aos alunos de iniciação científica que tive a oportunidade de conviver e transmitir conhecimento, por serem meu incentivo diário para trabalhar, por toda ajuda nos trabalhos do laboratório, pelos momentos compartilhados. O sorriso de cada um de vocês alegrava meus dias.

A todos os participantes e famílias que fizeram parte deste estudo, pela disposição e oportunidade de aprendizado com as experiências de vivência da doença de Alzheimer.

À Juliana e Danila de Oliveira, pela convivência diária e pela companhia carinhosa neste processo.

À família Nájera Bernal, pelo imenso apoio, amizade e companhia durante todos esses anos, em especial nos momentos difíceis.

Ao Ministério de Universidade Renovadas e todos os grupos de oração, que me acolheram e deram o suporte espiritual, pelos maravilhosos ensinamentos e amizades.

Ao Encontro de Jovens com Cristo e a todos os meus amigos, que me acompanharam nessa caminhada.

À família Cristeli por todo o amor, cuidado e companhia, por ser minha família no Brasil.

Ao Brasil e todo seu povo por me receber de braços abertos e fazer minha caminhada por aqui mais leve e alegre.

“O coração humano projeta o seu caminho, mas é o Senhor quem lhe dirige os passos”
(Prov 16,9)

RESUMO

As citocinas desempenham um papel importante no processo de neuroinflamação que está diretamente relacionado à fisiopatologia da doença de Alzheimer (DA). As interações contínuas entre as placas de beta amiloide (A β), a proteína Tau e as citocinas contribuem para promover o estado inflamatório do cérebro, aceleram a deposição de A β e impulsionam a patologia da proteína Tau favorecendo o declínio cognitivo. O presente estudo visa avaliar a relação entre as citocinas e os principais biomarcadores da DA no líquido cefalorraquidiano (LCR), A β 42, tau fosforilada (pTau), tau total (tTau), e o declínio cognitivo avaliado pelo teste de Mini Exame do Estado Mental (MEEM). Foi realizado um estudo transversal, do tipo caso/controle, no período de março de 2015 a fevereiro de 2024. Cento e oito idosos brasileiros foram categorizados clinicamente em grupos de demência da DA (n=54) e não-demência (n=54). Todos os participantes foram posteriormente submetidos a análises clínicas e punção lombar para coleta do LCR. Os níveis líquidos de A β , pTau181, tau tTau e 27 citocinas foram determinados através da técnica Luminex xMAP. Os níveis de citocinas foram comparados entre os grupos e foram feitas predições e associações entre citocinas, biomarcadores da DA e MEEM avaliadas por meio de análises de regressão linear múltipla. Foi realizada uma análise de rede para identificar as correlações entre as variáveis preditoras para cada modelo de regressão. Como resultado encontramos níveis elevados de G-CSF e MIP1 α no grupo com demência em comparação com o grupo sem demência. IL-13, IP-10 e VEGF apresentaram associações significativas com A β 42, enquanto IL-1ra e IL-4 apresentaram associações com pTau. A IL-1ra, a IL-9, a IL-10, a MCP-1 e a MIP1 α foram significativamente associadas à tTau. Eotaxina, IL-12, IL-1ra e RANTES demonstraram associações substanciais com os escores do MMSE. A rede para A β 42 mostrou fortes correlações entre as citocinas VEGF, IP-10 e IL-13. Na rede da proteína Tau, as citocinas pró-inflamatórias MIP1 α e IL-9 se correlacionaram fortemente com as citocinas anti-inflamatórias IL-4 e IL-10. De acordo com a análise de rede para o escore do MEEM, a eotaxina teve uma correlação positiva significativa forte com RANTES e correlações positivas leves com IL-12 e pTau. Foram encontradas correlações positivas e leves entre IL-12 com RANTES e IL-1ra. Nossos achados fornecem evidências de que as citocinas desempenham um papel no processo inflamatório ligado à patologia A β e Tau. Principalmente os níveis líquidos da IL-1ra podem estar alterados especialmente na fisiopatologia da proteína Tau.

Palavras-chave: Doença de Alzheimer, demência, citocina, biomarcador, neuroinflamação, fluido cerebrospinal, declínio cognitivo, Luminex.

ABSTRACT

Cytokines play an important role in the neuroinflammatory process that is directly related to the pathophysiology of Alzheimer's disease. (DA). The continuous interactions between beta amyloid (A β) plaques, Tau protein and cytokines contribute to promoting the inflammatory state of the brain, accelerate the deposition of A β and boost the pathology of Tau protein benefiting cognitive decline. The present study aims to evaluate the relationship between cytokines and the main biomarkers of DA, (A β 42, pTau, tTau) and the cognitive decline evaluated by the Mini Mental State Examination test (MMSE). A cross-sectional case/control study was conducted in the period from March 2015 to February 2024. One hundred and eight elderly Brazilians were categorized clinically into groups of dementia of the DA (n=54) and non-dementia (n=54). All participants were subsequently subjected to clinical analyses and lumbar puncture for the collection of cerebrospinal fluid (CSF). CSF levels of A β , phosphorylated tau (pTau), total tau (tTau) and 27 cytokines were determined using the Luminex xMAP technique. Cytokine levels were compared between groups and predictions and associations between cytokines, DA biomarkers and MMSE were evaluated using multiple linear regression analyses. A network analysis was performed to identify the correlations between the predictor variables for each regression model. We found high levels of G-CSF and MIP1 α in the dementia group compared to the non-dementia. IL-13, IP-10 and VEGF showed significant associations with A β 42, while IL-1ra and IL-4 showed association with pTau. Significant associations were found between tTau and IL-1ra, IL-9, IL-10, MCP-1 and MIP1 α . Eotaxin, IL-12, IL-1ra and RANTES demonstrated substantial associations with MMSE scores. The network for A β 42 showed strong correlation between the cytokines VEGF, IP-10 and IL-13. In the Tau protein network, the pro-inflammatory cytokines MIP1 α and IL-9 had strongly correlation with the anti-inflammatory cytokines IL-4 and IL-10. According to the network analysis for MMSE score, eotaxin had a positive significant strong correlation with RANTES and positive mild correlation with IL-12 and pTau. Positive and mild correlation were found between IL-12 with RANTES and IL-1ra. Our findings provide evidence that cytokines play a role in the inflammatory process linked to A β and Tau pathology. IL-1ra may be compromised mainly in Tau pathophysiology.

Keywords: Alzheimer's disease, dementia, cytokine, biomarker, neuroinflammation, cerebrospinal fluid, cognitive decline, Luminex.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fisiopatologia da doença de Alzheimer.....	31
Figura 2. Ativação do inflamassoma NLRP3 na micróglia pela proteína beta amiloide (A β) ...	45
Figura 3. Diagrama de fluxo de inclusão dos participantes no estudo.....	58
Figura 4. Discriminação alélica para o gene da APOE	62
Figura 5. Sistema Luminex xMAP.....	65
Figura 6. Box plot of comparisons of cytokines levels between dementia and non-dementia groups.....	83
Figura 7. Network analyses for AD biomarkers.....	89
Figura 8. Network analyses for predictor variables of MMSE.....	123

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Clinical and sociodemographic characteristics for non-demented and demented participants.....	81
Tabela 2. Adjusted associations between CSF Alzheimer's disease biomarkers and cytokines.....	86
Tabela 3. Adjusted associations between MMSE and cytokines.....	121

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Categorização de analitos de fluidos e biomarcadores de imagem.....	36
Quadro 2. Estadiamento biológico.....	37
Quadro 3. Estadiamento biológico conceitual com biomarcadores fluidos.....	38
Quadro 4. Sequência dos alelos responsáveis pelo polimorfismo do gene da APOE.....	61
Quadro 5. Considerações finais.....	133

ANEXOS

Anexo 1. Material suplementar dos métodos.....	154
Anexo 2. Material suplementar artigo 1.....	157
Anexo 3. Material suplementar artigo 2.....	160
Anexo 3. Comitê de Ética em Pesquisa.....	162
Anexo 4. Termos de consentimento livre e esclarecido (TCLEs/TALE)	163
Anexo 6. Certificados de participação em eventos científicos internacionais.....	169

LISTA DE ABREVIACÕES

APOE: apolipoproteína E

APP: proteína precursora amilóide

ASC: Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD

AVD: actividades da vida diária

A β : proteína Beta amiloide

BHE:barreira hematoencefálica

CARD: C-terminal caspase recruitment domain

CCL: comprometimento cognitivo leve

CDK: Cyclin-dependent kinase 5

CDR: Escala de Demência Clínica

COX-2: ciclo oxigenase-2

CTMM: Centro de Ciência e Tecnologia em Medicina Molecular

DA: doença de Alzheimer

DDA: Demência por Doença de Alzheimer

DAMP: Padrões Moleculares Associados a Danos

EDTA: tubos com ácido etilenodiamino tetra-acético

G-CSF: fator estimulador de colônias granulocitárias

GM-CSF: fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos

GSK3B: Glycogen Synthase Kinase 3 Beta

IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IFN- γ : interferon-gama

IJAF: Instituto Jenny de Andrade Faria

IL: interleucina

INCT-Neurotec R: Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia

iNOS: óxido nítrico sintase induzida

IP-10: proteína 10 kD induzida por interferon gamma

LCR: Líquido Cefalorraquidiano

LPS: lipopolissacarídeo

MAPK: proteína quinase ativada por mitógeno p38

MCP1: proteína quimioatrativa de monócitos 1
MCPs: proteínas quimiotáticas de monócitos
MEEM: Mini-Exame do Estado Mental NIA-
MIP-1 α : proteínas inflamatórias de macrófagos alfa
MIP-1 β : proteínas inflamatórias de macrófagos beta
NF-kB: fator de transcrição nuclear kappa B
NIA-AA: National Institute on Aging and Alzheimer's Association
NLR: Nod-like Receptors
NLRP3: NOD-, LRR- and pyrin domain-containing protein 3
NPI: Inventário Neuropsiquiátrico
OMS: Organização Mundial da Saúde
PBMC: células mononucleares de sangue periférico
PDGF-BB: fator de crescimento derivado de plaquetas BB
PET: Tomografia por emissão de pósitrons
PL: Punção Lombar
PS1: presenilina-1
PS2: presenilina-2
PSP: Paralisia Supranuclear Progressiva
pTau: proteína tau fosforilada
RANTES: Regulated on Activation, Normal T Expressed and Secreted
SNC: Sistema Nervoso Central
sCCO: sem comprometimento cognitivo objetivo
TALE: Termo de Assentimento Livre e Esclarecido
TCLE: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TNFs: fatores de necrose tumoral
TNF- α : fator de necrose tumoral alfa.
tTau: proteína Tau total
UFMG: Universidade Federal de Minas Gerais
VEGF: fator de crescimento endotelial vascular

SUMÁRIO

1. CONSIDERAÇÕES INICIAIS	23
1.1 INTRODUÇÃO	23
1.2 JUSTIFICATIVA.....	25
2. ANTECEDENTES CIENTÍFICOS.....	27
2.1 DOENÇA DE ALZHEIMER	27
2.2 FISIOPATOLOGIA DA DOENÇA DE ALZHEIMER	28
2.3 RECOMENDAÇÕES SOBRE OS BIOMARCADORES NO LCR.....	32
2.4 INFLAMAÇÃO E O PROCESSO DE ENVELHECIMENTO	38
2.5 NEUROINFLAMAÇÃO NA DA	39
2.6 CITOCINAS	41
2.7 RELAÇÃO ENTRE PROTEÍNA BETA AMILÓIDE E CITOCINAS	42
2.8 RELAÇÃO ENTRE A PROTEÍNA TAU E CITOCINAS.....	46
2.9 RELAÇÃO ENTRE DECLÍNIO COGNITIVO E CITOCINAS	47
2.10 RELAÇÃO ENTRE APOE E CITOCINAS	48
3. HIPÓTESES.....	50
3.1 HIPÓTESE NULA:	50
3.2 HIPÓTESE ALTERNATIVA:.....	50
4. OBJETIVOS.....	50
4.1 OBJETIVO GERAL	50
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	50
5. MATERIAIS E MÉTODOS.....	52
5.1 DESENHO DO ESTUDO	52
5.2 SELEÇÃO DOS PARTICIPANTES	52
5.3 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO	54
5.4 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO.....	54
5.5 AVALIAÇÃO CLÍNICA	55
5.6 AVALIAÇÃO COGNITIVA	55
5.6.1 Mini Exame do Estado Mental (MEEM)	56

5.6.2	Escala de demência clínica	56
5.7	CLASSIFICAÇÃO DOS PARTICIPANTES	57
5.8	COLETA E PROCESSAMENTO DO SANGUE PERIFÉRICO	58
5.9	EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE DNA	59
5.10	GENOTIPAGEM.....	60
5.11	REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE EM TEMPO REAL.....	61
5.12	DISCRIMINAÇÃO ALÉLICA PARA O GENE DA APOE	62
5.13	COLETA E PROCESSAMENTO DO LCR.....	63
5.14	TÉCNICA DE LUMINEX xMAP	64
5.15	DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE AB42, PTAU E TTAU NO LCR COM LUMINEX xMAP	65
5.16	DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE CITOCINAS COM LUMINEX xMAP	67
5.17	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	68
6.	RESULTADOS.....	70
6.1	ARTIGO 1	70
6.2	ARTIGO 2	114
7.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	132
7.1	CONCLUSÃO.....	137
8.	REFERÊNCIAS	138
	ANEXO 1. MATERIAL SUPLEMENTAR DOS MÉTODOS.....	154
	ANEXO 2. MATERIAL SUPLEMENTAR ARTIGO 1.....	157
	ANEXO 3. MATERIAL SUPLEMENTAR ARTIGO 2.....	160
	ANEXO 4. COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA.....	162
	ANEXO 5. TERMOS DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLES/TALE)	163
	ANEXO 6. CERTIFICADOS DE PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS CIENTIFICOS INTERNACIONAIS.....	169

1. CONSIDERAÇÕES INICIAIS

1.1 Introdução

A demência é uma síndrome geralmente de natureza crônica e progressiva que leva à deterioração da função cognitiva, para além do que se poderia esperar pelo envelhecimento biológico. O comprometimento da função cognitiva é comumente acompanhado e ocasionalmente precedido por mudanças no humor, controle emocional, comportamento ou motivação. Esta condição tem impactos físicos, psicológicos, sociais e econômicos, não apenas para as pessoas que vivem com demência, mas também para seus cuidadores, famílias e sociedade em geral. Muitas vezes há uma falta de conscientização e compreensão das pessoas com relação à demência, resultando em estigmatização, sofrimento familiar, barreiras para o diagnóstico e tratamento (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2023).

Em 2020 mais de 55 milhões de pessoas em todo o mundo padeciam com demência. Estima-se que esse número irá quase dobrar a cada 20 anos, atingindo 78 milhões em 2030 e 139 milhões em 2050 (LONG; BENOIST; WEIDNER, 2023). Embora exista uma tendência a estabilização da incidência de demência em alguns países de alto nível sócio-econômico (WU et al., 2017), os países de baixo e média renda apresentam um aumento na incidência de demência, especialmente devido ao baixo nível de educação (MAESTRE et al., 2018). No Brasil a prevalência padronizada por idade da demência por doença de Alzheimer (DA) e de outros tipos de demência aumentou 7,8%, com aproximadamente 1,5 milhão de pessoas vivendo com demência no Brasil e ocupando o segundo lugar como causa de morte em pessoas com mais de 70 anos (Melo et al., 2020). A DA é a forma mais comum e pode contribuir para 60-70% dos casos, sendo uma das principais causas de incapacidade em pessoas com mais de 60 anos (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2023). Conforme Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) (IBGE, 2010), a população ≥ 60 anos aumentará em 284,2% de 2000 a 2050, e segundo a amostra de Brasileiros avaliada por Feter et al. (2021) a probabilidade de um diagnóstico médico de DA aumenta em 11% para cada ano de aumento na expectativa de vida (FETER et al., 2021).

A patologia da DA está representada por dois achados neuropatológicos distintivos principais: a acumulação da proteína beta-amiloide ($A\beta$) fora dos neurônios e a hiperfosforilação da proteína tau dentro dos neurônios. Eles são acompanhados pela morte de neurônios, danos ao tecido cerebral e neuroinflamação (LANE; HARDY; SCHOTT, 2018). A neuroinflamação é um fator potencial subjacente à etiopatogênese e à progressão da DA (SWANSON et al., 2018). A interação entre os achados neuropatológicos da DA e as citocinas que acompanham o processo de inflamação compõem uma das hipóteses associadas à neuroinflamação na DA. Esta hipótese envolve um estímulo inflamatório inicial por $A\beta$ que desencadeia a reatividade da micróglia no sistema nervoso central (SNC). A micróglia secreta várias citocinas pró-inflamatórias como a interleucina (IL)-1 β , IL-6 e fator de necrose tumoral (TNF α) e quimiocinas que recrutam mais micróglia e astrócitos para o local da inflamação. Na DA, a produção excessiva de $A\beta$ e a hiperfosforilação da proteína tau desregulam o mecanismo de limpeza dessas proteínas pela micróglia e astrócitos que não conseguem depurar $A\beta$ de forma eficaz, o que leva à produção excessiva de citocinas (HENEKA et al., 2015; HENEKA; KUMMER; LATZ, 2014; THAKUR et al., 2023). Este ambiente neuroinflamatório crônico abriga níveis patológicos de citocinas que favorecem o processamento de proteínas precursoras amiloide, contribuindo para a liberação de $A\beta$ e hiperfosforilação da proteína Tau. Este processo desencadeia um ciclo neuroinflamatório nocivo vicioso, auto-suficiente que determina maior perda neuronal e consequente declínio cognitivo na DA (MINTER; TAYLOR; CRACK, 2016).

1.2 Justificativa

A neuroinflamação associada à patologia da DA tem sido amplamente documentada (THAKUR et al., 2023; WANG et al., 2015; WOJCIESZAK; KUCZYŃSKA; ZAWILSKA, 2022) e está vinculada principalmente à desregulação da depuração de A β que resulta na indução da micróglia e astrócitos ao estado pró-inflamatório constante, caracterizado pela excessiva produção de citocinas levando à exacerbação de A β e ativação imune sustentada (AVILA-MUÑOZ; ARIAS, 2014). Alterações na proteína Tau também estão estreitamente ligadas à patologia da DA e à inflamação desregulada. Estudos recentes em animais revelaram uma forte relação entre inflamação e propagação de Tau (LI et al., 2003) assim como processos imunes desregulados, incluindo micróglia reativa e receptores alterados de quimiocinas, que precedem e exacerbam a agregação de Tau em modelos animais da DA (CHO et al., 2011; MAPHIS et al., 2015).

No processo de neuroinflamação as citocinas cumprem um rol fundamental (DINARELLO, 2007). Estudos sobre o papel das citocinas na DA tem ganhado forte interesse, especialmente com as citocinas clássicas pró-inflamatórias IL-1, IL-6, IFN γ e TNF α (SU; BAI; ZHANG, 2016; ZHENG; ZHOU; WANG, 2016) e quimiocinas (WANG et al., 2023; WOJCIESZAK; KUCZYŃSKA; ZAWILSKA, 2022), mas é grande a variedade de citocinas que participam da resposta imune. Contudo, a literatura é escassa sobre o papel e a relação específica de outras citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias com os biomarcadores da DA que também poderiam participar na resposta inflamatória relacionada à patologia desta doença. A maioria dos estudos avalia o processo inflamatório relacionado à patologia amilóide. Porém, existem evidências de que a inflamação relaciona-se especialmente com a patologia Tau (CHEN; YU, 2023; LAURENT et al., 2017). Portanto, desvendar o impacto da disfunção imunológica e a relação das citocinas com cada biomarcador específico da DA, assim como a associação destes marcadores inflamatórios com variáveis cognitivas, possui grande importância na compreensão dos mecanismos da doença.

No presente estudo, levantamos as seguintes perguntas de pesquisa:

1) Quais citocinas participam da patologia da proteína A β e Tau na DA?

- 2) As citocinas estão associadas e podem influenciar a variação dos biomarcadores de proteína amiloide beta 42 (A β 42), proteína Tau hiperfosforilada (pTau) e proteína Tau total (tTau)?
- 3) As citocinas estão associadas e podem influenciar a variação do declínio cognitivo avaliado pelo MEEM?
- 4) Quais citocinas interagem no processo de inflação associado aos biomarcadores da DA e do declínio cognitivo?

Para isso, visamos analisar os níveis das citocinas na população estudada; as associações citocinas - biomarcador e citocinas - declínio cognitivo e as correlações entre citocinas. Descrevendo quais citocinas estão envolvidas, a direção da relação, correlações entre as mesmas e se estas podem prever ou influenciar as variações dos biomarcadores líquóricos da DA e o declínio cognitivo no líquido cefalorraquidiano (LCR) de uma amostra de idosos Brasileiros. A melhor compreensão dessas interações poderá favorecer a compreensão dos mecanismos da resposta inflamatória no cérebro, dos processos patológicos destes biomarcadores e do declínio cognitivo na DA, além de revelar possíveis potenciais novos alvos de pesquisa.

2. ANTECEDENTES CIENTÍFICOS

2.1 Doença de Alzheimer

A DA é a causa mais comum de demência e é uma das principais causas de incapacidade em pessoas com mais de 60 anos. É uma doença progressiva, cujos sintomas progridem gradualmente ao longo de vários anos. Em seus estágios iniciais, na apresentação típica da DA, a perda de memória é leve, mas no estágio tardio, os indivíduos perdem a capacidade tais como manter uma conversa e responder ao seu ambiente. À medida que a doença avança, leva a sintomas em outros domínios, incluindo desorientação, alterações de humor e comportamento; confusão aprofundada sobre eventos, tempo e lugar; suspeitas infundadas sobre a família, amigos e cuidadores profissionais; e alterações comportamentais mais graves; e dificuldade em falar, engolir e andar (ALZHEIMER'S ASSOCIATION, 2024). O envelhecimento normal se relaciona a um leve declínio de memória, de modo que a linha entre o esquecimento normal relacionado à idade e os primeiros sinais da doença podem ser tênues. Além disso, não é esperado que este esquecimento cause prejuízo nas atividades da vida diária (AVD). Por outro lado, o transtorno neurocognitivo leve (DSM5) ou Comprometimento Cognitivo Leve (CCL) se refere aos quadros de prejuízos cognitivos discretos sem comprometimento da funcionalidade e que não preenchem critério para demência, pode corresponder, mas não sempre, a um estágio prodromático das demências, especialmente da demência por DA, uma vez que indivíduos com esse diagnóstico possuem um risco cerca dez vezes maior de progressão para demência em relação à população geral (ARETOULI et al., 2010; PETERSEN et al., 2014).

A DA é classificada como familiar ou esporádica. A incidência de casos familiares é baixa (5-10%) e está relacionada à presença de mutações em três genes diferentes: presenilina-1 (PS1), presenilina-2 (PS2) e proteína precursora de amiloide (APP) (CHARTIER-HARLIN et al., 1991; DUFF et al., 1996; GOATE, 1991; LEVY-LAHAD et al., 1995; SCHEPER et al., 1999). A DA esporádica ou início tardio que representa o 90-95% do total de casos e, que embora sua etiologia seja multifatorial, existem fatores de risco associados. Estes fatores podem ser divididos em

ambientais e genéticos. Os fatores ambientais sendo o principal fator de risco a idade (HEBERT et al., 2010). Outros fatores incluem baixa escolaridade, hipertensão arterial, diabetes mellitus, obesidade, sedentarismo, traumatismo craniano, depressão, tabagismo, perda auditiva e isolamento social (LIVINGSTON et al., 2020), destacando-se que podem ser prevenidos e modificados. Ter um histórico familiar de demência Alzheimer também pode contribuir para o desenvolvimento desta doença (LAUTENSCHLAGER et al., 1996). Enquanto a fatores de risco genéticos, a presença do alelo $\epsilon 4$ do gene da apolipoproteína E (APOE) aumenta o risco para desenvolvimento de DA e antecipa em alguns anos o seu início. Os indivíduos com uma cópia do alelo $\epsilon 4$ têm um aumento no risco para desenvolver a DA de 2 a 3 vezes e de 8 a 10 vezes para aqueles com duas cópias ($\epsilon 4/\epsilon 4$) (LIU et al., 2013).

2.2 Fisiopatologia da doença de Alzheimer

As principais características patológicas da DA são oligômeros amiloides tóxicos extra-neuronais e emaranhados neurofibrilares intraneuronais constituídos por Tau hiperfosforilada. A patogênese da proteína β -amilóide começa pela clivagem da APP, uma proteína encontrada na membrana plasmática. Ela pode ser clivada por duas vias, a via amiloidogênica e a via não-amiloidogênica. Na via amiloidogênica, ela é clivada de forma anormal pela β -secretase liberando a (APPs β) truncada e o fragmento C-terminal C99. Este último é retido na membrana e posteriormente clivado pela γ -secretase, liberando os peptídeos A β insolúveis neurotóxicos. Esses oligômeros A β tendem a se agregar e polimerizar ainda mais, formando a placa A β (SELKOE, 2004). Existem dois tipos principais de peptídeos A β que têm um papel direto na formação das placas e neurotoxicidade induzida: A $\beta 40$ e A $\beta 42$ (Figura 1a). A $\beta 40$ é abundante e menos neurotóxico que A $\beta 42$. A $\beta 42$ é menos abundante, altamente insolúvel, severamente neurotóxico e mais propenso à agregação (TIWARI et al., 2019). Os principais componentes das placas senis e dos oligômeros são os peptídeos A $\beta 40$ e A $\beta 42$. Ambos têm capacidade de autoagregação, mas com cinética diferente. A sequência mais longa pode se agregar espontaneamente em minutos, enquanto em condições semelhantes o A $\beta 40$ leva horas e dias para se reunir em fibrilas (BALDUCCI et al., 2010; FORLONI; BALDUCCI, 2018). Os oligômeros solúveis de amiloide beta (A β) são agregados

neuro e sinaptotóxicos de A β implicados no desencadeamento da patologia A β relacionada à DA, que são derivados da clivagem sequencial da proteína precursora amiloide transmembrana (APP) (LARSON; LESNÉ, 2012; TOLAR et al., 2021). A agregação A β 40/A β 42 resulta em canais iônicos bloqueados, homeostase do cálcio alterada, aumento do estresse oxidativo mitocondrial e diminuição do metabolismo energético e da regulação da glicose, contribuindo para a morte celular neuronal (TIWARI et al., 2019).

A proteína Tau tem um domínio de ligação aos microtúbulos e se articula a estes para formar microtúbulos maduros e estáveis (CLAEYSEN et al., 2012; MARCUS; SCHACHTER, 2011). Tem a propriedade de estabilizar microtúbulos e formar pontes de interconexão contíguas entre eles para formar uma rede estável adequada e mantê-los juntos. Quando a proteína Tau entra em contato com as quinases liberadas, devido à abundância de A β no ambiente, ela se torna hiperfosforilada, o que leva à sua oligomerização. O túbulo fica instável devido à dissociação das subunidades tubulares, que se desfazem e se convertem em grandes fragmentos filamentosos de Tau (Figura 1b). Estes se agregam ainda mais em emaranhados fibrilares altamente insolúveis no citoplasma, levando à perda de comunicação entre neurônios e processamento de sinais, conduzindo ao processo de apoptose neuronal (EFTEKHARZADEH et al., 2018; LEE; GOEDERT; TROJANOWSKI, 2001). Os emaranhados neurofibrilares são resultantes da hiperfosforilação da proteína Tau associada a microtúbulos. São fragmentos de filamentos proteicos pareados e helicoidalmente enrolados no citoplasma celular dos neurônios. A fosforilação da Tau é regulada por várias quinases, incluindo Glicogênio Sintase quinase 3 (GSK3 β) e quinase 5 dependentes de ciclina (CDK5) ativada por A β extracelular. Embora GSK3 β e CDK5 sejam quinases primariamente responsáveis pela hiperfosforilação, outras quinases como Proteína Quinase C, Proteína Quinase A, ERK2, Serina/Treonina Quinase, Caspase 3 e Caspase 9 também possuem papéis proeminentes e podem ser ativados pela presença da A β (DE STROOPER; WOODGETT, 2003).

Os agregados da proteína Tau no cérebro são conhecidas como taupatias que podem ser classificadas pelas isoformas específicas de Tau (FAGAN et al., 2006; JANKOWSKY et al., 2004; JONSSON et al., 2012). Os níveis no LCR das proteínas pTau181, pTau 281 e pTau 199 mostraram-se significativamente elevados em indivíduos com DA quando comparados com indivíduos controle ou com outras causas de demências. As isoformas pTau 231 e 181 atingiram

níveis de especificidade superiores a 75% entre indivíduos com DA e sem DA (HAMPEL et al., 2004). Altos níveis de pTau e tTau têm sido encontrados no LCR de indivíduos com DA (OLSSON et al., 2016). A tTau no LCR é considerada um biomarcador inespecífico de lesão neuronal, mas a pTau pode refletir a taupatia relacionada à DA (JACK et al., 2018). Durante as últimas décadas, a pTau 181 no LCR, juntamente com a tTau e a A β 42 foram amplamente validados como biomarcadores da DA e atualmente são amplamente utilizados como critérios de diagnóstico em pesquisa (MOLINUEVO et al., 2018).

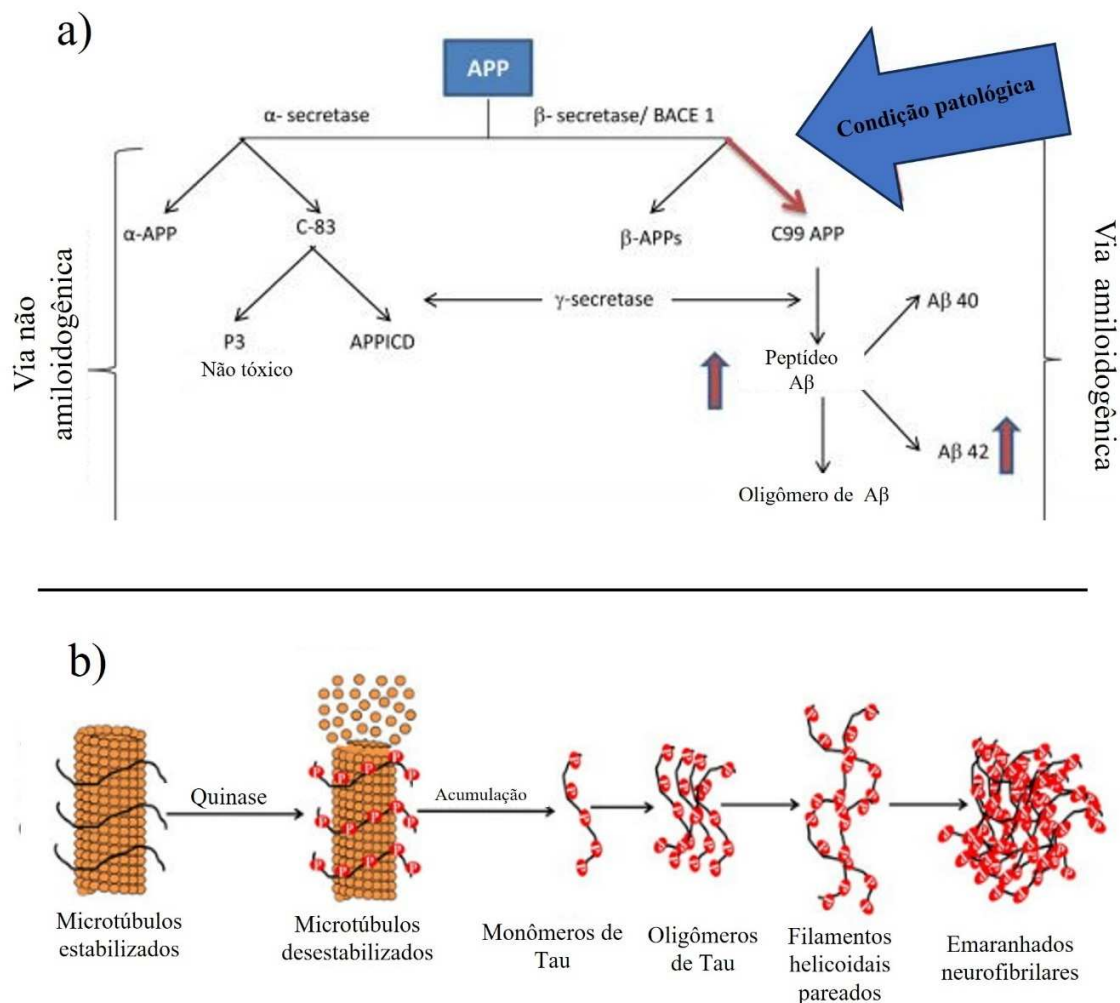


Figura 1. Fisiopatologia da doença de Alzheimer. a) via patológica e não patológica de processamento da proteína precursora amiloide (APP) b) processo de formação dos emaranhados neurofibrilares. Legenda: $A\beta$: proteína amiloide; APPICD: Amyloid-precursor protein intracellular domain; BACE1: beta-site amyloid precursor protein cleaving enzyme; C83: 83-amino-acid C-terminal APP fragmente; C99: transmembrane 99-residue C-terminal fragmente. Fonte: adaptado de Kumar & Ekavali, 2015 e Kazim and Iqbal, 2016 e Mamun et al., 2019.

2.3 Recomendações sobre os biomarcadores no LCR

Embora existam diferentes causas genéticas e ambientais, os indivíduos desenvolvem o padrão de neuropatologia característico da doença, independentemente de ser considerada como familiar ou esporádica. Um biomarcador é um indicador considerado para a avaliação de processos biológicos normais, bem como patógenos e efeitos farmacológicos de qualquer terapia. A deposição extracelular da proteína amiloide ($A\beta$) e a forma agregada de proteína Tau hiperfosforilada no cérebro constituem as duas características patológicas, que definem os biomarcadores principais da DA (HANSSON et al., 2018b). No LCR são doçadas as formas solúveis das proteínas da DA, já no PET as formas insolúveis agregadas.

As fibrilas amiloides são maiores, insolúveis e se agrupam em placas amiloides, que são características da DA, já os oligômeros de $A\beta$ são solúveis e se espalham pelo cérebro. A distribuição do tamanho dos oligômeros de $A\beta$ é heterogênea. A caracterização estrutural dos oligômeros é complicada porque seus estados oligoméricos são mais transitórios do que as fibrilas (CHEN et al., 2017; ODDO et al., 2003). O peptídeo $A\beta_{42}$ agrega-se rapidamente para formar oligômeros, protofibrilas e fibrilas a caminho da deposição de placas amiloides associados à DA. As alterações observadas incluem uma redução no LCR do 50% de $A\beta_{42}$ como consequência da deposição de amiloide no cérebro (JACK et al., 2018).

A proteína tau é altamente solúvel e normalmente está ligada aos microtúbulos axonais. Formas anormalmente fosforiladas da proteína tau associada ao microtúbulo são encontradas de forma consistente no cérebro de pacientes com DA, e podem ser detectadas no LCR. O peso molecular das isoformas de tau varia de 48 kDa a 68 kDa. A fosforilação da proteína tau em filamentos helicoidais pareados (FHP) é um evento inicial na formação de FHPs e emaranhados fibrilares precedendo sua agregação e incorporação em FHPs (BANCHER et al., 1989; GREENBERG; DAVIES, 1990; HYMAN et al., 1988). Portanto, a FHP-tau solúvel também pode estar presente no LCR. A DA se caracteriza por aumentos nos níveis líquidos de pTau e tTau. Acredita-se que os aumentos em ambas as formas de Tau reflitam a extensão da neurodegeneração, sendo a p-Tau um marcador mais específico para DA (JACK et al., 2018). A combinação da proteína pTau e de $A\beta_{42}$ na razão pTau/ $A\beta_{42}$ fornece uma das melhores precisões diagnósticas para DA. No LCR a

pTau/A β 42 demonstrou ser um forte indicador da conversão de indivíduos cognitivamente normais em demência muito leve ou leve (FAGAN et al., 2007) e da taxa de declínio ao longo do tempo em indivíduos com demência muito leve (SNIDER et al., 2009)(24). Campbell e colaboradores no 2021 mostraram o biomarcador p-tau/A β 42 proporciona uma concordância superior com a classificação da PET amiloide (CAMPBELL et al., 2021). Contudo, esse biomarcador tem se destacado por permitir capturar uma medida biológica das duas características neuropatológicas mais proeminentes da DA, criando alta especificidade para a classificação diagnóstica da doença (JACK et al., 2018, 2024).

Em 2018, o *National Institute on Aging e Alzheimer's Association* (NIA-AA) consolidou as alterações cognitivas como um *continuum* e atualizou alguns conceitos em um *guideline* para pesquisas. Jack et cols (2018) propôs 2 modelos que se entrelaçam: o clínico e o biológico. Foi definido, então, o termo “*continuum* cognitivo”, que classifica o estado cognitivo do indivíduo, independente do biomarcador, em três estágios, que ocorrem de forma sequencial: cognição normal, comprometimento cognitivo leve, e demência. Este termo caracteriza e abrange como um “guarda-chuva” as mudanças neuropatológicas e cognitivas, os indivíduos com biomarcadores positivos da DA ou com alterações patológicas de DA.

As recomendações para uso de biomarcadores em pesquisas nesse ano propuseram o diagnóstico biológico de DA por meio de marcadores biológicos, mesmo sem a presença de sinais ou sintomas clínicos. Dessa forma, consolidaram-se as análises de concentrações no LCR de A β e Tau e a neuroimagem molecular e estrutural como os principais marcadores de DA. Estabeleceu-se 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 era baseado em manifestações clínicas (sinais e sintomas). Desta forma, a DA passou a ser considerado um construto biológico (JACK et al., 2018).

Baseado nesse sistema, o indivíduo podia ser agrupado em 3 perfis: biomarcador normal para DA, *continuum* da DA e alterações patológicas não Alzheimer (APNA). Esse sistema se baseou principalmente na presença de proteína A β , considerada a “assinatura” da DA no indivíduo. Assim o “*continuum* da DA” tornou-se um termo abrangente, uma vez que inclui todos os indivíduos com evidência de biomarcadores de A β , independente da presença de taupatia ou neuro degeneração,

ao passo que o termo “Doença de Alzheimer” passou ser restrito a presença de patologia A β e Tau, independente de neurodegeneração e da apresentação clínica (JACK et al., 2018).

Recentemente foi publicada a atualização dos critérios diagnósticos da DA, que foi definida como um processo biológico que começa com o surgimento de alterações neuropatológicas da DA enquanto as pessoas estão assintomáticas. A progressão da carga neuropatológica leva ao posterior aparecimento e progressão dos sintomas clínicos. A nova atualização do estadiamento clínico da doença foi acrescentado o estágio 0, que inclui os indivíduos assintomáticos, com biomarcadores normais que apresentem mutações genéticas de Presenilina-1 (PS1), PS2, Proteína Precursora Amilóide (APP) ou Síndrome de *Down*. Enquanto a os biomarcadores estes foram categorizados através dos seus mecanismos ou da proteinopatia e são agrupados nas categorias: biomarcadores centrais 1 e 2; biomarcadores de processos inespecíficos envolvidos na fisiopatologia da DA e biomarcadores de co-patologia não-DA. São considerados os biomarcadores fluidos no líquido ou plasma e/ou biomarcadores de imagem para cada categoria de biomarcador. Para cada categoria os biomarcadores específicos da proteinopatia ou do processo patogênico foram sub-categorizados. Desta forma, os biomarcadores centrais 1 são especificamente relacionados a beta amiloide reduzida no líquido ou no plasma e observado através da imagem de PET amilóide. A taupatia, foi subdividida em tau 1 (T1), relacionados com a proteinopatia tau precoce, considerando o *continuum* da doença e tau 2 (T2), relacionados com a presença de agregados de tau na DA, associados com a progressão da doença. Para a categoria de biomarcadores não específicos da fisiopatologia da DA, a neurodegeneração foi representada pela letra “N”, compreendendo o neurofilamento leve (NfL), um biomarcador de lesão axonal. A inflamação é representada neste grupo através da letra “T”, sinalizando um biomarcador de reatividade astrocítica, a Proteína Glial Fibrilar Ácida (GFAP). Para finalizar, a categoria de biomarcadores de co-patologias não-DA associadas à letra “V” para as patologias vasculares e à letra “S” para as patologias envolvendo a α -sinucleína (JACK et al., 2024) (Quadro 1).

