

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ANÁLISES CLÍNICAS E
TOXICOLÓGICAS

VANÊSSA GOMES FRAGA

AVALIAÇÃO DE POLIMORFISMOS EM GENES DE CITOCINAS NO
ENVELHECIMENTO SAUDÁVEL, COMPROMETIMENTO COGNITIVO NÃO
DEMÊNCIA E DEMÊNCIA: UMA ABORDAGEM COGNITIVA E FUNCIONAL

Belo Horizonte – MG

2015

VANÊSSA GOMES FRAGA

**AVALIAÇÃO DE POLIMORFISMOS EM GENES DE CITOCINAS NO
ENVELHECIMENTO SAUDÁVEL, COMPROMETIMENTO COGNITIVO NÃO
DEMÊNCIA E DEMÊNCIA: UMA ABORDAGEM COGNITIVA E FUNCIONAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do grau de mestre em Análises Clínicas e Toxicológicas.

Orientadora: Profa. Dra. Karina Braga Gomes Borges - UFMG

Coorientador: Prof. Dr. Paulo Caramelli - UFMG

Belo Horizonte – MG

2015



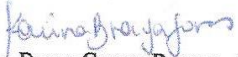
FOLHA DE APROVAÇÃO

AVALIAÇÃO DE POLIMORFISMOS EM GENES DE CITOCINAS NO ENVELHECIMENTO SAUDÁVEL, COMPROMETIMENTO COGNITIVO NÃO DEMÊNCIA E DEMÊNCIA: UMA ABORDAGEM COGNITIVA E FUNCIONAL

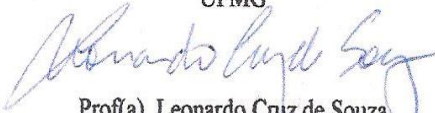
VANÊSSA GOMES FRAGA

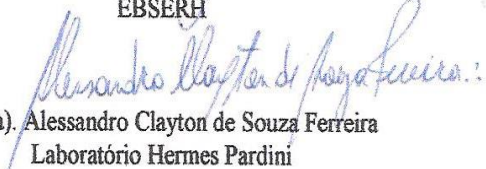
Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS, como requisito para obtenção do grau de Mestre em ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS, área de concentração ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS.

Aprovada em 06 de abril de 2015, pela banca constituída pelos membros:


Prof(a). Karina Braga Gomes Borges - Orientador
UFMG


Prof(a). Paulo Caramelli
UFMG


Prof(a). Leonardo Cruz de Souza
EBSERH


Prof(a). Alessandro Clayton de Souza Ferreira
Laboratório Hermes Pardini

Belo Horizonte, 6 de abril de 2015.

A todos aqueles que dedicam seu esforço e energia em prol de ajudar os outros contribuindo na semeadura de um mundo mais fraterno, justo e humanitário.

*“ De tudo ficaram três coisas...
A certeza de que estamos começando...
A certeza de que é preciso continuar...
A certeza de que podemos ser interrompidos
antes de terminar...
Façamos da interrupção um caminho novo...
Da queda, um passo de dança...
Do medo, uma escada...
Do sonho, uma ponte...
Da procura, um encontro!”*

Fernando Sabino

AGRADECIMENTOS

A Deus, grandioso engenheiro da vida e sábio guia dos nossos destinos.

À UFMG, por me proporcionar uma formação profissional de qualidade e gratuita.

À minha querida orientadora e amiga, Prof^ª. Dr^ª. Karina Braga Gomes Borges, pela constante ajuda e compreensão, confiança e apoio. Obrigada pela dedicação, ensinamentos e, sobretudo, por sua inabalável benevolência. A você todo meu respeito e admiração.

Ao meu coorientador, Prof. Dr. Paulo Caramelli, por ser um exemplo de pesquisador dedicado e preocupado com o bem comum. Meu agradecimento pela importante ajuda neste trabalho e pela brilhante iniciativa de realizar o Estudo *Pietà*, coorte de idosos brasileiros da qual este trabalho se deriva.

À colaboradora e amiga, Prof^ª. Dr^ª. Maria das Graças Carvalho, pela valiosa ajuda e incentivo. Agradeço imensamente seu apoio durante a caminhada.

A todo grupo de pesquisadores participantes do Estudo *Pietà*, pelo esforço para a concepção e construção de um projeto tão rico e importante para o país.

Ao colaborador Henrique Cerqueira Guimarães, pelas importantes sugestões e pela solícita ajuda na realização deste trabalho.

Ao colaborador Elvis Cueva, pela solicitude e boa vontade para contribuir com esta pesquisa.

À Vivian Proença Lara, pela solícita contribuição com os dados de genotipagem de ApoE dos indivíduos estudados.

À Kathryn Fontana, pela ajuda preciosa durante o treinamento da metodologia do projeto.

Aos queridos professores da Faculdade de Farmácia da UFMG, em especial aos do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, pelo incentivo, amizade e exemplo.

A todos os funcionários do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, pela ajuda em diversos momentos, em especial àqueles integrantes do Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas e Toxicológicas.

Às queridas amigas do mestrado, Tamara, Tatiana e Bianca pela alegria e parceria de sempre.

Aos especialíssimos colegas de laboratório, pela parceria, amizade e bons momentos. Em especial, agradeço às amigas Michelle e Carol pela força e por tornarem essa caminhada mais alegre e leve.

Aos meus pais, Bernardete e Geraldo, pelos grandes ensinamentos ao longo da vida. Pela humildade e força dados como exemplo. Por cada vez que disseram: Nós acreditamos em você e sempre estaremos por perto. Vocês são meu tesouro!

Aos meus amados irmãos, Fred e Felipe, pelos felizes momentos ao longo de cada caminhada. Pela amizade genuína e amor fraterno.

Ao Philippe, pela presença nos momentos felizes e difíceis. Obrigada pelo amor, companheirismo e pelos momentos inesquecíveis.

Aos demais familiares, agradeço pelo apoio e ajuda constantes. Obrigada por acreditarem em mim. Agradeço em especial à tia Aninha pelas orações e pelo exemplo de generosidade e à tia Eliza, pela presença alegre e insubstituível, pelo bom humor e risadas.

Enfim, agradeço a todas as pessoas de bem que fazem parte da minha vida e contribuem para minha felicidade e aprendizado.

Ao CNPq e à FAPEMIG pelo apoio financeiro em várias oportunidades.

RESUMO

O envelhecimento é um processo natural potencialmente associado ao desenvolvimento de transtornos neurodegenerativos, causadores de comprometimento cognitivo e demência. É possível que desequilíbrios entre o sistema imune e nervoso influenciem na evolução destes processos. O estudo *Pietà* consiste em uma investigação epidemiológica de base populacional acerca do envelhecimento cerebral, realizada na cidade de Caeté-MG em idosos muito idosos (≥ 75 anos). Objetivando identificar a influência de polimorfismos em genes de citocinas na ocorrência de comprometimento cognitivo não demência (CCND) ou demência e no declínio cognitivo e funcional observado em idosos, 259 participantes do estudo *Pietà* foram divididos em três grupos: controles cognitivamente saudáveis (n=124), CCND (n=81) e demência (n=54). Oito polimorfismos em genes de cinco citocinas foram estudados: TNF- α -308G>A, TGF- β 1 codon +10 C>T, TGF- β 1 codon +25 G>C, IL-10 -1082 A>G, IL-10 -819 C>T, IL-10 -592 C>A, IL-6 -174 G>C e INF- γ +874T>A por PCR multiplex. Dados da genotipagem foram comparados de acordo com sua distribuição entre os grupos e considerando o desempenho cognitivo e funcional dos idosos de modo transversal e longitudinal (após um ano). Foi observado que polimorfismos nos genes de TGF- β 1 (+10 C>T e +25 G>C), INF- γ (+874T>A) e haplótipos de IL-10 apresentaram diferentes distribuições entre os grupos além de influenciar juntamente com TNF- α (-308G>A), de maneira transversal, o desempenho cognitivo e funcional. Quando avaliados de forma longitudinal, observou-se que o polimorfismo +10C>T no gene de TGF- β 1 esteve associado à predição do declínio cognitivo e funcional a curto prazo entre os controles e que o polimorfismo -174G>C no gene de IL-6 associou-se à redução do desempenho cognitivo de idosos com CCND no período de um ano. Estes resultados sugerem, portanto, que fatores de risco genéticos ligados à inflamação podem associar-se ao desenvolvimento de CCND/demência e à deterioração das habilidades cognitivas e funcionais em idosos muito idosos. Assim, pretende-se fornecer dados para que novos estudos sejam desenvolvidos nesta vertente, a fim de elucidar a importância do processo inflamatório nas doenças demenciais.

Palavras-chave: Envelhecimento, demência, comprometimento cognitivo não demência, citocinas, polimorfismos, inflamação.

ABSTRACT

Aging is a natural process potentially associated with the development of neurodegenerative disorders, causing cognitive impairment and dementia. It is possible that imbalances between the immune and nervous system influence the evolution of these processes. The *Pietà* study is an epidemiological investigation on brain aging, developed in Caeté (state of Minas Gerais), Brazil, involving oldest-old individuals (≥ 75 years). In order to identify the influence of cytokine gene polymorphisms and the occurrence of cognitive impairment not dementia (CCND) and dementia, and on cognitive and functional decline in elderly, 259 participants from the *Pietà* study were divided into three groups: cognitively healthy controls ($n = 124$), CCND ($n = 81$) and dementia ($n = 54$). Eight polymorphisms in five cytokines genes were studied: TNF- α -308G> A, TGF- β 1 codon 10 C> T, TGF- β 1 codon 25 G> C, IL-10 -1082 A> G, IL-10 -819 C> T, IL-10 -592 C> A, IL-6 -174 G> C and INF- γ + 874T>A, using multiplex PCR. Genotypes were compared according to their distribution between the groups and considering the cognitive and functional performance of cross-sectional and longitudinal evaluations (after one year). Polymorphisms in TGF- β 1 (10 C> T +25 G> C), IFN- γ (+ 874T> A) and IL-10 haplotype presented different distributions between the groups beyond influence together TNF- α (-308G> A) the cognitive and functional performance. On longitudinal analysis, the polymorphism +10C> T in the TGF- β 1 gene could predict the cognitive and functional decline in the short-term among controls, and the polymorphism -174G>C in the IL-6 gene was associated with reduction of cognitive performance among CCND subjects within one year. These results suggest that genetic risk factors linked to inflammation may be associated with the development of CCND/dementia and deterioration of cognitive and functional abilities in oldest-old individuals. Thus, this study provides data for further research in order to elucidate the importance of the inflammatory process in dementia.