Um resultado anormal do biomarcador central 1 é suficiente para estabelecer um diagnóstico de DA e para informar a tomada de decisões clínicas durante todo o processo contínuo da doença. Os biomarcadores centrais 2 podem fornecer informações prognósticas e, quando anormais, aumentarão a confiança de que a DA está contribuindo para os sintomas. No entanto, nem todos os testes de biomarcadores do Core 1 disponíveis têm precisão suficiente para serem adequados para

o diagnóstico. Foram propostos para o diagnóstico os marcadores p-tau181/A β 42, t-tau/A β 42, A β 42/40 no LCR, até o presente momento, nenhum marcador no plasma est aprovado para o diagnóstico (JACK et al., 2024).

Quadro 1. Categorização de analitos de fluidos e biomarcadores de imagem.

Categoria de Biomarcadores	Analitos no Líquor ou plasma	Imagem
Biomarcadores Centrais		
Centrais 1 A ($A\beta$ proteinopatia)	$A\beta_{42}$	PET Amiloide
T ₁ : (Tau fosforilado e tau secretada da DA)	p-tau217, p-tau181, p-tau231	
Centrais 2 T ₂ (tau proteinopatia da DA)	MTBR-tau243, e outras formas fosforiladas de tau (e.g., p-tau205), e fragmentos de tau com regiões médias não fosforiladas ^a	PET Tau
Biomarcadores de processos não-específicos envolvidos na patologia da DA		
N (injúria, disfunção ou degeneração do nerópilo) I (inflamação) Reatividade Astrocítica	NfL GFAP	RNM Anatômica PET-FDG
Biomarcadores de copatologia não-DA		
V Lesão cerebral vascular S α -sinucleína	α Syn-SAA ^a	Infarto na Ressonância magnética ou Tomografia Computadorizada, hiperintensidade da substância branca.

Legenda: $A\beta$: beta amilóide; PET: tomografia por emissão de pósitrons; p-tau: proteína tau fosforilada; t-tau: proteína tau total; MTBR: microtubule-binding region; NfL: neurofilamento leve; GFAP: Proteína Glial Fibrilar ácida; RNM: ressonância magnética; FDG: fluorodeoxyglucose; α Syn: α -sinucleína. Fonte: adaptado de Jack Jr. *et al.*, (2024).

Para a determinação e classificação dos indivíduos segundo o estágio da patologia no que se encontraram. Foi indicado um esquema de estadiamento biológico fazendo uso apenas biomarcadores essenciais. Seguindo a natureza da patologia, uma pessoa deve progredir dos estágios iniciais para os avançados em sequência da patologia. Para o estadiamento biológico foi proposto um esquema de quatro estágios com base na sequência de eventos: estágio A, biomarcadores de estágio inicial; estágio B, estágio precoce; estágio C, estágio intermediário; estágio D, estágio avançado, para o qual poderiam ser usados o PET ou marcadores fluidos. Estadiamento incluiu o uso do PET de amiloide e tau ou com uma combinação de marcadores de fluido T1, sendo considerado como clinicamente viável no momento (Quadro 2). Também foi descrito um esquema conceitual de estadiamento baseado apenas em biomarcadores de fluidos (Quadro 3). (JACK et al., 2024).

Quadro 2. Estadiamento biológico

Tecnología	Biomarcadores de estágio inicial (A)	Biomarcadores em estágio precoce (B)	Biomarcadores de estágio intermediário (C)	Biomarcadores em estágio avançado (D)
PET	PET Amiloide $A+T_2 -$	PET Tau região temporal medial $A+T_{2MTL} +$	PET Tau captação neocortical moderada $A+T_{2MOD} +$	PET Tau Captação neocotical alta $A+T_{2HIGH} +$
			+	-
Marcadores centrais 1 fluidos	LCR $A\beta_{42}/A\beta_{40}$, p-Tau181/ $A\beta_{42}$, ensaios acurados de plasma dos marcadores centrais 1 podem estabelecer que um indivíduo está no estágio biológico A ou superior, mas não podem discriminar entre os estágios A-D do PET no momento.			

Legenda: LCR: líquido cefalorraquidiano; $A\beta$: beta amilóide; PET: tomografia por emissão de pósitrons; p-tau: proteína tau fosforilada; t-tau: proteína tau total; MTL: refere-se à captação do lobo temporal medial captação do lobo temporal medial no PET. Fonte: adaptado de Jack Jr. *et al.*, (2024).

Quadro 3. Estadiamento biológico conceitual com biomarcadores fluidos

	Biomarcadores estágio inicial (A)	Biomarcadores estágio precoce (B)	Biomarcadores estágio intermediário (C)	Biomarcadores estágio avançado (D)
Estadiamento por fluido	LCR A β 42/40, p- tau181/A β 42, t- tau/A β 42, e ensaios acurados do plasma ^b	Outras formas de p-tau (p.ex., p- tau205a)	MTBR-tau243 ^a	Fragmentos de tau não fosforilados ^a

Legenda: LCR: líquido cefalorraquidiano; A β : beta amilóide; p-tau: proteína tau fosforilada; t-tau: proteína tau total; MTBR: microtubule-binding region. Fonte: adaptado de Jack Jr. *et al.*, (2024).

2.4 Inflamação e o processo de envelhecimento

Uma característica do processo de envelhecimento é um aumento progressivo crônico do estado pró-inflamatório, originalmente chamado de "*Inflammaging*". Isto acontece devido a uma desregulação da resposta imunológica, levando a um estado inflamatório sistêmico crônico. Entre os mediadores pró-inflamatórios desregulados, estão as citocinas e quimiocinas, principais responsáveis pelo desenvolvimento da inflamação crônica e do processo de imunosenescência (BRUUNSGAARD et al., 2003; Chung et al., 2019).

As citocinas pró-inflamatórias desempenham um papel importante no *Inflammaging*, causado pela inflamação crônica (SALVIOLI et al., 2006). Citocinas como IFN- γ , TNF- α e a IL-4 em linfócitos T CD4+ não ativados e de memória, participam do processo pró-inflamatório (ALBERTI et al., 2006). Os linfócitos T CD8+ e CD4+ desempenham um papel fundamental no desenvolvimento da rede de citocinas, contribuindo para o estado pró-inflamatório crônico e o envelhecimento inflamatório (FRANCESCHI et al., 2000). O estudo desenvolvido por De Martinis e colaboradores

em 2005, mostrou que níveis elevados de IL-6 e TNF- α no soro de idosos associam-se à maior prevalência de doença, incapacidade e mortalidade. A IL-6, dosada no soro, demonstrou ser um marcador confiável ou índice preditivo do envelhecimento inflamatório (DE MARTINIS et al., 2005).

O envelhecimento relaciona-se ao aumento do estado pró-inflamatório determinado pela elevação dos níveis de citocinas pró-inflamatórias na circulação, incluindo IL-1, IL-6, TNF- α , PGE2 (BRUUNSGAARD et al., 2003; CESARI et al., 2004). Durante o período de inflamação, altos níveis de citocinas pró-inflamatórias na circulação criam um ambiente inflamatório para tecidos e órgãos (Lio, 2003). Então, manter o equilíbrio geral das citocinas, tais como IL-6 e TNF- α parece desempenhar um papel decisivo no envelhecimento.

2.5 Neuroinflamação na DA

A neuroinflamação é definida como uma resposta inflamatória no cérebro ou na medula espinhal. Essa inflamação é mediada pela produção de citocinas, quimiocinas, espécies reativas de oxigênio e mensageiros secundários. O grau de neuroinflamação depende do contexto, da duração e do curso do estímulo ou insulto primário. Estas respostas neuroinflamatórias podem trazer consequências imunológicas, fisiológicas, bioquímicas e psicológicas (DISABATO; QUAN; GODBOUT, 2016).

A neuroinflamação é constantemente associada e relatada como um processo desregulado, fundamental na patologia da DA, facilitando a progressão da doença (THAKUR et al., 2023). Após um estímulo inflamatório que geralmente começa pela proteína A β , causa a reatividade da micróglia que nessa condição secreta citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias de maneira desacerbada (CORRÊA et al., 2011; WANG et al., 2015) para facilitar o recrutamento celular para o local da inflamação. Essas células imunológicas recrutadas do SNC se juntam aos astrócitos e micróglia para coordenar uma resposta inflamatória robusta. Em indivíduos saudáveis, essa resposta é protetora e crucial para a remoção de patógenos, envolvendo o início pró-inflamatório, a depuração fagocítica e a resolução do processo. Na DA, esse processo é cronicamente desregulado, levando a um ambiente pró-inflamatório prejudicial à integridade neuronal. A

produção excessiva de A β e a falta de uma depuração eficiente do peptídeo pela micróglia e pelos astrócitos levam a uma maior neurotoxicidade e à secreção aumentada de padrões moleculares associados a danos (DAMP), desencadeando uma resposta pró-inflamatória (AL-GHRAIYBAH et al., 2022). Esse ambiente neuroinflamatório crônico abriga níveis patológicos de citocinas que desencadeiam um viés de processamento da proteína precursora amilóide em direção à liberação de peptídeos A β . Portanto, esse ciclo neuroinflamatório deletério permanece vicioso, autossuficiente, levando a mais perdas neuronais na DA (MINTER; TAYLOR; CRACK, 2016). Por fim, no estágio final da DA, a unidade neurovascular que controla a permeabilidade da barreira hematoencefálica é comprometida, levando a um influxo significativo de células inflamatórias periféricas que continuam como principais facilitadores da neuroinflamação deletéria (CHEN et al., 2023).

No entanto, o papel da inflamação na DA é complexo e pode mudar ao longo dos estágios da doença. Existem dois possíveis picos de atividade inflamatória. Em estágios iniciais (primeiro pico), a inflamação poderia ter um papel benéfico, uma vez que a micróglia e os astrócitos ativados poderiam estar envolvidos na depuração de A β . No entanto, a no estado de reatividade da micróglia (segundo pico), se relaciona com um aumento de A β e possivelmente com a fosforilação da proteína Tau (MERAZ-RÍOS et al., 2013).

Existem dois tipos de células fagocitárias dentro do SNC capazes de iniciar a resposta imune inata: micróglia e macrófagos periféricos (GATE et al., 2010; REZAI-ZADEH; GATE; TOWN, 2009). As respostas microgliais aos estímulos patológicos têm uma influência substancial na progressão da DA, mudanças dinâmicas na ativação microglial tem efeitos variáveis ao longo da trajetória da doença, sendo essa resposta também é influenciada pela suscetibilidade individual. A micróglia ativada exibe diversos fenótipos e tem interações multifacetadas com espécies de amiloide- β e tau. Entre todas as espécies de A β , os oligômeros menores de A β tem sido destacam-se por gerar estímulos muito mais fortes para induzir resposta microglial e são mais tóxicos para os neurônios do que os oligômeros maiores (YANG et al., 2017). As respostas microgliais também interatuam com circuitos neuronais e poderia ser modulada em vários pontos da trajetória da DA com o fim de evitar ou modificar a progressão da doença (LENG; EDISON, 2021). Os astrócitos têm um rol homeostático e de suporte neural importante no SNC saudável, mas estes adotam estados reativos

em condições adversas agudas ou crônicas. Estudos transcriptômicos em pacientes humanos e modelos de doenças neurodegenerativas revelaram a coexistência de muitos subestados reativos de astrócitos relacionados à patologia da DA (PATANI; HARDINGHAM; LIDDELOW, 2023). Em um modelo animal de DA, ativação da via JAK-STAT (especificamente, JAK2-STAT3), que está a jusante da exposição a citocinas ou fatores de crescimento, foi observada em astrócitos. Essa via é considerada um importante mediador de vários aspectos da reatividade dos astrócitos, bem como da indução de estados e fenótipos astrocíticos específicos (CEYZÉRIAT et al., 2016).

Microglia e astrocitos são recrutados para o SNC por citocinas e quimiocinas específicas, que são liberadas durante o a reativade dessas células e são capazes de atravessar a barreira hematoencefálica. A indução de uma resposta inflamatória dirigida pela micróglia resulta na liberação de vários mediadores inflamatórios incluindo toda uma gama de citocinas neurotóxicas (AKIYAMA et al., 2000; TAN et al., 1999). Iniciada a reatividade da micróglia, estas se encarregam de recrutar astrócitos que aumentam ativamente a resposta inflamatória nos depósitos extracelulares de A β . Este processo se caracteriza por uma resposta de fase aguda mediada por citocinas, ativação da cascata do complemento e indução de sistemas enzimáticos inflamatórios, como o óxido nítrico sintase induzida (iNOS) e ciclooxigenase-2 (COX-2), que contribuem para a disfunção e morte celular, isoladamente ou em conjunto (ABBAS et al., 2002; BEZZI et al., 2001; BROWN; BAL-PRICE, 2003).

2.6 Citocinas

As Citocinas são proteínas secretadas com funções tais como crescimento, diferenciação, ativação e comunicação, regulam e determinam a natureza das respostas imunes, controlam o tráfego de células imunes e o arranjo celular de órgãos imunológicos. São produzidas em resposta a um insulto imunológico e determinam, inicialmente, se uma resposta imunológica se desenvolve e, posteriormente, se essa resposta é citotóxica, humoral, mediada por células ou alérgica. Uma cascata de respostas ocorre, e muitas vezes, várias citocinas são necessárias para expressar a função ideal. Cada citocina pode ter uma função completamente diferente, dependendo da fonte celular,

do alvo e da fase específica da resposta imune durante a qual ela é apresentada (BORISH; STEINKE, 2003).

As citocinas podem ser reconhecidas conforme o tipo de células que as produzem: linfocinas (citocinas produzidas por linfócitos), monocinas (citocinas feitas por monócitos), interleucinas (citocinas produzidas por leucócitos e atuam sobre outros leucócitos (ZHANG; AN, 2007). Existem também outros tipos importantes de citocinas como fatores de necrose tumoral (TNFs), interferons (IFNs) e fatores de crescimento transformadores, fatores estimuladores de colônias (CSF). As quimiocinas consistem em inúmeras proteínas, todas com seus respectivos receptores, e incluem moléculas como RANTES, as proteínas quimiotáticas de monócitos (MCPs) e a linfotactina. Todas elas estão relacionadas ao recrutamento e à ativação de células imuno-competentes e inflamatórias em locais de dano celular (FOSTER, 2001).

As citocinas se ligam às células alvo e ativam receptores específicos de superfície celular de alta afinidade. A expressão dos receptores de citocinas é regulada temporal e espacialmente no SNC e estes estão estreitamente envolvidos nos processos de proliferação celular, glicogênese, neurogênese, migração celular, apoptose e liberação sináptica de neurotransmissores (BORSINI et al., 2015; BOULANGER, 2009). Em geral, as ações exercidas sobre as células alvo podem ocorrer sobre as mesmas células que as secretam (ação autócrina), em células próximas (ação parácrina) ou, em alguns casos, em células distantes (ação endócrina) (ZHANG; AN, 2007).

2.7 Relação entre proteína beta amiloide e citocinas

Os monômeros de A β podem formar conjuntos de ordem superior que variam de oligômeros de baixo peso molecular (incluindo dímeros, trímeros, tetrâmeros e pentâmeros) a oligômeros de peso molecular médio, oligômeros de alto peso molecular, fibrilas protofibrilares e placas senis (CHEN et al., 2017). As fibrilas de A β são o agente neurotóxico que leva à morte celular. As espécies oligoméricas ou pré-fibrilares do peptídeo A β , que aparecem relativamente cedo no processo de deposição A β na DA, são as mais prejudiciais às células neuronais, (BLÖMEKE et al., 2024; LESNÉ et al., 2013). A β solúvel pode se ligar a várias moléculas no espaço extracelular, incluindo

receptores de superfície celular, metais e membranas celulares (CHEN et al., 2017). Evidências sugerem que vários complexos de A β interagem com receptores de reconhecimento de padrões expressos na micróglia e astrócitos que iniciam a resposta imune inata. A desregulação do processo de depuração de A β resulta na reatividade da micróglia ou de astrócitos ao estado pró-inflamatório, caracterizado por níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias e capacidade comprometida na fagocitose de A β . Como consequência, ocorre o acúmulo dessas proteínas e ativação imunológica sustentada (MINTER; TAYLOR; CRACK, 2016).

Uma das principais vias de sinalização que explicam a interação entre A β e a produção de citocinas envolve ativação do fator de transcrição nuclear kappa B (NF- κ B) e o *NOD-like receptor family pyrin domain containing 3* (NLRP3) inflamassoma. A β fibrilar extracelular pode ativar o inflamassoma através da ativação da sinalização via receptores de tipo Toll (TLR)/ fator de diferenciação mielóide 88 (MyD88) / NF- κ B. No cérebro da DA os receptores TLRs são super expressos na micróglia e neurônios. Os TLRs ativam principalmente a via canônica de sinalização NF- κ B, levando à expressão de fatores pró-inflamatórios (CHIARINI et al., 2020). O NF- κ B pode ser ativado através da via TLR/ receptor de IL-1 (IL-1R) -MyD88. A ativação de NF- κ B através de vias complementares, TLR e IL-1R pode criar um aumento sinérgico de fatores pró-inflamatórios (YANG; WISE; FUKUCHI, 2020). A reatividade microglial é um dos primeiros eventos que leva ao desenvolvimento da DA, dado que a função primária da micróglia no cérebro é a proteção contra patógenos e a depuração de detritos celulares, incluindo a formação de placa beta amiloide (A). Assim, a ativação da sinalização NF- κ B e consequente liberação de citocinas e quimiocinas da micróglia resulta em inflamação crônica observada na DA (THAWKAR; KAUR, 2019).

No caso do inflamassoma NLRP3, a proteína A β fagocitada pela micróglia leva a danos lisossômicos e liberação de catepsina B e/ou à produção de espécies reativas de oxigênio, que desencadeiam a formação do complexo inflamatório do NLRP3, causando a ativação da caspase 1, produção de citocinas e a pyroptose (HALLE et al., 2008; PARAJULI et al., 2013). Os oligômeros e fibrilas de A β podem interagir diretamente com NLRP3 e com a proteína associada a apoptose contendo um domínio CARD (ASC), uma importante molécula adaptadora necessária para os processos inflamatórios. Essa interação contribui para a ativação do inflamassoma NLRP3 (NAKANISHI et al., 2018). As partículas ASC liberadas pela piroptose microglial se ligam

rapidamente à A β extracelular e induzem à propagação de oligômeros e agregados de A β (VENEGAS et al., 2017), que promovem ainda mais a ativação do inflamassoma microglial através da sinalização da via TLR/MyD88. Adicionalmente, a IL-1 β secretada a partir da microglia pirotótica pode se ligar ao IL-1R e induzir a ativação da via MyD88. A indução da via MyD88 através dos subprodutos da piroptose microglial leva a um ciclo vicioso de ativação inflamatória e piropotose que agrava a patologia de A β . Assim, este círculo vicioso de ativação inflamatória do NLRP3 por sinalização TLR/IL-1R/MyD88 pode levar a inflamação crônica/sustentada e à neurodegeneração na DA (YANG; WISE; FUKUCHI, 2020) (Figura 2).

Estudos em animais relatam a interação entre citocinas e a proteína A β . Kiyota et al. (2010) demonstraram que a superexpressão de IL-4 resulta na atenuação da patologia A β e melhora do comportamento em modelo animal de DA (KIYOTA et al., 2010). A superexpressão de IL-1 β em camundongos APP/PS1 causou uma redução das placas A β através da reatividade expressiva da micróglia com capacidade de fagocitose (GHOSH et al., 2013). Níveis de IP-10 significativamente elevados foram encontrados no córtex e hipocampo de um modelo animal da patologia amiloide A β 42 (JORFI et al., 2023).

Em humanos, estudos no LCR mostram que as concentrações das citocinas podem ser variáveis. Corrêa e colaboradores (2011) encontraram aumentos significativos de IL-2 no LCR de indivíduos com DA quando comparado aos controles. Mas, os níveis de IL-10 e IL-8 não diferiram entre esses grupos (CORRÊA et al., 2011). Chen et al. (2018) reportou níveis mais elevados de IL-8 no LCR em pessoas com DA do que em indivíduos saudáveis (CHEN et al., 2018). Indivíduos com DA tiveram níveis mais elevados das citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias: eotaxina, IL-1ra, IL-4, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-15, fator de estimulação da colônia de granulócitos (G-CSF), proteína quimiotática monocítica 1 (MCP-1), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGFBB) e fator de necrose tumoral alfa (TNF α), em comparação com indivíduos controles (TAIPA et al., 2019).

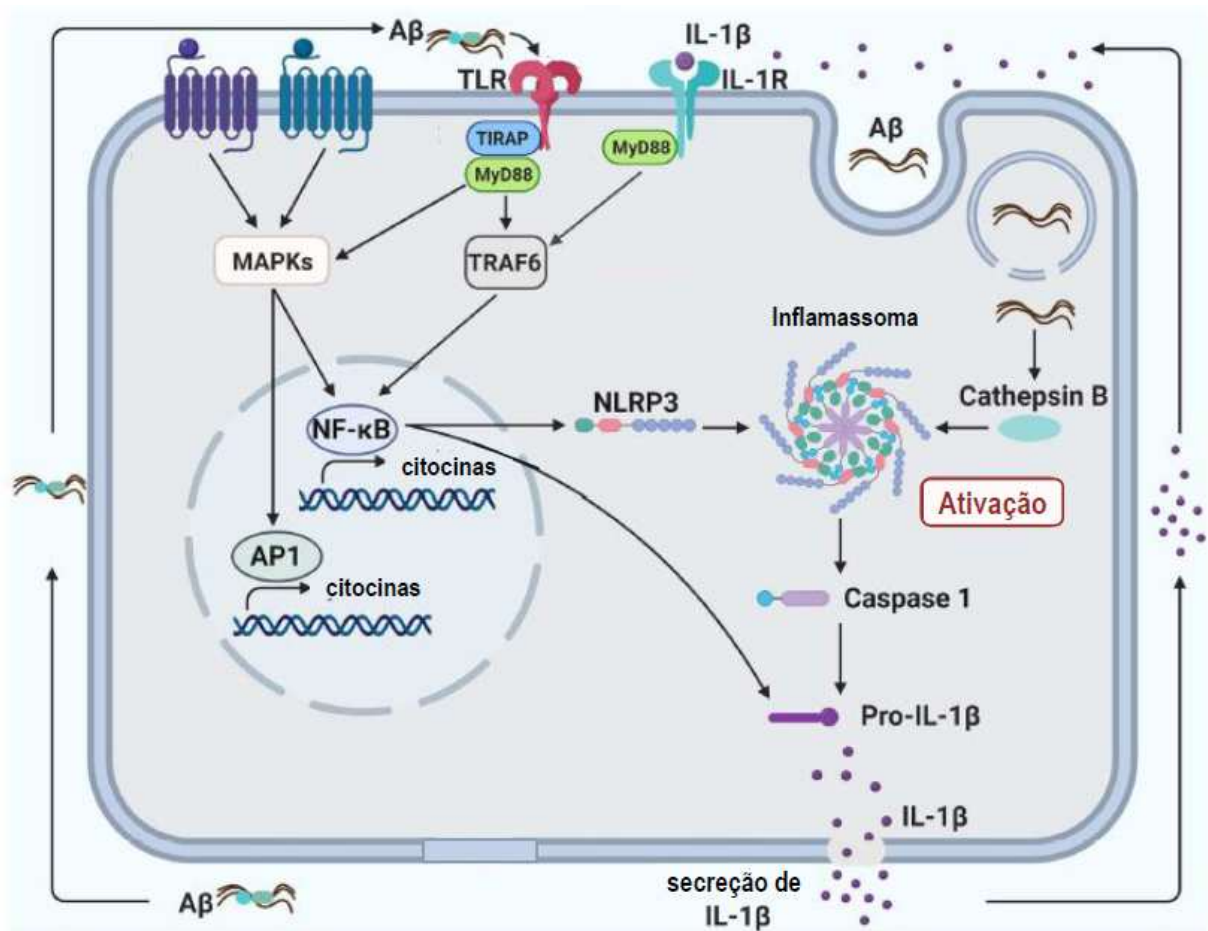


Figura 2. Ativação do inflamassoma NLRP3 na microglia pela proteína beta amiloide (Aβ).
 Legenda: NLRP3: *NOD-like receptor family pyrin domain containing 3*; NF-κβ: fator de transcrição nuclear kappa B; IL-1β: interleucina β; MyD88: fator de diferenciação mielóide 88; TLR: receptores tipo Toll; LPS: Endotoxina bacteriana ou lipopolissacarídeo; MAPK: proteína quinase ativada por mitógeno p38; TRAF6: *TNF Receptor Associated Factor 6*; TIRAP: *TIR Domain Containing Adaptor Protein*. Fonte: Adaptado de Yang et al.,2020.

2.8 Relação entre a proteína Tau e citocinas

A reatividade das células da glia e a liberação de fatores inflamatórios envolvidos na neuroinflamação como as citocinas, podem agravar a patologia Tau levando a danos neuronais e comprometimento cognitivo, agravando a patologia da DA (KITAZAWA et al., 2011; LEYNS; HOLTZMAN, 2017). Felsky et al. (2019) demonstraram que a proporção de micróglia morfológicamente ativada no tecido cortical cerebral post-mortem de indivíduos com DA relaciona-se fortemente à patologia Tau, o que sugere a reatividade microglial como um evento ascendente na DA que leva ao acúmulo de Tau hiperfosforilada e subsequente declínio cognitivo (FELSKY et al., 2019). Os astrócitos ativados de forma crônica também desempenham um papel na hiperfosforilação da Tau ao exacerbar este mecanismo induzido pela A β . O mecanismo relaciona-se ao aumento da atividade da caspase-3 causada por fatores inflamatórios solúveis liberados por astrócitos ativados (GARWOOD et al., 2011). Essas evidências sugerem que a reatividade dessas células participa na progressão da neuropatologia relacionada à Tau, um dos principais efeitos da produção e liberação de citocinas pró-inflamatórias.

Um estudo recente mostrou que a ativação do inflamassoma NLRP3 induz a hiperfosforilação e agregação de Tau através da modulação das quinases e fosfatases de Tau (ISING et al., 2019). O inflamassoma NLRP3 se acumula dentro da micróglia após a ativação da mesma, promovendo a divisão e a atividade da caspase-1 e a liberação de IL-1 β (HENEKA; MCMANUS; LATZ, 2018). A sobreexpressão de IL-1 β liberada pela micróglia exacerba a fosforilação da Tau através da ativação da proteína quinase ativada por mitógeno p38 (MAPK) na cultura de células de neurônios (LI et al., 2003).

A relação entre as citocinas e a patologia Tau na DA tem despertado um interesse nas últimas décadas. Citocinas pró-inflamatórias têm mostrado um consistente impacto sobre a patologia Tau. IL-1, IL-6 e TNF- α têm sido implicadas em uma cascata inflamatória que leva à hiperprodução de A β e à hiperfosforilação de Tau (FERNÁNDEZ et al., 2008). A fosforilação da proteína Tau induzida pela IL-1, contribuiu para a interrupção da estrutura normal de microtúbulos e estabilização dos axônios, o que eventualmente pode resultar na perda de proteínas sinápticas e sinapses (LI et al., 2003). O bloqueio de IL-1 β , pela via de sinalização do receptor antagonista IL-

Ira ou do anticorpo anti-IL-1 β , reverteu os déficits cognitivos e determinou diminuição na patologia da proteína Tau (BEN-MENACHEM-ZIDON et al., 2014). O bloqueio da sinalização da IL-1 no modelo animal 3xTg da DA reduziu significativamente o número de neurônios com pTau na região CA1 do hipocampo enquanto nenhuma alteração na tTau foi detectada. No mesmo estudo, após o tratamento com 1L-1R, os níveis de pTau foram significativamente reduzidos enquanto os níveis de tTau permaneceram inalterados (KITAZAWA et al., 2011). Em um modelo animal de patologia de Tau, a sobreexpressão de MCP-1 associou-se à exacerbação de Tau, observada com um aumento geral nos níveis de tTau no hipocampo (JOLY-AMADO et al., 2020). Segundo Laurent et al. (2017), a taupatia associa-se a um aumento precoce do MIP1 α seguido de infiltração de células T no hipocampo, o que promove déficits de memória espacial desencadeados pela Tau (LAURENT et al., 2017).

2.9 Relação entre declínio cognitivo e citocinas

Citocinas e quimiocinas inflamatórias relacionadas ao sistema imune inato e adaptativo foram ligadas à neuroinflamação na DA, demência e outros transtornos cognitivos (AZIZI; MIRSHAFIEY, 2012; WANG et al., 2023). O desenvolvimento do CCL e da DA pode estar relacionado a um processo inflamatório em que as citocinas promovem a inflamação, o que prejudica a função cognitiva.

A Neuroinflamação geralmente desempenha um papel no declínio da função cognitiva (MIR et al., 2021; SARTORI et al., 2012). Na DA, a inflamação crônica leva à produção de placas A β , o que aumenta sua agregação e favorece a inflamação prejudicando as sinapses neuronais. A β é um grande gatilho para a neurodegeneração, pois inicia uma resposta pró-inflamatória pelas células da glia (NEWCOMBE et al., 2018). Exemplos de fatores pró-inflamatórios liberados nesta resposta imunológica incluem citocinas como IL-1 β , IL-6, IL-18, TNF- α e as quimiocinas MCP-1, MIP1 α , IL-8 e fatores de transcrição como o NF- κ B (IQUBAL et al., 2018, 2020). Os cérebros na velhice mantêm um nível de inflamação crônica que contribui para a perda da capacidade de depuração de proteínas pelas células da glia (NEWCOMBE et al., 2018; WENDELN et al., 2018). A reatividade da micróglia e a resposta inflamatória derivada, levam ao aumento dos emaranhados

neurofibrilares, através da ativação das quinases que fosforilam a proteína Tau (GORLOVOY et al., 2009). No ambiente inflamatório, a barreira hematoencefálica também fica atrofiada, aumentando a capacidade de extravasamento de células imunes e citocinas da periferia para o cérebro contribuindo para o declínio cognitivo.

Marcadores pró-inflamatórios estão associados a declínio cognitivo. A eotaxina tem sido fortemente associada à função cognitiva prejudicada. Butcher et al. (2018) demonstraram níveis mais elevados de eotaxina em pessoas idosas associados a um pior desempenho no MMSE (BUTCHER et al., 2018). Em camundongos adultos jovens, elevações da eotaxina acompanharam-se por déficits nas funções cognitivas associadas à diminuição da neurogênese e comprometimento da aprendizagem e da memória, relacionado à função do hipocampo (VILLEDA et al., 2011). A eotaxina é capaz de atravessar a barreira hematoencefálica (BHE). Portanto, é possível que a elevação sistêmica desta quimiocina afete as funções cerebrais (ERICKSON et al., 2014). Células imunes que produzem IL-17 se acumulam no SNC no início dos déficits cognitivos e persistem ao longo da progressão da DA. A neutralização dessa citocina foi suficiente para prevenir déficits de memória de curto prazo e disfunção glutamatérgica do hipocampo nos estágios iniciais da DA, mecanismo independente das patologias A β e Tau ou da perturbação da BHE (BRIGAS et al., 2021). Marcadores plasmáticos e no LCR dos receptores solúveis de TNF α foram relacionados com declínio cognitivo, probabilidade de conversão para DA e progressão da doença (BUCHHAVE et al., 2010). Lin et al. (2019) sugeriram que os mecanismos de neuroinflamação associados à IL-12 podem estar ligados à DA (LIN et al., 2019).

2.10 Relação entre APOE e citocinas

Em humanos, a apolipoproteína E (APOE) é expressa por um único gene localizado no cromossomo 19q13.2 com três principais variantes alélicas (ϵ 2, ϵ 3, ϵ 4) que codificam três proteínas ou isoformas (MAHLEY, 1988). Existe uma associação forte entre a herança do alelo ϵ 4 e o risco relativo do indivíduo desenvolver DA de início tardio. Os indivíduos com uma cópia do alelo ϵ 4 (ϵ 2/ ϵ 4 ou ϵ 3/ ϵ 4) têm um aumento no risco para desenvolver a DA de 2 a 3 vezes e de 8 a 10 vezes para aqueles com duas cópias (ϵ 4/ ϵ 4) (LIU et al., 2013). Por outro lado, a herança de um ou dois

alelos $\epsilon 2$ está associada a uma redução de aproximadamente 50% para os homozigotos ($\epsilon 2/\epsilon 2$) no risco de desenvolver DA e, portanto, constitui um fator de proteção (CORDER et al., 1994).

No organismo, a APOE é produzida principalmente pelo fígado, mas também pela glândula suprarrenal e por macrófagos (ELSHOURBAGY et al., 1985; KOCKX; TRAINI; KRITHARIDES, 2018). No SNC, a APOE é expressa principalmente por astrócitos e micróglia, mas também de forma menos intensa por neurônios sob condições de estresse (Huang et al., 2004; Xu, 2006).

Existem algumas evidências de que a APOE tem uma relação direta com a produção de placas $A\beta$ na DA, assim como de que é regulada por citocinas. Ainda que se tenha uma clara relação do alelo $\epsilon 4$ com o maior acúmulo de $A\beta$, não está claro o mecanismo subjacente. Um dos primeiros estudos sugeriu que a APOE é co-depositada com a proteína $A\beta$ nas placas amilóides, propondo que uma interação direta proteína-proteína poderia relacionar a APOE à agregação amilóide (NAMBA et al., 1991). Por outro lado, também foi encontrado um aumento direto na produção de proteína $A\beta$ em células cerebrais humanas de carreadores da APOE $\epsilon 4$ (LIN et al., 2018; WANG et al., 2018).

Olgati e colaboradores (2009) demonstraram que pessoas com pelo menos uma cópia do alelo $\epsilon 4$ da APOE, apresentaram produção espontânea e alta de IL-1 β comparado com indivíduos não carreadores do alelo. Também foi observada correlação positiva significativa entre os escores no Inventário Neuropsiquiátrico e a produção de IL-6. Esses achados sugerem o efeito patogênico do alelo $\epsilon 4$ da APOE relacionado à resposta inflamatória na DA (OLGIATI et al., 2010). Outros estudos demonstraram que em astrócitos a produção da APOE é fortemente regulada por TGF- β e desregulada por lipopolissacarídeo bacteriano (LPS) e pelas citocinas inflamatórias IFN- γ , TNF- α e IL-1 β . Braesch-Andersen e colaboradores (2013) avaliaram a produção de APOE em células mononucleares de sangue periférico (PBMC) e a relação com as citocinas. Neste estudo observou-se um efeito semelhante em relação à desregulação da APOE foi pelo IFN- α , enquanto a IL-6, frequentemente considerada como uma das citocinas inflamatórias mais proeminentes, não afetou a produção de APOE (BRAESCH-ANDERSEN et al., 2013).

3. HIPÓTESES

3.1 Hipótese nula: não há associação entre as citocinas, biomarcadores da DA e o desempenho cognitivo.

3.2 Hipótese alternativa: há associação entre as citocinas, biomarcadores da DA e o desempenho cognitivo.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Avaliar as relações entre citocinas e os principais biomarcadores da doença de Alzheimer no líquido cefalorraquidiano e o desempenho cognitivo de uma amostra de pessoas idosas Brasileiras.

4.2 Objetivos específicos

- ❖ Descrever as características sociodemográficas e quantificar os biomarcadores dos participantes do estudo.
- ❖ Quantificar os níveis das citocinas no LCR dos participantes do estudo
- ❖ Avaliar se há diferença entre os níveis das citocinas no LCR entre os participantes classificados segundo o diagnóstico clínico de demência por DA
- ❖ Avaliar as associações entre os níveis das citocinas e da proteína A β 42, dosados no LCR
- ❖ Avaliar as associações entre os níveis das citocinas e da proteína pTau, dosados no LCR

- ❖ Avaliar as associações entre os níveis das citocinas e da proteína tTau, dosados no LCR
- ❖ Descrever as relações entre os níveis das citocinas no LCR e o desempenho cognitivo avaliado pelo escore do MEEM
- ❖ Avaliar as correlações entre as variáveis independentes do modelo de regressão para cada biomarcador da DA e para o escore do MEEM.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Desenho do estudo

Trata-se de estudo observacional transversal que visou analisar as relações entre citocinas e os biomarcadores A β , pTau, tTau da DA no LCR e o desempenho cognitivo de uma amostra de pessoas idosas Brasileiras, cognitivamente não comprometidos, com CCL e com demência pela DA.

5.2 Seleção dos participantes

O presente estudo é um estudo transversal aninhado numa COORTE prospectiva denominada "Cog-aging", em desenvolvimento no Serviço de Geriatria do Instituto Jenny de Andrade Faria (IJAF) de atenção à saúde do idoso e da mulher do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) desde 2011. Os participantes são pacientes em acompanhamento no Instituto Jenny de Andrade Faria- Centro de Referência do Idoso do Estado de Minas Gerais, encaminhados pela atenção primária da prefeitura de Belo Horizonte para atendimento especializado em geriatria, com demandas variadas.

Estes indivíduos foram previamente submetidos a avaliação geriátrica multidimensional por médico geriatra e pela equipe de gerontologia visando definir os planos de cuidado. Aqueles que apresentaram queixas subjetivas de memória, suspeita clínica de comprometimento cognitivo ou demência inicial foram encaminhados ao ambulatório de comprometimento cognitivo leve da mesma Instituição e convidados a participar do ambulatório de pesquisa de comprometimento cognitivo, Cog-Aging.

O recrutamento dos participantes, por conveniência, ocorreu no período compreendido entre março 2015 a fevereiro de 2024. Os idosos que aceitaram participar do estudo foram submetidos novamente a avaliação geriátrica com foco em avaliação cognitiva, bem como à avaliação neuropsicológica. Foram realizados exames laboratoriais e exames de neuroimagem (tomografia computadorizada e/ou ressonância nuclear magnética de encéfalo), com o fim de excluir outras possíveis causas de comprometimento cognitivo e corroborar o diagnóstico etiológico de DA. Após essas avaliações, os casos foram discutidos em reunião de equipe de neuropsicologia, psiquiatria e geriatria, para a definição final do diagnóstico de cada participante, seguindo os critérios do DSM-5 (ASSOCIAÇÃO AMERICANA DE PSIQUIATRIA, 2014) para o diagnóstico de Comprometimento Cognitivo Leve e o de Demência por Doença de Alzheimer provável (DDA), pelos critérios propostos por Mckhann (MCKHANN et al., 2011). As pessoas idosas que apresentavam queixas cognitivas, sem comprometimento cognitivo objetivo foram classificadas como declínio cognitivo subjetivo. Após a definição do diagnóstico, os participantes diagnosticados com CCL e com DDA provável foram convidados para participar do presente estudo, iniciando pela coleta sangue e seguido por punção lombar para extração do líquido cefalorraquidiano.

Todos os participantes assinaram o termo de assentimento livre e o Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE). No caso de indivíduos portadores de demência, o participante assinava a Termo de Assentimento Livre e Esclarecido (TALE) e o TCLE era assinado pelo acompanhante. Este estudo foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa da UFMG sob o número CAAE 72729423.3.0000.5149.

A fim de evitar procedimentos desnecessários e levando em conta as considerações éticas relativas à realização de procedimentos com finalidade de pesquisa em pessoas sem alterações clínicas, a seleção dos participantes sem comprometimento cognitivo objetivo (SCCO), ocorreu nos hospitais Odilon Behrens, João XXIII, e no hospital da Polícia Militar de Minas Gerais. Nestes locais, rastream-se os indivíduos com indicação pela equipe médica assistente para realização de procedimentos cirúrgicos eletivos sob raquianestesia, permitindo, assim, a coleta de LCR para o estudo. Os acompanhantes do paciente eram entrevistados antes do procedimento cirúrgico, para identificar, durante a triagem, possíveis fatores de exclusão. Após confirmar a viabilidade do

paciente para participar do estudo, este era convidado e informado da coleta de sangue e do LCR durante a realização da raquianestesia. Todos os indivíduos que aceitaram participar do estudo assinaram o TCLE. Passados 30 dias do procedimento cirúrgico-anestésico, os participantes foram contatados para agendar as avaliações clínica e cognitiva com objetivo de evitar interferência do processo de hospitalização nas funções cognitivas e permitir a recuperação do paciente. Estes indivíduos foram submetidos ao mesmo protocolo aplicado aos participantes dos demais grupos. Os participantes que não apresentavam comprometimento cognitivo e funcional objetivo e aceitaram participar foram incluídos no estudo.