Keywords: Aging, dementia, cognitive impairment not dementia, cytokines, polymorphisms, inflammation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Cidade de Caeté (MG)	19
Figura 2 – Funções fisiológicas da micróglia na manutenção de circuitos neurais	30
Figura 3 – Influência da micróglia no cérebro de adultos e idosos	32
Figura 4 – Mecanismos inflamatórios envolvidos na acentuação ou prevenção da neurodegeneração.	34
Figura 5 – Resumo dos principais resultados	86

CAPÍTULO 1

Figure 1 – <i>Cognitive performance of patients group (CIND+dementia) and polymorphisms in cytokine genes</i>	61
Figure 2 – <i>Cognitive performance of CIND group and polymorphisms in cytokine genes.</i>	61
Figure 3 – <i>Cognitive performance of dementia group and polymorphisms or haplotypes in cytokine genes</i>	62
Figure 4 – <i>Functional evaluation and polymorphisms in patients and CIND groups</i>	63

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Table1 – <i>Baseline characteristics of participants.</i>	64
Table 2 – <i>Distribution of genotypic and allelic frequencies in controls, CIND and dementia groups</i>	65
Supplementary Table 1 –<i>Details of polymorphisms in the gene of the studied cytokines</i>	67
Supplementary Table 2 –<i>Details of haplotypes in the gene of the studied cytokine (IL-10).</i>	67
Supplementary Table 3 –<i>Cognitive evaluation results for CIND, dementia and patients as a whole (CIND+dementia) groups.</i>	68

CAPÍTULO 2

Table 1 – <i>Short-term cognitive outcome in CIND participants according to IL-6 -174 G>C genotype</i>	73
--	-----------

CAPÍTULO 3

Table1 – <i>Short-term functional outcome in healthy oldest-old according to TGF-β1 codon 10 T>C genotype</i>	81
Table 2 – <i>Short-term cognitive outcome in healthy oldest-old according to TGF-β1 codon 10 T>C genotype</i>	81

LISTA DE ABREVIATURASE SIGLAS

APA	<i>American Psychiatry Association</i>
APOE	Apolipoproteína E
AVDs	Atividades de vida diária
BBRC	Bateria breve de rastreio cognitivo
CCL	Comprometimento cognitivo leve
CCND	Comprometimento cognitivo não demência
COEP-UFMG	Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG
DA	Doença de Alzheimer
DSM-IV	<i>Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders 4th edition</i>
DSM-V	<i>Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders 5th edition</i>
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IL- 4	Interleucina-4
IL- 6	Interleucina-6
IL-10	Interleucina-10
INF-γ	Interferon- γ
MEEM	Mini-exame do estado mental
MG	Minas Gerais
OMS	Organização Mundial de Saúde
QAF	Questionário de atividades funcionais
SNC	Sistema nervoso central
SNP	<i>Single nucleotide polymorphism</i>
TGF-β1	Fator de Crescimento Tumoral- β 1

TNF- α

Fator de Necrose Tumoral- α

UFMG

Universidade Federal de Minas Gerais

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 Envelhecimento populacional, desfechos cognitivos e inflamação.....	15
1.2 O Estudo Pietà.....	17
2 REFERENCIAL TEÓRICO	19
2.1 Envelhecimento populacional e epidemiologia.....	19
2.2 Envelhecimento cerebral saudável	20
2.3 Comprometimento cognitivo não demência.....	22
2.4 Demência.....	24
2.5 Testes para avaliação funcional e cognitiva	26
2.6 Sistema imune e SNC.....	27
2.7 Inflamação e neurodegeneração	31
2.8 Citocinas e polimorfismos	34
3 JUSTIFICATIVA	37
4 OBJETIVOS	39
4.1 Objetivo Geral.....	39
4.2 Objetivos específicos.....	39
5 RESULTADOS	40
5.1 Capítulo 1.....	40
5.2 Capítulo 2.....	68
5.3 Capítulo 3.....	76
6 DISCUSSÃO	84
7 CONCLUSÕES	91
8 PERSPECTIVAS	92
REFERÊNCIAS	93
APÊNDICE A – Parecer do Comitê de Ética	104
APÊNDICE B – Artigo publicado durante o mestrado	105
APÊNDICE C – Apresentação de trabalhos em encontros científicos.....	106

1 INTRODUÇÃO

1.1 Envelhecimento populacional, desfechos cognitivos e inflamação

O envelhecimento populacional é o processo de transição demográfica mais destacado em todo o mundo (Schoeni e Ofstedal, 2010). O crescimento do contingente populacional de idosos, especialmente daqueles indivíduos com 75 anos ou mais, verificado em diversas sociedades, tem se dado de forma particularmente rápida em países emergentes ou em desenvolvimento, como o Brasil (Schoeni e Ofstedal, 2010; OMS, 2011; Preston e Stokes, 2012). Taxas acentuadas de crescimento no número de idosos acarretam rápida transformação do cenário de doenças e morbidades mais prevalentes nesta população, com aumento da importância de condições crônico-degenerativas, como a demência (OMS, 2011).

De maneira geral, podemos identificar três distintos desfechos cognitivos na senescência: envelhecimento cerebral saudável ou bem-sucedido, demência e um estágio de transição entre eles, que pode ser denominado comprometimento cognitivo não demência (CCND). O termo “demência” ilustra um conjunto heterogêneo de doenças cuja frequência aumenta com o avançar da idade, embora não sejam componentes naturais do envelhecimento (OMS, 2011; OMS, 2012; Burla *et al.*, 2013). Processos neurodegenerativos subjacentes a grande parte das síndromes demenciais ocasionam progressiva redução das habilidades cognitivas e funcionais necessárias à manutenção da independência e qualidade de vida e são as principais causas de incapacidade entre idosos (OMS, 2012), inclusive em países de baixo e médio desenvolvimento (Sousa *et al.*, 2009). Com o avanço do processo demencial, há redução da aptidão para execução de atividades de vida diária (AVDs) e de cuidado próprio, ocasionando uma situação de dependência física, psicológica e social. Esta perda de capacidade em executar AVDs varia conforme o tipo de atividade e impacta negativamente sobre a qualidade de vida do idoso, cuja extensão depende do estágio de demência e do meio em que vive, devido às variações culturais na percepção dos sintomas (Giebel *et al.*, 2014).

O conceito de envelhecimento cerebral saudável está relacionado à manutenção pelo idoso de uma vida independente, a despeito da existência de certo declínio nas habilidades cognitivas, o qual frequentemente acompanha o natural

processo de envelhecimento (Shankar, 2010). O envelhecimento fisiológico ocasiona mudanças no sistema nervoso central (SNC) que são, entretanto, compensadas por mecanismos de plasticidade e redundância do cérebro, não impactando de forma intensa no funcionamento do órgão (Park e Yeo, 2013; Rossini *et al.*, 2013).

Conhecendo os dois desfechos cognitivos opostos, a demência e o envelhecimento cerebral bem-sucedido, é válido ressaltar a existência de uma fase prodrômica ou intermediária entre eles, em que já há alterações de alguns marcadores de imagem e bioquímicos relacionados à demência (Campbell *et al.*, 2013). O CCND é caracterizado pela observação de um declínio cognitivo superior ao esperado para a idade e escolaridade do idoso, mas não suficiente para impedir a execução de AVDs (Gauthier *et al.*, 2006). A deterioração de domínios da cognição maior que o esperado, entretanto, sugere a existência de um processo neurodegenerativo inicial com possível evolução para demência (Gauthier *et al.*, 2006).

O cenário epidemiológico atual incentiva a busca de respostas acerca dos fatores genéticos e ambientais envolvidos na determinação de diferentes desfechos cognitivos. Neste sentido, o papel da inflamação e de seus elementos, como as citocinas, tem sido estudado. Pesquisas demonstrando a associação entre mediadores inflamatórios e processos cognitivos e comportamentais no cérebro saudável e doente surgiram principalmente a partir da década de 90 e persistem até a atualidade (Maier e Watkins, 1998; Gahtan e Overmier, 1999; McAfoose e Baune, 2009; Niranjana, 2013). Embora haja consenso a respeito da associação entre inflamação e demência (Swardfager *et al.*, 2010), muitas dúvidas precisam ser elucidadas.

Os polimorfismos em genes de citocinas podem influenciar a expressão destes mediadores proteicos e por isso, estudos envolvendo tais variantes genéticas e demência, principalmente a doença de Alzheimer (DA), também têm sido desenvolvidos. Os resultados gerados, entretanto, permanecem conflitantes. Além disso, pouco se sabe a respeito do envolvimento de polimorfismos em genes de citocinas e a evolução para CCND e desta para demência.

1.2 O Estudo Pietà

O estudo *Pietà* é um inquérito epidemiológico de base populacional iniciado em 2007, cujo objetivo é investigar o envelhecimento cerebral bem sucedido em uma amostra de idosos muito idosos (≥ 75 anos) residentes em Caeté (MG), Brasil (Figura 1). A coorte *Pietà* compreendeu inicialmente o recrutamento de 639 idosos (Caramelli *et al.*, 2011) e o presente trabalho é um estudo do tipo caso-controle derivado desta coorte, que utiliza alguns dados clínicos de avaliação funcional e cognitiva dos participantes, além de amostras de DNA destes indivíduos. A metodologia básica do estudo *Pietà* pode ser dividida em quatro etapas:

- Fase 1: Recrutamento dos idosos, coleta de dados como identificação pessoal, parâmetros sociodemográficos e socioeconômicos, histórico de saúde, medicações em uso, hábitos de vida. Tais dados foram obtidos por entrevistadores previamente treinados, por meio de questionários e na própria residência dos idosos.
- Fase 2: Avaliação clínica individual dos idosos por uma equipe médica, composta por neurologistas, geriatras e um psiquiatra. Foram realizados exames físicos e neurológicos, seguidos de avaliação cognitiva, funcional e psiquiátrica. Aqueles indivíduos com suspeita de CCND e demência foram submetidos a avaliações neuropsicológicas e funcionais adicionais, a fim de confirmar ou excluir a suspeita. Esta etapa ocorreu na instituição de assistência social aos idosos da cidade de Caeté.
- Fase 3: Coleta de sangue periférico para avaliação laboratorial bioquímica e genética. Esta etapa foi concluída em julho de 2008, totalizando 358 amostras.
- Fase 4: Reavaliação clínica dos idosos um ano após a primeira coleta de dados, em 2009.

Características dos participantes do estudo *Pietà*, métodos e critérios diagnósticos utilizados já foram detalhadamente publicados em 2011 (Caramelli *et al.*, 2011). O estudo *Pietà* é o quarto inquérito epidemiológico brasileiro a respeito do envelhecimento e eventos associados a ele. Este tipo de estudo começou a ser desenvolvido no Brasil na primeira década do século XXI e compreende além do *Pietà* o estudo de Catanduva (SP), o estudo de Bambuí (MG) e a coorte PALA realizada no Rio Grande do Sul (Herrera Jr *et al.*, 2002; Barbosa *et al.*, 2006; Blay *et*

al., 2007; Godinho *et al.*, 2012). Segundo a OMS, a obtenção de informação e pesquisas a respeito do envelhecimento populacional são essenciais à preparação para o enfrentamento das síndromes demenciais em países em desenvolvimento, como o Brasil (OMS, 2012).

Este trabalho objetiva avaliar a frequência dos polimorfismos que regulam a expressão das citocinas IL-6, IL-10, INF- γ , TGF- β 1 e TNF- α e a ocorrência de CCND e demência em idosos do projeto *Pietà*, bem como a importância destes polimorfismos no comprometimento cognitivo e funcional desta população.

Figura 1 – Cidade de Caeté (MG), Brasil. Município sede do estudo *Pietà*, localizado nas proximidades da Serra da Piedade.