5.3 Critérios de inclusão

Os critérios de inclusão eram: indivíduos com idade igual ou superior a 60 anos, sem comprometimento cognitivo objetivo e funcional ou com diagnóstico clínico de CCL amnésico (CCLa) de único ou múltiplos domínios, ou com demência por doença de Alzheimer provável com CDR1, que aceitaram participar do projeto e assinaram o TALE e o TCLE pelo acompanhante e que não apresentavam nenhum dos critérios de exclusão a seguir.

5.4 Critérios de Exclusão

1. Incapacidade cognitiva por outras causas não DA
2. Incapacidade cognitiva por transtorno depressivo maior;
3. Portadores de transtornos mentais moderados a graves;
4. Transtornos cerebrovasculares, hidrocefalia e massa intracraniana documentada por tomografia computadorizada ou RNM;
5. Anormalidades nos exames complementares que estejam associados com comprometimento cognitivo; Doenças inflamatórias crônicas ou agudas;
6. Doença neoplásica em atividade;

7. Tratamento com anti-inflamatórios ou anticoagulantes;
8. Portadores de distúrbios de coagulação ou osteoartrite grave da coluna lombar, suspeita de abscesso epidural espinal, infecção de pele no local da punção lombar, que contraindicassem o procedimento;
9. Não comparecimento à consulta, após coleta do LCR durante o procedimento cirúrgico-anestésico, para aplicação dos protocolos clínicos e cognitivos;
10. Deficiência sensorial grave, que dificultasse a aplicação e resposta aos instrumentos de avaliação cognitiva;
11. Fragilidade importante.

5.5 Avaliação Clínica

Todos os participantes foram submetidos ao mesmo protocolo de pesquisa estabelecido. Inicialmente, foi aplicado um questionário para conhecer os aspectos sociodemográficos, histórias clínica e familiar, caracterização das comorbidades, medicamentos em uso, hábitos de vida e detalhamento da queixa cognitiva. Além disso, foram analisados os resultados dos exames laboratoriais e de neuroimagem (tomografia computadorizada e/ou RNM do encéfalo) para avaliação de causas secundárias de declínio cognitivo, em concordância com os critérios diagnósticos reconhecidos internacionalmente (STONE et al., 2014).

5.6 Avaliação cognitiva

O protocolo de avaliação cognitiva aplicado aos participantes incluiu os seguintes instrumentos: Mini Exame do Estado Mental (BERTOLUCCI et al., 1994), escala de demência clínica (CDR) (MORRIS, 1993), teste de fluência verbal (NITRINI et al., 1994), lista de palavras da bateria CERAD (BERTOLUCCI et al., 2001), teste de reconhecimento de figuras (NITRINI et al., 1994), teste do Relógio (1994) (SHULMAN, 2000), inventário neuropsiquiátrico (NPI) (CUMMINGS et

al., 1994), avaliação funcional de Pfeffer (PFEFFER et al., 1982), critérios diagnósticos de depressão (DSM-5) (ASSOCIAÇÃO AMERICANA DE PSIQUIATRIA, 2014), geriatric depression scale (GDS) versão 15 itens (ALMEIDA; ALMEIDA, 1999). Para este estudo usamos para as pontuações do Mini Exame do Estado Mental e do CDR de cada paciente.

5.6.1 Mini Exame do Estado Mental (MEEM)

O MEEM é um dos testes mais usados para a avaliação do comprometimento cognitivo. É composto por 11 itens, com pontuação total de 30 pontos (FOLSTEIN; FOLSTEIN; MCHUGH, 1975). Tem uma consistência interna moderada e boa confiabilidade teste-reteste. Apresenta sensibilidade de 85% e especificidade de 90% para a detecção de demência em entornos comunitários e de atenção primária (CREAVIN et al., 2016). A acurácia para detectar demência é significativamente influenciada pela idade, grupo étnico e escolaridade (TOMBAUGH; MCINTYRE, 1992). Os itens avaliados são: orientação temporal e espacial, memória, atenção, linguagem, praxia, gnose e função executiva. Utilizamos como ponto de corte, de acordo com a escolaridade, 18 pontos (para baixa escolaridade) e 26 pontos (para escolaridade maior ou igual a 8 anos). O tempo estimado da duração de aplicação dos testes é de 5 a 8 minutos em indivíduos saudáveis (BERTOLUCCI et al., 1994).

5.6.2 Escala de demência clínica

A escala clínica de demência (do inglês, “*Clinical Dementia Rating*” -CDR) desenvolvida por Morris em 1993, avalia a gravidade da doença e identifica casos em que há dúvida no diagnóstico por meio da avaliação do nível de comprometimento em seis categorias funcionais: memória, orientação, julgamento e resolução de problemas, assuntos comunitários, atividades domésticas e de lazer e autocuidado. Cada categoria do CDR pode ser graduada em cinco diferentes níveis: cognição normal (0), comprometimento cognitivo questionável (0,5), leve (1), moderado (2) e

grave (3) (MORRIS, 1993). Esta escala de gravidade é a mais usada nos estudos clínicos e na prática clínica de demência e é um critério padrão em ensaios clínicos multicêntricos na DA (SCHAFER et al., 2004).

5.7 Classificação dos participantes

Um total de 131 indivíduos foram selecionados. Foram excluídos 23 participantes pelas seguintes causas: 1 com Venereal Disease Research Laboratory (VDRL) positiva, 1 com demência fronto temporal (DFT), 1 por visão comprometida, 2 por óbito, 3 que pediram para ser excluídos da pesquisa e 15 por não comparecimento à consulta após coleta do LCR. Finalmente foram incluídos 108 participantes e classificados em dois grupos: grupo demência por DA com CDR1 (n=54) e grupo não-demência (n = 54) (33 CCLa (CDR 0.5) e 21 SCCO; (CDR 0)) (Figura 3). Esta classificação foi usada para comparar os níveis das citocinas entre esses grupos.

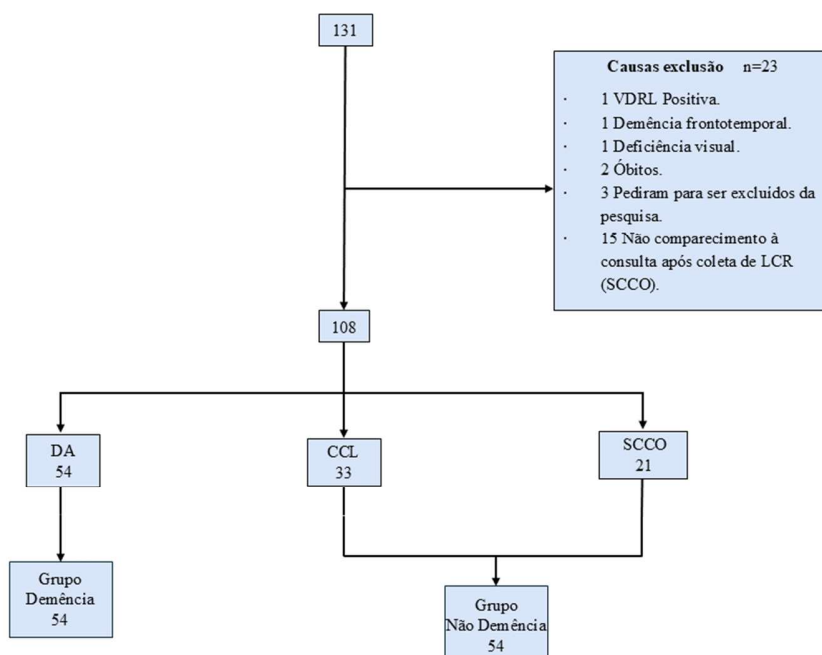


Figura 3. Diagrama de fluxo de inclusão dos participantes no estudo. Legenda: LCR: líquido cefalorraquidiano; VDRL: *venereal disease research laboratory*; DFT: demência fronto temporal. DA: demência por doença de Alzheimer; CCL: comprometimento cognitivo leve; SCCO: sem comprometimento cognitivo objetivo.

5.8 Coleta e processamento do sangue periférico

Foram coletadas amostras de sangue por meio de técnica estéril, em sistema a vácuo totalmente descartável em tubos com ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) de 4 mL e transportadas para o Laboratório de Medicina Molecular da Faculdade de Medicina da UFMG, para a extração do DNA.

5.9 Extração e quantificação de DNA

Utilizamos o método salino de extração do DNA, conforme estabelecido por Lahiri e Numberger (1991), para obtenção do DNA.). Para começar a extração o conteúdo de cada amostra foi transferido para os respectivos tubos Falcon de 15 mL e posteriormente adicionado tampão de TKM contendo 30% Triton X-100 (4,27 de TKM e 130 uL de Triton por amostra), segundo o volume de cada amostra. As amostras foram agitadas vigorosamente por 30 segundos e deixadas em repouso a temperatura ambiente por 2 minutos (para lise das membranas citoplasmáticas). Após esta etapa foram centrifugadas a 22°C, 1200g por 10 minutos com aceleração de 9 e desaceleração de 3. Se descartou o sobrenadante e o pellet foi conservado para lavagem com TKM (4mL), foi aplicada agitação manual e depois centrifugação a 22°C, 1200g por 10 minutos com aceleração de 9 e desaceleração de 3. Este procedimento foi repetido 3 vezes.

Após a limpeza com TKM, foram adicionados 850 µL de solução de TKM-SDS (800 uL de TKM e 50 uL de SDS 10% por amostra), para lise da membrana nuclear. Os tubos foram agitados vigorosamente, até desfragmentar o *pellet*, para depois passar à incubação em "banho maria" a 55°C, por 10 minutos. Após este passo, as amostras foram agitadas com ajuda do vórtex para completa desfragmentação do pellet. Posteriormente, centrifugou-se rapidamente a 22°C, 400g, por 1 minuto com aceleração de 9 e desaceleração de 3. Passada esta etapa, foi feita a transferência do sobrenadante para novos tubos *Eppendorf* com 300 uL de NaCl 5.1M, para cada uma das amostras. Os tubos foram agitados manualmente para formação do precipitado de proteínas e posteriormente centrifugaram-se a 22°C, 12000g, 5 minutos com aceleração de 9 e desaceleração de 3. O sobrenadante foi transferido para tubos de rosca de capacidade de 2mL contendo isopropanol com o fim de que, ao fazer a agitação, fosse formado o precipitado do DNA em temperatura ambiente.

Os tubos foram centrifugados novamente a 22°C, 16000g, 15 minutos com aceleração de 9 e desaceleração de 3, descartado o sobrenadante e conservado o pellet para iniciar a lavagem com etanol 70% e agitação manual para desprendê-lo e centrifugar a 22°C, 12000g por 5 minutos com aceleração de 9 e desaceleração de 3. Esta etapa foi repetida, mais uma vez. Posteriormente, o sobrenadante foi descartado e os tubos foram deixados invertidos sobre papel toalha para remover

o excesso de álcool. As amostras foram deixadas para secagem em temperatura ambiente durante 1 hora. Finalmente foram colocadas em solução de TE pH:8 e mantidas em "banho maria" overnight para incubação. Após este período, as amostras foram armazenadas a 4°C, em geladeira, até seu uso (LAHIRI; NUMBERGER, 1991).

A quantificação e avaliação das amostras de DNA foi feita por meio do *NanoDrop*TM 2000/2000 (*Thermoscientific*®, Waltham, MA, USA), pelas razões de absorbância 260/280 e 260/230 e a concentração ajustada de 50 ng/μL para a técnica de PCR em tempo real.

5.10 Genotipagem

Para o estudo dos polimorfismos do gene de APOE, realizamos a genotipagem através da técnica de *Polimerase Chain Reaction* PCR em tempo real. Esta técnica de biologia molecular é usada para amplificar e quantificar os fragmentos de DNA de interesse, por meio da utilização de sondas específicas. Essas sondas são oligonucleotídeos ligados a um fluoróforo de alelo específico (VIC/FAM). As sondas sofrem anelamento com a fita de DNA complementar e com isso a DNA polimerase realiza extensão do fragmento. No momento em que a sonda é clivada, o fluoróforo ligado a ela, é liberado permitindo a detecção da fluorescência, a sonda fluorescente aumenta significativamente a especificidade e possibilita a quantificação do DNA (LIVAK; MARMARO; TODD, 1995).

No presente estudo foram usadas as sondas relacionadas ao polimorfismo do gene de APOE: *rs429358* (C__3084793_20) e *rs7412* (C__9045973_10), provenientes da *Applied Biosystems* (*Applied Biosystems, Foster City, CA, USA*), cuja sequência se encontra descrita no seguinte quadro:

Quadro 4. Sequência dos alelos responsáveis pelo polimorfismo do gene da APOE

SNP/Sonda	Sequência do polimorfismo
rs429358 C__3084793_20	GGCTGGGCGCGGACATGGAGGACGTG[C/T]GCGGCCGC CTGGTGCAGTACCGCGG Alelo de maior frequência: T
rs7412 C__9045973_10	TCCGCGATGCCGATGACCTGCAGAAG[C/T]GCCTGGCAG TGTACCAGGCCGGGGC Alelo de maior frequência: C

Legenda: (SNP): *Single Nucleotide Polymorphism* (polimorfismo de nucleotídeo único).

5.11 Reação em cadeia da Polimerase em tempo real

Após quantificadas, as amostras de DNA foram diluídas em água Milli-Q para ajustá-las a uma mesma concentração de 50 ng/μL e em seguida distribuídas em uma placa de 96 poços. Para a reação em cadeia da polimerase, foram usados os seguintes reagentes:

- Master mix TaqMan™ Gene Expression que contém AmpliTaq Gold™ DNA Polimerase (Ultra Pure), Uracil-DNA glicosilase, dNTPs (com dUTP), ROX™ de referência passiva e componentes de buffer otimizados;
- Sondas TaqMan™ para o Gene da APOE: *rs429358* e *rs7412*, para determinar as variantes genéticas (alelos ε2, ε3 e ε4);
- Água Milli-q autoclavada
- DNA

A combinação dos reagentes anteriores e a amostra de DNA diluída foram adicionadas em cada poço da placa. Para controle de qualidade dos resultados, foram duplicadas 10% das amostras em forma aleatória, além disso, foram incluídos controles dos genótipos e controles negativos (usando água Milli-q em vez de amostra). Para a leitura das placas foi usado o termociclador *CFX96*

Touch™ Real-Time PCR Detection System; Bio Rad; Hercules, California, U.S.A, aplicando o seguinte protocolo:

Etapa 1. **Desnaturação** 95° – 10 minutos

Etapa 2. **Extensão** 95° -15 segundos

Etapa 3. **Anelacão** 60° – 1 min e 30 segundos

Número de ciclos: 60

5.12 Discriminação Alélica para o gene da APOE

Ao término da leitura da placa pelo equipamento, procedeu-se à discriminação alélica utilizando o software Bio-Rad CFX Manager. Cada participante foi avaliado considerando o agrupamento por cluster e os valores de unidades de fluorescência relativa (RFU) para as sondas rs429358 (C_3084793_20) e rs7412 (C_9045973_10). Após a análise discriminatória, os participantes foram categorizados como portadores ou não portadores do alelo $\epsilon 4$. Considerou-se como portadores aqueles participantes que apresentavam um ou dois alelos $\epsilon 4$ (Figura 4).

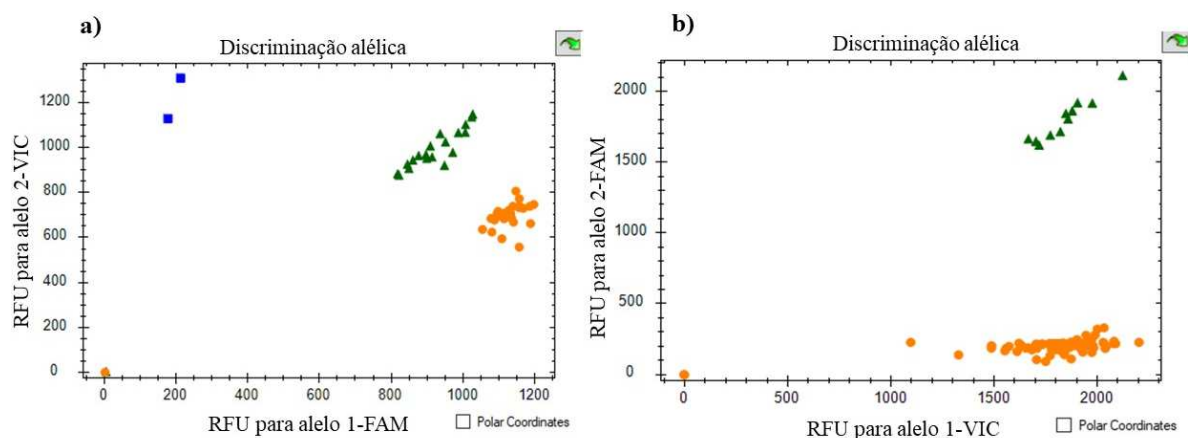


Figura 4. Discriminação alélica para o gene da APOE. a) discriminação da sonda rs429358 (C_3084793_20), b) discriminação da sonda rs7412 (C_9045973_10) Legenda: RFU: *relative fluorescence units*; FAM: *amine-reactive fluorescein*; VIC: *2'-chloro-7'-phenyl-1,4-dichloro-6-carboxyfluorescein*. Fonte: própria.

5.13 Coleta e processamento do LCR

Depois da avaliação clínica, os participantes com CCL e DDA, eram convidados para a coleta de LCR e eram explicados todos os procedimentos a respeito da pesquisa, punção lombar e o TCLE para o paciente e acompanhante.

No caso dos participantes com SCCO, a coleta acontecia durante a realização da raquianestesia todos os indivíduos que aceitaram participar do estudo lhes era explicado o TCLE e solicitadas as assinaturas tanto do paciente como do acompanhante.

Embora a punção lombar seja geralmente reconhecida como segura, traz alguns riscos. As complicações mais comuns são a dor lombar e cefaléia pós-punção lombar, que ocorrem entre as 24 e 48 horas após o procedimento, tem ocorrência rara em idosos. O tratamento consiste em repouso, hidratação e analgesia simples. Em situações mais graves pode ocorrer: infecção pós-punção, hematomas e trombose de seio venoso. Os sangramentos volumosos são raros, principalmente quando as recomendações são cuidadosamente atendidas e o procedimento realizado por pessoal treinado, conforme adotado no presente estudo.

A punção lombar foi realizada com técnica estéril por médico anestesista com o paciente sentado. A agulha usada para este procedimento era tipo Quinck número 22 e era inserida no espaço subaracnóideo, entre as vértebras L3/L4 ou L4/L5. Foram coletados 6 mL de LCR em tubos de polipropileno (ENGELBORGHS et al., 2017). Após a coleta, as amostras foram imediatamente transportadas em uma caixa com compressas de gelo até chegar no laboratório. O intervalo do tempo entre a coleta e o início do processamento das amostras era de máximo de 30 minutos a 60 minutos. O protocolo de processamento do LCR constava de uma temperatura de 4°C, centrifugados a 3.000g, por 10 minutos com aceleração de 1 e desaceleração de 1. Após isto foram feitas alíquotas de 500 µL e eram armazenadas no freezer -80°C até o experimento.

5.14 Técnica de Luminex xMap

Esta plataforma combina bioensaios usando microesferas com tecnologia digital avançada, processamento de sinal e técnicas de propriedade de identificação para realizar testes de múltiplos analitos em tempo real, gerando múltiplos dados provenientes de uma única amostra. As microesferas são codificadas por cores com concentrações precisas de corantes fluorescentes específicos, produzindo centenas de conjuntos de microesferas de cores distintas. Reagentes de captura específicos com anticorpos são acoplados à superfície das microesferas. Os conjuntos das mesmas são combinados em um único poço para medir vários analitos de uma amostra. Os analitos são capturados por anticorpos acoplados às microesferas. Em seguida, o anticorpo de detecção se liga ao antígeno formando um sanduíche. E finalmente, a molécula repórter com um corante fluorescente diferente é adicionada. Após esse processo, as microesferas são separadas em um analisador e passam por dois lasers para a detecção: o primeiro baseado na citometria de fluxo, pelo qual as esferas passam por uma única linha de fluxo onde um laser que possui uma cor vermelha é usada para excitar os corantes fluorescentes e identificar as esferas específicas. O segundo laser é cor verde e tem como função excitar e quantificar as moléculas repórter do ensaio. Entre as vantagens da tecnologia encontram-se a aquisição rápida de dados e excelentes sensibilidade e capacidade de análise multiplexada (Figura 5) (GUARENE et al., 2018). Estudos cujo objetivo é a detecção de biomarcadores da DA têm usado a técnica de Luminex para mensurar tanto as proteínas da DA como as citocinas com perfil anti e pró-inflamatório em fluidos como LCR ou plasma (HANSEN et al., 2021; TAIPA et al., 2019; TANG et al., 2011). Desta forma, torna-se uma ferramenta importante na detecção desses analitos, ofertando ensaios realizados com grande rapidez, precisão e confiabilidade.

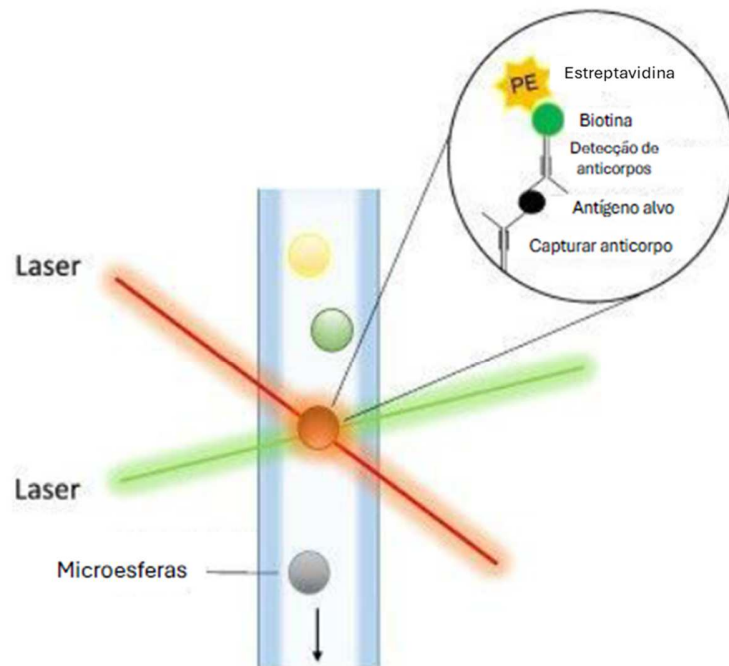


Figura 5. Sistema Luminex xMAP representando a linha única de fluxo por onde passam as microesferas e os dois lasers de detecção: o vermelho para identificação das esferas e o verde que excita e quantifica as moléculas repórter do ensaio. Adaptado de BIGGAR; STOREY, 2014.

5.15 Determinação dos níveis de A β 42, pTau e tTau no LCR com Luminex xMap

Para determinar as concentrações dos marcadores A β 42, pTau, tTau no LCR foi usada a técnica de Luminex xMap e o kit *Human Amyloid Beta and Tau Magnetic Bead Panel* (HNABTMAG-68K) -Millipore xMap - (Millipore, Germany). Para os ensaios Luminex, utilizaram-se as recomendações do fabricante. Inicialmente, descongelaram-se as amostras dos LCR à temperatura ambiente (RANGANATHAN et al., 2006), homogeneizou-se (vórtex por 5 segundos) e centrifugou-se 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. Posteriormente, foi adicionado, conforme cada poço previamente designado: 25 µL de cada padrão aos “poços de padrão”; 25 µL de *Assay buffer* (tampão de ensaio) aos poços da curva padrão; 25µL de amostras diluídas e centrifugadas aos “poços de amostras”; 25µL de anticorpos de detecção e 25µL de microesferas em cada poço. A placa foi selada, embrulhada com papel alumínio e incubada durante a noite (16-20 horas), a temperatura ambiente (20-25°C) e sob agitação (300 ±50 rpm).

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 incubada 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*. O *pellet* foi resuspendido com adição de 100 µL de tampão de ensaio e homogeneizou-se as amostras por 10 minutos.

As intensidades médias de fluorescência foram determinadas por aquisição das amostras no equipamento *Bio-Plex 200* (*Bio-Rad Laboratories*, Califórnia, EUA), utilizando-se o *software Luminex xPONENT* versão 3.1. 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*, Califórnia, EUA).

O limite de detecção das concentrações dos biomarcadores é realizado a partir de uma curva padrão providenciada pelo próprio *kit* HNABTMAG-68K. A curva padrão consiste em 7 pontos que vão desde o Padrão 1 até o 7. A concentração do padrão 1 é providenciada pelo kit, partindo desses valores são feitas diluições seriadas desde a padrão 1 até chegar no 7. O kit também proporciona os valores dos padrões para cada analito (Anexo 1, tabela 1), níveis dos controles de qualidade e faixa esperada (Anexo 1, tabela 2), assim como o valor da porcentagem de recuperação em amostras no LCR (Anexo 1, tabela 3). As concentrações das amostras são detectadas dentro dessa curva padrão. No caso de que algum valor de concentração das amostras esteja abaixo ou acima dos limites da curva, esses valores podem ser extrapolados usando a equação da curva.

a faixa de controle que funciona como controle positivo são providenciadas pelo kit para cada um dos analitos, partindo desses valores são feitas diluições seriadas desde S1 até chegar no S8. As concentrações das amostras são detectadas dentro dessa curva padrão. No caso de que algum valor de concentração das amostras esteja abaixo ou acima dos limites da curva padrão, esses valores podem ser extrapolados usando a equação da curva. Os limites de detecção encontram-se no anexo (x).

5.16 Determinação dos níveis de citocinas com Luminex xMap

Para as quantificações dos biomarcadores solúveis sistêmicos utilizou-se também a tecnologia Luminex xMap com o kit *Bio-Plex Pro Human Cytokine 27-plex Assay #M500KCAF0Y* da BIO-RAD, que permitiu a pesquisa das seguintes citocinas: IL-1 β , IL-1ra, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-17, eotaxina, FGF, G-CSF, GM-CSF, IFN γ , IP-10, MCP-1, MIP-1 α , MIP1 β , PDGF-BB, RANTES, TNF-alfa, VEGF.

Inicialmente, descongelaram-se as amostras de LCR (banho-maria a 37°C), homogeneizadas no vórtex por 5 segundos e centrifugando a 14.000 x g por 5 minutos em temperatura ambiente. Subsequentemente, adicionou-se 50 μ L das amostras em placas para ensaio *Luminex*, previamente preparadas através da adição de 50 μ L da mistura de *beads* (diluída 10x), em cada poço, seguida por lavagem (duas vezes com 100 μ L de tampão de lavagem). Incubou-se as placas *overnight*, 4°C e sob agitação (300 $\pm$ 50rpm). No dia seguinte, adicionou-se 25 μ L do anticorpo de detecção em cada poço (previamente diluído 10x), incubou-se por 30 minutos em agitador (300 $\pm$ 50rpm), temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Subsequentemente, procedeu-se a lavagem com 100 μ L de tampão de lavagem, (procedimento realizado por 3 vezes). Posteriormente, adicionou-se 50 μ L da estreptavidina-ficoeritrina (SAPE) em cada poço (previamente diluído 10x) e incubou por 30 minutos em agitador (300 $\pm$ 50rpm), em temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Subsequentemente, procedeu-se à lavagem com 100 μ L de tampão de lavagem. O pellet foi resuspendido com 125 μ L de tampão de ensaio. Após isso as amostras foram homogeneizadas por 10 minutos.

Determinaram-se as intensidades médias de fluorescência por aquisição das amostras (50 microesferas por analito avaliado) no equipamento *Bio-Plex 200* (*Bio-Rad Laboratories*, Califórnia, 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*TM versão 6.2 (*Bio-Rad Laboratories*, Califórnia, EUA).

O limite de detecção das concentrações das citocinas é realizado a partir da curva padrão que é providenciada pelo próprio *kit Bio-Plex Pro Human Cytokine 27-plex Assay #M500KCAF0Y* da BIO-RAD. A curva padrão consiste em 8 pontos do S1 até o S8. As concentrações de S1 e a faixa de controle que funciona como controle positivo são providenciadas pelo kit para cada um dos analitos, partindo desses valores são feitas diluições seriadas desde S1 até chegar no S8. As concentrações das amostras são detectadas dentro dessa curva padrão. No caso de que algum valor de concentração das amostras esteja abaixo ou acima dos limites da curva padrão, esses valores podem ser extrapolados usando a equação da curva. A tabela com os limites de detecção encontram-se no Anexo1 na tabela 4.

5.17 Análise estatística

Realizamos uma revisão minuciosa de todos os valores. Por recomendação do fabricante foram excluídos os valores dos ensaios Luminex que estivessem por acima ou abaixo dos limites da curva padrão.

Iniciou-se por uma análise descritiva de todas as variáveis considerando a análise de distribuição normal por meio do teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov. As comparações entre os grupos foram realizadas pelo Teste de U de Mann-Whitney ou teste do Qui-quadrado. As associações significativas entre cada biomarcador da DA o escore do MEEM e as citocinas foram feitas por meio de análises de regressão linear múltipla. Antes da análise, as citocinas e as variáveis proteicas que não tinham distribuição normal foram transformadas logaritmicamente usando logaritmo

natural ou neperiano (Ln). Para o ajuste do modelo, não realizamos imputação de dados e apenas casos com informações completas para todos os participantes foram considerados.

As variáveis dependentes foram os níveis líquidos de A β 42, pTau, tTau e o escore do MEEM e como independentes os níveis das citocinas. Os fatores idade, escolaridade formal, sexo e ser carreador de ao menos um alelo ϵ 4 da APOE foram usados como variáveis de ajuste independentes. Para seleção de variáveis, foi seguido o método estabelecido por Hosmer e Lemeshow (2013) no qual foram feitas regressões lineares univariadas ajustadas entre cada citocina e variável dependente. Citocinas com valores $p < .25$ foram selecionadas para o modelo inicial multivariado ajustado. Nesse modelo, as variáveis com $p < .05$ e que não provocaram uma grande alteração (mais do que 20% de mudança) nas estimativas do (β), foram removidas do modelo, uma de cada vez. Após verificar todas as variáveis, avaliamos o efeito de cada variável incluída no modelo inicial, etapa é fundamental para verificar se a variável isoladamente não significativa tem importância na presença de outras variáveis. Para cada regressão, foi usado o método de entrada forçada de variáveis. (BIELEFELDT; BOFF; CASTELLO BRANCO, 2019; HOSMER; LEMESHOW, 2013). Após cada regressão, foram revisados o diagnóstico de colinearidade, estatísticas de resíduos e gráfico de normalidade dos resíduos para avaliar a viabilidade das análises. As análises estatísticas foram realizadas usando o SPSS Versão 22. Para ilustrar as correlações entre as variáveis preditoras do modelo de regressão dos biomarcadores A β 42 e Tau (pTau e tTau) e do escore do MEEM, foi construída uma rede unidirecional com base em estimativas de correlação não paramétrica. Para cada modelo de regressão foram construídos dois modelos de rede: a primeira para ilustrar a relação entre todas as preditoras do modelo e a segunda onde só foram representadas as correlações significativas $p < .05$. As linhas indicam correlações, com a espessura das linhas representando a força da correlação (maior espessura para correlações mais fortes). As linhas azuis indicam correlações positivas, enquanto linhas vermelhas indicam correlações negativas. As análises foram realizadas através do software o JASP versão 0.18.3.0.

6. RESULTADOS

6.1 ARTIGO 1

O objetivo do primeiro estudo, “*The Relationships between cerebrospinal fluid cytokines and Alzheimer’s disease biomarkers in a sample of Brazilian older adults demented and non-demented*”, foi investigar quais citocinas estão associadas a cada biomarcador da DA e se estas podem prever ou influenciar as variações dos mesmos no LCR de uma amostra de pessoas idosas brasileiras.

Este estudo foi submetido para apreciação do *Brain, Behavior, and Immunity*.

The Relationships between cerebrospinal fluid cytokines and Alzheimer's disease biomarkers in a sample of Brazilian older adults demented and non-demented.

Ivonne Carolina Bolaños Burgos^{a,b,c}, Erika de Oliveira Hansen^a, Natália Silva Dias^d, Andréa Teixeira Carvalho^e, Igor Nunes Lanna^a, Aloisio Joaquim Freitas Ribeiro^g, Lourdes Coral Contreras Montenegro^g, Gabriela Tomé Oliveira Engelmann^{a,i}, Júlia de Almeida Barreto^{a,c,f}, Giovanna Correia Pereira Moro^{a,c,f}, Jonas Jardim de Paula^{a,c,j}, Alfredo Ramirez Zuniga^h, Débora Marques de Miranda^{c,i}, Marco Aurélio Romano-Silva^{c,i}, Luiz Armando Cunha de Marco^{c,i}, Bernardo de Mattos Viana^{a,c,d,i,j} and Maria Aparecida Camargos Bicalho^{a,b,c,i,k}

^aCog-aging Research Group– Reference Center for the Elderly, University Hospital of the Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Brazil,

^bSciences Applied to Adult Health Postgraduate Program, Faculty of Medicine, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Brazil,

^cNeurotec R National Institute of Science and Technology (INCT-Neurotec R), Faculty of Medicine, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Brazil,

^dOlder Adult Psychiatry and Psychology Extension Program (PROEPSI), Faculty of Medicine, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Brazil,

^eRené Rachou Institute, Oswaldo Cruz Foundation (Fiocruz), Belo Horizonte, Brazil,

^fUndergraduate medicine, Faculty of Medicine, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Brazil,

^gDepartment of Statistics, Institute of Exact Sciences, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Brazil,

^hDepartment of Psychiatry, Medical Faculty, University of Cologne, Cologne, Germany

ⁱ Molecular Medicine Postgraduate Program, Faculty of Medicine, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Brazil,

^j Department of Mental Health, Faculty of Medicine, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Brazil,

^k Department of Clinical Medicine, Faculty of Medicine, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Brazil.

Abstract: The pathophysiology of Alzheimer's disease (AD) is associated with a neuroinflammatory process in which cytokines play a significant role. Ongoing interactions between amyloid beta (A β) plaques, Tau protein, and cytokines contribute to the maintenance of the brain's inflammatory state, accelerate A β deposition, and drive Tau protein pathology. Our study assessed the relationship between cytokines and the Alzheimer's disease (AD) biomarkers A β 42, pTau and tTau. One hundred and eight Brazilian older adults were categorized clinically into the initial probable AD Dementia (ADD) (n=54) and the non-dementia (n=54) groups. We compared cytokine levels between groups and associations between each AD biomarker and cytokines were further explored in multiple linear regression analyses. A network analysis was performed to identify the correlations between the predictor variables for each biomarker regression model. We found high levels of G-CSF and MIP1 α in the dementia group when compared to the non-dementia group. IL-13, IP-10 and VEGF showed significant associations with A β 42 while IL-1ra and IL-4 had associations with pTau. IL-1ra, IL-9, IL-10, MCP-1 and MIP1 α were significantly associated with tTau. The network for A β 42 showed strong correlations between the cytokines VEGF, IP-10 and IL-13. In the Tau protein network, the pro-inflammatory cytokines MIP1 α and IL-9 had strongly correlation with the anti-inflammatory cytokines IL-4 and IL-10. Our

findings provide evidence that cytokines and its interactions may play a role in the inflammatory process linked to A β and Tau pathology. IL-1ra may primarily be compromised in Tau pathology, indicating that it could be a promising target biomarker to investigate Tau pathology.

Keywords: Alzheimer's disease, dementia, Cytokines, AD biomarkers, Neuroinflammation, cerebrospinal fluid, APOE

1. Introduction

Neuroinflammation is one of the main pathological features of Alzheimer's disease (AD). The hypothesis about AD-related neuroinflammation involves the inflammatory stimulus caused by amyloid beta (A β) oligomers which triggers reactivity of microglia in the central nervous system (CNS). Activated microglia secretes various pro-inflammatory cytokines, such as interleukin IL-1 β , IL-6, and tumor necrosis factor (TNF) and chemokines, such as IL-8, that recruit more microglia and astrocytes to the inflammatory site. Under normal circumstances, immune cells are recruited to the site of inflammation and contribute to the removal of the 'pathogen' with subsequent resolution of the inflammatory response. In AD, the overproduction of A β and hyperphosphorylated Tau protein dysregulates this immune clearance mechanism. Hence, the microglia and astrocytes recruited to the site of inflammation are unable to perform the clearance of the A β peptides effectively, resulting in an overproduction of pro-inflammatory cytokines and chemokines (Minter et al., 2016). Pro-inflammatory cytokines exacerbate microglia-mediated inflammation, leading to increased amyloid beta accumulation. Chemokines are subsequently released, directing microglia to neuroinflammation and triggering local inflammation (Thakur et al., 2023).

Most studies on the pathology of AD focus on the individual study of the main neuropathological findings of the disease, A β and Tau (Blennow & Zetterberg, 2018; Gouras et al., 2015; Mandelkow & Mandelkow, 1998; Tiwari et al., 2019). Nevertheless, AD is accompanied by other pathological processes such as inflammation (Calsolaro & Edison, 2016; Heneka & O'banion, 2007; Heneka et al., 2015), which contributes to maintaining the inflammatory state of the brain. Cytokines have a crucial role modulating the inflammatory process. Associations were observed between CSF IL-8 levels and CSF A β 42 levels. CSF levels of macrophage inflammatory protein 1- β (MIP1 β), interferon-gamma inducible protein (IP-10) and IL8 were associated with high CSF phosphorylated Tau (pTau) levels and, monocyte chemotactic protein 1 (MCP-1) was able to predict pTau and total Tau (tTau) values (Bettcher et al., 2018). In addition, high CSF IL-15 levels were associated with high pTau and tTau levels in A β 42 biomarker-positive patients (Janelidze et al., 2018).

Several studies reporting the relationships between AD biomarkers and cytokines have been published (Aksnes et al., 2021; Bettcher et al., 2018; Domingues et al., 2017; Janelidze et al., 2018). Studies evaluating cytokines in CSF are controversial and divided, which makes it a complex field. Difficulties remain in understanding the role of cytokines in the production of AD biomarkers. The roles of the classic pro-inflammatory cytokines IL-1, IL-6 and TNF α in AD are well studied (Azizi & Mirshafiey, 2012; Ng et al., 2018; Wang et al., 2015), but other cytokines from the immune response also play important roles in AD related neuroinflammatory processes (de Paula et al., 2013; Domingues et al., 2017; Wojcieszak et al., 2022). Therefore, a multimarker approach is needed to understand and predict the progression of AD pathogenesis. In addition, these phenomena need to be studied in different populations around the World. In this study, we aimed to analyze the relationships between cytokines and the main AD biomarkers as well as possible

cytokine correlations in a sample of Brazilian older adults to evaluate the mechanisms involved in the neuroinflammation of AD.

2. Methods

2.1 Subjects

The present study recruited Brazilian older adults, both men and women, with cognitive complain from Cog aging study, between March 2015 and February 2024. The participants of this study have been treated at the geriatric outpatient clinic at the Jenny de Andrade Faria Institute (JAFI) of the University Hospital of the Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Brazil., JAFI is the city reference Center for older adults, specialized for diagnosis and treatment of dementia and frail older adults. Individuals without cognitive impairment were enrolled from the Orthopedic Clinic of the Hospital da Polícia Militar de Minas Gerais, Brazil.

All participants underwent the same research protocol, which consisted of an assessment of sociodemographic characteristics, medical comorbidities, medication, lifestyle habits, medical history and memory complaints. The cognitive assessment protocol included the following instruments: Mini-Mental State Examination (MMSE) (Bertolucci et al., 1994), Clinical Dementia Rating Scale (Morris, 1993), Verbal Fluency Test (Nitrini et al., 1994), CERAD battery word list (Bertolucci et al., 2001), Brief Cognitive Screening (Nitrini et al., 1994), clock drawing test (Shulman, 2000), Neuropsychiatric Inventory (Cummings et al., 1994), functional activities questionnaire (Pfeffer et al., 1982), diagnostic criteria for depression (DSM-5) (American Psychiatric Association, 2014), Geriatric Depression Scale 15 items version (GDS) (Almeida & Almeida, 1999). Participants were also assessed by a neuropsychological battery consisted of tests and questionnaires validated to Brazilian older adults (de Paula et al, 2013).

Individuals with cognitive impairment also underwent a neuropsychological assessment and have been followed at the same Center for two or more years. The applied neuropsychological battery was previously validated for assessment of older adults with low educational levels, heterogeneous cognitive backgrounds and for use in Brazilian older adults. The cut-off points were based on individuals' educational level (de Paula et al., 2013). These participants also underwent laboratory exams and neuroimaging, computerized tomography (CT) and/or nuclear magnetic resonance imaging (MRI), in order to exclude other dementia etiologies and to support AD diagnosis.

Probable AD dementia (ADD) was diagnosed according to the criteria of McKhann et al. (2011) (McKhann et al., 2011). ADD participants were classified based in Clinical Dementia Rating (CDR) as CDR 1. Amnesic Mild Cognitive Impairment (aMCI) was diagnosed according to DSM-5 criteria (American Psychiatric Association, 2014). The inclusion criteria consisted of individuals aged 60 or over, with a clinical diagnosis of aMCI single or multiple domains, or with probable ADD or individuals with normal cognition (NC) who agreed to take part in the project and signed the consent form. The exclusion criteria were: cognitive impairment due to causes other than AD or depression, patients with moderate to severe mental disorders or cerebrovascular disorders, hydrocephalus and intracranial mass documented by CT scan or MRI, severe sensory impairment, which made it difficult to apply and respond to the cognitive assessment instruments, and contraindication for lumbar puncture for cerebrospinal fluid collection. NC individuals must have an indication of an elective Knee surgical approach. The participants had no cognitive complaints, which was confirmed by family members. They underwent the same cognitive assessment protocol. However, they did not undergo neuroimaging tests. CSF collection was performed immediately before spinal anesthesia at the time of elective knee surgery. A total of 108 individuals were selected and classified into two groups: CDR1 AD probable dementia group (n=54) and non-

dementia group (n=54) (33 aMCI; CDR 0.5 and 21 NC; CDR 0). This study was approved by the local Ethics Committee (CAAE 79354317.1.0000.5149) and all participants or legal guardians signed the consent form term

2.2 Biological sample collection and processing

Following clinical evaluation, all participants underwent blood and CSF collection. Whole blood samples were collected in ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) tubes and deoxyribonucleic acid (DNA) DNA extraction was performed using the saline method (Lahiri & Numberger, 1991). CSF was collected (6 ml) by lumbar puncture in polypropylene tubes (Engelborghs et al., 2017) and immediately transported to the laboratory. The CSF samples were centrifuged, at 3,000g, for 10 minutes at 4°C. Aliquots of 500 µL were made and stored at -80°C.

2.3 APOE genotyping

Apolipoprotein E (*APOE*) gene polymorphisms were genotyped by the real-time polymerase chain reaction (PCR) technique, previously described (Bicalho et al., 2013). We used the probes rs429358 (C__3084793_20) and rs7412 (C__9045973_10) from Applied Biosystems (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Allelic discrimination was performed to determine the *APOE* alleles (ϵ 2, ϵ 3, ϵ 4) for each participant, using Bio-Rad CFX Manager software.

2.4 Measurement of A β 42, pTau and tTau (AD biomarkers)

The CSF concentrations of A β 42, pTau181 and tTau were measured by Luminex xMap assay using the Human Amyloid Beta and Tau Magnetic Bead Panel (HNABTMAG-68K) (Millipore, Germany) kit by Luminex xMAP (Hansen et al., 2021). Biomarker concentrations were obtained using the Bio-Plex Manager™ version 6.2 software (Bio-Rad Laboratories, California, USA).

2.5 Cytokines measurements

The CSF cytokine levels were measured using Bio-Plex Pro Human Cytokine 27-plex Assay kit #M500KCAF0Y from BIO-RAD to measure the following cytokines: basic fibroblast growth factor (FGF basic), eotaxin, granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF), granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), interferon-gamma (IFN- γ), the interleukins (IL) IL-1 β , interleukin-1 receptor antagonist (IL-1ra), IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-17A, (IP-10), (MCP-1), macrophage inflammatory proteins (MIP)-1 α , (MIP)-1 β , platelet-derived growth factor (PDGF-BB), TNF- α , Regulated on Activation, Normal T Expressed and Secreted (RANTES) and vascular endothelial growth factor (VEGF). Experiments were performed according to the manufacturer's instructions using the Luminex xPONENT version 3.1 software (Merck Millipore, Massachusetts, USA). No imputation data was performed.

2.6 Statistical analysis

A descriptive analysis was performed, considering normality through the Kolmogorov-Smirnov normality test. Group comparisons were assessed with Mann-Whitney U-test and chi-square test. Significant associations between AD biomarkers and cytokines were further explored in multiple linear regression (MLR) analyses. Before analysis, cytokines and protein variables were log-transformed to normalize the skewness in its distribution. For model fitting, we did not perform data imputation and only cases with complete information for all participants were considered. The dependent variables were A β 42, pTau, and tTau levels. CSF Cytokines levels and adjustment variables such as age, formal education, sex, and APOE allele 4 carrier status were used as independent variables. For selection of variables, the method established by Hosmer and Lemeshow (2013) was followed. Adjusted univariate linear regressions were applied between each

cytokine and dependent variable. Cytokines with $p < .25$ were selected for the initial adjusted multivariate model. Cytokines with $p < .05$ were considered. After checking all variables, the effect of each variable not included in the initial model was tested to check whether the variable was significant in the presence of these variables (Bielefeldt et al., 2019; Hosmer & Lemeshow, 2013). Statistical analyses were performed using SPSS Version 22. To illustrate the correlations between the predictor variables of the A β 42 and Tau biomarker (pTau and tTau) regression model, a unidirectional network was performed based on non-parametric correlation estimates. For each regression model we created two network models: the first to illustrate the relationship between all the predictors, and the second, only for the significant correlations $p < .05$. The analyses were realized using the JASP software version 0.18.3.0.

3. Results

3.1 Characteristics of sample

This study included 108 participants, 54 non-demented and 54 with clinical ADD. Significant differences were found for formal education, MMSE, CSF A β 42, pTau, tTau levels and APOE ϵ 4 allele status. All participants of the dementia group were classified as CDR1, 61.11% of non-dementia group were CDR 0.5 and 38.88 were CDR 1 ($p = 0.010$). The dementia group also had a lower MMSE score ($p < .001$), 4 years of formal education with a larger interquartile interval ($p = .010$) compared to the non-dementia group. There was no difference between the groups for age and sex. Considering AD CSF biomarkers, the dementia group had lower CSF levels of A β 42 ($p = .021$) and higher levels of pTau ($p < .001$) and tTau ($p = .004$) compared to non-dementia group.

50.94% of the dementia group were carriers of at least one APOE ϵ 4 allele compared to 26.92% of the non-dementia group ($p=0.012$) (Table 1).

Table 1. Clinical and sociodemographic characteristics for non-demented and demented participants.

Variable	Non-dementia (n=54)	Dementia(n=54)	p-value
	Median (P25-P75)	Median (P25-P75)	
Sex (Women)^b	36 (66.66%)	33 (61.11%)	.548
Age (Years)^a	73 (69-80)	76 (72-80)	.108
Formal education (Years)^a	4 (2-6)	4 (4-12)	.010*
CDR 0	21(38.88%)	0 (0.0%)	
0.5	33(61.11%)	0 (0.0%)	
1	0 (0.0%)	54 (100%)	
MMSE^a	25 (23-28)	20,5 (18-24)	<0.001**
CSF Aβ42^a	677,24 (349,85-800,67)	433,47 (358,76-544,3)	.021*
CSF pTau^a	55,20 (40,48-71,71)	109,90 (67,43-130,15)	<0.001**
CSF tTau^a	965,44 (729,33-1357,22)	1248,45 (996,62-1554,22)	.004**
APOE allele ϵ4 carrier^b	14 (26.92%) _{χ}	27 (50.94%) _{ϕ}	.012*

Sex: was defined as man and woman; MMSE: Mini-Mental State Examination; CDR: Clinical Dementia Rating; CSF: cerebrospinal fluid; A β 42: amyloid beta protein 42; pTau: phosphorylated tau protein; tTau: total Tau; APOE: apolipoprotein ϵ 4 allele. All dementia patients were classified as CDR1. ^aMann-Whitney U-test; ^bChi-Square test. Non-dementia group (aMCI;CDR 0.5 and normal cognition; CDR 0); biomarkers concentrations (pg/mL)*p<-05; **p<.01

χ

: In the non-dementia group three participants were not genotyped

ϕ : In the dementia group one participant was not genotyped

3.2 Comparison of CSF cytokine levels between dementia and non-dementia groups.

The comparison between CSF cytokine levels for the dementia and non-dementia groups showed that G-CSF ($U=1742.0$; $p=.033$) and MIP1 α ($U=1805.5$; $p=.033$) were significantly increased in the participants with dementia compared to the non-dementia group (Figure 6). The results for comparisons of each cytokine level between the non-demented and demented groups can be seen in supplementary table 1 (ANEXO 1).

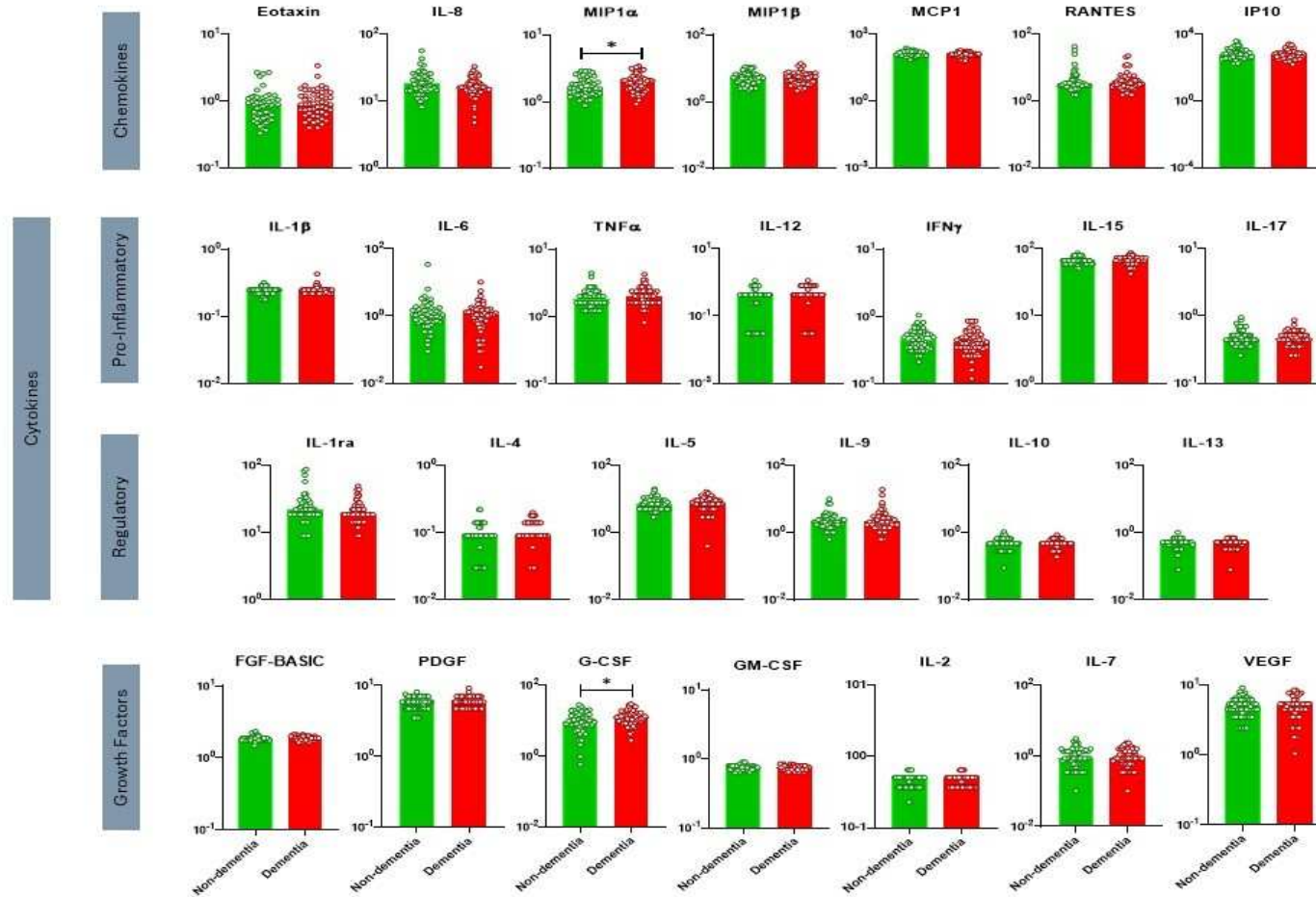


Figure 6. Box plot of comparisons of CSF cytokines levels between dementia and non-dementia groups. IL: interleukin; FGF basic: basic fibroblast growth factor; G-CSF: granulocyte colony-stimulating factor; GM-CSF: granulocyte-macrophage colony-stimulating factor; IFN-g: interferon-gamma; IP-10: Interferon-gamma inducible protein; MCP-1: monocyte chemotactic protein 1; MIP1 α : macrophage inflammatory protein-1 alpha; MIP1 β : macrophage inflammatory protein-1 beta; PDGF-BB: platelet-derived growth factor; TNF: tumor necrosis factor; VEGF: vascular endothelial growth factor. U Mann Whitney test; (*) p<0,05.

3.3 Associations between CSF A β 42 levels and cytokines

After performing the variable selection between A β 42 and cytokines and applying the multivariate model for the selected cytokines (Table 2), it was observed that IL-13, IP-10 and VEGF adjusted for age, formal education, sex and ϵ 4 allele carrier status have a significant association with A β 42 [F (7,95) = 4,190; $p < .001$; $R^2_a = .180$]. IL-13 ($\beta = .241$; $p = .012$) and IP-10 ($\beta = .247$; $p = .018$) showed a positive significant association, therefore increased CSF levels of IL-13 and IP-10 are associated with increased CSF levels of A β 42. On the other hand, VEGF presented a negative significant association with A β 42 ($\beta = -0.260$; $p = .009$), thus, decreased CSF levels of VEGF are associated with increased CSF levels of A β 42. VEGF has the largest effect size ($\beta = .260$) on A β 42 levels compared to IL-13 and IP-10. Analyzing the adjustment variables, APOE ϵ 4 allele status showed a significant negative association with A β 42 ($\beta = -.247$; $p = .010$), which suggests that carrying one or two APOE ϵ 4 alleles is associated with lower levels of A β 42.

3.4 Associations between CSF pTau levels and cytokines

We next examined the association between the pTau biomarker and cytokines. We found that IL-1ra and IL-4 adjusted for age, formal education, sex and APOE ϵ 4 allele status had significant associations with pTau [F (6,95) = 9,383; $p < .001$; $R^2_a = .332$]. IL-1ra showed a significant negative association ($\beta = -.207$; $p = .014$) with pTau, so high CSF levels of pTau are associated with CSF low levels of IL-1ra. In contrast, IL-4 showed a significant positive association ($\beta = .305$; $p < .01$) with pTau. Among cytokines, IL-4 had a larger effect size ($\beta = .305$) compared to IL-1ra. However, APOE ϵ 4 alleles had the largest effect size ($\beta = .488$; $p < .001$) on pTau levels among all variables (Table 2).

3.5 Associations between CSF tTau levels and cytokines

IL-1ra, IL-9, IL-10, MCP-1 and MIP1 α , adjusted for age, formal education, sex and APOE ϵ 4 allele status, have significant associations with tTau [$F(9.91) = 5.082$; $p < .001$; $R^2a = .269$]. IL-1ra ($\beta = -.259$; $p = .009$) (Table 2). IL-10 ($\beta = -.200$; $p = .042$) showed significant negative associations with tTau, consequently low CSF levels of IL-1ra and IL-10 were associated with high CSF levels of tTau. However, IL-9 ($\beta = .354$; $p < .001$), MCP-1 ($\beta = .207$; $p = .020$) and MIP1 α ($\beta = .235$; $p = .030$) maintained significant positive associations with pTau, suggesting that high CSF levels of IL-9, MCP-1 and MIP1 α are associated with high CSF levels of tTau. IL-9 ($\beta = .354$) was the cytokine with the largest effect size on tTau levels. In this case, no significant associations were found between adjustment variables and tTau (Table 2).

Table 2. Adjusted associations between CSF Alzheimer's disease biomarkers and cytokines.

Biomarker	Variable	B	SD	β	p-value
Aβ42	Constant	5.806	.700		<.001
	Age	-.002	.007	-.029	.766
	Formal Education	-.011	.009	-.109	.247
	Sex	.067	.104	.065	.519
	Allele ϵ 4	-.252	.096	-.247	.010
	IL-13	.272	.107	.241	.012
	IP-10	.194	.081	.247	.018
	VEGF	-.357	.134	-.260	.009
pTau	Constant	5.503	.665		<.001
	Age	.007	.006	.094	.275
	Formal Education	.013	.009	.126	.142
	Sex	.077	.088	.072	.382
	Allele ϵ 4	.516	.088	.488	<.001
	IL-4	.320	.088	.305	<.001
	IL-1ra	-.253	.101	-.207	.014

Table 2. Continued adjusted associations between CSF Alzheimer's disease biomarkers and cytokines.

Biomarker	Variable	B	SD	β	p-value
tTau	Constant	5.373	1.002		<.001
	Age	-.001	.006	-.009	.926
	Formal Education	.012	.008	.132	.150
	Sex	.048	.082	.052	.556
	Allele $\epsilon 4$	.142	.081	.154	.084
	IL-1ra	-.281	.105	-.259	.009**
	MCP-1	.399	.168	.207	.020*
	MIP1 α	.342	.155	.235	.030*
	IL-9	.291	.077	.354	<.001**
	IL-10	-.276	.133	-.200	.042*

B: regression slope or unstandardized coefficient; SD: standard deviation; β : standardized coefficient that indicates the effect of size; Sex: was defined as man and woman; A β 42: amyloid beta protein 42; pTau: phosphorylated tau protein; tTau: total Tau; IL: interleukin; IP-10: Interferon Gamma Induced Protein; MCP-1: monocyte chemoattractant protein-1; IL-1ra: interleukin-1 receptor antagonist; MIP-1 α : Macrophage inflammatory protein; VEGF: vascular endothelial growth factor; *p<.05; **p<.01

3.6 Network analysis for AD biomarkers

A network analysis was performed in order to identify the relationships between the predictive variables of the regression model for each biomarker. The left side represents the network with correlations including all the predictor variables (Fig. 7a and 7c) and right side the networks with only the variables with significant correlations (Fig. 7b and 7d). The network for the A β 42 predictors showed that IP-10 was correlated strongly and positively with VEGF and sex, and negatively with formal education. VEGF was correlated strongly and positively with IP-10 and IL-

13. Formal education and age also showed strong correlation. The APOE ϵ 4 allele has no statistically significant correlation (Fig. 7b). Correlations values are available in supplementary table 2 (ANEXO 1).

The predictive variables of both pTau and tTau were integrated in a single network analysis (Fig. 7c). The results showed that pro-inflammatory cytokine MIP1 α showed strong significant positive correlation with pro-inflammatory cytokine IL-9 and with the three anti-inflammatory cytokines IL-10, IL-4 and IL-1ra and also with age. IL-9 also showed strong significant correlation with IL-10, IL-4 and moderate correlation with age. IL-10 and IL-4 maintained strong positive correlation between them. Age was correlated with formal education. MCP-1, sex and APOE ϵ 4 allele presented no significant correlations (Fig. 7d). Correlations values are available in the supplementary table 3 (ANEXO 1).

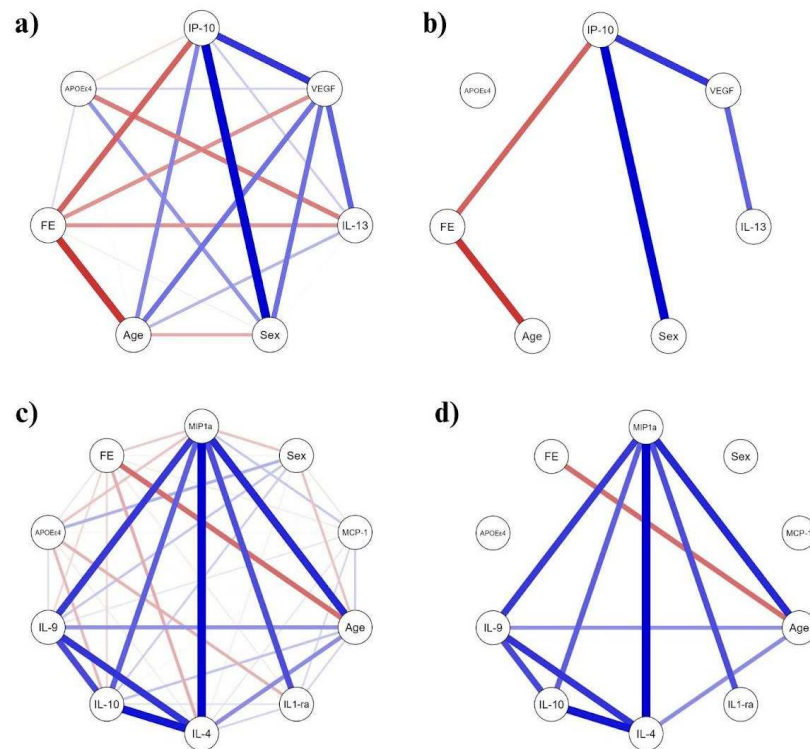


Figure 7. Network analyses for AD biomarkers. **7a)** All AB42 predictor variables; **7b)** Significant A β 42 predictor variables; **7c)** All Tau predictor variables; **7d)** Significant Tau predictor variables. Abbreviations: AD: Alzheimer's Disease; A β 42: Amyloid beta 42; IL: Interleukin; IP-10: Interferon-gamma inducible protein; VEGF: vascular endothelial growth factor; IL-13: Interleukin 13; FE: Formal Education; APOE ϵ 4: Apolipoprotein E ϵ 4 allele; MIP1a: Macrophage inflammatory protein-1 alpha; MCP1: Monocyte chemotactic protein 1. Lines indicate correlations, and the width represents the strength of correlation (the wider the line the stronger is the correlation). Blue lines indicate positive correlations, while red lines indicate negative correlations.

4. Discussion

This study investigated the associations between cytokines and AD-specific biomarkers in CSF in a sample of Brazilians older adults with ADD and without dementia. We found high levels of G-CSF and MIP1 α in the dementia group when compared to the non-dementia group. IL-13, IP-10 and VEGF showed significant associations with A β 42 while IL-1ra and IL-4 maintained significant associations with pTau. IL-1ra, IL-9, IL-10, MCP-1 and MIP1 α were significantly associated with tTau. APOE ϵ 4 allele carrier status was significantly associated with A β 42 and pTau.

Our sociodemographic results showed a controversial finding about formal education among the dementia and non-dementia groups. They possess the same value as the median of formal education (4 years), while the interquartile interval of the dementia group possessed a greater dispersion, which was not to be expected. Our result is controversial in relation to literature. Previous studies have reported that people with dementia have lower levels of education or have no differences with cognitive unimpaired individuals (Taipa et al., 2019; Gertje et al., 2023). Although Brazil has advanced in the educational level in recent years, it is heterogeneous and there is great inequality between the public and private schools and there has been a modification of education over time. It's probable that our sample size is too small for evaluating this difference.

The analyses of cytokine levels comparisons showed that in individuals clinically diagnosed with ADD, levels of G-CSF and MIP1 α were increased compared to non-dementia group. G-CSF is a hematopoietic growth factor required for proliferation, maturation, and differentiation of hematopoietic precursors of neutrophil granulocytes. It is recognized by significantly enhancing the microglial A β clearance and the neurogenesis in neural stem cells, increasing neuronal Neprilysin activity and contributing to decreasing the amount of A β (Doi et al., 2014). In line with

our results, Taipa et al. (2019) also observed increased CSF G-CSF levels in AD compared to normal cognition individuals (Taipa et al., 2019). By contrast, Laske et al. (2009) observed lower G-CSF plasma levels in 50 early AD patients in comparison with 50 age-matched healthy controls. They also observed a significant inverse correlation with CSF A β levels. However, these results were observed in plasma. We hypothesize that G-CSF is increased in early ADD by the need of increased A β 42 clearance. Strong increases in MIP1 α and MIP1 β concentrations, produced by astrocytes, have been reported at the early stages of A β deposition (Wojcieszak et al., 2022). Activation of the MIP1 α /CCR5 (C-C chemokine receptor 5) signaling pathway is one of the earliest events after injection of A β 40, representing an important signal for the accumulation of activated glial cells as well as inflammatory response, synaptic dysfunction, and cognitive failure (Passos et al., 2009) and higher MIP1 α levels could be associated with the inflammatory response related to microglia reactivity generated by A β in initial stages of AD.

IL-13 and IP-10 were positively associated with A β 42, while VEGF was negatively associated with A β 42. A β peptides contribute to the reactivity of glial cells such as microglia and astrocytes resulting in a pro-inflammatory response, stimulating the synthesis and release of neuroinflammatory factors, such as cytokines, interleukins and chemokines (Pasqualetti et al., 2015). IL-13, an anti-inflammatory cytokine, has neuroprotective effects and controls brain inflammation by inhibiting expression of pro-inflammatory cytokines. This cytokine is also related to the microglia M2 phenotype reactivity through the signal transducer and activator of transcription 6 (STAT6) (Gordon et al., 2010). It was observed that serum IL-13 levels were significantly higher in AD compared to controls (Kaiyrlykyzy et al., 2022) and in postmortem tissues from the mid-temporal cortex of AD individuals (Chai et al., 2023). Considering IP-10, it was observed that the CSF levels of this pro-inflammatory cytokine were higher in MCI and ADD

individuals compared to age-matched control subjects (Galimberti et al., 2006). In addition, two meta-analyses studies revealed that plasma/serum IP-10 levels were significantly elevated in individuals with AD compared to health controls (Lai et al., 2017; Zhou et al., 2023), contradicted by a meta-analyses study conducted by Wang et al. (2023), that demonstrate increases of CSF IP-10 levels in AD. Astrocytes stimulated by A β release IP-10 (Lai et al., 2013). Jordy et al. (2023) reported significantly elevated IP-10 levels released by astrocytic in the cortex and hippocampus of A β 42 amyloid pathology model mice (Jorfi et al., 2023). Our sample includes AD CDR1 stages where A β forms, oligomers (A β o) are abundant (Blömeke et al., 2024) and considered the most toxic A β species in AD and key activators of microglia (Hong et al., 2018). Our results suggest that the association between IL-13 and IP-10 and A β 42 could be related to a compensatory mechanism against A β .

VEGF plays a role in both vascular and neuronal function, promotes neurogenesis, neuroprotection and glial growth, reduces cognitive deficits and reverses memory defects (Garcia et al., 2014). It can aggregate in senile plaques, explaining neuronal and vascular dysfunction (Tang et al., 2013; Wang et al., 2007), and promotes microglial phagocytosis of A β o (de Gea et al., 2023). Tarkowski et al. (2002) observed that CSF VEGF was elevated in AD individuals (Tarkowski et al., 2002). In addition, a high CSF VEGF level was associated with better memory performance in the presence of a low A β 42 level (Hohman et al., 2015). In our sample, VEGF is elevated in the AD group, which could suggest a VEGF role in A β clearance in order to improve neuronal and vascular functions.

Considering pTau biomarker, we found positive association with IL4 and negative association with IL-1ra. IL-4 is known for its anti-inflammatory effects and is related to regulation of microglia reactivity in the CNS and contributes to memory and learning performances (Azizi & Mirshafiey,

2012). Microglia stimulation with cytokines such as IL-4 or IL-13 results in anti-inflammatory and pro-repair microglia M2 phenotype (Gordon et al., 2010). In AD, IL-4 exerts protective effects, inhibiting blockade of A β -induced autophagy flux (Tang et al., 2019) and induces clearance of A β o (Shimizu et al., 2008). In an animal model, Chakrabarty et al. (2012) reported that IL-4 expression did not affect pTau levels. More studies are needed to unravel the relationship between IL-4 and Tau protein in AD pathology. However, we suggest that the increased release of this cytokine promotes the reactivity of the M2 microglia to contribute to the processes of phagocytosis as possible an anti-inflammatory response.

Interestingly, in our study, IL-1ra showed negative associations with pTau and tTau. IL-1ra is produced and expressed in monocytes/macrophages, participates in the regulation of IL-1 activity, and protects cells against the IL-1 overstimulation (Wakabayashi et al., 1991). The harmful effects of IL-1 are known to include disrupting normal assembly of microtubules and stabilization of the axon, resulting in synapses loss. (Li et al., 2003; Sheng et al., 2001). IL-1 β also, increase tau phosphorylation mediated by the activation of mitogen-activated protein kinase (p38-MAPK) pathway (Li et al., 2003), that is one of the kinase pathways that regulates the production of IL-1 β and TNF α (Bachstetter et al., 2010) and the activation of the the NOD-like receptor family pyrin domain-containing 3 (NLRP3) inflammasome. In AD, the NLRP3 activation promoting increased division and activity of caspase-1 and the release of IL-1 β (Heneka et al., 2018), induces hyperphosphorylation and Tau aggregation through modulation of Tau kinases and phosphatases (Ising et al. 2019). The release of IL-1 β by microglia in abnormal conditions also contributes to the activation of the inflammasome, which feeds the vicious neuroinflammatory cycle that facilitates neurodegeneration involving the Tau protein (Minter et al., 2016). Li et al. (2003) reported that IL-1ra as well as anti-IL-1 β antibody attenuated the influence of activated microglia on neuronal tau.

Increased CSF levels of IL-1ra were found in AD patients compared to NC individuals (Taipa et al., 2019) and increased plasma levels of IL-1ra were found in cognitive impairment (AD and MCI) subjects compared to NC individuals (Italiani et al., 2018; Liang et al., 2020). In AD, IL-1ra has been found to be expressed in globular deposits in senile plaques and in extracellular neurofibrillary tangles (Yasuhara et al., 1997) and uncontrolled inflammation has been associated with an insufficient amount of IL-1ra to regulate IL-1 activity (Dinarello et al., 2012; Kutukculer et al., 2019). Therefore, we suggest that reduced IL-1ra levels associated with Tau pathology, related to chronic inflammation, could indicate an impaired anti-inflammatory response in the AD process associated with IL-1 overexpression. However, the mechanisms involved in reducing IL-1ra levels and Tau pathology are not fully understood.

Other four CSF cytokines, MCP-1, MIP1 α , IL-9 and IL-10, were associated with tTau levels. MCP-1 contributes to migration and accumulation of peripheral immune cells and microglia at the damaged CNS sites and promotes transition from resting to activated microglia and loss of blood-brain barrier (BBB) integrity, facilitating the infiltration of peripheral immune cells into the CNS. MIP1 α mediates the targeted and tissue-specific migration of leukocytes to inflammation sites (Wojcieszak et al., 2022). In an animal model of tau pathology, MCP-1 overexpression was associated with exacerbation of tau pathology, observed as a general increase in tTau levels in the hippocampus (Joly-Amado et al., 2020). Regarding MIP1 α , studies in animal models showed that tau pathology is associated with an early increase in MIP1 α followed by infiltration of T cells in the hippocampus, which promotes spatial memory deficits triggered by tau (Laurent et al., 2017). Recent studies have shown that CD8⁺ T cells recruited by microglia are in fact responsible for tau-mediated neurodegeneration (Chen et al., 2023). We suggest that associations between these chemokines and tTau could indicate their role in tau pathology and the neurodegeneration process

is possibly linked to microglial activation and migration of T immune cells. However, the exact mechanism of how chemokines contribute to tau pathology has not yet been fully elucidated.

Few studies have linked IL-9 and IL-10 with AD pathology. IL-9 has a pro-inflammatory role and mediates inflammatory responses through the Janus kinase/signal transducer and activator of transcription (JAK/STAT) (Fontaine et al. 2008) signaling pathway. Wharton et al. (2019) found higher levels of IL-9 in CSF in African Americans with AD compared to AD Caucasians but it was not associated with tau pathology (Wharton et al., 2019). Considering IL-10 and its anti-inflammatory role, Weston et al. (2021) demonstrated that IL-10 deficiency exacerbates inflammation and induced tau pathology (Weston et al., 2021). However, cultured rat microglia exposed to Tau, increases IL10 levels (Wang et al. 2013). There is scarce and opposite literature related to these cytokines associated with tTau being difficult, the comprehension of its role in Tau pathology. Most studies have focused on the inflammation process related to amyloid pathology, but there is already evidence that inflammation is especially related to tau pathology (Chen & Yu, 2023; Laurent et al., 2017).

The network analysis for the predictive variables for A β 42, showed that VEGF had a strong and positively correlation with IP-10 and IL-13. VEGF improves the expression of chemokines and induces IP-10 overexpression (Boulday and al., 2006), while the IP-10 release inhibits the VEGF and physiological processes in which VEGF participates such as angiogenesis (Yates-Binder et al., 2012). On the other hand, IL-13 is able to induce the release of VEGF, enhancing its activity (Corne et al., 2000). In our regression model, the associations between these cytokines and A β 42 suggested a compensatory role of the inflammatory response against A β 42 and a similar result was observed in the network analysis that showed that these cytokines correlations positively, indicating a modulation in their activities. Both, VEGF and IL-13, could be acting to attenuate the inflammation

process, while the production of IP-10 would act by to favor inflammation, as reported by Jorfi et al. (2023) in an animal model of amyloid pathology.

We find a robust positive correlation between pro-inflammatory cytokine IL-9 and pro-inflammatory chemokine MIP1 α in the Tau biomarker network. Additionally, the network made it possible for us to see that these two anti-inflammatory cytokines had positive correlation with IL-4 and IL-10. In addition, IL-1ra had correlation with MIP1 α . Laurent et al. (2017) observed in animal model that the pathology of the Tau protein is associated with increases in the concentration of MIP1 α and a subsequent greater T cell infiltration in the hippocampal region that promoted memory impairments and the neurodegenerative process (Laurent et al., 2017). The anti-inflammatory cytokine IL-4 has been reported as an important regulator of the activity and production of MIP1 α (Standiford et al., 1993) and the study of Monteyne et al. (1997) showed that IL-4 regulates and potentiates the expression of IL-9 (Monteyne et al., 1997). Berkman et al. (1995) observed that the anti-inflammatory cytokine IL-10 can regulate the effects on cells, such as activated T lymphocytes, by inhibiting the expression of MIP1 α in monocytes and macrophages (Berkman and al., 1995), and according to Vilkeviciute et al. (2021), IL-9 can cause the expression of IL-10 (Vilkeviciute et al., 2021). The positive correlation between anti-inflammatory cytokines (IL-4 and IL-10) and pro-inflammatory MIP1 α and IL-9 could suggest a regulatory role of these cytokines against the neuroinflammatory effects conducted by MIP 1 α and IL-9 in AD pathology. These results could indicate an inflammatory cycle in which cytokines amplify each other, exacerbating and modulating the inflammatory response.

We also find a strong positive correlation between the pro-inflammatory cytokines MIP1 α , IL-9 and age, which can be explained due to *inflammaging*, the low-degree chronic inflammation that characterizes aging. Inflammaging is associated with a decline in immune system function and an

increase in the production of pro-inflammatory cytokines. Pro-inflammatory cytokines significantly contribute to the phenomenon of inflammatory aging in healthy older people in addition to playing an important role in age-related diseases (Franceschi et al., 2014).

Our study was able to observe that pro and anti-inflammatory cytokines are related to AD CSF biomarkers. This study is pioneering in the research of the relationship between cytokines and biomarkers of AD in the Brazilian population. It was possible to evaluate the associations between cytokines and biomarkers separately, even in the presence of complete AD pathology in humans. Future longitudinal studies could investigate the cytokine association with each biological stage of AD together with cognitive variables, and thus be able to address the clinical and biological fields that compose the disease. Studies in animal models could go deeper into the mechanisms and signaling pathways that involve cytokines and the AD pathologies, especially in Tau pathology.

We had some limitations, mainly with the small sample size. The number of samples in the different subgroups was small, generating limitations in statistical power. Nevertheless, it should be taken into account that CSF sampling is difficult to access due to the invasive nature of the procedure. Our study has a cross-sectional design, which limits causal-effect conclusions. Longitudinal samples are needed to better interpret the relationships between neuroinflammatory markers and AD biomarkers.

5. Conclusions

In summary, our results support that cytokines are involved in AD pathology. Different cytokines, other than the classical ones, participate in the inflammatory process associated with A β and Tau pathology. Our principal findings indicate that IL-1ra activity may be compromised in Tau pathophysiology and could potentially serve as a biomarker for this condition.