Fonte: Website < <http://capitalnanet.blogspot.com.br/2013/05/300-anos-de-caete.html>.> Foto de Gustavo Pinheiro.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Envelhecimento populacional e epidemiologia

O termo “envelhecimento populacional” refere-se à mudança na média etária da população, caracterizada pelo aumento no peso relativo da frequência de pessoas acima de determinada idade (Carvalho e Garcia, 2003). Dados epidemiológicos recentes revelam que o número de idosos em todo mundo tende a um aumento contínuo. Em 2010, havia no mundo cerca de 576 milhões de pessoas com mais de 65 anos. A expectativa para 2050 é que esse número seja aproximadamente o triplo, alcançando 1,5 bilhão de pessoas (OMS, 2011). Importante destacar que as maiores taxas de envelhecimento populacional são verificadas em países em desenvolvimento, como o Brasil, onde essa mudança representa um desafio particular para as políticas de saúde. É esperado que entre 2010 e 2050 o número de idosos em países menos desenvolvidos cresça em níveis acima de 250%, enquanto nos países desenvolvidos essa expectativa seja de 71% (OMS, 2011).

No Brasil, nas últimas décadas, tem-se verificado importante queda da mortalidade nas idades mais avançadas e, em paralelo, acelerada diminuição da taxa de fecundidade, principalmente a partir de 1965 (Camarano e Kanso, 2009). Estes dois fatores atuam sinergicamente para que haja um aumento da proporção da população idosa em relação à jovem. De acordo com o último censo demográfico realizado no Brasil, em 2010, a população com 60 anos ou mais correspondia a 10,8% da população ou aproximadamente 20,5 milhões de pessoas (IBGE, 2010). Considerando que em 2000 este mesmo segmento populacional era composto por cerca de 14,5 milhões de pessoas, evidencia-se a rapidez da transformação vivenciada (IBGE, 2000). Se por um lado o aumento da longevidade reflete progressos sociais como avanços na qualidade de vida da população, conquistas tecnológicas na área médico-assistencial e melhorias do acesso aos serviços de saúde, por outro, faz aumentar a demanda por remanejamentos das políticas públicas de saúde, à medida que a população idosa requer uma assistência diferenciada, por ser prevalentemente acometida por doenças crônico-degenerativas. O Brasil possui um cenário demográfico complexo, por apresentar dois segmentos etários distintos e relevantes (idosos e jovens), que necessitam de

programas específicos e recursos públicos. Além disso, faz-se imprescindível a habilidade gestora que possibilite efetiva administração da escassez de recursos (Veras, 2009).

De certo, a perspectiva de crescimento da população idosa no mundo traz como marcante consequência a necessidade de melhor compreensão dos transtornos crônicos e progressivos, como o comprometimento cognitivo e a demência. Vivencia-se atualmente o aumento da incidência e prevalência destas condições. Segundo a Organização Mundial de Saúde, em 2012, havia no mundo 35,6 milhões de pessoas com demência e esse número está projetado para quase duplicar em 2030, atingindo 65,7 milhões de pessoas, e em 2050, 115,4 milhões. A cada ano há o acréscimo de 7,7 milhões de pessoas nesta estimativa, o que implica dizer que há um diagnóstico de demência a cada quatro segundos no mundo (OMS, 2012). Assim, existe uma demanda dual de investimentos e planejamento em saúde nos países em desenvolvimento, pois enquanto as doenças demenciais emergem, as infectocontagiosas ainda prevalecem (Bygbjerg, 2012).

No Brasil, há escassez de dados acerca da incidência e prevalência de idosos com demência, indicando precariedade no registro dessa doença e prejudicando o conhecimento sobre seu impacto epidemiológico no país. Burla *et al.* (2013) estimaram a prevalência da demência no Brasil por idade, baseando-se nos principais estudos regionalizados sobre este tema publicados entre janeiro de 1995 e outubro de 2012. Os autores encontraram uma prevalência total de demência em idosos acima de 65 anos de 7,6%, valor próximo à prevalência estimada para países da América Latina, que é 7,1%. Além disso, foi descrita no referido estudo a relação direta entre o envelhecimento e o aumento da prevalência de demência, que variou de 1,9% entre idosos de 65-69 anos a 23,1% em idosos com mais de 80 anos (Burlá *et al.*, 2013).

2.2 Envelhecimento cerebral saudável

O envelhecimento é uma das maiores questões entre os fenômenos biológicos. Envelhecer é um processo que envolve diversas mudanças nos sistemas orgânicos a nível molecular, celular e funcional. Trata-se de um evento fisiológico

inevitável e ainda não completamente compreendido, que é influenciado por fatores genéticos e interações ambientais (Park e Yeo, 2013). Neste contexto, o envelhecimento natural do Sistema Nervoso Central (SNC) é um evento que ocasiona algum grau de declínio em diferentes funções cognitivas (Shankar, 2010).

O termo cognição incorpora os seguintes domínios: linguagem, pensamento, memória, funções executivas (habilidades de planejar e de executar tarefas), julgamento, atenção, percepção e aprendizado, que, juntamente com o componente emocional, caracterizam a saúde mental de um indivíduo (Hendrie *et al.*, 2006; Desai, Grossberg e Chibnall, 2010). Alterações observadas no envelhecimento saudável do SNC, como redução do volume cerebral e diminuição de sinapses, são eventos associados ao declínio em habilidades cognitivas específicas, como a velocidade de processamento, funções executivas e memória episódica (Fjell e Walhovd, 2010). Entretanto, há manutenção da atividade cerebral em idosos saudáveis suficiente para suprir as necessidades da vida cotidiana, devido às redundâncias neural e sináptica, bem como à plasticidade estrutural e funcional do cérebro (Rossini *et al.*, 2013). O conceito de envelhecimento cerebral saudável, apesar de ainda não ser consensual entre os autores, exalta justamente a manutenção da autonomia e independência na senescência. Segundo Caramelli *et al.* (2011), o envelhecimento cerebral saudável é aquele livre de qualquer disfunção comportamental, cognitiva e motora que permite manutenção da autonomia e integração do idoso com o meio ambiente e social. De acordo com (Mora, 2013), o envelhecimento cerebral bem sucedido é expresso pela preservação da vida independente em faixas etárias mais avançadas, processo este influenciado por interações entre fatores ambientais e genéticos. Ainda segundo o *Critical Evaluation Study Committee* (Hendrie *et al.*, 2006) o conceito de saúde cognitiva em pessoas idosas não deve considerar somente a ausência de doença, mas também o desenvolvimento e a preservação de habilidades que permitam ao indivíduo uma participação social ativa, um modo de vida independente, a capacidade de se recuperar de doenças e de lidar com déficits funcionais típicos da idade avançada (Hendrie *et al.*, 2006).

2.3 Comprometimento cognitivo não demência

Muitos termos são utilizados para descrever o comprometimento cognitivo de nível intermediário observado na senescência, como: comprometimento cognitivo não demência (CCND), comprometimento cognitivo leve (CCL) e declínio cognitivo associado à idade (De Carli, 2003; Werner e Korczyn, 2008; Ward *et al.*, 2012). Estas múltiplas denominações estão associadas a critérios clínicos mais ou menos abrangentes e, por isso, possuem diferentes valores estimados de prevalência e incidência na população idosa (Decarli, Charles, 2003; Werner e Korczyn, 2008; Ward *et al.*, 2012). No presente estudo, os critérios diagnósticos para identificação de indivíduos que exibiam declínio cognitivo subclínico estarão associados ao termo comprometimento cognitivo não demência (CCND) (Graham *et al.*, 1997). A definição de CCND está associada à presença de comprometimento em faculdades cognitivas e funcionais como memória, percepção, habilidade motora, linguagem e capacidade executiva, na ausência de síndrome demencial clinicamente definida (Graham *et al.*, 1997; De Carli, C., 2003).

O significado de CCND é, de certo modo, próximo ao de comprometimento cognitivo leve (CCL), pois também é tido como uma fase de transição entre envelhecimento saudável e demência caracterizada por declínio cognitivo acima do esperado para a idade e escolaridade do indivíduo, mas que não é grave o suficiente para comprometer significativamente a execução de AVDs (Graham *et al.*, 1997; Gauthier *et al.*, 2006; Langa e Levine, 2014). Entretanto, em uma abordagem conceitual mais ampla, CCND supera o conceito de CCL, pois não é necessário que o indivíduo relate a própria percepção de declínio cognitivo, tornando-se clinicamente mais valioso e abrangente (Schneider *et al.*, 2009).

. A prevalência de CCND estimada por Graham *et al.* (Graham *et al.*, 1997) na população idosa canadense acima de 65 anos foi de 16,8%, um valor que supera a prevalência de todas as formas de demência somadas e que se mostra crescente com o avançar da idade da população estudada. Em indivíduos categorizados na faixa etária de 75-84 anos, a prevalência de CIND foi de 24,0% e entre idosos com 85 anos ou mais este indicador alcançou 30,3% (Graham *et al.*, 1997). Em uma revisão sistemática mais recente (Ward *et al.*, 2012), observou-se que a prevalência de CIND varia entre 5,1-35,9% entre a população idosa, uma vez que esta larga

distribuição pode estar associada à heterogeneidade de idade dos idosos avaliados em diferentes estudos.

Observar que o processo demencial instaura-se gradualmente e atestar a frequente existência de uma fase prodrômica ou subclínica é de interesse principalmente devido à busca do entendimento etiológico das demências, de estratégias de manejo e de terapias modificadoras do curso das doenças relacionadas. Evidências indicam que pessoas que apresentam CCND ou CCL têm maior chance de desenvolver um quadro demencial do que aquelas que não apresentam declínio cognitivo (Plassman *et al.*, 2008; Campbell *et al.*, 2013; Vega e Newhouse, 2014). As estimativas de conversão são variáveis e podem alcançar aproximadamente 12% em um ano (Plassman *et al.*, 2008) e até 47% em cinco anos de seguimento (Tuokko *et al.*, 2003). Alguns fatores de risco para a conversão de CCND em demência já são conhecidos e podem ser classificados como modificáveis e não modificáveis (Campbell *et al.*, 2013). Como fatores modificáveis podemos mencionar a presença de outras comorbidades e sintomas neuropsiquiátricos como a depressão, e como fatores não modificáveis a idade e características genéticas como a presença do alelo $\epsilon 4$ do gene da apolipoproteína E (ApoE) (Campbell *et al.*, 2013). A identificação clínica e acompanhamento de indivíduos com CCND é também importante porque estes indivíduos apresentam maior índice de mortalidade em cinco anos de acompanhamento do que idosos saudáveis (Tuokko *et al.*, 2003).

Apesar de ser considerada como uma fase subclínica da demência, é importante notar que as taxas de conversão não são absolutas, isto é, CCND é uma entidade clínica complexa que pode envolver diferentes desfechos (Gauthier *et al.*, 2006; Forlenza e Chiu, 2008; Manly *et al.*, 2008). Indivíduos com CCND podem evoluir para a demência, para a estabilização do quadro ou até mesmo a regressão dos sintomas manifestada por melhoria na performance cognitiva e funcional (Manly *et al.*, 2008).