5. References

- Almeida, O. P., & Almeida, S. A., 1999. Confiabilidade da versão brasileira da Escala de Depressão em Geriatria (GDS) versão reduzida. *Arquivos de Neuro-Psiquiatria*. 57(2B), 421–426.
<https://doi.org/10.1590/S0004-282X1999000300013>
- American Psychiatric Association, A. *The Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders. DSM-V* (5^a Ed), 5a Ed. Arlington, VA, American Psychiatric Association, 2014
- Aksnes, M., Aass, H. C. D., Tiiman, A., Edwin, T. H., Terenius, L., Bogdanović, N., Vukojević, V., & Knapskog, A.-B., 2021. Associations of cerebrospinal fluid amyloidogenic nanoplaques with cytokines in Alzheimer's disease. *Translational Neurodegeneration* . 10(1), 18.
<https://doi.org/10.1186/s40035-021-00244-3>
- Azizi, G., & Mirshafiey, A., 2012. The potential role of proinflammatory and antiinflammatory cytokines in Alzheimer's disease pathogenesis. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*. 34(6), 881–895. <https://doi.org/10.3109/08923973.2012.705292>
- Bachstetter, Adam D, and Linda J Van Eldik., 2010. The P38 MAP Kinase Family as Regulators of Proinflammatory Cytokine Production in Degenerative Diseases of the CNS. *Aging and Disease* 1 (3) :199–211. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22720195>.
- Berkman, N, M John, G Roesems, P J Jose, P J Barnes, and K F Chung., 1995. Inhibition of Macrophage Inflammatory Protein-1 Alpha Expression by IL-10. Differential Sensitivities in Human Blood Monocytes and Alveolar Macrophages. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 155 (9): 4412–18. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7594602>.
- Bertolucci, Okamoto, I. H., Brucki, S. M. D., Siviero, M. O., Toniolo Neto, J., & Ramos, L. R., 2001. Applicability of the CERAD neuropsychological battery to Brazilian elderly. *Arquivos*

de Neuro-Psiquiatria. 59 (3A), 532–536. <https://doi.org/10.1590/S0004-282X2001000400009>

Bertolucci, P. H., Brucki, S. M., Campacci, S. R., & Juliano, Y., 1994. The Mini-Mental State Examination in a general population: impact of educational status. *Arquivos de Neuro-Psiquiatria*. 52(1), 1–7. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8002795>

Bettcher, B. M., Johnson, S. C., Fitch, R., Casaletto, K. B., Heffernan, K. S., Asthana, S., Zetterberg, H., Blennow, K., Carlsson, C. M., Neuhaus, J., Bendlin, B. B., & Kramer, J. H., 2018. Cerebrospinal Fluid and Plasma Levels of Inflammation Differentially Relate to CNS Markers of Alzheimer’s Disease Pathology and Neuronal Damage. *Journal of Alzheimer’s Disease*. 62(1), 385–397. <https://doi.org/10.3233/JAD-170602>

Blennow, K., & Zetterberg, H., 2018. Biomarkers for Alzheimer’s disease: current status and prospects for the future. *Journal of Internal Medicine*. 284(6), 643–663. <https://doi.org/10.1111/joim.12816>

Blömeke, L., Rehn, F., Kraemer-Schulien, V., Kutzsche, J., Pils, M., Bujnicki, T., Lewczuk, P., Kornhuber, J., Freiesleben, S. D., Schneider, L., Preis, L., Priller, J., Spruth, E. J., Altenstein, S., Lohse, A., Schneider, A., Fliessbach, K., Wiltfang, J., Hansen, N., ... Peters, O., 2024. Aβ oligomers peak in early stages of Alzheimer’s disease preceding tau pathology. *Alzheimer’s & Dementia: Diagnosis, Assessment & Disease Monitoring*. 16(2). <https://doi.org/10.1002/dad2.12589>

Bicalho, Maria Aparecida Camargos, Fausto Aloísio Pimenta, Luciana Bastos-Rodrigues, Érika de Oliveira Hansen, Samara Canguçu Neves, Marina Melo, Daniela Valadão Rosa... Luiz De Marc., 2013. Sociodemographic Characteristics, Clinical Factors, and Genetic

- Polymorphisms Associated with Alzheimer's Disease. *International Journal of Geriatric Psychiatry* 28 (6): 640–46. <https://doi.org/10.1002/gps.3875>.
- Bielefeldt, V., Boff, R., & Castello Branco, A., 2019. Statistical modeling: questions you have always wanted to ask but never had the courage to. *Clinical and Biomedical Research*. <https://doi.org/https://doi.org/10.22491/2357-9730.98944>
- Boulday, Gwénola, Zdenka Haskova, Marlies E. J. Reinders, Soumitro Pal, and David M. Briscoe., 2006. Vascular Endothelial Growth Factor-Induced Signaling Pathways in Endothelial Cells That Mediate Overexpression of the Chemokine IFN- γ -Inducible Protein of 10 KDa In Vitro and In Vivo. *The Journal of Immunology* 176 (5): 3098–3107. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.176.5.3098>.
- Calsolaro, V., & Edison, P., 2016. Neuroinflammation in Alzheimer's disease: Current evidence and future directions. *Alzheimer's and Dementia*. 12(6), 719–732. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2016.02.010>
- Chai, Y. L., Lee, J. H., Chong, J. R., Ballard, C., Francis, P. T., Kennedy, B. K., Arumugam, T. V., Chen, C. P., Aarsland, D., & Lai, M. K. P., 2023. Inflammatory panel cytokines are elevated in the neocortex of late-stage Alzheimer's disease but not Lewy body dementias. *Journal of Neuroinflammation*. 20(1), 111. <https://doi.org/10.1186/s12974-023-02789-8>
- Chakrabarty, P., Tianbai, L., Herring, A., Ceballos-Diaz, C., Das, P., & Golde, T. E., 2012. Hippocampal expression of murine IL-4 results in exacerbation of amyloid deposition. *Molecular Neurodegeneration*. 7(1), 36. <https://doi.org/10.1186/1750-1326-7-36>
- Chen, X., Firulyova, M., Manis, M., Herz, J., Smirnov, I., Aladyeva, E., Wang, C., Bao, X., Finn, M. B., Hu, H., Shchukina, I., Kim, M. W., Yuede, C. M., Kipnis, J., Artyomov, M. N., Ulrich,

- J. D., & Holtzman, D. M., 2023. Microglia-mediated T cell infiltration drives neurodegeneration in tauopathy. *Nature*. 615(7953), 668–677. <https://doi.org/10.1038/s41586-023-05788-0>
- Chen, & Yu, Y., 2023. Tau and neuroinflammation in Alzheimer's disease: interplay mechanisms and clinical translation. *Journal of Neuroinflammation*, 20(1), 165. <https://doi.org/10.1186/s12974-023-02853-3>
- Colodner, K. J.; Feany, M. B., 2010. Glial Fibrillary Tangles and JAK/STAT-Mediated Glial and Neuronal Cell Death in a Drosophila Model of Glial Tauopathy. *The Journal of Neuroscience*, v. 30, n. 48, p. 16102–16113 doi: 10.1523/JNEUROSCI.2491-10.2010
- Corne, Jonathan, Geoffrey Chupp, Chun Guen Lee, Robert J. Homer, Zhou Zhu, Qingsheng Chen, Bing Ma, et al., 2000. IL-13 Stimulates Vascular Endothelial Cell Growth Factor and Protects against Hyperoxic Acute Lung Injury. *Journal of Clinical Investigation* 106 (6): 783–91. <https://doi.org/10.1172/JCI9674>.
- Cummings, J. L., Mega, M., Gray, K., Rosenberg-Thompson, S., Carusi, D. A., & Gornbein, J., 1994. The Neuropsychiatric Inventory: Comprehensive assessment of psychopathology in dementia. *Neurology*. 44(12), 2308–2308. <https://doi.org/10.1212/WNL.44.12.2308>
- de Gea, P., Benkeder, S., Bouvet, P., Aimard, M., Chounlamountri, N., Honnorat, J., Do, L. D., & Meissirel, C., 2023. VEGF controls microglial phagocytic response to amyloid- β . *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 17. <https://doi.org/10.3389/fncel.2023.1264402>
- de Paula, J. J., Bertola, L., Ávila, R. T., Moreira, L., Coutinho, G., de Moraes, E. N., Bicalho, M. A. C., Nicolato, R., Diniz, B. S., & Malloy-Diniz, L. F., 2013. Clinical Applicability and Cutoff Values for an Unstructured Neuropsychological Assessment Protocol for Older Adults

with Low Formal Education. *PLoS ONE*. 8(9), e73167.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073167>

Dinareello, C. A., Simon, A., & van der Meer, J. W. M., 2012. Treating inflammation by blocking interleukin-1 in a broad spectrum of diseases. *Nature Reviews Drug Discovery*. 11(8), 633–652. <https://doi.org/10.1038/nrd3800>

Doi, Y., Takeuchi, H., Mizoguchi, H., Fukumoto, K., Horiuchi, H., Jin, S., Kawanokuchi, J., Parajuli, B., Sonobe, Y., Mizuno, T., & Suzumura, A., 2014. Granulocyte-Colony Stimulating Factor Attenuates Oligomeric Amyloid β Neurotoxicity by Activation of Neprilysin. *PLoS ONE*. 9(7), e103458. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0103458>

Domingues, C., da Cruz e Silva, O. A. B., & Henriques, A. G., 2017. Impact of Cytokines and Chemokines on Alzheimer's Disease Neuropathological Hallmarks. *Current Alzheimer Research*. 14(8), 870-882. <https://doi.org/10.2174/1567205014666170317113606>

Engelborghs, S., Niemantsverdriet, E., Struyfs, H., Blennow, K., Brouns, R., Comabella, M., Dujmovic, I., Flier, W., Frölich, L., Galimberti, D., Gnanapavan, S., Hemmer, B., Hoff, E., Hort, J., Iacobaeus, E., Ingelsson, M., Jan de Jong, F., Jonsson, M., Khalil, M., ... Teunissen, C. E., 2017. Consensus guidelines for lumbar puncture in patients with neurological diseases. *Alzheimer's & Dementia: Diagnosis, Assessment & Disease Monitoring*. 8(1), 111–126. <https://doi.org/10.1016/j.dadm.2017.04.007>

Fontaine, R H, O Cases, V Lelièvre, B Mesplès, J-C Renauld, G Loron, V Degos, P Dournaud, O Baud, and P Gressens., 2008. IL-9/IL-9 Receptor Signaling Selectively Protects Cortical Neurons against Developmental Apoptosis. *Cell Death & Differentiation* 15 (10): 1542–52. <https://doi.org/10.1038/cdd.2008.79>.

- Franceschi, C., and J. Campisi., 2014. Chronic Inflammation (Inflammaging) and Its Potential Contribution to Age-Associated Diseases. *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences* 69 (Suppl 1): S4–9. <https://doi.org/10.1093/gerona/glu057>.
- Galimberti, D., Schoonenboom, N., Scheltens, P., Fenoglio, C., Bouwman, F., Venturelli, E., Guidi, I., Blankenstein, M. A., Bresolin, N., & Scarpini, E., 2006. Intrathecal Chemokine Synthesis in Mild Cognitive Impairment and Alzheimer Disease. *Archives of Neurology*. 63(4), 538. <https://doi.org/10.1001/archneur.63.4.538>
- Garcia, K. O., Ornellas, F. L. M., Martin, P. K. M., Patti, C. L., Mello, L. E., Frussa-Filho, R., Han, S. W., & Longo, B. M., 2014. Therapeutic effects of the transplantation of VEGF overexpressing bone marrow mesenchymal stem cells in the hippocampus of murine model of Alzheimer's disease. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 6. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2014.00030>
- Gertje, Eske Christiane, Shorena Janelidze, Danielle van Westen, Nicholas Cullen, Erik Stomrud, Sebastian Palmqvist, Oskar Hansson, and Niklas Mattsson-Carlsson., 2023. Associations Between CSF Markers of Inflammation, White Matter Lesions, and Cognitive Decline in Individuals Without Dementia. *Neurology* 100 (17). <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000207113>.
- Gouras, G. K., Olsson, T. T., & Hansson, O., 2015. β -amyloid Peptides and Amyloid Plaques in Alzheimer's Disease. *Neurotherapeutics*. 12(1), 3–11. <https://doi.org/10.1007/s13311-014-0313-y>
- Gordon, Siamon, and Fernando O. Martinez., 2010. Alternative Activation of Macrophages:

Mechanism and Functions. *Immunity* 32 (5): 593–604.
<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2010.05.007>.

Hansen, Erika Oliveira, Natalia Silva Dias, Ivonne Carolina Bolaños Burgos, Monica Vieira Costa, Andréa Teixeira Carvalho, Antonio Lucio Teixeira, Izabela Guimarães Barbosa, ...Maria Aparecida Camargos Bicalho., 2021. Millipore XMap® Luminex (HATMAG-68K): An Accurate and Cost-Effective Method for Evaluating Alzheimer's Biomarkers in Cerebrospinal Fluid. *Frontiers in Psychiatry* 12 (August).
<https://doi.org/10.3389/fpsyt.2021.716686>.

Heneka, M., & O'banion, M., 2007. Inflammatory processes in Alzheimer's disease. *Journal of Neuroimmunology*. 184(1–2), 69–91. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2006.11.017>

Heneka, M. T., Carson, M. J., Khoury, J. El, Landreth, G. E., Brosseon, F., Feinstein, D. L., Jacobs, A. H., Wyss-Coray, T., Vitorica, J., Ransohoff, R. M., Herrup, K., Frautschy, S. A., Finsen, B., Brown, G. C., Verkhratsky, A., Yamanaka, K., Koistinaho, J., Latz, E., Halle, A., Kummer, M. P., 2015. Neuroinflammation in Alzheimer's disease. *The Lancet Neurology*. 14(4), 388–405. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(15\)70016-5](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(15)70016-5)

Heneka, Michael T., Róisín M. McManus, and Eicke Latz., 2018. Inflammasome Signalling in Brain Function and Neurodegenerative Disease. *Nature Reviews Neuroscience* 19 (10): 610–21. <https://doi.org/10.1038/s41583-018-0055-7>.

Hohman, T. J., Bell, S. P., & Jefferson, A. L., 2015. The Role of Vascular Endothelial Growth Factor in Neurodegeneration and Cognitive Decline. *JAMA Neurology*. 72(5), 520-529.
<https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2014.4761>

- Hong, W., Wang, Z., Liu, W., O'Malley, T. T., Jin, M., Willem, M., Haass, C., Frosch, M. P., & Walsh, D. M., 2018. Diffusible, highly bioactive oligomers represent a critical minority of soluble A β in Alzheimer's disease brain. *Acta Neuropathologica*. 136(1), 19–40. <https://doi.org/10.1007/s00401-018-1846-7>
- Hosmer, D., & Lemeshow, S., 2013. *Applied Logistic Regression* (Third Edit).
- Ising, Christina, Carmen Venegas, Shuangshuang Zhang, Hannah Scheiblich, Susanne V. Schmidt, Ana Vieira-Saecker, Stephanie Schwartz...Eicke Latz., 2019. NLRP3 Inflammasome Activation Drives Tau Pathology. *Nature* 575 (7784): 669–73. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1769-z>.
- Italiani, P., Puxeddu, I., Napoletano, S., Scala, E., Melillo, D., Manocchio, S., Angiolillo, A., Migliorini, P., Boraschi, D., Vitale, E., & Di Costanzo, A., 2018. Circulating levels of IL-1 family cytokines and receptors in Alzheimer's disease: new markers of disease progression? *Journal of Neuroinflammation*. 15(1), 342. <https://doi.org/10.1186/s12974-018-1376-1>
- Janelidze, S., Mattsson, N., Stomrud, E., Lindberg, O., Palmqvist, S., Zetterberg, H., Blennow, K., & Hansson, O., 2018. CSF biomarkers of neuroinflammation and cerebrovascular dysfunction in early Alzheimer disease. *Neurology*. 91(9), e867–e877. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000006082>
- Joly-Amado, A., Hunter, J., Quadri, Z., Zamudio, F., Rocha-Rangel, P. V., Chan, D., Kesarwani, A., Nash, K., Lee, D. C., Morgan, D., Gordon, M. N., & Selenica, M.-L. B., 2020. CCL2 Overexpression in the Brain Promotes Glial Activation and Accelerates Tau Pathology in a Mouse Model of Tauopathy. *Frontiers in Immunology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00997>

- Jorfi, M., Park, J., Hall, C. K., Lin, C.-C. J., Chen, M., von Maydell, D., Kruskop, J. M., Kang, B., Choi, Y., Prokopenko, D., Irimia, D., Kim, D. Y., & Tanzi, R. E., 2023. Infiltrating CD8+ T cells exacerbate Alzheimer's disease pathology in a 3D human neuroimmune axis model. *Nature Neuroscience*. 26(9), 1489–1504. <https://doi.org/10.1038/s41593-023-01415-3>
- Kaiyrlykyzy, A., Zholdasbekova, G., Alzhanova, D., Olzhayev, F., Baibulatova, A., Tsoy, A., & Askarova, S., 2022. The expression levels of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines and chemokines in blood serum of Alzheimer's dementia patients: report from a pilot study in Kazakhstan. *Alzheimer's & Dementia*. 18(S6). <https://doi.org/10.1002/alz.069259>
- King, E., O'Brien, J. T., Donaghy, P., Morris, C., Barnett, N., Olsen, K., Martin-Ruiz, C., Taylor, J.-P., & Thomas, A. J., 2018. Peripheral inflammation in prodromal Alzheimer's and Lewy body dementias. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*. 89(4), 339–345. <https://doi.org/10.1136/jnnp-2017-317134>
- Kutukculer, N., Puel, A., Eren Akarcan, S., Moriya, K., Edeer Karaca, N., Migaud, M., Casanova, J.-L., & Aksu, G., 2019. Deficiency of Interleukin-1 Receptor Antagonist: A Case with Late Onset Severe Inflammatory Arthritis, Nail Psoriasis with Onychomycosis and Well Responsive to Adalimumab Therapy. *Case Reports in Immunology*, 2019, 1–6. <https://doi.org/10.1155/2019/1902817>
- Lahiri, D. K., & Numberger, J. I., 1991. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Research*. 19(19), 5444–5444. <https://doi.org/10.1093/nar/19.19.5444>
- Lai, K. S. P., Liu, C. S., Rau, A., Lanctôt, K. L., Köhler, C. A., Pakosh, M., Carvalho, A. F., &

- Herrmann, N., 2017. Peripheral inflammatory markers in Alzheimer's disease: a systematic review and meta-analysis of 175 studies. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*. 88(10), 876–882. <https://doi.org/10.1136/jnnp-2017-316201>
- Lai, Wu, J., Zou, X., Xie, J., Zhang, L., Zhao, X., Zhao, M., Wang, Q., & Ji, J., 2013. Secretome Analyses of A β 1–42 Stimulated Hippocampal Astrocytes Reveal that CXCL10 is Involved in Astrocyte Migration. *Journal of Proteome Research*. 12(2), 832–843. <https://doi.org/10.1021/pr300895r>
- Laske, C., Stellos, K., Stransky, E., Leyhe, T., & Gawaz, M., 2009. Decreased Plasma Levels of Granulocyte-Colony Stimulating Factor (G-CSF) in Patients with Early Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's Disease*. 17(1), 115–123. <https://doi.org/10.3233/JAD-2009-1017>
- Laurent, C., Dorothée, G., Hunot, S., Martin, E., Monnet, Y., Duchamp, M., Dong, Y., Légeron, F.-P., Leboucher, A., Burnouf, S., Faivre, E., Carvalho, K., Caillierez, R., Zommer, N., Demeyer, D., Jouy, N., Sazdovitch, V., Schraen-Maschke, S., Delarasse, C., ... Blum, D., 2017. Hippocampal T cell infiltration promotes neuroinflammation and cognitive decline in a mouse model of tauopathy. *Brain*. 140(1), 184–200. <https://doi.org/10.1093/brain/aww270>
- Li, Liu, L., Barger, S. W., & Griffin, W. S. T., 2003. Interleukin-1 Mediates Pathological Effects of Microglia on Tau Phosphorylation and on Synaptophysin Synthesis in Cortical Neurons through a p38-MAPK Pathway. *The Journal of Neuroscience*. 23(5), 1605–1611. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-05-01605.2003>
- Liang, C.-S., Su, K.-P., Tsai, C.-L., Lee, J.-T., Chu, C.-S., Yeh, T.-C., Su, M.-W., Lin, G.-Y., Lin, Y.-K., Chu, H.-T., Tsai, C.-K., & Yang, F.-C., 2020. The role of interleukin-33 in patients with mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Alzheimer's Research & Therapy*.

12(1), 86. <https://doi.org/10.1186/s13195-020-00652-z>

- Madhurantakam, S., Lee, Z. J., Naqvi, A., & Prasad, S., 2023. Importance of IP-10 as a biomarker of host immune response: Critical perspective as a target for biosensing. *Current Research in Biotechnology*. 5, 100130. <https://doi.org/10.1016/j.crbiot.2023.100130>
- Mandelkow, E. M., & Mandelkow, E., 1998. Tau in Alzheimer's disease. *Trends in Cell Biology*. 8(11), 425–427. [https://doi.org/10.1016/S0962-8924\(98\)01368-3](https://doi.org/10.1016/S0962-8924(98)01368-3)
- McKhann, G. M., Knopman, D. S., Chertkow, H., Hyman, B. T., Jack, C. R., Kawas, C. H., Klunk, W. E., Koroshetz, W. J., Manly, J. J., Mayeux, R., Mohs, R. C., Morris, J. C., Rossor, M. N., Scheltens, P., Carrillo, M. C., Thies, B., Weintraub, S., & Phelps, C. H., 2011. 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. *Alzheimer's & Dementia*. 7(3), 263–269. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2011.03.005>
- Minter, M. R., Taylor, J. M., & Crack, P. J., 2016. The contribution of neuroinflammation to amyloid toxicity in Alzheimer's disease. *Journal of Neurochemistry*. 136(3), 457–474. <https://doi.org/10.1111/jnc.13411>
- Monteyne P, Renauld JC, Van Broeck J, Dunne DW, Brombacher F, Coutelier JP., 1997. IL-4-Independent Regulation of in Vivo IL-9 Expression. *Journal of Immunology* 159 (6): 2616-2623. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.159.6.2616>
- Morris, J. C., 1993. The Clinical Dementia Rating (CDR): current version and scoring rules. *Neurology*. 43(11), 2412–2414. <https://doi.org/10.1212/wnl.43.11.2412-a>
- Ng, A., Tam, W. W., Zhang, M. W., Ho, C. S., Husain, S. F., McIntyre, R. S., & Ho, R. C., 2018. IL-1 β , IL-6, TNF- α and CRP in Elderly Patients with Depression or Alzheimer's disease:

- Systematic Review and Meta-Analysis. *Scientific Reports*. 8(1), 12050. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-30487-6>
- Nitrini, R., Helena Lefèvre, B., Mathias, S. C., Caramelli, P., Carrilho, P. E. M., Sauaia, N., Massad, E., Takiguti, C., Silva, I. O. Da, Porto, C. S., Magila, M. C., & Scaff, M., 1994. Testes neuropsicológicos de aplicação simples para o diagnóstico de demência. *Arquivos de Neuro-Psiquiatria*. 52(4), 457–465. <https://doi.org/10.1590/S0004-282X1994000400001>
- Pasqualetti, G., Brooks, D. J., & Edison, P., 2015. The Role of Neuroinflammation in Dementias. *Current Neurology and Neuroscience Reports*. 15(4), 17. <https://doi.org/10.1007/s11910-015-0531-7>
- Passos, G. F., Figueiredo, C. P., Prediger, R. D. S., Pandolfo, P., Duarte, F. S., Medeiros, R., & Calixto, J. B., 2009. Role of the Macrophage Inflammatory Protein-1 α /CC Chemokine Receptor 5 Signaling Pathway in the Neuroinflammatory Response and Cognitive Deficits Induced by β -Amyloid Peptide. *The American Journal of Pathology*. 175(4), 1586–1597. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2009.081113>
- Pfeffer, R. I., Kurosaki, T. T., Harrah, C. H., Chance, J. M., & Filos, S., 1982. Measurement of Functional Activities in Older Adults in the Community. *Journal of Gerontology*. 37(3), 323–329. <https://doi.org/10.1093/geronj/37.3.323>
- Shimizu, E., Kawahara, K., Kajizono, M., Sawada, M., & Nakayama, H., 2008. IL-4-Induced Selective Clearance of Oligomeric β -Amyloid Peptide 1–42 by Rat Primary Type 2 Microglia. *The Journal of Immunology*. 181(9), 6503–6513. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.9.6503>
- Sheng, J. G., Jones, R. A., Zhou, X. Q., McGinness, J. M., Van Eldik, L. J., Mrak, R. E., & Griffin,

- W. S. T., 2001. Interleukin-1 promotion of MAPK-p38 overexpression in experimental animals and in Alzheimer's disease: potential significance for tau protein phosphorylation. *Neurochemistry International*. 39(5–6), 341–348. [https://doi.org/10.1016/S0197-0186\(01\)00041-9](https://doi.org/10.1016/S0197-0186(01)00041-9)
- Shulman, K. I., 2000. Clock-drawing: is it the ideal cognitive screening test? *International Journal of Geriatric Psychiatry*. 15(6), 548–561. [https://doi.org/10.1002/1099-1166\(200006\)15:6<548::AID-GPS242>3.0.CO;2-U](https://doi.org/10.1002/1099-1166(200006)15:6<548::AID-GPS242>3.0.CO;2-U)
- Standiford, Theodore J., Steven L. Kunkel, Janice M. Liebler, Marie D. Burdick, Andrew R. Gilbert, and Robert M. Strieter., 1993. Gene Expression of Macrophage Inflammatory Protein-1 α from Human Blood Monocytes and Alveolar Macrophages Is Inhibited by Interleukin-4. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 9 (2): 192–98. <https://doi.org/10.1165/ajrcmb/9.2.192>.
- Taipa, R., das Neves, S. P., Sousa, A. L., Fernandes, J., Pinto, C., Correia, A. P., Santos, E., Pinto, P. S., Carneiro, P., Costa, P., Santos, D., Alonso, I., Palha, J., Marques, F., Cavaco, S., & Sousa, N., 2019. Proinflammatory and anti-inflammatory cytokines in the CSF of patients with Alzheimer's disease and their correlation with cognitive decline. *Neurobiology of Aging*. 76, 125–132. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2018.12.019>
- Tang, Mao, X., Xie, L., Greenberg, D. A., & Jin, K., 2013. Expression level of vascular endothelial growth factor in hippocampus is associated with cognitive impairment in patients with Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*. 34(5), 1412–1415. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2012.10.029>

- Tang, R.-H., Qi, R.-Q., & Liu, H.-Y., 2019. Interleukin-4 affects microglial autophagic flux. *Neural Regeneration Research*. 14(9), 1594-1602. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.255975>
- Tarkowski, E., Issa, R., Sjögren, M., Wallin, A., Blennow, K., Tarkowski, A., & Kumar, P., 2002. Increased intrathecal levels of the angiogenic factors VEGF and TGF- β in Alzheimer's disease and vascular dementia. *Neurobiology of Aging*. 23(2), 237–243. [https://doi.org/10.1016/S0197-4580\(01\)00285-8](https://doi.org/10.1016/S0197-4580(01)00285-8)
- Thakur, S., Dhapola, R., Sarma, P., Medhi, B., & Reddy, D. H., 2023. Neuroinflammation in Alzheimer's Disease: Current Progress in Molecular Signaling and Therapeutics. *Inflammation*. 46(1), 1–17. <https://doi.org/10.1007/s10753-022-01721-1>
- Vilkeviciute, Alvita, Dzastina Cebatoriene, Loresa Kriauciuniene, Reda Zemaitiene, and Rasa Liutkeviciene., 2021. IL-9 and IL-10 Single-Nucleotide Variants and Serum Levels in Age-Related Macular Degeneration in the Caucasian Population. Edited by Ayumi Ouchi. *Mediators of Inflammation 2021 (April)*: 1–13. <https://doi.org/10.1155/2021/6622934>.
- Wakabayashi, G., Gelfand, J. A., Burke, J. F., Thompson, R. C., & Dinarello, C. A., 1991. A specific receptor antagonist for interleukin 1 prevents Escherichia coli -induced shock in rabbits. *The FASEB Journal*. 5(3), 338–343. <https://doi.org/10.1096/fasebj.5.3.1825816>
- Wang, H., Zong, Y., Zhu, L., Wang, W., & Han, Y., 2023. Chemokines in patients with Alzheimer's disease: A meta-analysis. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 15. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2023.1047810>
- Wang, Jiang, Q., Chu, J., Lin, L., Li, X.-G., Chai, G.-S., Wang, Q., Wang, J.-Z., & Tian, Q., 2013. Expression of Tau40 Induces Activation of Cultured Rat Microglial Cells. *PLoS ONE*. 8(10), e76057. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0076057>

- Wang, Ou Mao, X., Xie, L., Banwait, S., Marti, H. H., Greenberg, D. A., & Jin, K., 2007. Vascular Endothelial Growth Factor Overexpression Delays Neurodegeneration and Prolongs Survival in Amyotrophic Lateral Sclerosis Mice. *The Journal of Neuroscience*. 27(2), 304–307. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4433-06.2007>
- Wang, Tan, M.-S., Yu, J.-T., & Tan, L., 2015. Role of pro-inflammatory cytokines released from microglia in Alzheimer's disease. *Annals of Translational Medicine*. 3(10), 136. <https://doi.org/10.3978/j.issn.2305-5839.2015.03.49>
- Weston, L. L., Jiang, S., Chisholm, D., Jantzie, L. L., & Bhaskar, K., 2021. Interleukin-10 deficiency exacerbates inflammation-induced tau pathology. *Journal of Neuroinflammation*. 18(1), 161. <https://doi.org/10.1186/s12974-021-02211-1>
- Wharton, Kollhoff, A. L., Gangishetti, U., Verble, D. D., Upadhya, S., Zetterberg, H., Kumar, V., Watts, K. D., Kippels, A. J., Gearing, M., Howell, J. C., Parker, M. W., & Hu, W. T., 2019. Interleukin 9 alterations linked to alzheimer disease in african americans. *Annals of Neurology*. 86(3), 407–418. <https://doi.org/10.1002/ana.25543>
- Wojcieszak, J., Kuczyńska, K., & Zawilska, J. B., 2022. Role of Chemokines in the Development and Progression of Alzheimer's Disease. *Journal of Molecular Neuroscience*. 72(9), 1929–1951. <https://doi.org/10.1007/s12031-022-02047-1>
- Yasuhara, O., Matsuo, A., Terai, K., Walker, D. G., Berger, A. E., Akiguchi, I., Kimura, J., & McGeer, P. L., 1997. Expression of interleukin-1 receptor antagonist protein in post-mortem human brain tissues of Alzheimer's disease and control cases. *Acta Neuropathologica*. 93(4), 414–420. <https://doi.org/10.1007/s004010050633>
- Yates-Binder, Cecelia C., Margaret Rodgers, Jesse Jaynes, Alan Wells, Richard J. Bodnar, and

Timothy Turner., 2012. An IP-10 (CXCL10)-Derived Peptide Inhibits Angiogenesis. Edited by Paul Proost. *PLoS ONE* 7 (7): e40812. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040812>.

Zhou, F., Sun, Y., Xie, X., & Zhao, Y., 2023. Blood and CSF chemokines in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment: a systematic review and meta-analysis. *Alzheimer's Research & Therapy*. 15(1), 107. <https://doi.org/10.1186/s13195-023-01254->

6.2 ARTIGO 2

O objetivo do segundo estudo, “*CSF cytokines and cognitive performance: results of a Brazilian older adults study*” foi investigar quais citocinas, mensuradas no LCR de uma amostra de idosos brasileiros, estão associadas ao declínio cognitivo avaliado pelo teste de MEEM e se estas citocinas podem prever ou influenciar as variações do escore deste teste.

Este estudo foi submetido para apreciação do *The Journals of Gerontology, Series A, Biological Sciences*.

CSF cytokines and cognitive performance: results of a Brazilian older adults' study

Ivonne Carolina Bolaños Burgos^{a,b,c}, Gabriela Tomé Oliveira Engelmann^{a,e}, Andréa Teixeira Carvalho^d, Igor Nunes Lanna^a, Giovanna Correia Pereira Moro^{a,f}, Rafaela Teixeira de Ávila^a, Jonas Jardim de Paula^{a,c,j}, Alfredo Ramirez Zuniga^g, Aloisio Joaquim Freitas Ribeiro^h, Lourdes Coral Contreras Montenegro^h, Débora Marques de Miranda^{c,e}, Marco Aurélio Romano-Silva^{c,e}, Luiz Armando Cunha de Marco^{c,e}, Maria Aparecida Camargos Bicalho^{a,b,c,e,k} and Bernardo de Mattos Viana^{a,c,e,i}.

^aCog-aging Research Group– Reference Center for the Elderly, University Hospital of the Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Brazil,

^bSciences Applied to Adult Health Postgraduate Program, Faculty of Medicine, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Brazil,

^cNeurotec R National Institute of Science and Technology (INCT-Neurotec R), Faculty of Medicine, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Brazil,

^dRené Rachou Institute, Oswaldo Cruz Foundation (Fiocruz), Belo Horizonte, Brazil,

^eMolecular Medicine Postgraduate Program, Faculty of Medicine, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Brazil,

^fUndergraduate medicine, Faculty of Medicine, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Brazil,

^gDepartment of Psychiatry, Medical Faculty, University of Cologne, Cologne, Germany

^hDepartment of Statistics, Institute of Exact Sciences, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Brazil,

ⁱOlder Adult Psychiatry and Psychology Extension Program (PROEPSI), Faculty of Medicine, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Brazil,

^j, Faculty of Medicine, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Brazil,

^kDepartment of Clinical Medicine, Faculty of Medicine, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Brazil.

Abstract

The pathophysiology of Alzheimer's disease (AD) is associated with a neuroinflammatory process, in which cytokines play a significant role. The exacerbation of cytokine production and activity contributes to neurodegeneration and cognitive impairment. Our study assessed the relationship between cytokines, AD biomarkers and mini-mental state exam (MMSE) scores. We recruited 108 Brazilian older adults. Cerebrospinal fluid (CSF) Aβ42, pTau, tTau and cytokines levels were measured using the Luminex xMAP-method. Associations between cytokines, AD biomarkers and MMSE score were further explored in multiple linear regression analyses. A network analysis was performed to identify the correlations between the predictor variables of the regression model. Results of multiple linear regression analyses demonstrated that Eotaxin and IL-12 presented negative associations, while IL-1ra and RANTES had substantial positive associations with MMSE scores. According to the network analysis, Eotaxin had a strong positive correlation with RANTES and positive mild correlation with IL-12 and pTau. Positive and mild correlations were found between IL-12 with RANTES and IL-1ra. Our findings provide evidence that in AD, cytokines may play a role in cognitive impairment, assessed by MMSE.

Keywords: Alzheimer's disease, Cytokine, Cognitive impairment, Neuroinflammation, mini mental state examination.

1. Introduction:

Inflammation plays an important role in Alzheimer's disease (AD), the main cause of dementia. During neuroinflammation, the microglia reactivity stimulates the release of cytokines and chemokines, causing synaptic and neuronal damage and promoting neurodegeneration (1). Inflammatory biomarkers seem to be related to cognitive performance (2). The mini-mental state exam (MMSE) is an easy-to-apply screening test, commonly used around the world, for identifying cognitive impairment (CI). (3). Additionally, it has been used for longitudinal assessment of cognitive decline. Therefore, it has also been considered a reliable proxy measure to assess AD's progression. Our aim was to study the associations between cognitive performance on the MMSE and CSF cytokine levels, as well as the interactions between CSF cytokines and AD biomarkers of a sample of Brazilians older adults.

2. Methods

2.1 Subjects

Participants aged 60 and over, with CI, amnesic mild cognitive impairment (aMCI) and probable AD dementia (ADD) and, cognitively unimpaired (CU) were recruited between March 2015 and February 2024, from the Cog-aging Study at the outpatient Reference Center for older adults of the University Hospital of the Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Brazil. Additionally, CU individuals were recruited at the Orthopedic Clinic of the Hospital da Polícia Militar de Minas Gerais, Brazil. All participants underwent the same research protocol with a comprehensive clinical and cognitive assessment, which included the MMSE (4), clinical dementia rating scale (CDR) (5), laboratory and neuroimaging exams, and collection of Cerebrospinal Fluid (CSF). In addition, participants were also assessed by a neuropsychological battery consisted of tests and

questionnaires validated to Brazilian older adults (de Paula et al., 2013). CU group had CSF collected during spinal anesthesia proceeding for an elective knee surgical approach. Probable AD dementia was diagnosed according to the criteria of McKhann et al. (2011) (6). Amnesic MCI was diagnosed according to DSM-5 criteria (4). The exclusion criteria were: CI due to causes other than AD, patients with moderate to severe mental disorders, cerebrovascular disorders, hydrocephalus, and intracranial mass, and severe sensory impairment. This study was approved by the local Ethics Committee. All participants or their legal guardians signed the consent form term.

2.2 Biological sample collection, processing and genotyping

The CSF samples were collected by lumbar puncture, centrifuged, at 3,000g, for 10 minutes at 4°C and stored at -80°C. DNA extraction from whole blood was performed and Apolipoprotein E (APOE) gene polymorphisms were genotyped by a targeted Taqman assay for rs7412 and rs429358. Heterozygote or homozygote carriers of $\epsilon 4$ haplotype were grouped as $\epsilon 4$ carriers.

2.3 Measurement of A β 42, pTau and tTau (AD biomarkers)

The CSF concentrations of Amyloid- β protein 42 (A β 42), Phospho-Tau (pTau181) and Total tau (tTau) were measured by Luminex xMAP, following manufacturer's instructions assay using the Human Amyloid Beta and Tau Magnetic Bead Panel (HNABTMAG-68K) (Millipore, Germany) kit.

2.4 Cytokines measurements

The CSF cytokine levels were measured using Bio-Plex Pro Human Cytokine 27-plex Assay kit #M500KCAF0Y from BIO-RAD to measure the following cytokines: FGF basic), Eotaxin (CCL11), G-CSF, GM-CSF, IFN- γ , IL-1 β , IL-1ra, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-17, IP-10, MCP1, MIP1 α , e MIP1 β , PDGF-BB, TNF- α , Regulated on Activation, Normal T Expressed and Secreted (RANTES), and vascular endothelial growth factor (VEGF). Experiments were performed according to the manufacturer's instructions.

2.5 Statistical analysis

A descriptive analysis was performed, considering normality through the Kolmogorov-Smirnov normality test. Significant associations between total MMSE score, dependent variable, and log-transformed cytokines levels were explored in multiple linear regression analyses. Age, formal education, sex, APOE allele 4 carrier status, A β 42, and pTau levels were considered as adjustment-independent variables. Adjusted univariate linear regressions were applied between each cytokine and dependent variable. Cytokines with $p < .25$ were selected for the initial adjusted multivariate model. Cytokines with $p < .05$ were considered. After checking all variables, the effect of each variable not included in the initial model was tested to check whether the variable was significant in the presence of these variables (7). Statistical analyses were performed using SPSS Version 22. To illustrate the correlations between the predictor variables of the regression model, a unidirectional network was performed based on non-parametric correlation estimates. We created the network models to illustrate the relationship between all the predictors. The analyses were realized using the JASP software version 0.18.3.0.

3. Results

3.1 Characteristics of sample

We selected 108 older adults: 54 with AD (CDR1), 33 with aMCI and 21 with CU. Women were 63.88%, the median age was 76 years, and 4 years of formal education. The MMSE median total score was 23 points (IQR P25-P75). Our CSF sample's median levels of AD biomarkers were 499.99 pg/ml for A β 42, 69.57 pg/ml for pTau, and 1102.87 pg/ml for tTau. Furthermore, 39.04% carried one or two ϵ 4 alleles of the APOE gene. All sample information is available in the supplementary Table 1 (ANEXO 2).

3.2 Associations between MMSE score and CSF cytokines levels

Our model showed that eotaxin, IL-1ra, IL-12 and RANTES adjusted for age, formal education, sex, APOE ϵ 4 status, A β 42, and pTau levels were associated with MMSE score [$F(10,90) = 6.205$; $p < .001$; $R^2 = .342$] (Table 3). Eotaxin ($\beta = -.241$; $p = .021$) and IL-12 ($\beta = -.202$; $p = .021$) showed a significant negative association with MMSE; hence, higher CSF eotaxin and IL-12 levels are associated with low MMSE scores. Conversely, IL-1ra ($\beta = .254$; $p = .004$) and RANTES ($\beta = .267$; $p = .007$) had a significant positive association with the MMSE score and suggesting that low CSF IL-1ra and RANTES levels were associated with low MMSE scores. RANTES had the largest effect size (26,7%) of the score variation. Formal education and CSF A β 42 levels had a significant positive association with MMSE.

Table 3. Adjusted associations between MMSE score and cytokines

Variable	B	SD	β	p-value
Constant	15.438	8.600		.076
Sex	-.908	.731	-.103	.217
Age	-.107	.054	-.170	.052
Formal Education	.227	.076	.264	.004*
APOE ϵ 4 carrier	.913	.828	.104	.274
pTau	-2.415	.843	-.290	.005*
A β 42	2.074	.775	.241	.009*
Eotaxin	-2.266	.963	-.241	.021*
IL-1ra	2.569	.880	.254	.004*
IL-12	-.724	.307	-.202	.021*
RANTES	1.570	.571	.267	.007*

Note: APOE: Apolipoprotein E; B: regression slope or unstandardized coefficient, SD: standard deviation; β : standardized coefficient, indicates the effect of size; Sex: was defined as man and woman; MMSE: mini-mental state exam; IL: interleukin; IL-1ra: interleukin-1 receptor antagonist; RANTES: Regulated on Activation, Normal T Expressed and Secreted; (*p<.05).

3.3 Network analysis for predictor variables

A network analysis was performed in order to identify the correlations between the predictive variables of the regression model for MMSE score. Figure 8 shows on the right-hand side the network with the correlations between all variables (Fig. 8a) and left the network with only the significant variables (Fig. 8b). The analysis revealed that eotaxin was correlated strongly and positively with RANTES and had significantly mild positive correlation with IL-12, pTau and age, while it had mild negative correlation with formal education. RANTES was correlated positively and mildly with IL-12 and age. IL-12 had mildly and positively correlation with IL-1ra. A β 42 was correlated strongly and negatively with pTau and APOE ϵ 4 allele carrier status, while pTau and APOE showed a strong positive correlation. Formal education and age showed a negatively correlation. Sex showed no significant correlation. Correlation values are available in supplementary table 2 (ANEXO 2).

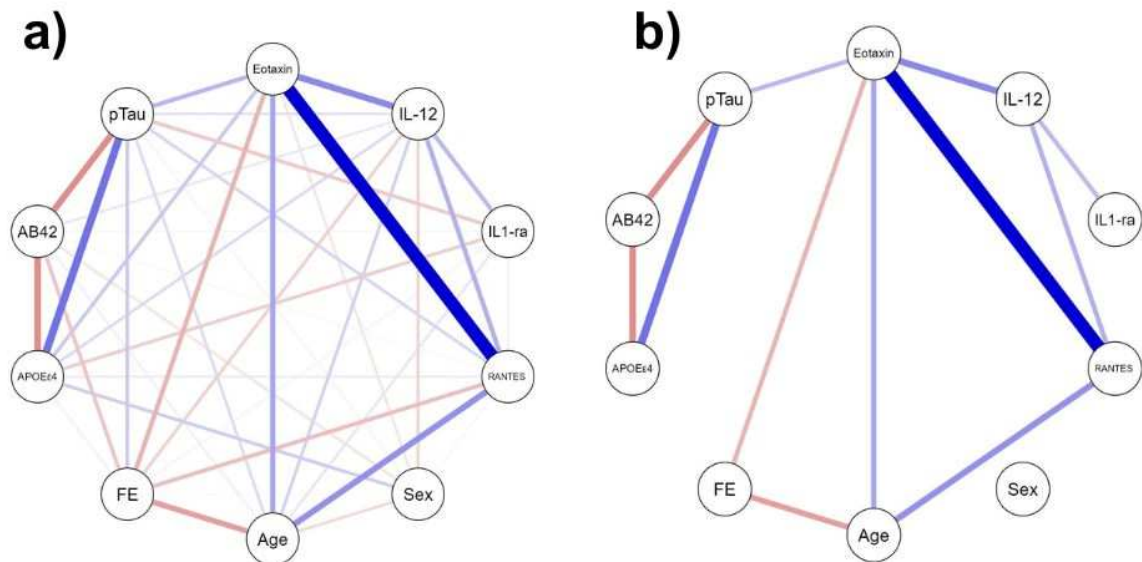


Figure 8. Network analyses for predictor variables of MMSE. 8a) All MMSE predictor variables, **8b)** Significant MMSE predictor variables. Abbreviations: MMSE: Mini Mental State Examination; IL: Interleukin; RANTES:Regulated on Activation, Normal T Expressed and Secreted; FE: Formal Education; APOE: Apolipoprotein E; A β 42: Amyloid Beta 42; pTau: Phosphorylated Tau Protein. The lines indicate correlations and the width representing correlation strength (the wider the line the stronger is the correlation). Blue lines indicate positive correlations, while red lines indicate negative correlations.

4. Discussion

CI has been linked to cytokines (2). This study investigated associations between CSF cytokines and MMSE score of a sample of Brazilians older adults, adjusted by AD risk factors variables, and CSF AD biomarkers. We observed a negative association between eotaxin and IL-12 and positive association between IL-1ra and RANTES, and MMSE score.

Eotaxin is a chemokine known for carefully recruiting eosinophils and has been strongly associated with CI. Higher eotaxin levels were found in AD individuals (2). Butcher et al. (2018) (9) reported higher eotaxin levels in older adults associated with poorer cognitive performance measured by MMSE (9). In contrast, Westin et al. (2012) (8) observed lower levels of eotaxin in MCI patients who progressed to AD (8). Eotaxin not only impacts MMSE scores, but also episodic and semantic memory, paired-association learning, executive functions, emotion recognition, and rapid visual processing (10). In young adult mice, elevations in eotaxin are accompanied by deficits in cognitive functions associated with decreased neurogenesis and impaired hippocampal-related learning and memory (11) and the correlation between higher MCP-1 and eotaxin levels predicts worse verbal and visual episodic memory scores in individuals with MCI and AD dementia (12). Eotaxin in circulation can access and accumulate in many brain regions via transport across the blood-brain barrier (BBB), indicating its pathophysiological activities in the central nervous system (13). Our results showed an inverse association between eotaxin and the MMSE scores, indicating that high levels of eotaxin are associated with low MMSE scores, which suggest that this chemokine could mediate the cognitive impairment reflected on the cognitive test score.

We also observed IL-12 inverse association with MMSE score. IL-12 is a key proinflammatory cytokine in the regulation of immune responses. There is evidence to support a connection between

neuroinflammation, IL-12, CI and the AD pathophysiology (14; 15). Elevated CSF IL-12p40 subunit level (IL-12p40) was significantly associated with conversion to AD (16). Nevertheless, Motta et al. (2007) (17) showed a positive relation between IL-12 and MMSE and described initial higher IL-12 levels in mild AD individuals and decreased levels as the disease progressed. This may indicate that IL-12 may be involved in the early stages of AD development (17). Furthermore, in another study, CSF IL-12 levels were lower in a sample with MCI/AD and other dementias compared to healthy control individuals, and no association between CSF IL-12/IL23 and MMSE score was discovered (18). Previous animal research has shown that blocking IL-12/IL-23 signaling may attenuate AD pathology and reduce cognitive decline. In line with our findings, the authors also observed a negative association between MMSE score and CSF IL12, IL-12p40 (15). Although the role of IL-12 in the context of AD cognitive impairment has not yet been established, the background confirms its role in inflammation in AD pathology and cognitive decline.

Additionally, our findings demonstrated a significant positive association between the MMSE score and RANTES and IL-1ra. RANTES, a proinflammatory chemokine, is a member of the chemokine family that regulates cell migration and modulation of glutamatergic neurotransmission, chemotaxis and pro-inflammatory activation of resident immune cells. Chemokines have been frequently reported to be involved in AD (1). However, the exact mechanisms for chemokine up or downregulation during the AD's development have not been sufficiently clarified and association between RANTES and cognitive decline is still poorly understood. However, Kester et al. (2012)(19) observed lower human RANTES messenger RNA (mRNA) expression associated with lower MMSE score (19). A previous study has suggested that decreased RANTES compromises the activity of cellular energy metabolism, contributing to

decline of cognitive functions. In contrast, increasing RANTES is related to improvement of cognitive performance (20).

The IL-1ra also presented a direct association with MMSE score. Cytokines and receptors of the IL-1 family are known for their ability to activate and regulate inflammatory responses (21). IL-1ra is an anti-inflammatory cytokine that participates in the regulation of IL-1 activity, and protects cells against the IL-1 overstimulation (22). In AD, A β peptides activated microglia causing the IL-1 β overexpression, which is mediated by the nuclear factor-kappa B (NF- κ B) and the NOD-like receptor family pyrin domain-containing 3 (NLRP3) inflammasome activation. The IL-1 β exacerbates production, increases BBB leakage and induces neurodegeneration (21). Insufficient amount of IL-1ra has been associated with disability to regulate IL-1 activity and, consequently, uncontrolled inflammation (25). However, the specific relationship between IL-1ra and MMSE or CI is still poorly explored. We suggested that there could be an impairment in the anti-inflammatory response of IL-1ra due to the AD chronic inflammation that involves overproduction of IL-1 and BBB damage that leads to cognitive decline.

Network analysis showed a strong correlation between the chemokines eotaxin and RANTES. Together, they perform immune cells' recruitment role, particularly of eosinophils (1). Deregulation in activities of eotaxin and RANTES may lead to a high infiltration of eosinophils which could result in tissue damage and cognitive deficit. The eosinophils themselves are a source of cytokines, chemokines and growth factors that, when dysregulated, cause profound effects on progression of immune and inflammatory responses that result in neurodegeneration and cognitive decline. We also observed a positive correlation of eotaxin with IL-12 and pTau. These predictive variables presented negative association with the MMSE score. In fact, in AD, increases in eotaxin and IL-12 levels are associated with increases in inflammation, (10, 14, 17), as well as high levels

of tau pathology are related to cognitive deterioration and exacerbating inflammations. These results suggest that eotaxin, IL-12 and pTau could be positively favoring the inflammatory process associated with cognitive decline. Although in regression low levels of IL-1ra have been associated with low MMSE score indicating an impairment of anti-inflammatory activity, the network model revealed a positive correlation with IL-12 suggesting a modulation over the inflammatory activities of IL-12. Therefore, the physiological importance of this correlation is not entirely clear and needs to be explored in other studies.

Our main limitation was the small sample size. In addition, since our study is cross-sectional, inferences about causality are constrained. On the other hand, we were able to characterize associations between cytokines and MMSE score as well as possible cytokine interactions in a sample of Brazilian older adults, providing evidence about cytokine role and the impact of neuroinflammation on cognitive impairment in AD. The connection between cognitive performance and the cytokines discussed in this study is still being explored in literature. Future studies in animal models could focus on studying the mechanisms of action, signaling paths involving the AD hallmarks, cytokines and cognitive decline

5. Conclusion

Our findings provide further evidence that cytokines are associated with cognitive impairment in AD, evaluated by MMSE. Nevertheless, future longitudinal studies with repetitive measures are needed to further understand the relations between these variables through the course of AD.

6. References

1. Wang H, Zong Y, Zhu L, Wang W, Han Y. Chemokines in patients with Alzheimer's disease: A meta-analysis. *Front Aging Neurosci.* 2023;15:1047810. doi:10.3389/fnagi.2023.1047810
2. Taipa R, das Neves SP, Sousa AL, et al. Proinflammatory and anti-inflammatory cytokines in the CSF of patients with Alzheimer's disease and their correlation with cognitive decline. *Neurobiol Aging.* 2019;76:125-132. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2018.12.019
3. Santiago-Bravo G, Sudo FK, Assunção N, Drummond C, Mattos P. Dementia screening in Brazil: a systematic review of normative data for the mini-mental state examination. *Clinics (Sao Paulo).* 2019;74. doi:10.6061/clinics/2019/e971
4. American Psychiatric Association. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders.* 5th ed. Arlington, VA: American Psychiatric Association; 2013.
5. Morris JC. The Clinical Dementia Rating (CDR): current version and scoring rules. *Neurology.* 1993;43(11):2412-2414.
6. McKhann GM, Knopman DS, Chertkow H, et al. The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement.* 2011;7(3):263-269. doi:10.1016/j.jalz.2011.03.005
7. Hosmer DW, Lemeshow S. *Applied Logistic Regression.* 3rd ed. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons; 2013.

8. Westin K, Buchhave P, Nielsen H, Minthon L, Janciauskiene S, Hansson O. CCL2 is associated with a faster rate of cognitive decline during early stages of Alzheimer's disease. *PLoS One*. 2012;7(1). doi:10.1371/journal.pone.0030525
9. Butcher L, Pérès K, André P, et al. Association between plasma CCL11 (eotaxin-1) and cognitive status in older adults: Differences between rural and urban dwellers. *Exp Gerontol*. 2018;113:173-179. doi:10.1016/j.exger.2018.10.004
10. Sirivichayakul S, Kanchanatawan B, Thika S, Carvalho AF, Maes M. Eotaxin, an Endogenous Cognitive Deteriorating Chemokine (ECDC), Is a Major Contributor to Cognitive Decline in Normal People and to Executive, Memory, and Sustained Attention Deficits, Formal Thought Disorders, and Psychopathology in Schizophrenia Patients. *Neurotox Res*. 2019;35(1):122-138. doi:10.1007/s12640-018-9937-8
11. Villeda SA, Luo J, Mosher KI, et al. The aging systemic milieu negatively regulates neurogenesis and cognitive function. *Nature*. 2011;477(7362):90-94. doi:10.1038/nature10357
12. Bettcher BM, Fitch R, Wynn MJ, et al. MCP-1 and eotaxin-1 selectively and negatively associated with memory in MCI and Alzheimer's disease dementia phenotypes. *Alzheimers Dement (Diagn Assess Dis Monit)*. 2016;3(1):91-97. doi:10.1016/j.dadm.2016.05.004
13. Erickson MA, Banks WA. Rapid transport of CCL11 across the blood-brain barrier: Regional variation and importance of blood cells. *J Pharmacol Exp Ther*. 2014;349(3):497-507. doi:10.1124/jpet.114.215145

14. Tan MS, Yu JT, Jiang T, Zhu XC, Guan HS, Tan L. IL-12/23 p40 inhibition ameliorates Alzheimer's disease-associated neuropathology and spatial memory in SAMP8 mice. *J Alzheimers Dis.* 2014;38(3):633-646. doi:10.3233/JAD-131148
15. vom Berg J, Prokop S, Miller KR, et al. Inhibition of IL-12/IL-23 signaling reduces Alzheimer's disease-like pathology and cognitive decline. *Nat Med.* 2012;18(12):1812-1819. doi:10.1038/nm.2965
16. Contreras JA, Aslanyan V, Albrecht DS, et al. Higher baseline levels of CSF inflammation increase risk of incident mild cognitive impairment and Alzheimer's disease dementia. *Alzheimers Dement (Amst).* 2022;14(1). doi:10.1002/dad2.12346
17. Motta M, Imbesi R, Di Rosa M, Stivala F, Malaguarnera L. Altered plasma cytokine levels in Alzheimer's disease: Correlation with the disease progression. *Immunol Lett.* 2007;114(1):46-51. doi:10.1016/j.imlet.2007.09.002
18. Johansson P, Almqvist EG, Wallin A, et al. Reduced cerebrospinal fluid concentration of interleukin-12/23 subunit p40 in patients with cognitive impairment. *PLoS One.* 2017;12(5). doi:10.1371/journal.pone.0176760
19. Kester MI, van der Flier WM, Visser A, Blankenstein MA, Scheltens P, Oudejans CB. Decreased mRNA expression of CCL5 [RANTES] in Alzheimer's disease blood samples. *Clin Chem Lab Med.* 2012;50(1). doi:10.1515/cclm.2011.731
20. Ajoy, Reni, Yu-Chun Lo, Man-Hau Ho, You-Yin Chen, Yun Wang, Yuan-Hao Chen, Chiu Jing-Yuan, et al. CCL5 Promotion of Bioenergy Metabolism Is Crucial for Hippocampal Synapse Complex and Memory Formation. *Molecular Psychiatry* 2021.2021 2021. 26 (11): 6451–68. <https://doi.org/10.1038/s41380-021-01103-3>.

21. Boraschi D, Italiani P, Migliorini P, Bossù P. Cause or consequence? The role of IL-1 family cytokines and receptors in neuroinflammatory and neurodegenerative diseases. *Front Immunol.* 2023;14:1128190. doi:10.3389/fimmu.2023.1128190
22. Wakabayashi G, Gelfand JA, Burke JF, Thompson RC, Dinarello CA. A specific receptor antagonist for interleukin 1 prevents Escherichia coli-induced shock in rabbits. *FASEB J.* 1991;5(3):338-343. doi:10.1096/fasebj.5.3.1825816
23. Italiani P, Puxeddu I, Napoletano S, et al. Circulating levels of IL-1 family cytokines and receptors in Alzheimer's disease: new markers of disease progression? *J Neuroinflammation.* 2018;15(1):342. doi:10.1186/s12974-018-1376-1
24. Minochkin AK, Lobzin VY, Suchentseva NN, Popov OS, Apalko SV, Sherbak SG. New potential biomarkers of Alzheimer's disease: markers of endothelial dysfunction and neuroinflammation. *Neurology, Neuropsychiatry, Psychosomatics.* 2022;14(2):35-42. doi:10.14412/2074-2711-2022-2-35-42
25. Kutukculer N, Puel A, Eren Akarcan S, et al. Deficiency of Interleukin-1 Receptor Antagonist: A Case with Late Onset Severe Inflammatory Arthritis, Nail Psoriasis with Onychomycosis and Well Responsive to Adalimumab Therapy. *Case Rep Immunol.* 2019;2019:1902817. doi:10.1155/2019/1902817

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Na DA, a sobreprodução e deposição das proteínas A β e Tau levam a reatividade contínua das células da glia que liberam citocinas de forma exacerbada o que contribui para manter um estado inflamatório crônico do cérebro, facilitando a neurodegeneração e progressão da doença. Várias citocinas participam da resposta imune à presença das proteínas A β e Tau. Mas, a literatura é ainda escassa sobre quais citocinas se relacionam especificamente com cada biomarcador e como funcionam essas relações com outras citocinas além das clássicas da DA (TNF α , IFN γ , IL-1 β , IL-6), que também poderiam participar na inflamação relacionada à patologia desta doença.

Assim, para elucidar as considerações finais deste trabalho, resgatou-se o problema de pesquisa que é "determinar quais citocinas estão associadas ao processo de neuroinflamação com cada biomarcador e se estas podem influenciar a variação dos mesmos e o declínio cognitivo". Nossos resultados mostraram que as citocinas se associam e podem sinalizar a proporção do efeito sobre os níveis dos biomarcadores da DA e do comprometimento cognitivo avaliado pelo MEEM. As considerações sobre estes resultados estão sumarizadas no quadro a seguir:

Quadro 5: Considerações Finais

Citocina	Biomarcador associado	Tipo de associação	Considerações
IL-13	A β 42	Direta	IL-13 junto com a expressão aumentada de IL-4, sugerem atuação na reatividade da micróglia tipo M2 como mecanismo anti-inflamatório contra a patologia da DA.
IP-10		Direta	Nos estágios iniciais da DA, os oligômeros A β , presentes em altos níveis, ativam astrócitos que consequentemente liberam IP-10, possivelmente para recrutar células imunes com objetivo de depurar as formas oligoméricas de A β .
VEGF		Inversa	Esta associação sugere que o VEGF atue na depuração de A β , a fim de melhorar as funções neuronais e vasculares.
IL-4	pTau	Direta	Foram insuficientes as referências que suportaram essa associação. No entanto, sugere-se que a liberação aumentada desta citocina promova a reatividade da micróglia M2 para contribuir nos processos de fagocitose.
IL-1ra	pTau/tTau	Inversa	Essa associação poderia indicar: 1. Uma resposta anti-inflamatória prejudicada no processo de DA devido à superexpressão da IL-1 (via p38 MAPK e NLRP3); 2. Uma ação ineficiente da IL-1ra pela liberação exacerbada de IL-1.
	MEEM	Direta	Resposta anti-inflamatória reduzida da IL-1ra devido à sobreprodução da IL-1 e extravasamento da BHE, o que poderia levar ao declínio cognitivo.
MCP-1	tTau	Direta	A atuação destas citocinas sugere sua contribuição na infiltração de células imunes periféricas e células T através da BHE recrutadas pela micróglia, cujo acúmulo poderia contribuir para exacerbar a taupatia.
MIP1 α			
IL-9		Direta	Foram insuficientes e contrárias as referências relacionadas a essas citocinas associadas com tTau. No entanto, IL-9 foi a citocina que apresentou o maior tamanho do efeito, sugerimos novos estudos que aprofundem o conhecimento desta associação.
IL-10		Inversa	

Quadro 5: Continuação das considerações Finais

Citocina	Biomarcador associado	Tipo de associação	Considerações
Eotaxina	MEEM	Inversa	Eotaxina é capaz de atravessar a BHE e pode acumular no cérebro, contribuindo nos processos fisiopatológicos da neurodegeneração e levando a declínio cognitivo.
IL-12		Inversa	IL-12 ativa a via de sinalização IL-12/IL-23 que está associada ao processo de neuroinflamação, morte neuronal e declínio cognitivo.
RANTES		Direta	RANTES reduzido sugere comprometimento do metabolismo energético celular contribuindo para a deterioração das funções cognitivas.

Legenda: IL: interleukin; G-CSF: granulocyte colony-stimulating factor; IP-10: Interferon-gamma inducible protein; MCP-1: monocyte chemotactic protein 1; MIP1 α : macrophage inflammatory protein-1 alpha; VEGF: vascular endothelial growth factor; IL-1ra: antagonist of the receptor of IL-1; RANTES: Regulated upon Activation, Normal T-cell Expressed, and Secreted; A β : amyloid beta protein; pTau: phosphorylated tau protein; tTau: total tau; MEEM: Mini-exame do Estado Mental;

Níveis elevados de G-CSF e MIP1 α no grupo demência apontam, no caso do G-CSF, para a reatividade da micróglia para a depuração de A β 42 como uma resposta à sua agregação. Níveis elevados de MIP1 α e a associação entre essa citocina e a patologia da Tau reafirmam o seu papel na patologia da DA, possivelmente contribuindo no recrutamento, ativação e migração de células imunes para o sítio de inflamação.

Não foram encontradas citocinas em comum entre as associações de A β 42 e Tau nem entre A β 42 e o escore do MEEM. No entanto, IL-1ra associou-se com Tau e o escore do MEEM, sugerindo sua participação em processos ligados ao comprometimento cognitivo.

Ser carreador de um ou dois alelos ϵ 4 da APOE se associou significativamente aos níveis tanto da proteína A β como a pTau. Assim como a educação, pTau e A β também se associaram significativamente com o comprometimento cognitivo avaliado pelo MEEM.

A análise de rede sugeriu que citocinas podem estimular-se mutuamente positiva ou negativamente, exacerbando e modulando a resposta inflamatória entre elas. Fatores de risco para DA também poderiam influenciar a expressão destes fatores inflamatórios.

Este trabalho é pioneiro no estudo da relação entre citocinas e biomarcadores da DA na população brasileira. Foi possível avaliar as associações entre as citocinas e biomarcadores separadamente. A maioria de estudos, em especial estudos animais, usam modelos para um único biomarcador o que pode criar um viés já que as duas proteínas, A β e Tau, agem em conjunto no processo de neuroinflamação da patologia da DA.

A análise estatística de marcadores neuroinflamatórios, como as citocinas, requer cautela devido aos possíveis *outliers*, que podem influenciar o resultado no caso da regressão linear. É necessário incluir variáveis de risco da DA, para contribuir para a validação do método.

Entre as principais limitações do estudo encontram-se: o pequeno tamanho amostral e o grande número de variáveis analisadas, o que gerou limitações para aplicação dos testes estatísticos. No entanto, deve-se considerar que a amostragem de CSF é difícil de acessar em pesquisas clínicas, tendo em vista a natureza invasiva do procedimento.

A técnica de laboratório usada para coleta e o processamento de amostras e variáveis pré-analíticas, tais como ciclos de congelamento, período de armazenamento ou centrifugação das amostras, pode influenciar os níveis das citocinas e biomarcadores e sua detecção pelos equipamentos de leitura.

Os estudos sobre os níveis das citocinas no LCR possuem resultados diversos, resultando em maior variabilidade na dependência da metodologia de análise, fluido biológico utilizado, número de amostra, modelo de estudo ou população estudada. Ainda é escassa a literatura que envolve citocinas, biomarcadores ou citocinas e declínio cognitivo e os mecanismos ou as vias de sinalização. As referências que existem focam especialmente nas citocinas pró-inflamatórias clássicas ou em modelos exclusivos para proteína A β , o que dificultou a compreensão das associações estudadas, em especial relativa à taupatia. Nosso estudo tem um desenho transversal, o que limita as conclusões causal-efeito.

Futuros estudos longitudinais que incluam todos os estágios clínicos da doença e um número maior de participantes, poderiam contribuir para a compreensão do comportamento das citocinas ao longo no continuum da DA e na validação dos achados do presente estudo. Tendo em conta a atualização dos critérios para DA, estudos da relação entre citocinas e a proteína A β em indivíduos assintomáticos com biomarcador A β positivo poderiam contribuir para conhecer quais citocinas estão envolvidas nesse estágio biológico da doença. Estudos em modelos animais poderiam aprofundar nos mecanismos e vias de sinalização que envolvem as citocinas e as patologias da DA em especial a taupatologia.

7.1 CONCLUSÃO

Em uma amostra de idosos brasileiros foram observadas associações entre as citocinas, os principais biomarcadores da DA e o escore do MEEM, corroborando com a participação das citocinas na patologia da DA e no comprometimento cognitivo. Citocinas, além das clássicas, estariam envolvidas no processo patológico da proteína A β , Tau e no comprometimento cognitivo. Foram encontradas associações independentes com cada biomarcador, assim como interações entre citocinas do mesmo modelo mostraram possíveis modulações entre elas. Contudo, estudos longitudinais e em modelos animais são necessários para estabelecer relações causais destas relações.

8. REFERÊNCIAS

ABBAS, N. et al. Up-regulation of the inflammatory cytokines IFN- γ and IL-12 and down-regulation of IL-4 in cerebral cortex regions of APPSWE transgenic mice. **Journal of Neuroimmunology**, v. 126, n. 1–2, p. 50–57, 1 maio 2002.

AKIYAMA, H. et al. Inflammation and Alzheimer's disease. **Neurobiology of aging**, v. 21, n. 3, p. 383–421, 2000.

AL-GHRAIYBAH, N. F. et al. Glial Cell-Mediated Neuroinflammation in Alzheimer's Disease. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 18, p. 10572, 12 set. 2022.

ALBERTI, S. et al. Age-dependent modifications of Type 1 and Type 2 cytokines within virgin and memory CD4+ T cells in humans. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 127, n. 6, p. 560–566, jun. 2006.

ALMEIDA, O. P. Mini exame dos estado mental e o diagnóstico de demência no Brasil. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 56, n. 3B, p. 605–612, set. 1998.

ALMEIDA, O. P.; ALMEIDA, S. A. Confiabilidade da versão brasileira da Escala de Depressão em Geriatria (GDS) versão reduzida. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 57, n. 2B, p. 421–426, jun. 1999.

ALZHEIMER'S ASSOCIATION. **ALZHEIMER'S AND DEMENTIA**. Disponível em: <<https://www.alz.org/alzheimers-dementia/what-is-alzheimers>>.

ARETOULI, E. et al. The Fate of the 0.5s: Predictors of 2-Year Outcome in Mild Cognitive Impairment. **Journal of the International Neuropsychological Society**, v. 17, n. 2, p. 277–288, 21 dez. 2010.

ASOCIAÇÃO AMERICANA DE PSIQUIATRIA. Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (DSM-5). v. 5a Ed., 2014.

AVILA-MUÑOZ, E.; ARIAS, C. When astrocytes become harmful: Functional and inflammatory responses that contribute to Alzheimer's disease. **Ageing Research Reviews**, v. 18, p. 29–40, nov. 2014.

AZIZI, G.; MIRSHAFIEY, A. The potential role of proinflammatory and antiinflammatory cytokines in Alzheimer disease pathogenesis. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, v. 34, n. 6, p. 881–895, 13 dez. 2012.

BALDUCCI, C. et al. Synthetic amyloid- β oligomers impair long-term memory independently of cellular prion protein. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 5, p. 2295–2300, 2 fev. 2010.

BANCHER, C. et al. Accumulation of abnormally phosphorylated τ precedes the formation of neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. **Brain Research**, v. 477, n. 1–2, p. 90–99, jan. 1989.

BEN-MENACHEM-ZIDON, O. et al. Intra-Hippocampal Transplantation of Neural Precursor Cells with Transgenic Over-Expression of IL-1 Receptor Antagonist Rescues Memory and Neurogenesis Impairments in an Alzheimer's Disease Model. **Neuropsychopharmacology**, v. 39, n. 2, p. 401–414, 19 jan. 2014.

BERTOLA, L. et al. Prevalence of Dementia and Cognitive Impairment No Dementia in a Large and Diverse Nationally Representative Sample: The ELSI-Brazil Study. **The Journals of Gerontology: Series A**, v. 78, n. 6, p. 1060–1068, 1 jun. 2023.

BERTOLUCCI et al. [The Mini-Mental State Examination in a general population: impact of educational status]. **Arquivos de neuro-psiquiatria**, v. 52, n. 1, p. 1–7, mar. 1994.

BERTOLUCCI et al. Applicability of the CERAD neuropsychological battery to Brazilian elderly. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 59, n. 3A, p. 532–536, set. 2001.

BEZZI, P. et al. CXCR4-activated astrocyte glutamate release via TNF α : amplification by microglia triggers neurotoxicity. **Nature Neuroscience**, v. 4, n. 7, p. 702–710, jul. 2001.

BIELEFELDT, V.; BOFF, R.; CASTELLO BRANCO, A. Statistical modeling: questions you have always wanted to ask but never had the courage to. **Clinical and Biomedical Research**, 2019.

BIGGAR, K. K.; STOREY, K. B. New Approaches to Comparative and Animal Stress Biology Research in the Post-genomic Era: A Contextual Overview. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, v. 11, n. 19, p. 138–146, set. 2014.

BLÖMEKE, L. et al. A β oligomers peak in early stages of Alzheimer's disease preceding tau pathology. **Alzheimer's & Dementia: Diagnosis, Assessment & Disease Monitoring**, v. 16, n. 2, 25 abr. 2024.

BORISH, L. C.; STEINKE, J. W. 2. Cytokines and chemokines. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 111, n. 2, p. S460–S475, fev. 2003.

BORSINI, A. et al. The role of inflammatory cytokines as key modulators of neurogenesis. **Trends in Neurosciences**, v. 38, n. 3, p. 145–157, mar. 2015.

BOULANGER, L. M. Immune Proteins in Brain Development and Synaptic Plasticity. **Neuron**, v. 64, n. 1, p. 93–109, out. 2009.

BRAESCH-ANDERSEN, S. et al. ApoE Production in Human Monocytes and Its Regulation by Inflammatory Cytokines. **PLoS ONE**, v. 8, n. 11, p. e79908, 14 nov. 2013.

BRIGAS, H. C. et al. IL-17 triggers the onset of cognitive and synaptic deficits in early stages of Alzheimer's disease. **Cell Reports**, v. 36, n. 9, p. 109574, ago. 2021.

BROWN, G. C.; BAL-PRICE, A. Inflammatory Neurodegeneration Mediated by Nitric Oxide, Glutamate, and Mitochondria. **Molecular Neurobiology**, v. 27, n. 3, p. 325–355, 2003.

BRUUNSGAARD, H. et al. Elevated levels of tumor necrosis factor alpha and mortality in centenarians. **The American Journal of Medicine**, v. 115, n. 4, p. 278–283, set. 2003.

BUCHHAVE, P. et al. Soluble TNF receptors are associated with A β metabolism and conversion to dementia in subjects with mild cognitive impairment. **Neurobiology of Aging**, v. 31, n. 11, p. 1877–1884, nov. 2010.

BUTCHER, L. et al. Association between plasma CCL11 (eotaxin-1) and cognitive status in older adults: Differences between rural and urban dwellers. **Experimental Gerontology**, v. 113, p. 173–179, nov. 2018.

CAMPBELL, M. R. et al. P-tau/A β 42 and A β 42/40 ratios in CSF are equally predictive of amyloid PET status. **Alzheimer's & dementia (Amsterdam, Netherlands)**, v. 13, n. 1, p. e12190, 2021.

CESARI, M. et al. Inflammatory Markers and Physical Performance in Older Persons: The

InCHIANTI Study. **The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences**, v. 59, n. 3, p. M242–M248, 1 mar. 2004.

CEYZÉRIAT, K. et al. The complex STATES of astrocyte reactivity: How are they controlled by the JAK–STAT3 pathway? **Neuroscience**, v. 330, p. 205–218, ago. 2016.

CHARTIER-HARLIN, M. C. et al. Screening for the β -amyloid precursor protein mutation (APP717: Val $\rightarrow$ Ile) in extended pedigrees with early onset Alzheimer's disease. **Neuroscience Letters**, v. 129, n. 1, p. 134–135, 5 ago. 1991.

CHEN, G. et al. Amyloid beta: structure, biology and structure-based therapeutic development. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 38, n. 9, p. 1205–1235, 17 set. 2017.

CHEN, X. et al. Cerebrospinal Fluid Inflammatory Cytokine Aberrations in Alzheimer's Disease, Parkinson's Disease and Amyotrophic Lateral Sclerosis: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Frontiers in Immunology**, v. 9, 19 set. 2018.

CHEN, Y. et al. Blood-brain barrier dysfunction and Alzheimer's disease: associations, pathogenic mechanisms, and therapeutic potential. **Frontiers in Aging Neuroscience**, v. 15, 13 nov. 2023.

CHEN; YU, Y. Tau and neuroinflammation in Alzheimer's disease: interplay mechanisms and clinical translation. **Journal of Neuroinflammation**, v. 20, n. 1, p. 165, 14 jul. 2023.

CHIARINI, A. et al. Danger-Sensing/Patten Recognition Receptors and Neuroinflammation in Alzheimer's Disease. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 23, p. 9036, 27 nov. 2020.

CHO, S.-H. et al. CX3CR1 Protein Signaling Modulates Microglial Activation and Protects against Plaque-independent Cognitive Deficits in a Mouse Model of Alzheimer Disease. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 37, p. 32713–32722, set. 2011.

CLAEYSEN, S. et al. Alzheimer culprits: Cellular crossroads and interplay. **Cellular Signalling**, v. 24, n. 9, p. 1831–1840, set. 2012.

CORDER, E. H. et al. Protective effect of apolipoprotein E type 2 allele for late onset Alzheimer disease. **Nature Genetics**, v. 7, n. 2, p. 180–184, jun. 1994.

CORRÊA, J. D. et al. Chemokines in CSF of Alzheimer's disease patients. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 69, n. 3, p. 455–459, jun. 2011.

CREAVIN, S. T. et al. Mini-Mental State Examination (MMSE) for the detection of dementia in clinically unevaluated people aged 65 and over in community and primary care populations. **The Cochrane database of systematic reviews**, n. 1, p. CD011145, 13 jan. 2016.

CUMMINGS, J. L. et al. The Neuropsychiatric Inventory: Comprehensive assessment of psychopathology in dementia. **Neurology**, v. 44, n. 12, p. 2308–2308, 1 dez. 1994.

DE MARTINIS, M. et al. Inflamm-aging and lifelong antigenic load as major determinants of ageing rate and longevity. **FEBS Letters**, v. 579, n. 10, p. 2035–2039, 11 abr. 2005.

DE STROOPER, B.; WOODGETT, J. Alzheimer's disease: mental plaque removal. **Nature**, v. 423, n. 6938, p. 392–393, maio 2003.

DINARELLO, C. A. Historical insights into cytokines. **European Journal of Immunology**, v. 37, n. S1, p. S34–S45, nov. 2007.

DISABATO, D. J.; QUAN, N.; GODBOUT, J. P. Neuroinflammation: the devil is in the details. **Journal of Neurochemistry**, v. 139, n. S2, p. 136–153, 4 out. 2016.

DUFF, K. et al. Increased amyloid- β 42(43) in brains of mice expressing mutant presenilin 1. **Nature**, v. 383, n. 6602, p. 710–713, out. 1996.

EFTEKHARZADEH, B. et al. Tau Protein Disrupts Nucleocytoplasmic Transport in Alzheimer's Disease. **Neuron**, v. 99, n. 5, p. 925–940.e7, set. 2018.

ELSHOURBAGY, N. A. et al. Apolipoprotein E mRNA is abundant in the brain and adrenals, as well as in the liver, and is present in other peripheral tissues of rats and marmosets. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 82, n. 1, p. 203–207, jan. 1985.

ENGELBORGH, S. et al. Consensus guidelines for lumbar puncture in patients with neurological diseases. **Alzheimer's & Dementia: Diagnosis, Assessment & Disease Monitoring**, v. 8, n. 1, p. 111–126, 18 jan. 2017.

ERICKSON, M. A. et al. Rapid Transport of CCL11 across the Blood-Brain Barrier: Regional Variation and Importance of Blood Cells. **Journal of Pharmacology and Experimental**

Therapeutics, v. 349, n. 3, p. 497–507, jun. 2014.

FAGAN, A. M. et al. Inverse relation between in vivo amyloid imaging load and cerebrospinal fluid A β 42 in humans. **Annals of Neurology**, v. 59, n. 3, p. 512–519, mar. 2006.

FAGAN, A. M. et al. Cerebrospinal fluid tau/beta-amyloid(42) ratio as a prediction of cognitive decline in nondemented older adults. **Archives of neurology**, v. 64, n. 3, p. 343–9, mar. 2007.

FARRER, L. et al. Effects of age, sex, and ethnicity on the association between apolipoprotein E genotype and Alzheimer disease. A meta-analysis. APOE and Alzheimer Disease Meta Analysis Consortium. **JAMA**, v. 278, n. 16, p. 1349–56, 1997.

FELSKY, D. et al. Neuropathological correlates and genetic architecture of microglial activation in elderly human brain. **Nature Communications**, v. 10, n. 1, p. 409, 24 jan. 2019.

FERNÁNDEZ, J. A. et al. The Damage Signals Hypothesis of Alzheimer's Disease Pathogenesis. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 14, n. 3, p. 329–333, 11 jun. 2008.

FETER, N. et al. Who are the people with Alzheimer's disease in Brazil? Findings from the Brazilian Longitudinal Study of Aging. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 24, 2021.

FOLSTEIN, M. F.; FOLSTEIN, S. E.; MCHUGH, P. R. "Mini-mental state". A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. **Journal of psychiatric research**, v. 12, n. 3, p. 189–98, nov. 1975.

FORLONI, G.; BALDUCCI, C. Alzheimer's Disease, Oligomers, and Inflammation. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 62, n. 3, p. 1261–1276, 13 mar. 2018.

FOSTER, J. R. The functions of cytokines and their uses in toxicology. **International journal of experimental pathology**, v. 82, n. 3, p. 171–92, jun. 2001.

FRANCESCHI, C. et al. The network and the remodeling theories of aging: historical background and new perspectives. **Experimental Gerontology**, v. 35, n. 6–7, p. 879–896, set. 2000.

GARWOOD, C. J. et al. Astrocytes are important mediators of A β -induced neurotoxicity and tau phosphorylation in primary culture. **Cell Death & Disease**, v. 2, n. 6, p. e167–e167, 2 jun.

2011.

GATE, D. et al. Macrophages in Alzheimer's disease: the blood-borne identity. **Journal of Neural Transmission**, v. 117, n. 8, p. 961–970, 2 ago. 2010.

GHOSH, S. et al. Sustained Interleukin-1 Overexpression Exacerbates Tau Pathology Despite Reduced Amyloid Burden in an Alzheimer's Mouse Model. **Journal of Neuroscience**, v. 33, n. 11, p. 5053–5064, 13 mar. 2013.

GOATE, A. Segregation of a missense mutation in the amyloid β -protein precursor gene with familial Alzheimer's disease. In: **Alzheimer: 100 Years and Beyond**. [s.l.] Springer Berlin Heidelberg, 1991. p. 157–161.

GORLOVOY, P. et al. Accumulation of tau induced in neurites by microglial proinflammatory mediators. **The FASEB Journal**, v. 23, n. 8, p. 2502–2513, 16 ago. 2009.

GREENBERG, S. G.; DAVIES, P. A preparation of Alzheimer paired helical filaments that displays distinct tau proteins by polyacrylamide gel electrophoresis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 87, n. 15, p. 5827–5831, ago. 1990.

GUARENE, M. et al. Luminex ® xMAP ® technology is an effective strategy for high-definition human leukocyte antigen typing of cord blood units prior to listing. **The International Journal of Artificial Organs**, v. 41, n. 5, p. 284–288, 16 maio 2018.

HALLE, A. et al. The NALP3 inflammasome is involved in the innate immune response to amyloid- β . **Nature Immunology**, v. 9, n. 8, p. 857–865, 11 ago. 2008.

HAMPEL, H. et al. Measurement of Phosphorylated Tau Epitopes in the Differential Diagnosis of Alzheimer Disease. **Archives of General Psychiatry**, v. 61, n. 1, p. 95, 1 jan. 2004.

HANSEN, E. O. et al. Millipore xMap® Luminex (HATMAG-68K): An Accurate and Cost-Effective Method for Evaluating Alzheimer's Biomarkers in Cerebrospinal Fluid. **Frontiers in Psychiatry**, v. 12, 31 ago. 2021.

HANSSON, O. et al. Association between CSF biomarkers and incipient Alzheimer's disease in patients with mild cognitive impairment: a follow-up study. **The Lancet Neurology**, v. 5, n. 3, p. 228–234, mar. 2006.

HANSSON, O. et al. The impact of preanalytical variables on measuring cerebrospinal fluid

biomarkers for Alzheimer's disease diagnosis: A review. **Alzheimer's & Dementia**, v. 14, n. 10, p. 1313–1333, 22 out. 2018a.

HANSSON, O. et al. CSF biomarkers of Alzheimer's disease concord with amyloid- β PET and predict clinical progression: A study of fully automated immunoassays in BioFINDER and ADNI cohorts. **Alzheimer's & Dementia**, v. 14, n. 11, p. 1470–1481, 27 nov. 2018b.

HEBERT, L. E. et al. Change in risk of Alzheimer disease over time. **Neurology**, v. 75, n. 9, p. 786–791, 31 ago. 2010.

HENEKA, M. T. et al. Neuroinflammation in Alzheimer's disease. **The Lancet Neurology**, v. 14, n. 4, p. 388–405, abr. 2015.

HENEKA, M. T.; KUMMER, M. P.; LATZ, E. Innate immune activation in neurodegenerative disease. **Nature Reviews Immunology**, v. 14, n. 7, p. 463–477, 25 jul. 2014.

HENEKA, M. T.; MCMANUS, R. M.; LATZ, E. Inflammasome signalling in brain function and neurodegenerative disease. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 19, n. 10, p. 610–621, 11 out. 2018.

HOSMER, D.; LEMESHOW, S. **Applied Logistic Regression**. Third Edit ed. [s.l: s.n.].

HUMPEL, C. Identifying and validating biomarkers for Alzheimer's disease. **Trends in Biotechnology**, v. 29, n. 1, p. 26–32, jan. 2011.

HYMAN, B. T. et al. Alz-50 Antibody recognizes alzheimer-related neuronal changes. **Annals of Neurology**, v. 23, n. 4, p. 371–379, 8 abr. 1988.

IBGE, I. B. DE G. E. **Censo demográfico 2010**.

IQUBAL, A. et al. Intranasally administered pitavastatin ameliorates pentylene-tetrazol-induced neuroinflammation, oxidative stress and cognitive dysfunction. **Life Sciences**, v. 211, p. 172–181, out. 2018.