Em maio de 2013, a *American Psychiatry Association* (APA) publicou a quinta edição do *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders* (DSM-V). A atualização incluiu critérios diagnósticos para o CCND ou declínio cognitivo intermediário, intitulando esta condição de Transtorno Neurocognitivo Leve. O objetivo desta inclusão é possibilitar a detecção precoce de declínio cognitivo em pacientes antes que os mesmos apresentem déficits mais acentuados e progressão

para o Transtorno Neurocognitivo Maior (ou demência) ou para outras condições debilitantes, visando prover melhor assistência e cuidado a estes pacientes (APA, 2013).

2.4 Demência

Demência é um termo geral que representa uma série de doenças de diferentes etiologias que possuem como ponto convergente a redução da autonomia e conseqüente impacto na execução de AVDs e qualidade de vida. A maioria das doenças neurodegenerativas que conduzem aos sintomas típicos da demência estão associados a polimorfismos e mutações genéticas, somados a fatores de risco ambientais (Holmes, 2008).

Segundo definição da APA (1994), veiculada na quarta edição do *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders* (DSM-IV), demência é uma síndrome caracterizada pelo declínio progressivo e global das funções cognitivas, que inclui comprometimento da memória (capacidade prejudicada de aprender novas informações ou recordar informações anteriormente aprendidas) e pelo menos uma das seguintes alterações potenciais impactantes das atividades sociais e ocupacionais do indivíduo: afasia (perturbação da linguagem); apraxia (capacidade prejudicada de executar atividades motoras, apesar de um funcionamento motor intacto); agnosia (incapacidade de reconhecer ou identificar objetos, apesar de um funcionamento sensorial intacto); perturbação do funcionamento executivo (isto é, planejamento, organização, sequenciamento, abstração) (APA, 1994). De acordo com atualizações publicadas no DSM-V (APA, 2013), o novo termo para referir-se à demência é transtorno neurocognitivo maior, caracterizado pelo declínio em um ou mais domínios cognitivos, ressaltando que tal declínio não deve ser apenas uma sensação pessoal de perda de habilidades cognitivas, mas constituir perdas observáveis por outros e atestáveis por uma avaliação cognitiva, como a realização de uma bateria de exames neuropsicológicos (APA, 2013).

A ocorrência de demência está associada ao envelhecimento, pois é observado que a idade é um consistente fator de risco para o desenvolvimento de síndromes demenciais e estas são importantes causas de incapacidade na senescência (OMS, 2012). A DA constitui o tipo mais comum e estudado de

demência, respondendo por cerca de 60-70% de todos os casos diagnosticados (Wortmann, 2012). Outros tipos comuns de demência, em ordem decrescente de frequência no segmento populacional acima de 65 anos, incluem: a demência vascular, demência mista, demência com corpos de Lewy, demência frontotemporal e demência associada à doença de Parkinson (OMS, 2012).

Nos últimos anos, muitos estudos têm sido desenvolvidos visando identificar fatores de suscetibilidade às demências e alguns fatores genéticos e ambientais tem se destacado. Alguns fatores ambientais de risco são passíveis de modificações que incluem: o controle de comorbidades como *diabetes mellitus* e hipertensão, a manutenção de um estilo de vida saudável e de níveis adequados de colesterol sérico, o aumento da escolaridade e a prevenção de acidentes vasculares cerebrais (AVCs) e traumas cranianos (Patterson *et al.*, 2007; Chen, Lin e Chen, 2009). Alguns fatores ambientais são, entretanto, não modificáveis e incluem idade e sexo, sendo que alguns estudos indicam maior número de DA entre mulheres (Chen, Lin e Chen, 2009). Entre os fatores de risco genéticos, o polimorfismo no gene da ApoE foi identificado como mais relevante no contexto de demências de início tardio e verificou-se que a presença do alelo $\epsilon 4$ predispõe à ocorrência de DA em diferentes populações (Corder *et al.*, 1993; Roses, 1996; Hendrie *et al.*, 2014).

Apesar dos avanços, os mecanismos patológicos das síndromes demenciais não estão completamente elucidados e é requerido conhecimento adicional para o desenvolvimento de terapias modificadoras do curso destas doenças e aprimoramento das estratégias de manejo. Uma linha importante de investigação é a relação da inflamação e seus mediadores na neurodegeneração. Um estado proinflamatório crônico, com exacerbação da produção de citocinas inflamatórias, são achados comuns nestes contextos patológicos (Amor *et al.*, 2010; Smith *et al.*, 2012). No entanto, permanecem controvérsias acerca desta relação, uma vez que o processo inflamatório pode configurar como causa, consequência, fator redutor ou acentuador do dano tecidual observado nas demências.

2.5 Testes para avaliação funcional e cognitiva

Diversas ferramentas clínicas estão disponíveis hoje para a avaliação do desempenho cognitivo e funcional dos pacientes. No acompanhamento de idosos, estes testes, principalmente sob forma de questionários ou comandos simples do ponto de vista executivo, fornecem valiosas informações ou indícios acerca do envelhecimento bem-sucedido ou declínio de suas faculdades. Segundo recomendação da APA (APA, 2013), o diagnóstico de demência ou transtorno neurocognitivo maior depende da verificação do declínio em domínios cognitivos por meio de uma bateria de exames neuropsicológicos. Embora não haja padrão-ouro neste sentido, testes de aplicação rápida e interpretação simples são interessantes no cuidado individual (Nitrini *et al.*, 1994).

Na avaliação cognitiva, podem ser utilizadas as ferramentas do mini-exame do estado mental (MEEM) (Brucki *et al.*, 2003) e testes neuropsicológicos simples, que em conjunto são denominados bateria breve de rastreio cognitivo (BBRC) (Nitrini *et al.*, 1994). O MEEM é um exame muito utilizado para triagem de demência e comprometimento cognitivo e também é adequadamente aplicável a estudos epidemiológicos, podendo avaliar simultaneamente diferentes áreas da cognição como linguagem, atenção, memória, orientação e habilidades construtivas e de cálculo (Brucki *et al.*, 2003; Bernard *et al.*, 2010). Além de possibilitar o rastreio de perdas cognitivas na clínica, o MEEM também permite o seguimento evolutivo de doenças e o monitoramento de resposta terapêutica (Brucki *et al.*, 2003).

Testes da BBRC podem avaliar diferentes habilidades cognitivas, como memória, linguagem e funções executivas (Nitrini *et al.*, 1994). A BBRC se inicia com um teste de memória visual, que é aplicado em quatro fases. Na primeira, uma folha de papel com 10 figuras (desenhos de objetos concretos) é apresentada ao indivíduo e pede-se apenas que ele as nomeie. Em seguida a folha é retirada e é solicitada a evocação das figuras (memória incidental). A folha é apresentada novamente por duas vezes, durante 30 segundos, seguida de duas evocações imediatas (memória imediata e aprendizado). São então feitos dois outros testes, fluência verbal semântica, em que o indivíduo é solicitado a dizer o maior número de animais em um minuto, e o teste do desenho do relógio, no qual ele deve desenhar o mostrador de um relógio e colocar os ponteiros marcando 2h45. Após esta

interferência mediada pela realização dos dois testes (que demandam cerca de cinco minutos), pede-se ao participante que evoque as figuras apresentadas previamente (evocação tardia), seguida de uma tarefa de reconhecimento. Nitrini *et al.* (1994) atestaram que estes testes apresentaram alta acurácia diagnóstica em uma amostra de idosos brasileiros.

A associação dos dados obtidos pelo MEEM e dos testes da BBRC pode ser utilizada para o cálculo de um escore cognitivo global. Para eliminar o viés da escolaridade sobre a performance cognitiva, deve-se proceder uma normalização dos dados de acordo com quatro níveis de escolaridade formal (analfabetos, 1-3, 4-7 e >7 anos) por meio de valores médios e desvios-padrão calculados para um grupo controle.

Uma das ferramentas empregadas na avaliação funcional dos participantes é o questionário de atividades funcionais (QAF) ou questionário de Pfeffer (Pfeffer *et al.*, 1982). Trata-se de uma série de 10 perguntas objetivas, de rápida aplicação, direcionadas ao cuidador, cujo objetivo é avaliar a capacidade de executar AVDs instrumentais, como manejar dinheiro ou tomar os remédios. A pontuação do QAF varia de 0 a 30 pontos, sendo que o aumento do escore está associado a maior nível de dependência (Pfeffer *et al.*, 1982).

A seleção de testes para avaliação funcional e cognitiva no presente estudo baseou-se em recomendações do Departamento Científico de Neurologia Cognitiva e do Envelhecimento da Academia Brasileira de Neurologia para diagnóstico de DA (Nitrini *et al.*, 2005) além de considerar possibilidades de normalização por escolaridade e aplicação em população de baixa escolaridade.

2.6 Sistema imune e SNC

As ações dos sistemas nervoso e imune são fundamentais à manutenção da homeostase e acreditava-se que a interação entre eles era limitada pela presença da barreira hematoencefálica (Marin e Kipnis, 2013). Entretanto, atualmente conhece-se que mecanismos de imunidade inata e adquirida são fundamentais no desenvolvimento e fisiologia cerebral (Filiano, Gadani e Kipnis; Schwartz e Kipnis, 2011) e participam dos complexos, e ainda não completamente elucidados,

processos cognitivos (McAfoose e Baune, 2009). A demonstração de uma íntima e recíproca conexão modulatória entre os sistemas nervoso e imune (Filiano, Gadani e Kipnis; 2014), principalmente a partir da primeira década do século XXI, representa uma importante revolução conceitual (Schwartz e Kipnis, 2011).

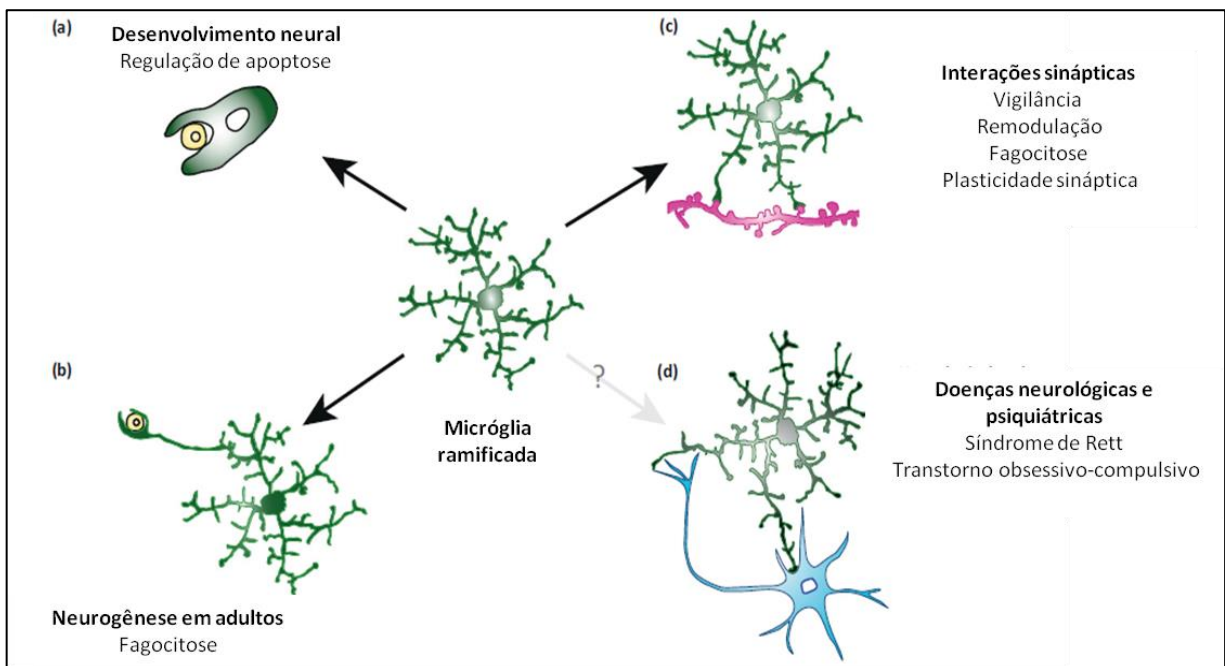
Mais de metade do volume cerebral é ocupada por astrócitos, oligodendrócitos e micróglia, tipos celulares diferentes dos neurônios que em conjunto são denominados glia (Barres, 2008). Astrócitos e oligodendrócitos compartilham uma origem neuroepitelial com os neurônios, enquanto a micróglia consiste em células semelhantes a macrófagos residentes no SNC e têm, portanto, origem e funções associadas ao sistema imune (Franklin e Bussey, 2013). A glia é essencial à manutenção e sobrevivência neuronal, e mais recentemente tem se demonstrado que estes tipos celulares influenciam diretamente a formação, manutenção e plasticidade sináptica, interferindo na função neuronal (Eroglu e Barres, 2010; Pfrieger, 2010). O envolvimento das células gliais na cognição podem ser exemplificadas pelo fato de que na escala evolutiva o aumento do tamanho cerebral, associado a maior potencial cognitivo, relaciona-se principalmente com o aumento de células da glia (Franklin e Bussey, 2013).

A influência mais clara do sistema imune na atividade e fisiologia cerebral se dá via micróglia. Tradicionalmente associada à resposta contra injúria cerebral devido à sua aptidão em realizar fagocitose e produzir mediadores inflamatórios, a micróglia é, além disso, um elemento modulador do funcionamento neuronal e da formação e manutenção de sinapses (Wake *et al.*, 2013). Quando inativa, a micróglia assume um fenótipo ramificado e quando ativada por estímulos como infecções, trauma e doenças neurodegenerativas, passa a exibir uma forma ameboide fagocítica com aumento da produção de citocinas e capacidade móvel (Helmut *et al.*, 2011). Nos últimos anos, tem se demonstrado que mesmo células microgliais inativas são fundamentais na manutenção dos circuitos neurais (Figura 2) (Wake *et al.*, 2013) e estão constantemente sondando o microambiente cerebral e os contatos sinápticos, atuando na remodelação através da remoção de células danificadas e de sinapses não funcionais (Kettenmann, Kirchhoff e Verkhratsky, 2013; Wake *et al.*, 2013). Células microgliais exibem, portanto, capacidade de integrar-se à atividade neural e este contato pode envolver neurotransmissores, neuropeptídeos e neuromoduladores, já que a micróglia apresenta grande variedade

de receptores para estas substâncias (Kettenmann *et al.*, 2011; Kettenmann, Kirchhoff e Verkhratsky, 2013). Além da micróglia, astrócitos e neurônios podem produzir citocinas e possuem receptores para tais mediadores imunológicos (Arisi, 2014), reforçando recíproca interação entre os sistemas nervoso e imunológico.

A equilibrada relação entre cérebro e sistema imune, observada em condições fisiológicas, depende de complexas e delicadas interações entre neurônios e células do sistema imune inato e periférico, particularmente micróglia, linfócitos T e macrófagos (Yirmiya e Goshen, 2011). Estas interações envolvem a resposta de células da glia a neurotransmissores clássicos (como glutamato e monoaminas), hormônios (como glicocorticoides) e também a secreção de níveis basais de citocinas, que exercem funções em neurônios e também em células gliais (Yirmiya e Goshen, 2011).

Figura 2 – Funções fisiológicas da micróglia na manutenção de circuitos neurais.



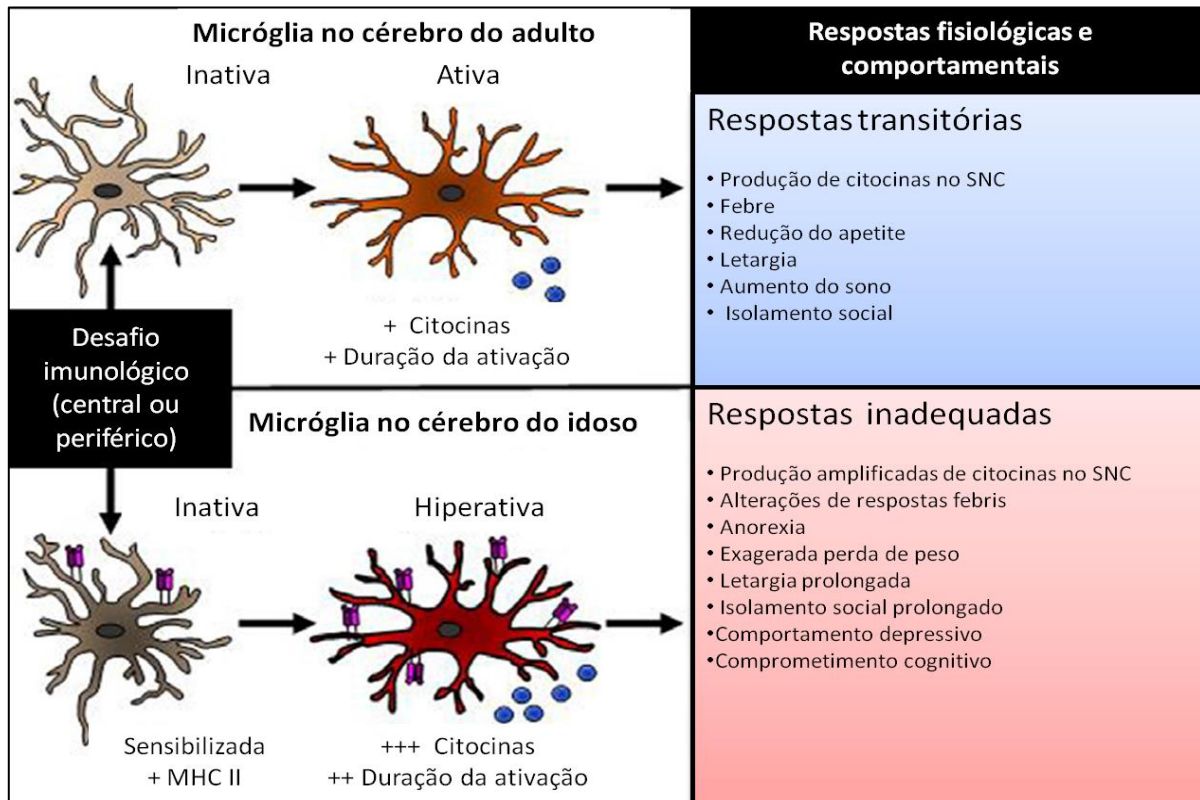
Fonte: Adaptado de Wake *et al.*, 2013. Em verde, micróglia; azul, neurônio; amarelo, célula da linhagem neural; rosa, sinapses em dendritos; cinza, micróglia não funcional. (a) Regulação da apoptose durante o desenvolvimento (b) Regulação da neurogênese incluindo a fagocitose de células recém geradas (c) Vigilância, monitoramento remodulação através de fagocitose para manutenção da homeostase sináptica (d) Disfunção microglial pode estar associada ao desenvolvimento de doenças neurológicas e psiquiátricas.

A micróglia é capaz de responder e propagar sinais inflamatórios oriundos da periferia (Norden e Godbout, 2013). A produção de interleucina 4 (IL-4), e possivelmente de outros mediadores inflamatórios por células T periféricas, modula a função e ativação de células do sistema imune inato no SNC e parece ser importante durante a execução de atividades cognitivas (Marin e Kipnis, 2013; Filiano, Gadani e Kipnis, 2014). Esta modulação pode, por exemplo, impedir o desencadeamento de processo inflamatório durante o estresse ocasionado por atividades cerebrais de aprendizado (Marin e Kipnis, 2013).

Alterações na produção de citocinas são observadas no envelhecimento normal e há uma tendência ao desenvolvimento de um estado proinflamatório (Michaud *et al.*, 2013). Durante o envelhecimento observa-se que a micróglia desenvolve um fenótipo mais inflamatório, com maior expressão de citocinas proinflamatórias, de receptores do MHC (*major histocompatibility complex*) de classe II e reduzida resposta à ação de citocinas anti-inflamatórias (Norden e Godbout, 2013). Considera-se que a micróglia com este novo fenótipo esteja sensibilizada ou reativa (Norden e Godbout, 2013). Estas alterações no sistema imune residente podem influenciar as funções cerebrais e é possível que exerçam influência sobre a cognição, funcionalidade e comportamento em idosos saudáveis. Um aumento de atividade inflamatória central no envelhecimento está associado a déficits de coordenação motora, cognição e plasticidade neural (Norden e Godbout, 2013). Embora o conhecimento acerca dos mecanismos envolvidos ainda seja limitado, algumas observações indicam a existência de efetiva influência da micróglia sensibilizada em características observáveis na senescência (Figura 3).

Em contextos neurodegenerativos, como ocorre em algumas formas de demência, há aumento expressivo da produção de citocinas e a instalação de um processo inflamatório crônico no SNC, com um franco desequilíbrio entre a interação sistema imune e cérebro. Especula-se que mudanças na micróglia devido ao envelhecimento sejam elementos chave no processo neurodegenerativo (Luo, Ding e Chen, 2010). Adicionalmente, a influência de citocinas, principalmente proinflamatórias, em processos de neurodegeneração tem sido descrita (Smith *et al.*, 2012).

Figura 3 – Influência da micróglia no cérebro de adultos e idosos.



Fonte: Adaptado de Nordon e Godbout., 2013.

2.7 Inflamação e neurodegeneração

O termo neurodegeneração representa um lento e progressivo processo de disfunção e perda axonal e neural que instala-se no SNC em resposta a variados fatores desencadeantes, como quadros demenciais, traumas, infecções e esclerose múltipla (Amor *et al.*, 2010). Apesar da diversidade de doenças que cursam com neurodegeneração, é observada a instalação de um processo inflamatório crônico como fator comum, que envolve, sobretudo, a micróglia e o recrutamento de linfócitos T (Amor *et al.*, 2010). Entender o papel da inflamação na neurodegeneração constitui, porém, um desafio, pois observa-se que em contextos patológicos a ativação do sistema imune pode exercer tanto ações benéficas, necessárias à neuroregeneração, quanto malefícios ao parênquima cerebral, acentuando a neurodegeneração (Tony, 2006; Amor *et al.*, 2010). Citocinas produzidas pela micróglia ativada exibem, por exemplo, ações neuropáticas e neuroprotetivas (Galimberti e Scarpini, 2011).