IQUBAL, A. et al. Gene Therapy, A Novel Therapeutic Tool for Neurological Disorders: Current Progress, Challenges and Future Prospective. **Current Gene Therapy**, v. 20, n. 3, p. 184–194, 9 out. 2020.

ISING, C. et al. NLRP3 inflammasome activation drives tau pathology. **Nature**, v. 575, n.

7784, p. 669–673, 28 nov. 2019.

JACK, C. R. et al. NIA-AA Research Framework: Toward a biological definition of Alzheimer's disease. **Alzheimer's and Dementia**, v. 14, n. 4, p. 535–562, 2018.

JACK, C. R. et al. Revised criteria for diagnosis and staging of Alzheimer's disease: Alzheimer's Association Workgroup. **Alzheimer's & Dementia**, 27 jun. 2024.

JANKOWSKY, J. L. et al. Mutant presenilins specifically elevate the levels of the 42 residue β -amyloid peptide in vivo: evidence for augmentation of a 42-specific γ secretase. **Human Molecular Genetics**, v. 13, n. 2, p. 159–170, 15 jan. 2004.

JOLY-AMADO, A. et al. CCL2 Overexpression in the Brain Promotes Glial Activation and Accelerates Tau Pathology in a Mouse Model of Tauopathy. **Frontiers in Immunology**, v. 11, 20 maio 2020.

JONSSON, T. et al. A mutation in APP protects against Alzheimer's disease and age-related cognitive decline. **Nature**, v. 488, n. 7409, p. 96–99, 11 ago. 2012.

JORFI, M. et al. Infiltrating CD8+ T cells exacerbate Alzheimer's disease pathology in a 3D human neuroimmune axis model. **Nature Neuroscience**, v. 26, n. 9, p. 1489–1504, 24 set. 2023.

KITAZAWA, M. et al. Blocking IL-1 Signaling Rescues Cognition, Attenuates Tau Pathology, and Restores Neuronal β -Catenin Pathway Function in an Alzheimer's Disease Model. **The Journal of Immunology**, v. 187, n. 12, p. 6539–6549, 15 dez. 2011.

KIYOTA, T. et al. CNS expression of anti-inflammatory cytokine interleukin-4 attenuates Alzheimer's disease-like pathogenesis in APP+PS1 bigenic mice. **The FASEB Journal**, v. 24, n. 8, p. 3093–3102, 6 ago. 2010.

KOCKX, M.; TRAINI, M.; KRITHARIDES, L. Cell-specific production, secretion, and function of apolipoprotein E. **Journal of Molecular Medicine**, v. 96, n. 5, p. 361–371, 7 maio 2018.

LAHIRI, D. K.; NUMBERGER, J. I. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. **Nucleic Acids Research**, v. 19, n. 19, p. 5444–5444, 1991.

LANE, C. A.; HARDY, J.; SCHOTT, J. M. Alzheimer's disease. **European Journal of Neurology**, v. 25, n. 1, p. 59–70, 19 jan. 2018.

LARSON, M. E.; LESNÉ, S. E. Soluble A β oligomer production and toxicity. **Journal of Neurochemistry**, v. 120, n. s1, p. 125–139, 28 jan. 2012.

LAURENT, C. et al. Hippocampal T cell infiltration promotes neuroinflammation and cognitive decline in a mouse model of tauopathy. **Brain**, v. 140, n. 1, p. 184–200, jan. 2017.

LAUTENSCHLAGER, N. T. et al. Risk of dementia among relatives of Alzheimer's disease patients in the MIRAGE study. **Neurology**, v. 46, n. 3, p. 641–650, mar. 1996.

LEE, V. M.-Y.; GOEDERT, M.; TROJANOWSKI, J. Q. Neurodegenerative Tauopathies. **Annual Review of Neuroscience**, v. 24, n. 1, p. 1121–1159, mar. 2001.

LENG, F.; EDISON, P. Neuroinflammation and microglial activation in Alzheimer disease: where do we go from here? **Nature Reviews Neurology**, v. 17, n. 3, p. 157–172, 14 mar. 2021.

LESNÉ, S. E. et al. Brain amyloid- β oligomers in ageing and Alzheimer's disease. **Brain**, v. 136, n. 5, p. 1383–1398, maio 2013.

LEVY-LAHAD, E. et al. A Familial Alzheimer's Disease Locus on Chromosome 1. **Science**, v. 269, n. 5226, p. 970–973, 18 ago. 1995.

LEYNS, C.; HOLTZMAN, D. Glial contributions to neurodegeneration in tauopathies. **Molecular Neurodegeneration**, v. 12, n. 1, p. 50, 29 dez. 2017.

LI, Y. et al. Interleukin-1 Mediates Pathological Effects of Microglia on Tau Phosphorylation and on Synaptophysin Synthesis in Cortical Neurons through a p38-MAPK Pathway. **The Journal of Neuroscience**, v. 23, n. 5, p. 1605–1611, 1 mar. 2003.

LIN, E. et al. Association and Interaction Effects of Interleukin-12 Related Genes and Physical Activity on Cognitive Aging in Old Adults in the Taiwanese Population. **Frontiers in Neurology**, v. 10, 9 out. 2019.

LIN, Y.-T. et al. APOE4 Causes Widespread Molecular and Cellular Alterations Associated with Alzheimer's Disease Phenotypes in Human iPSC-Derived Brain Cell Types. **Neuron**, v. 98, n. 6, p. 1141–1154.e7, jun. 2018.

LIU, C.-C. et al. Apolipoprotein E and Alzheimer disease: risk, mechanisms and therapy. **Nature Reviews Neurology**, v. 9, n. 2, p. 106–118, 8 fev. 2013.

LIVAK, K. J.; MARMARO, J.; TODD, J. A. Towards fully automated genome-wide polymorphism screening. **Nature Genetics**, v. 9, n. 4, p. 341–342, abr. 1995.

LIVINGSTON, G. et al. Dementia prevention, intervention, and care: 2020 report of the Lancet Commission. **The Lancet**, v. 396, n. 10248, p. 413–446, ago. 2020.

LONG, S.; BENOIST, C.; WEIDNER, W. **World Alzheimer Report 2023: Reducing dementia risk: never too early, never too late**. London, England: [s.n.].

MAESTRE, G. E. et al. Incidence of dementia in elderly Latin Americans: Results of the Maracaibo Aging Study. **Alzheimer's & Dementia**, v. 14, n. 2, p. 140–147, 21 fev. 2018.

MAHLEY, R. W. Apolipoprotein E: Cholesterol Transport Protein with Expanding Role in Cell Biology. **Science**, v. 240, n. 4852, p. 622–630, 29 abr. 1988.

MAPHIS, N. et al. Reactive microglia drive tau pathology and contribute to the spreading of pathological tau in the brain. **Brain**, v. 138, n. 6, p. 1738–1755, jun. 2015.

MARCUS, J. N.; SCHACHTER, J. Targeting Post-translational Modifications on Tau as a Therapeutic Strategy for Alzheimer's Disease. **Journal of Neurogenetics**, v. 25, n. 4, p. 127–133, 17 dez. 2011.

MATTSSON, N. et al. The Alzheimer's Association external quality control program for cerebrospinal fluid biomarkers. **Alzheimer's & Dementia**, v. 7, n. 4, p. 386, jul. 2011.

MELO, S. C. DE et al. Dementias in Brazil: increasing burden in the 2000–2016 period. Estimates from the Global Burden of Disease Study 2016. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 78, n. 12, p. 762–771, dez. 2020.

MCKHANN, G. M. 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. **Alzheimer's & Dementia**, v. 7, n. 3, p. 263–269, 22 maio 2011.

MERAZ-RÍOS, M. A. et al. Inflammatory process in Alzheimer's Disease. **Frontiers in**

Integrative Neuroscience, v. 7, 2013.

MINTER, M. R.; TAYLOR, J. M.; CRACK, P. J. The contribution of neuroinflammation to amyloid toxicity in Alzheimer's disease. **Journal of Neurochemistry**, v. 136, n. 3, p. 457–474, fev. 2016.

MIR, R. H. et al. Natural Anti-inflammatory Compounds as Drug Candidates in Alzheimer's Disease. **Current Medicinal Chemistry**, v. 28, n. 23, p. 4799–4825, 2 ago. 2021.

MOLINUEVO, J. L. et al. Current state of Alzheimer's fluid biomarkers. **Acta Neuropathologica**, v. 136, n. 6, p. 821–853, 28 dez. 2018.

MORRIS, J. C. The Clinical Dementia Rating (CDR): current version and scoring rules. **Neurology**, v. 43, n. 11, p. 2412–4, nov. 1993.

NAKANISHI, A. et al. Amyloid β directly interacts with NLRP3 to initiate inflammasome activation: identification of an intrinsic NLRP3 ligand in a cell-free system. **Inflammation and Regeneration**, v. 38, n. 1, p. 27, 12 dez. 2018.

NAMBA, Y. et al. Apolipoprotein E immunoreactivity in cerebral amyloid deposits and neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease and kuru plaque amyloid in Creutzfeldt-Jakob disease. **Brain Research**, v. 541, n. 1, p. 163–166, fev. 1991.

NEUROLOGY, A. A. OF. **AAN Guideline Summary for clinicians: detection, diagnosis and management of dementia**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <t: http://tools.aan.com/professionals/practice/pdfs/dementia_guideline.pdf>.

NEWCOMBE, E. A. et al. Inflammation: the link between comorbidities, genetics, and Alzheimer's disease. **Journal of Neuroinflammation**, v. 15, n. 1, p. 276, 24 dez. 2018.

NITRINI, R. et al. Testes neuropsicológicos de aplicação simples para o diagnóstico de demência. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 52, n. 4, p. 457–465, dez. 1994.

ODDO, S. et al. Triple-Transgenic Model of Alzheimer's Disease with Plaques and Tangles. **Neuron**, v. 39, n. 3, p. 409–421, jul. 2003.

OLGIATI, P. et al. APOE epsilon-4 allele and cytokine production in Alzheimer's disease. **International Journal of Geriatric Psychiatry**, v. 25, n. 4, p. 338–344, abr. 2010.

OLSSON, B. et al. CSF and blood biomarkers for the diagnosis of Alzheimer's disease: a systematic review and meta-analysis. **The Lancet Neurology**, v. 15, n. 7, p. 673–684, jun. 2016.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Demência**. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dementia>>.

PARAJULI, B. et al. Oligomeric amyloid β induces IL-1 β processing via production of ROS: implication in Alzheimer's disease. **Cell Death & Disease**, v. 4, n. 12, p. e975–e975, 19 dez. 2013.

PATANI, R.; HARDINGHAM, G. E.; LIDDELOW, S. A. Functional roles of reactive astrocytes in neuroinflammation and neurodegeneration. **Nature Reviews Neurology**, v. 19, n. 7, p. 395–409, 12 jul. 2023.

PETERSEN, R. C. et al. Mild cognitive impairment: a concept in evolution. **Journal of Internal Medicine**, v. 275, n. 3, p. 214–228, 8 mar. 2014.

PFEFFER, R. I. et al. Measurement of Functional Activities in Older Adults in the Community. **Journal of Gerontology**, v. 37, n. 3, p. 323–329, 1 maio 1982.

RANGANATHAN, S. et al. Assessment of protein stability in cerebrospinal fluid using surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry protein profiling. **Clinical Proteomics**, v. 2, n. 1–2, p. 91–101, mar. 2006.

REZAI-ZADEH, K.; GATE, D.; TOWN, T. CNS Infiltration of Peripheral Immune Cells: D-Day for Neurodegenerative Disease? **Journal of Neuroimmune Pharmacology**, v. 4, n. 4, p. 462–475, 11 dez. 2009.

SACHDEV, P. S. et al. DSM-5 and Mental Disorders in Older Individuals: An Overview. **Harvard review of psychiatry**, v. 23, n. 5, p. 320–8, 2015.

SALVIOLI, S. et al. Inflamm-Aging, Cytokines and Aging: State of the Art, New Hypotheses on the Role of Mitochondria and New Perspectives from Systems Biology. **Current Pharmaceutical Design**, v. 12, n. 24, p. 3161–3171, 1 ago. 2006.

SARTORI, A. C. et al. The Impact of Inflammation on Cognitive Function in Older Adults. **Journal of Neuroscience Nursing**, v. 44, n. 4, p. 206–217, ago. 2012.

SAUNDERS, A. M. et al. Association of apolipoprotein E allele $\epsilon 4$ with late-onset familial and sporadic Alzheimer's disease. **Neurology**, v. 43, n. 8, p. 1467–1467, ago. 1993.

SCHAFER, K. A. et al. Reliability of monitoring the clinical dementia rating in multicenter clinical trials. **Alzheimer disease and associated disorders**, v. 18, n. 4, p. 219–22, 2004.

SCHELTENS, P. et al. Alzheimer's disease. **The Lancet**, v. 388, n. 10043, p. 505–517, jul. 2016.

SCHEPER, W. et al. Function and dysfunction of the presenilins. **Alzheimer's Reports**, v. 2, n. 2, p. 73–81, 1999.

SELKOE, D. J. Cell biology of protein misfolding: The examples of Alzheimer's and Parkinson's diseases. **Nature Cell Biology**, v. 6, n. 11, p. 1054–1061, 1 nov. 2004.

SHULMAN, K. I. Clock-drawing: is it the ideal cognitive screening test? **International Journal of Geriatric Psychiatry**, v. 15, n. 6, p. 548–561, jun. 2000.

SNIDER, B. J. et al. Cerebrospinal fluid biomarkers and rate of cognitive decline in very mild dementia of the Alzheimer type. **Archives of neurology**, v. 66, n. 5, p. 638–45, maio 2009.

STONE, N. J. 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. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 63, n. 25 Pt B, p. 2889–934, 1 jul. 2014.

SU, F.; BAI, F.; ZHANG, Z. Inflammatory Cytokines and Alzheimer's Disease: A Review from the Perspective of Genetic Polymorphisms. **Neuroscience Bulletin**, v. 32, n. 5, p. 469–480, 27 out. 2016.

SWANSON, A. et al. Neuroinflammation in Alzheimer's disease: Pleiotropic roles for cytokines and neuronal pentraxins. **Behavioural Brain Research**, v. 347, p. 49–56, jul. 2018.

TAIPA, R. et al. Proinflammatory and anti-inflammatory cytokines in the CSF of patients with Alzheimer's disease and their correlation with cognitive decline. **Neurobiology of Aging**, v. 76, p. 125–132, abr. 2019.

TAN, J. et al. Microglial Activation Resulting from CD40-CD40L Interaction After β -

Amyloid Stimulation. **Science**, v. 286, n. 5448, p. 2352–2355, 17 dez. 1999.

TANG, J. X. et al. Human Alzheimer and Inflammation Biomarkers after Anesthesia and Surgery. **Anesthesiology**, v. 115, n. 4, p. 727–732, 1 out. 2011.

THAKUR, S. et al. Neuroinflammation in Alzheimer's Disease: Current Progress in Molecular Signaling and Therapeutics. **Inflammation**, v. 46, n. 1, p. 1–17, 20 fev. 2023.

THAWKAR, B. S.; KAUR, G. Inhibitors of NF- κ B and P2X7/NLRP3/Caspase 1 pathway in microglia: Novel therapeutic opportunities in neuroinflammation induced early-stage Alzheimer's disease. **Journal of Neuroimmunology**, v. 326, p. 62–74, jan. 2019.

TIWARI, S. et al. Alzheimer's disease: pathogenesis, diagnostics, and therapeutics. **International Journal of Nanomedicine**, v. Volume 14, p. 5541–5554, jul. 2019.

TOLAR, M. et al. Neurotoxic Soluble Amyloid Oligomers Drive Alzheimer's Pathogenesis and Represent a Clinically Validated Target for Slowing Disease Progression. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 12, p. 6355, 14 jun. 2021.

TOLEDO, J. B. et al. Nonlinear Association Between Cerebrospinal Fluid and Florbetapir F-18 β -Amyloid Measures Across the Spectrum of Alzheimer Disease. **JAMA Neurology**, v. 72, n. 5, p. 571, 1 maio 2015.

TOMBAUGH, T. N.; MCINTYRE, N. J. The mini-mental state examination: a comprehensive review. **Journal of the American Geriatrics Society**, v. 40, n. 9, p. 922–35, set. 1992.

VENEGAS, C. et al. Microglia-derived ASC specks cross-seed amyloid- β in Alzheimer's disease. **Nature**, v. 552, n. 7685, p. 355–361, 21 dez. 2017.

VILLEDA, S. A. et al. The ageing systemic milieu negatively regulates neurogenesis and cognitive function. **Nature**, v. 477, n. 7362, p. 90–94, set. 2011.

VISSER, P. J. et al. Prevalence and prognostic value of CSF markers of Alzheimer's disease pathology in patients with subjective cognitive impairment or mild cognitive impairment in the DESCRIPA study: a prospective cohort study. **The Lancet Neurology**, v. 8, n. 7, p. 619–627, jul. 2009.

WANG et al. Role of pro-inflammatory cytokines released from microglia in Alzheimer's disease. **Annals of translational medicine**, v. 3, n. 10, p. 136, jun. 2015.

WANG, C. et al. Gain of toxic apolipoprotein E4 effects in human iPSC-derived neurons is ameliorated by a small-molecule structure corrector. **Nature Medicine**, v. 24, n. 5, p. 647–657, 9 maio 2018.

WANG, H. et al. Chemokines in patients with Alzheimer's disease: A meta-analysis. **Frontiers in Aging Neuroscience**, v. 15, 9 mar. 2023.

WENDELN, A.-C. et al. Innate immune memory in the brain shapes neurological disease hallmarks. **Nature**, v. 556, n. 7701, p. 332–338, 11 abr. 2018.

WOJCIESZAK, J.; KUCZYŃSKA, K.; ZAWILSKA, J. B. Role of Chemokines in the Development and Progression of Alzheimer's Disease. **Journal of Molecular Neuroscience**, v. 72, n. 9, p. 1929–1951, 12 set. 2022.

WU, Y.-T. et al. The changing prevalence and incidence of dementia over time — current evidence. **Nature Reviews Neurology**, v. 13, n. 6, p. 327–339, 12 jun. 2017.

YANG, T. et al. Large Soluble Oligomers of Amyloid β -Protein from Alzheimer Brain Are Far Less Neuroactive Than the Smaller Oligomers to Which They Dissociate. **The Journal of Neuroscience**, v. 37, n. 1, p. 152–163, 4 jan. 2017.

YANG, J.; WISE, L.; FUKUCHI, K. TLR4 Cross-Talk With NLRP3 Inflammasome and Complement Signaling Pathways in Alzheimer's Disease. **Frontiers in Immunology**, v. 11, 23 abr. 2020.

ZHANG, J.-M.; AN, J. Cytokines, Inflammation, and Pain. **International Anesthesiology Clinics**, v. 45, n. 2, p. 27–37, 2007.

ZHENG, C.; ZHOU, X.-W.; WANG, J.-Z. The dual roles of cytokines in Alzheimer's disease: update on interleukins, TNF- α , TGF- β and IFN- γ . **Translational Neurodegeneration**, v. 5, n. 1, p. 7, 5 dez. 2016.

ANEXO 1. MATERIAL SUPLEMENTAR DOS MÉTODOS

Tabela 1. Limites de detecção da curva padrão para os biomarcadores da doença de Alzheimer

Padrão	Aβ40	Aβ42	tTau	pTau
Padrão 1	21	3	11	0.7
Padrão 2	62	8	33	2.1
Padrão 3	185	25	99	6.2
Padrão 4	556	74	296	18.5
Padrão 5	1.667	222	889	55.6
Padrão 6	5.000	667	2.667	166.7
Padrão 7	15.000	2.000	8.000	500

Legenda: A β : beta amiloide; p-tau: proteína tau fosforilada; t-tau: proteína tau total.

Tabela 2. Controle de qualidade e intervalo esperado

Analito	Nível de controle de qualidade	Intervalo esperado (pg/ml)
A β 40	Control I	345-716
	Control II	1303-2707
A β 42	Control I	47-97
	Control II	177-368
tTau	Control I	198-411
	Control II	742-1541
pTau	Control I	12--24
	Control II	46-95

Legenda: A β : beta amiloide; p-tau: proteína tau fosforilada; t-tau: proteína tau total.

Tabela 3. Recuperação em amostras de líquido cefalorraquidiano

Analito	% de recuperação em amostras de líquido cefalorraquidiano
A β 40	101
A β 42	109
tTau	98
pTau	91

Legenda: A β : beta amilóide; p-tau: proteína tau fosforilada; t-tau: proteína tau total.

Tabela 4. Limites de detecção da curva padrão para as citocinas

Analito	Valores S1 pg/ml	Valores S8 pg/ml	Faixa de controle pg/ml
FGF-Basico	50,124	0,00306	253-591
Eotaxina	2,411	0,00015	6-14
G-CSF	147,139	0,00898	941-2,196
GM-CSF	6,993	0,00043	33-78
IFN γ	32,873	0,00201	147-342
IL-1 β	8,63	0,00053	36-84
IL-1ra	156,832	0,00957	740-1,728
IL-2	45,753	0,00279	212-495
IL-4	3,454	0,00021	6-14
IL-5	175,664	0,01072	869-2,028
IL-6	7,023	0,00043	29-67
IL-7	59,322	0,00362	207-482
IL-8	11,828	0,00072	28-65
IL-9	79,136	0,00483	283-660
IL-10	29,333	0,00179	122-285
IL-12	35,294	0,00215	166-387
IL-13	4,631	0,00028	17-40
IL-15	349,512	0,02133	1,485-3,464
IL-17	60,959	0,00372	203-473
IP-10	15,69	0,00096	23-53
MCP1	8,808	0,00054	34-78
MIP1a	857	0,05231	4-9
MIP1 β	6,737	0,00041	31-72
PDGFBB	53,744	0,00328	188-439
RANTES	28,181	0,00172	142-332
TNFa	143,425	0,00875	598-1,396
VEGF	162,418	0,00991	383-895

Legenda: IL: interleucina; FGF básico: fator básico de crescimento de fibroblastos; G-CSF: fator estimulador de colônias de granulócitos; GM-CSF: fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos; IFN-g: interferon-gama; IP-10: proteína induzível por interferon-gama; MCP-1: proteína quimiotática de monócitos 1; MIP1 α : proteína inflamatória de macrófagos-1 alfa; MIP1 β : proteína inflamatória de macrófagos-1 beta; PDGF-BB: fator de crescimento derivado de plaquetas; TNF: fator de necrose tumoral; VEGF: fator de crescimento endotelial vascular.

ANEXO 2. MATERIAL SUPLEMENTAR ARTIGO 1

Supplementary Table 1. Comparisons of CSF cytokine levels between non-demented and demented groups.

Cytokine	Non-demented (n=54)	Demented (n=54)	p-value
	Median pg/ml (P25-P75)	Median pg/ml (P25-P75)	
Eotaxin	0,89 (0,58-1,09)	0,895 (0,66-1,26)	.253
FGF Basic	1,88 (1,76-1,88)	1,88 (1,76-1,94)	.916
G-CSF	9,78 (7,535-14,57)	12,185 (9,44-16,6)	.033
GM-CSF	0,75 (0,7-0,8)	0,75 (0,7-0,78)	.404
IFNγ	0,45 (0,35-0,59)	0,41 (0,35-0,54)	.254
IL-1β	0,25 (0,22-0,25)	0,25 (0,25-0,25)	.116
IL-1ra	22,1 (18,58-28,05)	18,58 (18,58-25,21)	.190
IL-2	0,51 (0,37-0,51)	0,51 (0,37-0,51)	.850
IL-4	0,09 (0,09-0,12)	0,09 (0,09-0,14)	.059
IL-5	7,12 (5,07-9,09)	7,12 (5,07-9,09)	.636
IL-6	1,08 (0,7-1,6)	1,12 (0,58-1,58)	.749
IL-8	18,09 (14,42-24,05)	16,145 (13,77-19,32)	.102
IL-9	2,08 (1,74-2,73)	2,08 (1,74-2,73)	.962
IL-10	0,48 (0,28-0,67)	0,48 (0,48-0,48)	.757
IL-12	0,43 (0,03-0,43)	0,43 (0,43-0,8)	.075
IL-13	0,52 (0,52-0,52)	0,52 (0,32-0,52)	.264

Supplementary Table 1. Continued comparisons of CSF cytokine levels between non-demented and demented groups.

Cytokine	Non-demented (n=54)	Demented (n=54)	p-value
	Median (P25-P75)	Median (P25-P75)	
IL-15	66,88 (59,51-73,74)	66,88 (59,51-73,74)	.845
IL-17	0,44 (0,44-0,52)	0,46 (0,44-0,52)	.977
IP-10	634,82 (424,46-1074,65)	642,32 (370,25-854,48)	.562
MCP-1	137,34 (113,32-163,37)	126,645 (113,74-150,68)	.308
MIP1α	1,585 (1,32-2,08)	1,925 (1,55-2,23)	.033
MIP1β	5,08 (3,6-6,6)	5,215 (3,75-6,7)	.735
PDGFBB	5,84 (4,68-6,96)	5,84 (4,68-6,96)	.484
RANTES	3,25 (2,89-4,29)	3,6 (2,71-5,29)	.635
TNFα	1,815 (1,62-2,2)	2,01 (1,62-2,39)	.090
VEGF	5,095 (4,43-6,13)	5,095 (3,97-6,13)	.840

CSF: cerebrospinal fluid; IL: interleukin; FGF basic: basic fibroblast growth factor; G-CSF: granulocyte colony-stimulating factor; GM-CSF: granulocyte-macrophage colony-stimulating factor; IFN-g: interferon-gamma; IP-10: Interferon-gamma inducible protein; MCP-1: monocyte chemotactic protein 1; MIP1 α : macrophage inflammatory protein-1 alpha; MIP1 β : macrophage inflammatory protein-1 beta; PDGF-BB: platelet-derived growth factor; TNF: tumor necrosis factor; VEGF: vascular endothelial growth factor.

Supplementary Table 2. Correlation coefficients of A β 42 predictors network Analysis

Variable	A β 42 Network						
	IP-10	VEGF	IL-13	Sex	Age	FE	APOE ϵ 4
IP-10	0.000	0.262	0.068	0.332	0.162	-0.205	-0.046
VEGF	0.262	0.000	0.207	0.189	0.185	-0.143	0.061
IL-13	0.068	0.207	0.000	0.006	0.096	-0.140	-0.170
Sex	0.332	0.189	0.006	0.000	-0.111	-0.023	0.140
Age	0.162	0.185	0.096	-0.111	0.000	-0.265	-0.008
FE	-0.205	-0.143	-0.140	-0.023	-0.265	0.000	0.046
APOE ϵ 4	-0.046	0.061	-0.170	0.140	-0.008	0.046	0.000

Abbreviations: IP-10: Interferon-gamma inducible protein; VEGF: vascular endothelial growth factor; IL-13: Interleukin-13; FE: Formal Education; APOE ϵ 4: Apolipoprotein E ϵ 4 allele.

Supplementary Table 3. Correlations coefficients of Tau predictors network analyses

Variable	Tau Network									
	MIP1a	Sex	MCP1	Age	IL1-ra	IL-4	IL-10	IL-9	APOE ϵ 4	FE
MIP1a	0.000	-0.111	0.101	0.390	0.322	0.458	0.290	0.358	-0.110	-0.099
Sex	-0.111	0.000	-0.048	-0.111	0.011	-0.033	0.088	0.105	0.140	-0.023
MCP1	0.101	-0.048	0.000	0.089	0.071	0.045	-0.016	0.049	-0.018	-0.040
Age	0.390	-0.111	0.089	0.000	0.076	0.208	0.110	0.201	-0.008	-0.265
IL1-ra	0.322	0.011	0.071	0.076	0.000	0.079	0.055	0.012	-0.140	-0.039
IL-4	0.458	-0.033	0.045	0.208	0.079	0.000	0.422	0.365	-0.039	-0.149
IL-10	0.290	0.088	-0.016	0.110	0.055	0.422	0.000	0.328	-0.128	-0.076
IL-9	0.358	0.105	0.049	0.201	0.012	0.365	0.328	0.000	0.063	-0.072
APOE ϵ 4	-0.110	0.140	-0.018	-0.008	-0.140	-0.039	-0.128	0.063	0.000	0.046
FE	-0.099	-0.023	-0.040	-0.265	-0.039	-0.149	-0.076	-0.072	0.046	0.000

Abbreviations: MIP1a: Macrophage inflammatory protein-1 alpha; MCP1: Monocyte chemotactic protein 1; IL1-ra: Interleukin-1 receptor antagonist; IL-4: Interleukin 4; IL-10: Interleukin 10; IL-9: Interleukin 9; APOE ϵ 4: Apolipoprotein E ϵ 4 allele; FE: Formal Education.

ANEXO 3. MATERIAL SUPLEMENTAR ARTIGO 2

Supplementary table 1. Clinical and sociodemographic characteristics of the sample

Variable	Median (P25-P75)
Sex (Women)	63.88%
Age (years)	76 (70.5-80)
Formal Education (years)	4 (3-10)
CDR 0	21 (19.44%)
0.5	33 (30.55%)
1	54 (50%)
MMSE	23 (20-26)
CSF A β 42	499.99 (358.36-728.87)
CSF pTau	69.57 (50.20-114.01)
CSF tTau	1102.87 (852.415-1525.95)
APOE ϵ 4 carrier	39.04%

Note: sex: was defined as man and woman; MMSE: mini-mental state exam; CDR: Clinical Dementia Rating; CSF: cerebrospinal fluid; A β 42: amyloid beta protein 42; pTau: phosphorylated tau protein; tTau: total Tau; APOE: apolipoprotein ϵ 4 allele. All dementia patients were classified as CDR1.

Supplementary table 2. MMSE predictors Network analyses, coefficients of correlations

Network										
Variable	Eotaxin	IL-12	IL1-ra	RANTES	Sex	Age	FE	APOEε4	AB42	pTau
Eotaxin	0.000	0.321	0.000	0.699	0.000	0.244	-0.209	0.000	0.000	0.198
IL-12	0.321	0.000	0.193	0.215	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
IL1-ra	0.000	0.193	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
RANTES	0.699	0.215	0.000	0.000	0.000	0.299	0.000	0.000	0.000	0.000
Sex	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
Age	0.244	0.000	0.000	0.299	0.000	0.000	-0.265	0.000	0.000	0.000
FE	-0.209	0.000	0.000	0.000	0.000	-0.265	0.000	0.000	0.000	0.000
APOEε4	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	-0.314	0.387
AB42	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	-0.314	0.000	-0.312
pTau	0.198	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.387	-0.312	0.000

Abbreviations: IL-12: Interleukin-12; IL-1ra: Interleukin- Receptor Antagonist; RANTES: Chemokine Ligand 5; FE: Formal Education; APOEε4: Apolipoprotein E ε4 allele; AB42: Amyloid Beta 42; pTau: Phosphorylated Tau Protein.

ANEXO 4. COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

- DADOS DA VERSÃO DO PROJETO DE PESQUISA	
Título da Pesquisa: Perfil de biomarcadores neuroinflamatórios no Líquido Cefalorraquidiano e no sangue periférico de pacientes sem comprometimento cognitivo objetivo, com Comprometimento Cognitivo Leve e Demência por Doença de Alzheimer provável.	
Pesquisador Responsável: MARIA APARECIDA CAMARGOS BICALHO	
Área Temática:	
Versão: 1	
CAAE: 72729423.3.0000.5149	
Submetido em: 07/08/2023	
Instituição Proponente: Faculdade de Medicina da UFMG	
Situação da Versão do Projeto: Aprovado	
Localização atual da Versão do Projeto: Pesquisador Responsável	
Patrocinador Principal: PRO REITORIA DE PESQUISA CONSELHO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO CIENTIFICO E TECNOLÓGICO-CNPQ	
	
Comprovante de Recepção:  PB_COMPROVANTE_RECEPCAO_2084572	

ANEXO 5. Termos de consentimento livre e esclarecido (TCLEs/TALE)

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) para participantes idosos:

Você está sendo convidado a participar da pesquisa “Perfil de biomarcadores neuroinflamatórios no Líquido Cefalorraquidiano e no sangue periférico de pacientes sem comprometimento cognitivo objetivo, com Comprometimento Cognitivo Leve e Demência por Doença de Alzheimer provável”, que pretendem avaliar e acompanhar as pessoas que não apresentam problemas nas funções cognitivas, como memória, atenção, organização, linguagem, aquelas que apresentam Comprometimento Cognitivo Leve, um quadro pré-demência, e aquelas com Demência de Alzheimer. A Demência de Alzheimer é uma doença que se caracteriza por piora das funções cognitivas e não tem cura. O Comprometimento Cognitivo Leve pode evoluir ou não para demência. Ainda não há medicação específica para evitar a piora do quadro.

Esta pesquisa irá acompanhar idosos com cognição normal, com Comprometimento Cognitivo Leve e com Demência de Alzheimer até 2032. Os objetivos principais são determinar os motivos dos pacientes desenvolverem a Demência de Alzheimer e verificar se alguns exames conseguem identificar os pacientes de maior risco para desenvolverem Demência. Além disso, os testes que serão aplicados podem permitir o diagnóstico da doença na fase inicial.

Caso você aceite participar, será submetido a uma avaliação geriátrica e também por neuropsicólogo, que aplicarão testes que avaliam a memória e outras funções cognitivas e o seu nível de capacidade para realizar atividades do dia-a-dia. Estas avaliações serão repetidas uma vez ao ano. Os pacientes que desenvolverem demência ao longo do acompanhamento serão encaminhados ao Ambulatório de Geriatria do Instituto Jenny de Andrade Faria de Atenção à Saúde do Idoso, visando manter o seguimento clínico e a introdução de medicação anti demência.

Durante as avaliações, será solicitado ao seu cuidador (acompanhante) que responda algumas perguntas sobre você. Esta entrevista compreenderá questões sobre o seu funcionamento nas tarefas do dia a dia, alterações de comportamento e o seu estado de saúde e poderá ser realizada presencialmente ou poderá ser solicitada a autorização para o agendamento de entrevista via ligação telefônica ou por videochamada.

Será coletada pequena quantidade de sangue (máximo de 20 ml), para avaliar a presença de alterações genéticas e inflamação que podem ter relação com o maior risco de desenvolver Alzheimer. A coleta de sangue poderá acarretar incômodo leve de curta duração. Ocasionalmente, pode ocorrer desenvolvimento de hematoma no local de punção e, mais raramente, complicações mais sérias como infecções. Estas complicações são inerentes a qualquer punção venosa. Os profissionais responsáveis pelo procedimento são experientes e treinados para a sua realização. O material é totalmente estéril e descartável.

Parte do sangue coletado será congelado à -80°C (forma adequada de armazenamento) e outra parte será reservada para testes genético, imunológicos e para o diagnóstico da doença de Alzheimer, até a realização dos exames. Caso parte ou o total do material armazenado não seja utilizado para realização de exames no período de dez anos, as amostras de sangue serão descartadas como resíduos hospitalares, conforme o Programa de Gestão de Resíduos Sólidos em Saúde (PGRSS) da Faculdade de Medicina da UFMG. Além disso, iremos avaliar os resultados de exames laboratoriais e de imagem e as informações coletadas do seu prontuário, de receitas médicas e exames prévios.

Baseado na avaliação do geriatra e do psicólogo, você será convidado a realizar a coleta de 6ml de para coleta de líquido espinhal (líquor). Este exame é realizado por médico anestesta e consiste na introdução de agulha na região das costas, entre as vértebras, para coleta de líquido espinhal. Tem o objetivo de avaliar algumas alterações possíveis na doença de Alzheimer, mesmo antes das manifestações clínicas. As complicações possíveis deste procedimento incluem dor local, sangramento, hematoma, infecção, fistula (vazamento temporário de líquido da coluna para pele). Estas complicações são reduzidas pela realização por médico treinado, com técnica adequada e material estéril evita complicações. Você só será submetido ao procedimento se aceitar realizá-lo. Este líquido será congelado à -80°C (forma adequada de armazenamento) até a realização dos exames. O resultado deste exame será comparado com o seu exame de sangue.

A pesquisa será suspensa caso ocorra disponibilização no mercado de tratamento eficaz para evitar a progressão de Comprometimento Cognitivo Leve para Demência de Alzheimer para que o paciente possa recebê-lo e possivelmente se beneficiar de seus resultados.

Rubrica do participante: _____ Rubrica do pesquisador: _____

Caso o Sr(a) opte por retirar-se do estudo após coleta do sangue e do líquor, ele será descartado segundo as normas definidas pelo PGRSS. A não participação na pesquisa não acarreta prejuízo no acompanhamento pela equipe de saúde do hospital. 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.

Sua participação nesta pesquisa é voluntária, portanto, não implica em qualquer dano material, físico ou moral, assim como também não resulta em qualquer benefício material.

As informações coletadas terão um caráter confidencial, ou seja, seu nome não será divulgado em nenhuma hipótese, seguiremos as normas da Lei Geral de Proteção de Dados (LGPD- Lei nº13.709/2018) em todas as etapas da pesquisa, utilizando de uma ferramenta sofisticada, o REDCAP (*Research Electronic Data Capture*), para a coleta, gerenciamento e a disseminação de dados de pesquisas de forma segura, mantendo o anonimato e o acesso restrito aos dados de informações dos participantes da pesquisa.

Você não terá nenhuma despesa, sendo de responsabilidade dos pesquisadores os gastos com impressão, cópias, realização de exames ou com qualquer outra eventualidade. Os gastos porventura existentes com transporte serão ressarcidos pelos pesquisadores.

O resultado desta pesquisa será divulgado em artigo de revista científica, sem colocar em evidência a identidade dos participantes.

Os pesquisadores ficam disponíveis a esclarecer quaisquer dúvidas, antes, durante e após o término do estudo e publicação dos resultados. Fica assegurado seu direito de se retirar da pesquisa a qualquer momento, sem que haja qualquer dano ou repressão, por parte dos pesquisadores. Se no transcorrer da pesquisa tiver alguma dúvida, ou por qualquer outro motivo necessitar de orientações, poderá procurar um dos pesquisadores.

Através deste documento fica assegurado o direito que ao Sr(a) _____ que terá todos os esclarecimentos relativos à pesquisa garantidos, incluindo os métodos utilizados. A partir do momento que o participante da pesquisa não desejar mais fazer parte da pesquisa, reserve-lhe o direito de retirar o seu consentimento, livre de sofrer qualquer penalidade ou danos, quaisquer que sejam.

Caso seja necessário, você poderá entrar em contato com o COEP/UFMG, sito à Av. Antonio Carlos 6627, Unidade Administrativa II, 2º andar, sala 2005, CEP:31270-901- Belo Horizonte- MG. Telefax (31) 3409-4592, e-mail coep@proq.ufmg.br, onde maiores esclarecimentos poderão ser obtidos.

Baseado neste termo, eu, _____, CI _____, órgão expedidor _____, aceito participar da pesquisa "O perfil de biomarcadores neuroinflamatórios no Líquido Cefalorraquidiano e no sangue periférico de pacientes com Comprometimento Cognitivo Leve e Demência por Doença de Alzheimer provável" em acordo com as informações acima expostas.

Belo Horizonte, _____ de _____ de 20____.

Assinatura do participante:

Assinatura do pesquisador:

Espaço para datiloscopia

Contato dos pesquisadores:

- 1- Professora Maria Aparecida Camargos Bicalho- médica geriatra: 31 98478-8629.
- 2- Professor Bernardo de Mattos Viana- médico psicogeriatra: 31 98293-9698.

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) para representante legais de participantes:

Você está sendo convidado a participar da pesquisa “Perfil de biomarcadores neuroinflamatórios no Líquido Cefalorraquidiano e no sangue periférico de pacientes sem comprometimento cognitivo objetivo, com Comprometimento Cognitivo Leve e Demência por Doença de Alzheimer provável”, que pretendem avaliar e acompanhar as pessoas que não apresentam problemas nas funções cognitivas, como memória, atenção, organização, linguagem, aquelas que apresentam Comprometimento Cognitivo Leve, um quadro pré-demência, e aquelas com Demência de Alzheimer. A Demência de Alzheimer é uma doença que se caracteriza por piora das funções cognitivas e não tem cura. O Comprometimento Cognitivo Leve pode evoluir ou não para demência. Ainda não há medicação específica para evitar a piora do quadro.