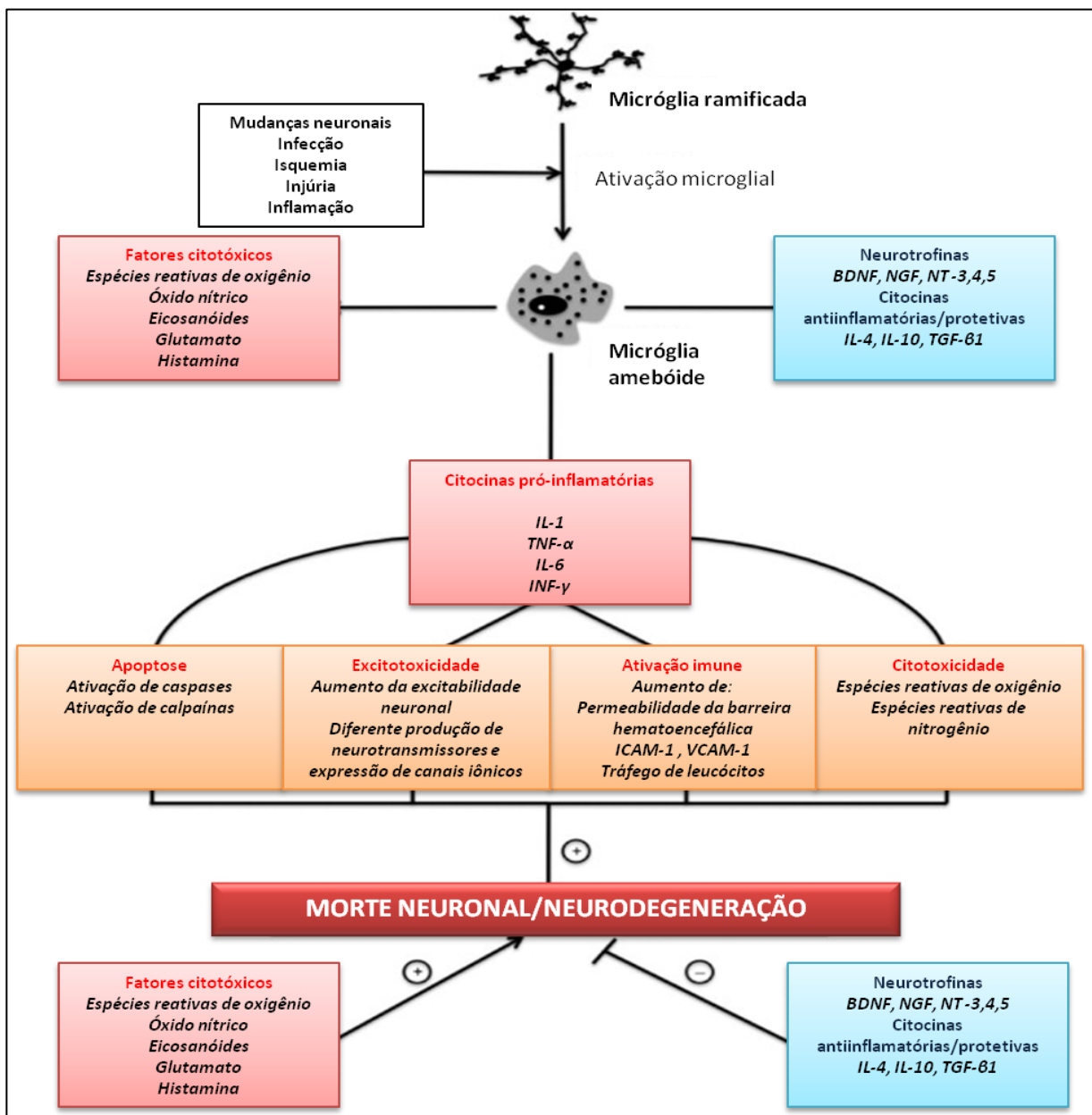
A maior parte do conhecimento sobre inflamação e neurodegeneração no contexto das demências deriva-se de estudos sobre a DA, a mais prevalente e estudada forma de demência. Microscopicamente, a DA caracteriza-se pela formação de placas senis ou depósitos amiloides extracelulares constituídos principalmente pelo peptídeo β -amiloide (β A) e pela presença de emaranhados neurofibrilares intracelulares formados pela proteína tau hiperfosforilada (Blennow, De Leon e Zetterberg, 2006). Estes achados patológicos localizam-se em áreas corticais e no lobo temporal medial e são acompanhados por neurodegeneração de neurônios e sinapses (Blennow, De Leon e Zetterberg, 2006).

Neurônios danificados, depósitos amiloides e emaranhados neurofibrilares são claros estímulos inflamatórios e é observado no decorrer da DA uma crescente exacerbação de ativação microglial e produção de mediadores como citocinas, quimiocinas, proteínas de fase aguda, além de intensificação da ativação do sistema do complemento (Akiyama *et al.*, 2000; Wyss-Coray, 2006). A hipótese de desencadeamento inflamatório pela anormal deposição amiloide em indivíduos com DA tem sido apontada como ponto chave na etiologia desta demência, à medida que maximiza a toxicidade e a deposição de β A e pode acentuar a formação de emaranhados da proteína tau em neurônios vulneráveis (McGeer e McGeer, 2013). Particular atenção tem sido dada às citocinas proinflamatórias IL-1, IL-6 e TNF- α , produzidas em larga escala pela micróglia ativada e cuja abundância está envolvida em mecanismos que conduzem à morte neuronal (Smith *et al.*, 2012). Outra evidência importante do envolvimento inflamação e demência reside na observação de que indivíduos com DA apresentam níveis mais elevados de citocinas proinflamatórias no soro, embora haja controvérsia a respeito da consistência destes dados com níveis líquidos dos mesmos marcadores (Swardfager *et al.*, 2010). Este aumento do estado proinflamatório pode influenciar negativamente a atividade cognitiva e contribuir para a fragilidade e dependência entre idosos (Gahtan e Overmier, 1999; Michaud *et al.*, 2013).

O estudo da inflamação na patologia da DA remonta desde a década de 1980 (Rogers *et al.*, 1996) e, apesar dos avanços, muito permanece por ser esclarecido, pois ainda não há definição na consideração da inflamação como causa, fator contribuinte ou achado secundário na DA (Wyss-Coray e Rogers, 2012). Neste período de 30 anos de pesquisa, o papel dual dos mecanismos inflamatórios em

neurodegeneração e neuroproteção tem demonstrado ser uma constante evidência (Figura 4). Se por um lado a ativação microglial com produção maciça de citocinas pró-inflamatórias catalisa o dano oxidativo e a morte neuronal (Smith *et al.*, 2012), por outro a inflamação é necessária, sobretudo em suas fases finais, para remoção de *debris* e restos apoptóticos para o retorno à homeostase (Hjorth, Zhu e Schultzberg, 2014).

Figura 4 – Mecanismos inflamatórios envolvidos na acentuação ou prevenção da neurodegeneração.



Fonte: Adaptado de Smith *et al.*, 2012. BDNF: *Brain-derived neurotrophic factor*; NGF: *Nerve growth factor*; NT-3, 4, 5: *Neurotrofinas-3, 4, 5*; ICAM-1: *Intercellular Adhesion Molecule 1*; VCAM-1: *vascular cell adhesion molecule 1*.

Duas recentes e interessantes hipóteses apontam para a existência de um desequilíbrio da resposta inflamatória em indivíduos com DA, associado à cronificação e exacerbada polarização pró-inflamatória. A primeira delas propõe que haja uma deficiência na produção e sinalização da citocina anti-inflamatória TGF- β 1 no cérebro de indivíduos com DA (Caraci *et al.*, 2012). TGF- β 1 possui propriedades neuroprotetoras e neurotróficas, atuando em processos de neurogênese, diferenciação de células progenitoras neurais em neurônios funcionais, na limitação da neuroinflamação e redução da toxicidade amiloide (Caraci *et al.*, 2011; Rodriguez-Martinez e Velasco, 2012; Martinez-Canabal, 2015). A segunda sugere que em indivíduos com DA haja um comprometimento da fase final da inflamação, fundamental ao retorno homeostático, denominada resolução da inflamação. Wang *et al.* (2015) evidenciaram pela primeira vez a presença de mediadores pró-resolutivos especializados (SPMs) e receptores para tais substâncias no cérebro humano, indicando a existência de um processo de resolução inflamatória central semelhante ao que ocorre na periferia. Estes mesmos autores descreveram redução dos níveis do SPM lipoxina A₄ (LXA₄) no líquido cefalorraquidiano e hipocampo de indivíduos com DA e demonstraram que as concentrações de LXA₄ correlacionavam-se com a pontuação MEEM dos pacientes (Wang *et al.*, 2015). Sendo assim, não a contenção da inflamação, mas o estímulo à fase final de resolução poderia constituir uma nova abordagem terapêutica na DA (Hjorth, Zhu e Schultzberg, 2014). Em adição, Zhu *et al.* (2015) descreveram que o peptídeo β A induz ou a redução da produção de agentes pró-resolutivos pela micróglia ou não estimula o aumento da secreção destes mediadores, o que não é observado quando estas células são desafiadas por lipopolissacarídeo bacteriano, que conduz ao aumento da expressão de pró-resolvinas (Zhu *et al.*, 2015).

2.8 Citocinas e polimorfismos

Citocinas são uma classe de pequenos peptídeos pleiotrópicos expressos em níveis basais em contextos fisiológicos, mas que podem ser induzidos rapidamente em resposta à injúria de natureza variada, funcionando como efetores e sinalizadores imunes (Gahtan e Overmier, 1999). De acordo com suas ações

imunológicas as citocinas são classificadas como anti-inflamatórias ou proinflamatórias.

Com o advento das pesquisas na área de neuroimunidade, tem sido aceito que citocinas expressas em baixos níveis no SNC (Arisi, 2014) participam da fisiologia cerebral, influenciando em processos cognitivos por atuar a nível molecular na neurogênese, neuromodulação e plasticidade sináptica (McAfoose e Baune, 2009; Yirmiya e Goshen, 2011).

As evidências mais consolidadas da atuação de citocinas na cognição referem-se às citocinas proinflamatórias TNF- α , IL-1 e IL-6 (McAfoose e Baune, 2009). Como mediadores imunológicos, as citocinas também influenciam o curso de processos patológicos cerebrais e sua produção nestes contextos pode aumentar milhares de vezes (Arisi, 2014). É importante ressaltar, portanto, que desequilíbrios observados na produção e sinalização de citocinas no SNC não se restringem apenas a distúrbios imunológicos, mas também envolvem perturbações nas funções cerebrais fisiologicamente influenciadas por estes mediadores (McAfoose e Baune, 2009).