Esta pesquisa irá acompanhar idosos com cognição normal, com Comprometimento Cognitivo Leve e com Demência de Alzheimer até 2032. Os objetivos principais são determinar os motivos dos pacientes desenvolverem a Demência de Alzheimer e verificar se alguns exames conseguem identificar os pacientes de maior risco para desenvolverem Demência. Além disso, os testes que serão aplicados podem permitir o diagnóstico da doença na fase inicial.

Caso vocês aceitem participar, o idoso será submetido a uma avaliação geriátrica e também por neuropsicólogo, que aplicarão testes que avaliam a memória e outras funções cognitivas e o seu nível de capacidade para realizar atividades do dia-a-dia. Estas avaliações serão repetidas uma vez ao ano. Os pacientes que desenvolverem demência ao longo do acompanhamento serão encaminhados ao Ambulatório de Geriatria do Instituto Jenny de Andrade Faria de Atenção à Saúde do Idoso, visando manter o seguimento clínico e a introdução de medicação anti demência.

Durante as avaliações, será solicitado ao Sr(a) (acompanhante) que responda algumas perguntas sobre o idoso. Esta entrevista compreenderá questões sobre o seu funcionamento nas tarefas do dia a dia, alterações de comportamento e o seu estado de saúde e poderá ser realizada presencialmente ou poderá ser solicitada a autorização para o agendamento de entrevista via ligação telefônica ou por videochamada.

Será coletada pequena quantidade de sangue (máximo de 20 ml), para avaliar a presença de alterações genéticas e inflamação que podem ter relação com o maior risco de desenvolver Alzheimer. A coleta de sangue poderá acarretar incômodo leve de curta duração. Ocasionalmente, pode ocorrer desenvolvimento de hematoma no local de punção e, mais raramente, complicações mais sérias como infecções. Estas complicações são inerentes a qualquer punção venosa. Os profissionais responsáveis pelo procedimento são experientes e treinados para a sua realização. O material é totalmente estéril e descartável.

Parte do sangue coletado será congelado à -80°C (forma adequada de armazenamento) e outra parte será reservada para testes genético, imunológicos e para o diagnóstico da doença de Alzheimer, até a realização dos exames. Caso parte ou o total do material armazenado não seja utilizado para realização de exames no período de dez anos, as amostras de sangue serão descartadas como resíduos hospitalares, conforme o Programa de Gestão de Resíduos Sólidos em Saúde (PGRSS) da Faculdade de Medicina da UFMG. Além disso, iremos avaliar os resultados de exames laboratoriais e de imagem e as informações coletadas do seu prontuário, de receitas médicas e exames prévios.

Baseado na avaliação do geriatra e do psicólogo, o idoso será convidado a realizar a coleta de 6ml de para coleta de líquido espinal (líquor). Este exame é realizado por médico anestesista e consiste na introdução de agulha na região das costas, entre as vértebras, para coleta de líquido espinal. Tem o objetivo de avaliar algumas alterações possíveis na doença de Alzheimer, mesmo antes das manifestações clínicas. As complicações possíveis deste procedimento incluem dor local, sangramento, hematoma, infecção, fistula (vazamento temporário de líquido da coluna para pele). Estas complicações são reduzidas pela realização por médico treinado, com técnica adequada e material estéril evita complicações. O idoso só será submetido ao procedimento se aceitar realizá-lo. Este líquido será congelado à -80°C (forma adequada de armazenamento) até a realização dos exames. O resultado deste exame será comparado com o resultado do exame de sangue.

Rubrica do participante: _____ Rubrica do pesquisador: _____

A pesquisa será suspensa caso ocorra disponibilização no mercado de tratamento eficaz para evitar a progressão de Comprometimento Cognitivo Leve para Demência de Alzheimer para que o paciente possa recebê-lo e possivelmente se beneficiar de seus resultados.

Caso vocês optem por retirar-se do estudo após coleta do sangue e do líquido, ele será descartado segundo as normas definidas pelo PGRSS. A não participação na pesquisa não acarreta prejuízo no acompanhamento pela equipe de saúde do hospital. 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.

A participação nesta pesquisa é voluntária, portanto, não implica em qualquer dano material, físico ou moral, assim como também não resulta em qualquer benefício material.

As informações coletadas terão um caráter confidencial, ou seja, os nomes dos participantes não serão divulgados em nenhuma hipótese. Seguiremos as normas da Lei Geral de Proteção de Dados (LGPD- Lei nº13.709/2018) em todas as etapas da pesquisa, utilizando de uma ferramenta sofisticada, o REDCAP (*Research Electronic Data Capture*), para a coleta, gerenciamento e a disseminação de dados de pesquisas de forma segura, mantendo o anonimato e o acesso restrito aos dados de informações dos participantes da pesquisa.

Vocês não terão nenhuma despesa, sendo de responsabilidade dos pesquisadores os gastos com impressão, cópias, realização de exames ou com qualquer outra eventualidade. Os gastos porventura existentes com transporte serão ressarcidos pelos pesquisadores.

O resultado desta pesquisa será divulgado em artigo de revista científica, sem colocar em evidência a identidade dos participantes.

Os pesquisadores ficam disponíveis a esclarecer quaisquer dúvidas, antes, durante e após o término do estudo e publicação dos resultados. Fica assegurado seu direito de se retirar da pesquisa a qualquer momento, sem que haja qualquer dano ou repressão, por parte dos pesquisadores. Se no transcorrer da pesquisa tiver alguma dúvida, ou por qualquer outro motivo necessitar de orientações, poderá procurar um dos pesquisadores.

Através deste documento fica assegurado o direito que ao Sr(a) _____ que terá todos os esclarecimentos relativos à pesquisa garantidos, incluindo os métodos utilizados. A partir do momento que o participante da pesquisa não desejar mais fazer parte da pesquisa, reserve-lhe o direito de retirar o seu consentimento, livre de sofrer qualquer penalidade ou danos, quaisquer que sejam.

Caso seja necessário, você poderá entrar em contato com o COEP/UFMG, sito à Av. Antonio Carlos 6627, Unidade Administrativa II, 2º andar, sala 2005, CEP:31270-901- Belo Horizonte- MG. Telefax (31) 3409-4592, e-mail coep@prpq.ufmg.br, onde maiores esclarecimentos poderão ser obtidos.

Baseado neste termo, eu, _____, CI _____, órgão expedidor _____, aceito participar da pesquisa "O perfil de biomarcadores neuroinflamatórios no Líquido Cefalorraquidiano e no sangue periférico de pacientes com Comprometimento Cognitivo Leve e Demência por Doença de Alzheimer provável", na qualidade de cuidador (acompanhante) do(a) Sr(a) _____, em acordo com as informações acima expostas.

Belo Horizonte, _____ de _____ de 20____.

Assinatura do cuidador:

Assinatura do pesquisador:

Espaço para datiloscopia

Contato dos pesquisadores:

- 1- Professora Maria Aparecida Camargos Bicalho- médica geriatra: 31 98478-8629.
- 2- Professor Bernardo de Mattos Viana- médico psiquiatra: 31 98293-9698.

Termo de Assentimento Livre e Esclarecido (TALE) para idosos

Você está sendo convidado a participar da pesquisa “Perfil de biomarcadores neuroinflamatórios no Líquido Cefalorraquidiano e no sangue periférico de pacientes sem comprometimento cognitivo objetivo, com Comprometimento Cognitivo Leve e Demência por Doença de Alzheimer provável.”, que procuram avaliar e acompanhar as pessoas que apresentam Comprometimento Cognitivo Leve e Demência de Alzheimer, para avaliar a eficácia de exame de sangue e líquido espinhal (líquor) para diagnóstico de doença de Alzheimer e o comportamento destes exames ao longo do tempo no sangue de idosos sem sintomas da doença, idosos com esquecimento leve comparado com o resultado do exame de sangue em idosos com diagnóstico de demência por Alzheimer.

Caso você aceite participar, será avaliado por um médico, estudantes de medicina e psicólogos. Será coletada pequena quantidade de sangue (cerca de 20 ml), com higiene rigorosa (técnica estéril), com material de coleta adequado. Parte do sangue coletado será congelado à -80°C (forma adequada de armazenamento) e outra parte será reservada para teste genético até a realização dos exames. Caso parte ou o total do material armazenado não seja utilizado para realização de exames no período de dez anos, as amostras de sangue serão descartadas como resíduos hospitalares, conforme as normas da Faculdade de Medicina da UFMG. Além disso, iremos avaliar os resultados de exames anteriores e informações do seu prontuário e receitas médicas. Baseado na avaliação do geriatra e do psicólogo, você será convidado a realizar a coleta de 6ml de líquor (líquido espinhal), através de punção lombar (na região das costas, como é feito para alguns tipos de anestesia), realizada por anestesista do nosso grupo. Esta punção é realizada para coleta de líquido que será congelado à -80°C (forma adequada de armazenamento) até a realização dos exames. O resultado deste exame será comparado com o seu exame de sangue.

Caso o Sr. opte por retirar-se do estudo após coleta dos materiais coletados, eles serão descartados conforme as normas da UFMG. A não participação na pesquisa não acarreta prejuízo no acompanhamento pela equipe de saúde do hospital. 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. O resultado desta pesquisa será divulgado em artigo de revista científica, sem a sua identificação. Não faremos mudanças no seu tratamento.

A doença de Alzheimer é a principal causa de demência. O diagnóstico desta doença ainda é um desafio.

Como possível benefício da pesquisa, esperamos contribuir para demonstrar a validade de testes realizados para o diagnóstico da doença de Alzheimer reduzindo a necessidade de exames mais caros, pouco disponíveis, mais difíceis de serem realizados e que levam a certos riscos para o paciente, além de compreender melhor esta doença.

Pode haver inconveniente relacionado ao tempo gasto por você para receber explicações sobre a pesquisa e para responder ao questionário com duração média de 2 a 3 horas, realizado em dias diferentes, bem como os riscos da coleta de sangue e líquor.

As complicações mais comuns da coleta de sangue são a formação de hematomas (manchas arroxeadas na pele), necessidade de múltiplas picadas, sangramentos e infecções. Geralmente, estas complicações não causam maiores repercussões. Seguimos de forma rigorosa as normas técnicas adequadas, realizadas por profissionais treinados, com utilização de materiais estéreis, descartáveis e de boa qualidade.

Embora a punção da espinha seja reconhecida como segura, pode trazer alguns riscos. Os riscos do procedimento são muito pequenos e 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, realizado por profissional experiente e com material estéril e de boa qualidade. O Senhor (a) será informado (a) com relação aos cuidados necessários antes, durante e após o procedimento, como posicionamento adequado, higienização, uso de analgésicos e ingestão de líquidos e cuidados locais. Estas condutas têm o objetivo de evitar, reduzir os riscos e atender os pacientes em caso de complicações.

Rubrica do participante: _____ Rubrica do pesquisador: _____

Caso você opte por retirar-se do estudo após coleta do sangue e do líquor, ele será descartado segundo as normas definidas pela Faculdade de Medicina da UFMG. A não participação na pesquisa não acarreta prejuízo no acompanhamento pela equipe de saúde do hospital. Fica assegurado o direito do participante de se retirar o seu consentimento, livre de sofrer qualquer penalidade ou danos, quaisquer que sejam. Se no transcorrer da pesquisa tiver alguma dúvida, ou por qualquer outro motivo necessitar de orientações, poderá procurar um dos pesquisadores, cujos contatos encontram-se descritos abaixo.

Em caso de dúvidas éticas, você poderá entrar em contato com o COEP/UFMG, Av. Antônio Carlos 6627, Unidade Administrativa II, 2o andar, sala 2005, CEP: 31270-901- Belo Horizonte – MG. telefax (31) 3409-4592, e-mail coep@prpq.ufmg.br, onde maiores esclarecimentos poderão ser obtidos.

Este termo de consentimento encontra-se impresso em duas vias originais. Uma delas será arquivada no local de pesquisa pelo pesquisador responsável, e a outra, será entregue ao Sr. (a).

Baseado neste termo, eu, _____
 aceito participar da pesquisa “Ensaio de desempenho clínico de dispositivo diagnóstico para avaliar e confirmar a associação de perfil de biomarcadores plasmáticos em idosos com doença de Alzheimer”, em acordo com as informações acima expostas.

Belo Horizonte _____ de _____ de 20 ____.

Assinatura do participante

Nome/assinatura do pesquisador

Espaço para datiloscopia

Contato dos Pesquisadores:

Professora Maria Aparecida Camargos Bicalho – médica geriatra: 31-98478-8629;

Professor Bernardo de Mattos Viana- médico psicogeriatra: 31-982939698.

ANEXO 6. CERTIFICADOS DE PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS CIENTÍFICOS INTERNACIONAIS

Com dos dados e resultados obtidos durante os quatro anos de doutorado participou-se de vários eventos científicos com o fim de compartilhar a pesquisa feita pelo grupo COG-AGING da UFMG e receber feedbacks que contribuíssem na melhora dos resultados. A continuação são apresentados os certificados emitidos pelas organizações desses eventos.

Ano 2022, Conferencia mundial do Alzheimer (AAIC 2022), participou-se na modalidade poster (online) com o trabalho intitulado: **Relationship between cytokines and β -amyloid and Tau protein in the CSF of patients with Alzheimer's dementia, amnestic mild cognitive impairment, and individuals without subjective cognitive impairment**. Este resumo foi publicado na revista Alzheimer's & Dementia no ano 2022.



DOI: 10.1002/alz.061465

BIOMARKERS

POSTER PRESENTATION

BIOMARKERS (NON-NEUROIMAGING)

Alzheimer's & Dementia
THE JOURNAL OF THE ALZHEIMER'S ASSOCIATIONRelationship between cytokines and β -amyloid and Tau protein in the CSF of patients with Alzheimer's disease, amnestic mild cognitive impairment, and individuals without subjective cognitive impairmentIvonne Carolina Bolaños Burgos^{1,2,3,4} | Erika de Oliveira Hansen^{1,5} |
Marco Aurelio Romano-Silva⁶ | Debora Miranda Sr.⁶ | Bernardo de Mattos Viana⁷ |
Maria Aparecida Camargos Bicalho^{1,2,8} | Research group on aging and neurodegenerative diseases¹ Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil² UFMG, Belo Horizonte, Brazil³ Adult Health Sciences Applied Program, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil⁴ National Institute of Science and Technology of Molecular Medicine (INCT-MM), Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil⁵ Jerry de Andrade Parla Institute – Reference Center for the Elderly Hospital das Clínicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil⁶ Molecular Medicine Program, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil⁷ Elderly Psychiatry and Psychology Extension Program (PROESP), Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil⁸ Department of Clinical Medicine, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

Correspondence

Ivonne Carolina Bolaños Burgos, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil.
Email: carolab2@gmail.com

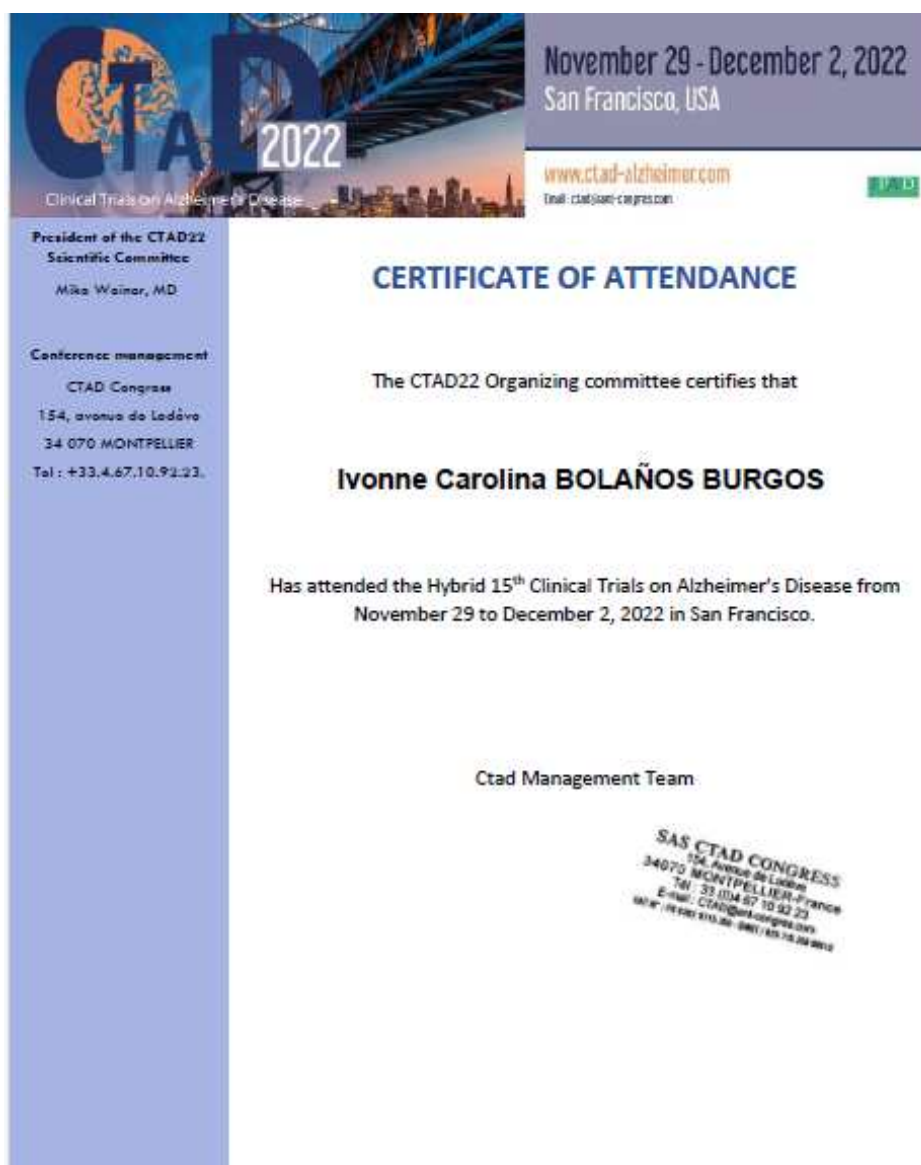
Abstract

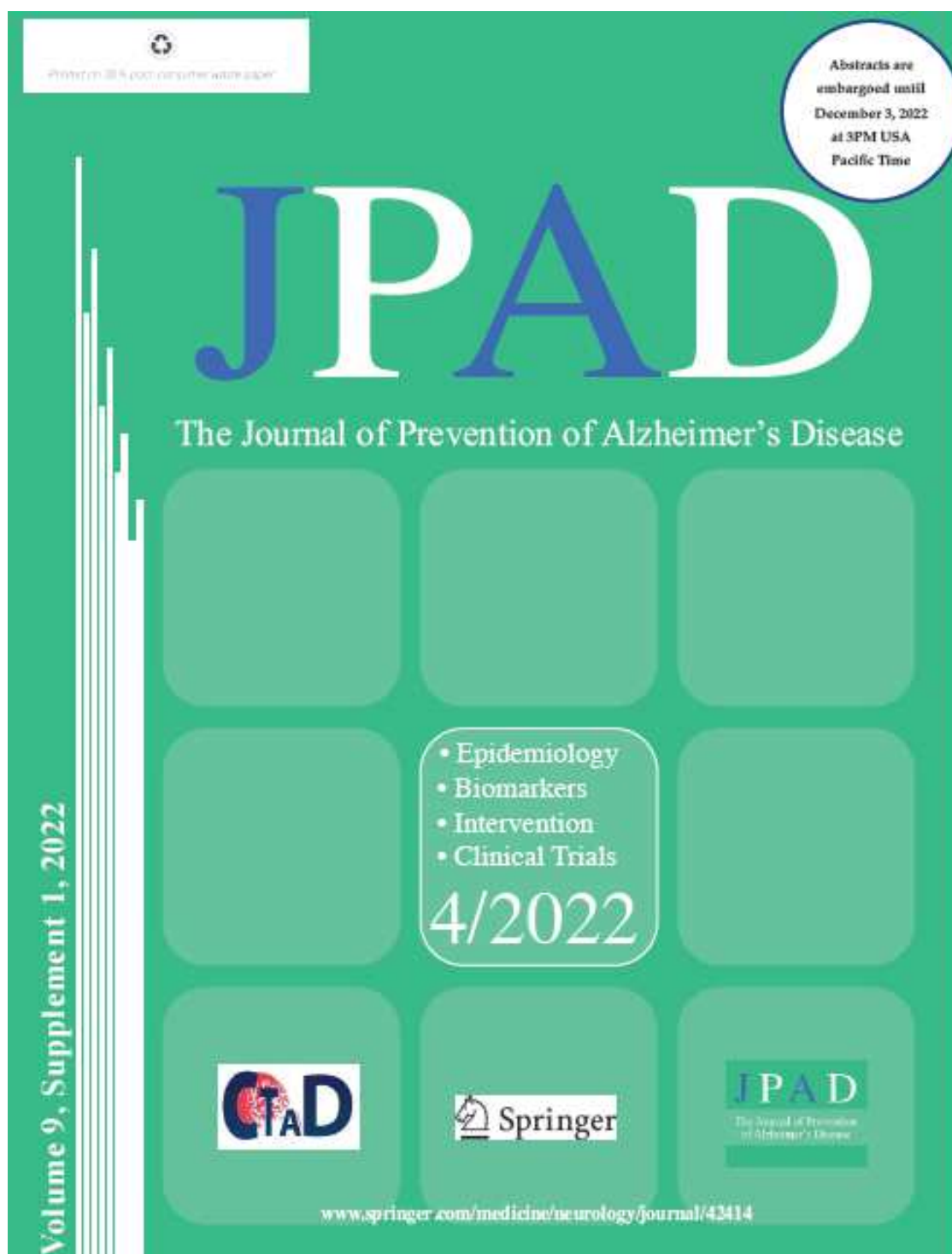
Background: The neuroinflammation process is one of the main pathological features of Alzheimer's disease (AD). In the course of AD, the deposits of β -amyloid plaques and neurofibrillary tangles lead to over-activation of the microglia, resulting in increased production of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines that may contribute to neuronal dysfunction and cell death. Currently, several efforts have been made to discover the role of cytokines in AD's pathogenesis and the relationship between these inflammatory factors and the presence of AD's main biological markers (1). The present study aimed to determine the quantitative correlation between cytokines, β -amyloid, and Tau proteins and the cognitive status of the participants.**Method:** CSF was collected by lumbar puncture from 80 older individuals with clinically defined AD ($n=36$), with amnestic mild cognitive impairment (aMCI) ($n=24$), and without objective cognitive impairment ($n=20$). CSF levels of β -amyloid and p-tau and t-Tau and 27 cytokines were determined using the Luminox xMAP technique. Correlations were made between the cytokines, the β -amyloid and Tau proteins levels, and the Mini-Mental State test (MEE M).**Result:** considering all individuals, there was a significant positive correlation between A β 42, IL-4 and IL-8; p-Tau positively correlated with G-CSF and GM-CSF and finally p-Tau/A β 42 negatively correlated with IL8. The MEE M was correlated negatively with Eotaxin, IL-6 and IL-15. Focusing only in the AD group, there was a positive correlation for A β 42 with IL-4, IL-8 and negatively with IL-17; t-Tau correlated negatively with IL-1 α and IL-5; p-Tau/A β 42 positively correlated with IL-17 and negatively with IL-8 and IP10. The MEE M showed a positive correlation with IL-4. In the control group, A β 42 and VEGF had a negative correlation; p-Tau negatively correlated with TNF- α ; p-Tau/A β 42 were correlated positively with GM-CSF, IL-1 β and IL-6. The MEE M did not

present any correlation. Between the aMCI group, t-tau was correlated positively with PDGF-BB, and the MEEB was correlated negatively with Eotaxin.

Conclusion: Changes in the neuroinflammatory profile are more prominent in AD patients compared to individuals without subjective cognitive impairment and those with aMCI.

Ano 2022, Hybrid 15th Clinical Trials on Alzheimer's Disease, participou-se na modalidade poster (online) com o trabalho intitulado: **Comparison of cytokine profile in older adults with positive and negative protein biomarkers A β 42, p-Tau, t-Tau and p-Tau /A β 42 ratio.** Este resumo foi publicado na revista The Journal of prevention of Alzheimer's no ano 2022.





All abstracts are embargoed until the day and time of presentation at the CTAD Conference

4-years. Kaplan-Meier and Cox proportional hazards models determined NPS group differences in dementia-free survival time and rates of incident AD. **Results:** ADNI participants had a mean age of 72 (43.5% female, median MMSE=28); MEMENTO participants had a mean age of 69 (46.2% female, MMSE=28). In ADNI, cross-sectional linear regressions showed that compared to nonNPS, MBI was associated with lower CSF A β 42 level and A β 42/40 ratio, higher CSF p-tau and t-tau levels, and higher t-tau/A β 42 and p-tau/A β 42 ratios. NPS-not-MBI was associated only with lower A β 42/40 ratio. Linear mixed effects models revealed this same AD-specific biomarker profile over 4 years in association with MBI, whereas NPS-not-MBI was associated with higher tau levels. Survival analyses revealed lower AD-free survival and greater rate of incident dementia in MBI (Hazard Ratio (HR) 3.5) relative to comparator groups. ADNI and MEMENTO findings were consistent. MEMENTO, a memory clinic study, demonstrated a similar magnitude and direction of effect for all biomarkers, but with a greater MBI-associated reduction in A β 40; HR for incident dementia was 3.93 in MBI and 1.83 in NPS-not-MBI. **Conclusion:** We have demonstrated the utility of applying the MBI criteria to MCI to improve the specificity for detection of prevalent AD, and prediction of incident AD dementia. These results are congruent with the a priori goals in development of the MBI criteria, and have implications for research methodology, clinical trial recruitment, drug development, clinical care, and public health efforts. **Disclosures:** All authors report no relevant disclosures.

LP47- COMPARISON OF CYTOKINE PROFILE IN OLDER ADULTS WITH POSITIVE AND NEGATIVE PROTEIN BIOMARKERS A β 42, P-TAU, T-TAU AND P-TAU/A β 42 RATIO. J.C. Bolaños Burgos^{1,2,3,4,5}, G.T. Oliveira Engelmann^{6,7}, E. Oliveira Hansen⁸, N. Silva Dias^{9,10}, A. Teixeira Carvalho¹¹, D. Valadão¹², D. Miranda^{13,14,15}, M.A. Romano-Silva^{16,17,18}, B. Mattos Viana^{19,20}, M.A. Camargos Bicalho^{21,22,23} (1. Adult Health Sciences Applied Program - Belo Horizonte (Brazil), 2. Hospital das Clínicas - Belo Horizonte (Brazil), 3. National Institute of Science and Technology of Molecular Medicine (INCT-MM), Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais - Belo Horizonte (Brazil), 4. Universidade Federal de Minas Gerais - Belo Horizonte (Brazil), 5. Molecular Medicine Program - Belo Horizonte (Brazil), 6. Jenny de Andrade Faria Institute- Reference Center for the Elderly/Hospital das Clínicas - Belo Horizonte (Brazil), 7. Jenny de Andrade Faria Institute- Reference Center for the Elderly, Hospital das Clínicas - Belo Horizonte (Brazil), 8. Older Adult Psychiatry and Psychology Extension Program (PROEPSI) - Belo Horizonte (Brazil), 9. René Rachou Institute, Osvaldo Cruz Foundation (Fiocruz) - Belo Horizonte (Brazil), 10. National Institute of Science and Technology of Molecular Medicine (INCT-MM)/Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais - Belo Horizonte (Brazil), 11. Universidade Federal de Minas Gerais - Belo Horizonte (Boswet Island), 12. Department of Mental Health/Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais - Belo Horizonte (Brazil))

Background/Objectives: Cytokines are small proteins that indicate inflammatory activity and may impair cognitive function. Moreover, in Alzheimer's disease (AD) the inflammation has been considered one of its neuropathological processes. Deposition of beta-amyloid in the brain may trigger inflammatory processes, as well as the inflammation may accelerate beta-amyloid (A β) deposition. Exaggerated release of pro-inflammatory cytokines and chemokines, may result in synaptic dysfunction, neurodegeneration and progression of the disease. Therefore, it's relevant to know the inflammatory profiles of the Cerebrospinal Fluid (CSF) of patients in the

AD biomarker continuum. This study aims to compare CSF cytokines levels in older adults with positive and negative biomarkers of proteins A β 42, p-Tau, t-Tau, and p-Tau/A β 42 ratio. **Methods:** We collected 80 older adults' CSF by lumbar puncture and stored it at -80°C. A β 42, p-Tau, t-Tau, and 27 cytokines were assessed by Luminex xMAP technique. The levels of A β 42, p-Tau, and t-Tau were determined using the cut-off points for each protein, and made a categorical classification in groups: A β 42+, A β 42-, p-Tau+, p-Tau-, t-Tau+, t-Tau-, and p-Tau/A β 42+ e p-Tau/A β 42-. Comparisons of CSF's cytokine levels between these groups were assessed with Mann-Whitney U Test. **Results:** Significantly lower IL-8 levels were found in A β 42+ compared to A β 42- groups [U=473.0, p=.029]. The granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) was significantly higher in p-Tau+ [U=625.0, p=.014] and p-Tau/A β 42+ [U=752.0, p=.033] groups. No significant differences were found between the groups in t-Tau+, and t-Tau-. **Conclusion:** Elevated levels of IL-8 in patients with negative A β 42 may be related to cell recruitment in response to damage caused by the accumulation of β -amyloid plaques. Increases in G-CSF levels in the p-Tau/A β 42+ group could be associated with decreased A β plaques and greater disease severity. The authors declare that they have no competing interests.

LP48- EARLY DETECTION OF ALZHEIMER'S DISEASE USING MICRORNAS. B. Steinkraus¹, M. Heuvelman², J.L. Cummings³, J. Manson⁴, C. Ritchie⁵ (1. Hummingbird Diagnostics - Heidelberg (Germany), 2. Department of Brain Health, School of Integrated Health Sciences, University of Nevada Las Vegas - Las Vegas (United States), 3. Centre for Clinical Brain Sciences, The University of Edinburgh - Edinburgh (United Kingdom))

Background: MicroRNAs (miRNAs) represent a class of ~22nt short non-coding RNAs that have been identified as a sophisticated layer of post-transcriptional regulation, governing many cellular, inflammatory and vascular processes. This characteristic, together with the observation that miRNAs are frequently secreted into the extracellular space and stable in blood and other body fluids, make them specific, robust and above all non-invasive biomarkers that could qualify to augment the amyloid and tau framework. miRNAs have been used for the detection of Alzheimer's disease (AD) in its early forms (e.g., mild cognitive impairment (MCI) due to AD) and to distinguish AD from other dementias. However, to date no miRNA panel has been translated into a clinical test. **Objectives:** With funding from the Alzheimer's Drug Discovery Foundation (ADDF) Hummingbird Diagnostics (HBDx) is developing a blood-based microRNA (miRNA) biomarker intended to inform the diagnosis and prognosis of Alzheimer's disease (AD). The project objective is two-fold: a) to evaluate the diagnostic performance of a miRNA panel in the following deeply phenotyped cohorts: i) amyloid-positive MCI due to AD subjects (prodromal AD), ii) amyloid-negative cognitively unimpaired control subjects, iii) amyloid-positive cognitively unimpaired subjects (predominant AD), iv) amyloid-negative MCI (due to non-AD conditions) subjects. And, b) to compare baseline small RNA profiles with longitudinal profiles (>2 years) and clinical outcome data. HBDx seeks to explore biomarkers that can be utilized to characterize clinicopathologic heterogeneity and could lead to the discovery of identifiers of disease prognosis (e.g. rapidly progressive AD). **Methods:** Through collaboration with the European Prevention of Alzheimer's Dementia (EPAD) consortium, we have analyzed 3,302 blood samples of 1,895 patients from over 20 European sites. To ensure a simple, robust, and reproducible platform,

Ano 2023, Conferencia mundial do Alzheimer (AAIC 2023), participou-se na modalidade poster (presencial) com o trabalho intitulado: **Predictive analysis between cytokine profile and A β 42, pTau, and pTau/A β 42 levels in the cerebrospinal fluid of older adults with and without cognitive impairment.** Este resumo foi publicado na revista Alzheimer's & Dementia no ano 2023.

ALZHEIMER'S ASSOCIATION

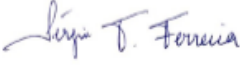
AAIC>23

POSTER PRESENTER

Ivonne Bolaños Burgos

presented "**Predictive analysis between cytokine profile and A β 42, p-Tau, and p-Tau/A β 42 levels in the cerebrospinal fluid of older adults with and without cognitive impairment.**"

at the Alzheimer's Association International Conference® (AAIC®).


Sergio T. Ferreira, PhD
Co-Chair, AAIC Scientific Program
Committee


Wiesje van der Flier, PhD
Co-Chair, AAIC Scientific Program
Committee

**RAI Amsterdam
Amsterdam, Netherlands
and/or virtually**

DOI: 10.1002/alz.077594

BIOMARKERS

POSTER PRESENTATION

BIOMARKERS (NON-NEUROIMAGING)

Alzheimer's & Dementia
THE JOURNAL OF THE ALZHEIMER'S ASSOCIATIONPredictive analysis between cytokine profile and A β 42, p-Tau, and p-Tau/A β 42 levels in the cerebrospinal fluid of older adults with and without cognitive impairment

Ivonne Carolina Bolaños Burgos^{1,2} | Pedro Henrique Oliveira Aquino^{3,4} |
 Julia Mendes Ribeiro^{3,4} | Rafael Souza de Andrade^{3,4} |
 Gabriela Tomé Oliveira Engemann⁵ | Erika de Oliveira Hansen⁶ | Natália Silva Dias^{7,8} |
 Andréa Teixeira Carvalho⁹ | Debora Miranda Sr.^{10,11} | Marco Aurelio Romano-Silva^{10,11} |
 Luiz Armando Cunha de Marco^{11,12} | Bernardo de Mattos Viana^{10,13} |
 Maria Aparecida Camargos Bicalho^{1,10,14}

¹Adult Health Sciences Applied Program,
Faculdade de Medicina, Universidade Federal
de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

²National Institute of Science and Technology
Neurotec II (INCT-IBM), Belo Horizonte, Brazil

³Undergraduate medicine, Faculdade de
Medicina, Belo Horizonte, Brazil

⁴Center of Technology in Molecular Medicine,
Belo Horizonte, Brazil

⁵Molecular Medicine Program, Faculdade de
Medicina, Belo Horizonte, Brazil

⁶Jenny de Andrade Faria Institute - Reference
Center for the Elderly, Hospital das Clínicas,
Universidade Federal de Minas Gerais, Belo
Horizonte, Brazil

⁷Older Adult Psychiatry and Psychology
Extension Program (PROESP), Faculdade de
Medicina, Belo Horizonte, Brazil

⁸Universidade Federal de Minas Gerais, Belo
Horizonte, Brazil

⁹Banki Rachou Institute, Oswaldo Cruz
Foundation (FIOCRUZ), Belo Horizonte, Brazil

¹⁰National Institute of Science and Technology
Neurotec II (INCT-IBM), Faculdade de
Medicina, Universidade Federal de Minas
Gerais, Belo Horizonte, Brazil

Abstract

Background: The immune system activation observed in Alzheimer's disease (AD) pathology contributes to its pathogenesis. It is proposed that ongoing interactions between β -amyloid plaques, tau protein, and neuroinflammatory mediators such as cytokines contribute to the maintenance of the inflammatory state in the brain. The aim was to evaluate whether cytokine profiles can predict variations in A β 42, pTau, and pTau/A β 42 cerebrospinal fluid (CSF) levels in older adults with and without objective cognitive impairment.

Methods: Eighty older adults were recruited, with a clinical diagnosis of AD dementia (36), with Mild Cognitive Impairment (MCI) (24), and without objective cognitive impairment (20). CSF levels of A β 42, pTau, and 27 cytokines were assessed by the Luminex xMAP technique. Significant associations between A β 42, pTau, and pTau/A β 42 CSF levels and cytokines were explored in multiple linear regression analyses adjusted for age, education, and APOE ϵ 4 carrier status.

Results: We found that Granulocyte and Macrophage colony-stimulating factors (GM-CSF) ($\beta = -.375$; $p = .010$) and IL-6 ($\beta = -.370$; $p = .014$) had a negative significant association with A β 42, while IL-8 ($\beta = .452$; $p = .002$) and IL-4 ($\beta = .488$; $p = .001$) had positive significant association and higher magnitude of effect on A β 42. For pTau, age ($\beta = .240$; $p = .029$), IL-2 ($\beta = .314$; $p = .012$) and ϵ 4 allele ($\beta = 0.349$; $p = .002$) had a positive significant association. The variable with the greatest magnitude of the effect

¹¹Molecular Medicine Program, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

¹²National Institute of Science and Technology Neurosciences (INCT-MN), Faculdade de Medicina, Belo Horizonte, Brazil

¹³Elderly Psychiatry and Psychology Extension Program (PROGEP), Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

¹⁴Department of Clinical Medicine, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

Correspondence

Isomere Carolina Sotolongo Burgos, Adult Health Sciences Applied Program, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil.
Email: carolad2@gmail.com

was the presence of the $\epsilon 4$ allele. For the p-Tau/A β 42 ratio, G-CSF ($\beta = .423$; $p = .003$) and GM-CSF ($\beta = .317$; $p = .019$) had a significant positive association, while for IL-8 ($\beta = -.554$; $p = .001$) and IL-12 ($\beta = -.334$; $p = .019$) the association was significantly negative. IL-8 had the greatest magnitude of effect on p-Tau/A β 42 ratio values.

Conclusion: The higher levels of IL-4 and the IL-8 associated to a higher A β 42 suggest their role at the beginning of the disease. On the other hand, the lower level of IL-8 associated with a higher p-Tau/A β 42 suggests its inactivation as the disease progresses. Conversely, the higher levels of GM-CSF associated with higher p-Tau/A β 42 suggests a more robust recruitment of the immune cells system at later stages.

Reference: Alksnes, M., et al. (2021). Associations of cerebrospinal fluid amyloidogenic nanoplaques with cytokines in Alzheimer's disease. *Translational Neurodegeneration*.

Table 1. Associations between cytokines, sociodemographic, and genetic risk variables and A β 42.

Variable	B	Std. Error	Beta	p-value
(Constant)	7.517	1.621		.000
Age	-.002	.011	-.024	.831
Education	-.003	.018	-.024	.848
APOE $\epsilon 4$	-.114	.149	-.084	.447
Eotaxin	-.150	.127	-.149	.245
GM-CSF	-1.276	.481	-.375	.010*
IL-6	-.448	.177	-.370	.014*
IL-8	.919	.278	.452	.002**
IL-12	1.050	.587	.233	.079
IL-4	1.380	.380	.488	.001**

$R^2 = .339$ Beta: standardized coefficient that indicates the magnitude of the effect

(IL): interleukin, (GM-CSF): granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, (APOE): apolipoprotein E, (*) $p < 0.05$; (**) $p < 0.01$.

Table 2. Associations between cytokines, sociodemographic, and genetic risk variables and p-Tau.

Variable	B	Std. Error	Beta	p-value
(Constant)	2.513	.773		.002
Age	.022	.010	.240	.029*
Education	.021	.014	.168	.125
APOE $\epsilon 4$	.427	.130	.549	.002**
IL-2	4.358	1.680	.514	.012*
IL-8	-.054	.030	-.226	.073

$R^2 = .259$ Beta: standardized coefficient that indicates the magnitude of the effect

(IL): interleukin, (APOE): apolipoprotein E, (*) $p < 0.05$; (**) $p < 0.01$.

Ano 2024, Conferencia mundial do Alzheimer (AAIC 2024), participou-se na modalidade poster (presencial) com o trabalho intitulado: **Decreased levels of CSF IL-8 in clinical and biological profiles of Alzheimer's disease: results of a cohort of Brazilian older adults**. Este resumo será publicado na revista Alzheimer's & Dementia no ano 2024.

POSTER PRESENTER

Ivonne Bolaños Burgos

presented "**Decreased levels of CSF CXCL8 in clinical and biological profiles of Alzheimer's disease: results of a cohort of Brazilian older adults.** []"

at the Alzheimer's Association International Conference® (AAIC®) on July 29, 2024.



Kejal Kantarci, M.D., M.S.
Chair, Scientific Program Committee



Philip Scheltens, M.D., Ph.D., FAAN
Co-Chair, Scientific Program Committee

**Los Angeles Convention Center
Los Angeles, California, USA**