Polimorfismos de base única ou *Single nucleotide polymorphisms* (SNPs) consistem na substituição de uma única base nitrogenada na sequência de DNA, permitindo assim a existência de duas ou mais formas alélicas de um mesmo gene. Tais variações são os tipos mais comuns de polimorfismos, mais frequentes do que mutações, e estima-se que ocorra um SNP a cada mil bases do total de três bilhões que compõem o genoma humano (Read, Brenner e Miller, 2001; Twyman e Squire, 2009). Os SNPs podem influenciar a expressão gênica e acredita-se que exerçam influência sobre muitas doenças humanas (Read, Brenner e Miller, 2001).

SNPs em genes de citocinas podem localizar-se na região promotora ou no interior do gene, em éxons ou íntrons, interferindo na atividade transcricional ou no processamento do produto proteico gerado. Devido às evidências associativas entre mecanismos inflamatórios e fisiopatologia do SNC, muitos estudos têm sido desenvolvidos visando investigar a associação de SNPs em genes de citocinas e transtornos como a demência. Com relação às síndromes demenciais, a maioria dos estudos possui delineamento caso-controle e dedica-se ao estudo da DA, sendo que para os polimorfismos mais estudados já estão disponíveis metanálises e revisões

sistemáticas (Araria-Goumidi *et al.*, 2002; Arosio *et al.*, 2004; Di Bona *et al.*, 2009; Di Bona *et al.*, 2012; Payao *et al.*, 2012; Chang *et al.*, 2013; Hua *et al.*, 2013). Entretanto, as conclusões destes estudos permanecem contraditórias e até hoje não se conseguiu demonstrar uma associação robusta entre os SNP em genes de citocinas e a DA, como a que se demonstrou para os polimorfismos no gene da ApoE, o mais consolidado fator de risco genético para DA de início tardio em populações etnicamente distintas (Corder *et al.*, 1993; Roses, 1996; Hendrie *et al.*, 2014). Entretanto, Licastro *et al.* (2007) propuseram a integração de informações genéticas de expressão de citocinas acessadas por SNPs com aquela oriunda da genotipagem do gene da ApoE e demonstraram que, em conjunto, variáveis genéticas associadas à alta expressão de fatores proinflamatórios constituem um fator de risco para ocorrência de DA, mesmo em idade inferior a 65 anos e de forma independente da presença do alelo de risco $\epsilon 4$ de ApoE (Licastro *et al.*, 2007).

No presente trabalho, cinco citocinas serão estudadas, sendo duas anti-inflamatórias (TGF- $\beta 1$ e IL-10) e três proinflamatórias (TNF- α , IL-6, INF- γ). No total, oito SNPs serão estudados, sendo: TNF- α -308 G>A (rs1800629); TGF- $\beta 1$ codon + 10 C>T (rs1800470) e TGF- $\beta 1$ codon + 25 G>C (rs1800471); IL-10 -1082 A>G (rs1800896), IL-10 -819 C>T (rs1800871) e IL-10 -592 (rs1800872); IL-6 -174 G>C (rs1800795) e INF- γ +874 T>A (rs2430561).

Evidências de envolvimento de SNPs em genes de citocinas com declínio cognitivo e funcional em idosos são escassas e, para algumas das variantes abordadas neste trabalho, em especial na população brasileira, inexistentes na literatura, o que justifica o presente trabalho.

3 JUSTIFICATIVA

CCND e demência são condições clínicas comuns em idosos, que exercem grandes impactos individuais e coletivos devido à sua natureza muitas vezes progressiva e incapacitante.

Considerando que:

1. Vivemos atualmente uma transformação demográfica mundial que conduz ao envelhecimento populacional, inclusive de forma acelerada em países em desenvolvimento, como o Brasil;

2. Os referidos transtornos cognitivos ainda são pouco esclarecidos do ponto de vista de etiologia;

3. Existem poucos estudos realizados no Brasil que visam estudar a influência de polimorfismos em genes de citocinas sobre os eventos envelhecimento cerebral saudável, CCND e demência;

4. Não é conhecido o efeito de polimorfismos em genes de citocinas sobre a cognição e funcionalidade de idosos brasileiros;

5. Os recursos diagnósticos para identificação precoce de CCND e demência ainda são limitados e necessitam de melhorias; e

6. Os recursos terapêuticos para tratamento destas alterações cognitivas ainda são de natureza sintomática e nem sempre eficazes; justifica-se e faz-se necessário elucidar e compreender os mecanismos envolvidos e fatores predisponentes destas desordens neurodegenerativas. Estudar as variáveis genéticas envolvidas e seu impacto na ocorrência e caracterização cognitiva de indivíduos com CCND e demência é importante para subsidiar ações que melhorem o manejo destas condições.

Este trabalho visa investigar características genéticas presentes na ocorrência do CCND e da demência, através do estudo de polimorfismos em genes de citocinas. Além disso, é objetivo deste trabalho relacionar os dados genéticos obtidos com o desempenho cognitivo e funcional dos idosos avaliados. A motivação para a realização desta pesquisa é prover maior conhecimento acerca da associação da inflamação e os desfechos envelhecimento cerebral saudável, CCND

e demência, em uma população de idosos brasileiros. É esperado que as conclusões geradas a partir deste estudo possibilitem algum avanço na compreensão de CCND e demência, e que possam auxiliar no desenvolvimento de novas soluções diagnósticas e terapêuticas.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Avaliar a associação entre polimorfismos em genes de citocinas (IL-6, IL-10, INF- γ , TGF- β 1 e TNF- α) e a ocorrência de CCND e demência, além de relacionar estes dados genéticos com variáveis cognitivas e funcionais de forma transversal e prospectiva em uma coorte de idosos muito idosos.

4.2 Objetivos específicos

- Genotipagem de polimorfismos em genes de citocinas (IL-6, IL-10, INF- γ , TGF- β 1 e TNF- α) em três grupos de idosos, sendo o Grupo 1 formado por idosos saudáveis, o Grupo 2 por idosos com CCND e o Grupo 3 por idosos com demência.
- Comparar a frequência dos polimorfismos estudados entre os grupos estudados.
- Avaliar a associação dos polimorfismos e haplótipos com o desempenho funcional e cognitivo dos participantes, avaliados de modo transversal por meio de testes adequados realizados no momento da coleta.
- Avaliar a associação dos polimorfismos e haplótipos com o desfecho de desempenho funcional e cognitivo dos participantes, avaliados por meio de testes adequados, de modo prospectivo utilizando dados obtidos um ano após a coleta.
- Avaliar, por meio de um modelo multivariado, as variáveis independentemente associadas ao CCND e à demência e ao desempenho cognitivo e funcional dos participantes.

5 RESULTADOS

5.1 Capítulo 1

INFLUENCE OF POLYMORPHISMS IN CYTOKINE GENES ON COGNITIVE AND FUNCTIONAL PERFORMANCES IN A POPULATION AGED 75+ YEARS: THE PIETÀ STUDY

FRAGA, V. G.^a; GUIMARÃES, H.C.^b; TEIXEIRA, A.L.^b; BARBOSA, M.T.^b; CARVALHO, M.G.^a; CARAMELLI, P.^b; GOMES, K.B.^a

^a*Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.*

^b*Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.*

*Corresponding author:

Karina Braga Gomes

Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais.

Avenida Antônio Carlos, 6627, Pampulha. Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

Zip Code: 31270-901.

Tel: 55 31 3409-6895, Fax: 55 31 3409-6985.

E-mail address: karinabgb@gmail.com

Abstract

Background: Several cytokines are involved in brain pathological processes such as dementia and cognitive impairment no dementia (CIND). Single nucleotide polymorphisms (SNPs) influence the expression of these inflammatory mediators and therefore may be related to the occurrence of pathological brain aging, leading to CIND and dementia. **Methods:** This case-control study investigated the frequency of cytokine genes polymorphisms (TNF- α -308G>A, TGF- β 1 codon +10 C>T, TGF- β 1 codon +25 G>C, IL-10 -1082 A>G, IL-10 -819 C>T, IL-10 -592 C>A, IL-6 -174 G>C and INF- γ +874T>A) and its association with the cognitive and functional performance of patients, evaluated respectively by the Brief Cognitive Screening Battery (BCSB) and Functional Activities Questionnaire (FAQ). The study enrolled a total of 259 Brazilian subjects comprising 81 classified as CIND and 54 demented elderly aged 75+ years, and 124 age and gender-matched cognitively healthy controls. **Results:** The CC genotype of TGF- β 1 codon +25 G>C, leading to lower gene expression, was frequent in both patients' groups. The TT genotype of INF- γ +874T>A was less frequent in dementia group. IL-10 haplotypes of lower expression were more frequent among patients. Genetic variants of higher expression of TGF- β 1, INF- γ and IL-10 showed better performance in the BCSB. In patients' group, the presence of A allele of INF- γ +874T>A associated with lower expression was related to worse FAQ scores, while the presence of A allele of TNF- α -308G>A with lower expression was associated to better BCSB and FAQ scores. **Conclusion:** Our findings suggest a potential role of certain cytokine genes polymorphisms in the development of CIND and dementia, which may influence the functional and cognitive performances of these patients.

Key words: Cytokines, polymorphisms, neuroinflammation, elderly, dementia

1. Introduction

Healthy brain aging is characterized by preservation of multiple cognitive abilities required to maintain an independent life. Cognitive impairment no-dementia (CIND), a transitional phase between normal cognitive function and dementia (Albert e Blacker, 2006), consists in a decline in cognitive domains higher than expected for age and education level, but without impact on activities of daily living (Gauthier *et al.*, 2006). Dementia refers to a clinical syndrome characterized by cognitive impairment severely enough to interfere with functional independence (WHO,2012; Holmes, 2008). Alzheimer disease (AD) accounts for 60-70% of all cases of dementia (WHO,2012).

Neuroinflammation involving mainly activated microglia is a common finding in degenerative diseases of the brain (Gahtan e Overmier, 1999; Amor *et al.*, 2010; Fan *et al.*, 2014), although their mechanisms and consequences are still not completely understood. In fact, the neuroinflammatory process in CIND and dementia is highly complex, because cytokines and other inflammatory mediators usually exert a dual role of neurodegeneration and neuroprotection (Galimberti e Scarpini, 2011; Smith *et al.*, 2012). Important to note that some cytokines also participate of brain physiological functions (McAfoose e Baune, 2009) and disturbs in the production of these mediators can affect this equilibrium, regardless of immunoregulatory properties of each cytokine (Schroeter e Jander, 2005). Several studies have suggested the existence of a decline in immune response in patients with severe AD (Hua *et al.*, 2013; Baune *et al.*, 2008). In addition, cytokines may intervene in cognitive processes by influencing neuronal plasticity, and the unbalanced release of cytokines in pathological contexts may be related to cognitive and functional impairment (McAfoose e Baune, 2009; Marin e Kipnis, 2013; Donzis e Tronson, 2014).

Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) may alter the cytokine gene expression. Many studies testing the hypothesis of involvement of polymorphisms in dementia, mainly in AD disease, have been developed. However, the conclusions remain controversial, as demonstrated by some systematic reviews (Di Bona *et al.*, 2009; Di Bona *et al.*, 2012; Chang *et al.*, 2013; Hua *et al.*, 2013). Indeed, only few studies evaluating the influence of SNPs in cytokine genes on cognitive and functional abilities of healthy oldest-old or CIND/dementia patients

have been conducted (Murphy *et al.*, 2001; Baune *et al.*, 2008; Krabbe *et al.*, 2009).

Within this context, our study aims to investigate the SNPs of anti-inflammatory and proinflammatory cytokine genes (TNF- α , IL6, IL10, IFN- γ , and TGF- β 1) and its association with the cognitive and functional performance of patients with CIND or dementia, in a Brazilian population-based sample of individuals aged 75+ years.

2. Material and Methods

2.1 Study design

This case-control study is derived from a Brazilian population-based investigation on brain aging among elderly individuals (The Pietà study), conducted in Caeté (Minas Gerais state), Brazil. Methods and baseline characteristics of the participants were previously published in detail in 2011 (Caramelli *et al.*, 2011). At the beginning of Pietà study, 639 elderly people aged 75+ years were recruited and underwent clinical, neurological, psychiatric and functional assessments. For the present study, results from the following tests and scales were considered: a Brief Cognitive Screening Battery (BCSB), consisting of the Mini-Mental State Examination (MMSE), animal category fluency test (CFT), picture drawings memory test (PDMT) and Functional Activities Questionnaire (FAQ). Peripheral blood samples were collected for genetic analyzes. All participants or their legal representatives signed the written informed consent and the study protocol was approved by the Ethics Committee of the Federal University of Minas Gerais.

2.2 Diagnostic procedures

The presence of cognitive and functional impairment was defined by a consensus discussion between clinical investigators, taking into account all available information and based on specific norms. Education-adjusted cut-offs for the MMSE were defined as the 25th percentile values from a previous Brazilian study on dementia (Herrera Jr *et al.*, 2002). In relation to BCSB tests, educational level was also considered, in accordance with previous studies using these same tests (Takada *et al.*, 2006; Caramelli *et al.*, 2007). Diagnosis of dementia was based on

the *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 3th edition* [DSM-III] (APA,1987). CIND diagnosis was defined by standard criteria (Graham *et al.*, 1997), based on the presence of cognitive impairment without significant functional loss (i.e., FAQ score \leq 5) (Teng *et al.*, 2010).

2.3 Subjects

Overall, 259 individuals provided blood samples for the present study. They were distributed into three groups according to their cognitive status, as follows: cognitively healthy subjects or controls (n=124), individuals with CIND (n=81) and dementia (n=54).The group of demented patients was heterogeneous, including individuals with Alzheimer disease, vascular and mixed dementia.

2.4 Data collection

Clinical and characteristic data were acquired through medical records. Gender, age, body mass index (BMI), educational level, presence of Apolipoprotein E gene (APOE) ϵ 4 allele and performance in MMSE and FAQ were used to characterize the sample. Cognitive tests extracted from the BCSB and the results of FAQ were utilized to evaluate the influence of cytokine genes polymorphisms on the cognitive and functional status of patients with CIND and dementia.

2.5 Genotyping

Genomic DNA was extracted from peripheral blood samples collected in EDTA. The molecular analyses using specific primers were performed using the multiplex PCR System kit (Cytokine genotyping Tray - One Lambda®), followed by agarose gel electrophoresis. The cytokine genes polymorphisms evaluated were - 308 G>A (rs1800629) for TNF- α ; -174 G>C (rs1800795) for IL6; -1082A>G (rs1800896), -819C>T (rs1800871), -592C>A (rs1800872) for IL10; +874T>A (rs2430561) for IFN- γ ; and 10 C>T (rs1800470), 25 G>C (rs1800471) for TGF- β 1 (Table 1S – Supplementary data).

2.6 Statistical Analysis

To eliminate the interference of educational level on cognitive performance of participants, the results obtained with the BCSB were transformed in a Z score, according to four levels of formal educational attainment (illiterate, 1-3, 4-7, > 7 years), obtained from mean and standard deviation values from the whole sample of Pietà study controls. This strategy also allowed the calculation of a global cognitive score (GCS) of each subject, by summing the normalized results from the MMSE, CFT, and both the learning and delayed recall tasks from the PDMT. Since all participants were submitted to such tests, these measures were the main cognitive outcomes of the Pietà study.

Categorical variables were compared by χ^2 test followed by residual test. Continuous variables were tested for normality by the Shapiro-Wilk test. Student's T-test was used to compare two groups of parametric variables and ANOVA/LSD *post hoc* test to compare three groups. The Mann-Whitney test was used to compare two groups of nonparametric variables and the Kruskal-Wallis test to compare three groups followed by Bonferroni correction. The level of statistical significance was considered at $p < 0.05$. Statistical analyses were performed with SPSS v.17.0 (Chicago, IL) software.

3 Results

3.1 Baseline analyses

The basic characteristics of each group are shown in Table 1. Women comprised about 60% of the individuals considering the three groups. No significant difference was observed between the groups regarding gender ($p = 0.710$), BMI ($p = 0.126$) and educational level ($p = 0.286$), although the group of dementia presented a slightly higher percentage of people with lower years of schooling (< 4 years). However, a significant difference between the groups in relation to age ($p < 0.001$) was found. Controls were younger than CIND and dementia patients ($p = 0.027$ and $p < 0.001$, respectively). The median age of CIND patients was also lower compared to dementia subjects ($p = 0.023$).

As expected, significant differences in cognitive scores were observed between groups (Table 1 and Table 3S- supplementary data). A similar result was observed for the functional, wherein dementia group showed higher FAQ scores ($p < 0.001$).

The presence of the APOE $\epsilon 4$ allele was also considered. As expected, the frequency of the $\epsilon 4$ allele among demented individuals was higher than in cognitively healthy individuals (46.8% versus 22.0%, $p = 0.005$). No difference in this allele frequency was observed between CIND and dementia and between control and CIND groups. Subjects with $\epsilon 2\epsilon 4$ genotype were excluded, since it is assumed that the allele $\epsilon 2$ balances the harmful effects of $\epsilon 4$.

3.2 Cytokine genes polymorphisms and haplotypes distribution

Comparative data on allelic, genotypic and haplotypic frequencies among the groups are shown in Table 2. At first, the three groups were compared with each other. Subsequently, CIND and dementia groups were pooled and compared to the control group. No difference in allelic frequencies was observed among the groups for any polymorphism. By other hand, TGF β 1 +25G>C polymorphism showed different genotypic distribution among the groups. The TGF β 1 +25G>C showed different genotypic distribution between the groups. The genotype GG^{higher} was more frequent and the CC^{lower} genotype was less frequent among controls in comparison with CIND patients ($p = 0.033$) but this finding was not independent of ApoE $\epsilon 4$ status. Comparing both patient groups (CIND + dementia) with controls the GG^{higher} genotype was more frequent and the CC^{lower} genotype was less frequent in the latter group ($p = 0.018$) regardless APOE $\epsilon 4$ status.

The polymorphism INF- γ +874T>A also showed differences in genotypic distribution among groups. Genotype TT^{higher} was less frequent in the dementia group when compared to other two groups while the TA^{intermediate} was less frequent in CIND group in comparison with control and dementia groups ($p = 0.044$). However, the genotypic comparison between controls and patients (CIND + dementia) was not significant ($p = 0.520$).

We considered simultaneously the polymorphisms in IL-10 genes by haplotypes analyses. The haplotypes were classified according to the level of

expression of each cytokine (Table 2S - supplementary data). Comparing healthy subjects with patients, we found that carriers of IL-10 haplotypes associated with lower expression were more frequent in patients group ($p=0.035$).

3.3 Polymorphisms and cognitive performance of patients

The values for cognitive performance of patients assessed by BCSB and normalized in Z scores are shown in Table 3S (supplementary data).

In patients (CIND + dementia), two polymorphisms were associated with cognitive tests (Figure 2). TGF- β 1 +10 C>T was related to the performance in PDMT delayed recall ($p=0.032$). Subjects with TT^{lower} genotype showed worse values than those with TC ($p=0.017$) and CC^{higher} ($p=0.018$). Carriers of at least one T^{lower} allele scored less points in this test ($p=0.03$). The same polymorphism was associated to CFT performance ($p=0.022$), with individuals presenting TT^{lower} genotypes showing significant lower mean scores than those homozygous to C^{higher} allele ($p=0.006$). Similarly, the presence of at least one T^{lower} allele was associated with worse performance ($p=0.024$). INF- γ +874T>A was associated with both MMSE ($p=0.038$) and GCS performances ($p=0.014$). When considering only the presence of the A^{lower} allele, individuals with TT^{higher} genotype showed better performance than TA and AA subjects in both MMSE ($p=0.041$) and GCS ($p=0.022$).

In the CIND group (Figure 2), carriers of A^{lower} allele of TNF- α -308G>A scored better in both CFT ($p=0.010$) and GCS ($p=0.019$) than those without this allele.

In the dementia group (Figure 3), TGF- β 1 +10 C>T was related to performance in all cognitive tests studied. Carriers of C^{higher} allele obtained better scores than individuals with TT^{lower} genotype in learning ($p=0.008$) and delayed recall ($p=0.011$) tasks from the PDMT, MMSE ($p=0.030$), CFT ($p=0.001$) and CGS ($p=0.005$). IL-10 -1082 A>G was related to all cognitive tests and carriers of the G^{higher} allele had better performance in MMSE ($p=0.039$), PDMT learning ($p=0.007$), PDMT delayed recall ($p=0.019$), CFT ($p=0.019$) and in GCS ($p=0.01$). The polymorphisms IL-10 -819 C>T and IL-10 -592 C>A were related to MMSE and GCS, wherein carriers of T^{lower} and A^{lower} alleles, respectively, showed worse performance than non-carriers in MMSE ($p=0.019$) and GCS ($p=0.025$). In relation

to the IL-10 haplotypes, individuals with higher or intermediate expression of IL-10 had better performance in MMSE ($p=0.039$), CFT (0.019), PDMT learning ($p=0.004$), PDMT delayed recall ($p=0.013$) and GCS ($p=0.001$) than carriers of haplotypes associated to lower expression of this anti-inflammatory cytokine.

3.4 Polymorphisms and functional performance of patients

With respect to association between the cytokine genes polymorphisms and haplotypes, and the functional performance of patients (CIND+dementia) evaluated by FAQ (Figure 4), only INF- γ +874T>A was significantly associated, with carriers of the A^{lower} allele showing more functional impairment than non-carriers ($p=0.037$). In CIND patients, TNF- α -308 G>A was associated with FAQ score (Figure 4), whose individuals with GG^{higher} genotype showed worse performance than AA^{lower} subjects ($p=0.012$, data not shown) and carriers of at least one A^{lower} allele demonstrated less functional impairment than non-carriers ($p=0.013$). No cytokine gene polymorphism or haplotype interfered in functional performance in the dementia group ($p>0.05$).

4 Discussion

Here we demonstrated association between TGF- β 1 codon +25 G>C, INF- γ +874 T>A and IL-10 haplotypes, and occurrence of CIND/dementia. We also verified influence of TGF- β 1 +10 C>T, INF- γ +874T>A, IL-10 -1082A>G, IL-10 -819C>T, IL-10 -592C>A, IL-10 haplotypes and TNF- α -308G>A on cognitive performance of patients. In respect to functional performance, only INF- γ +874T>A and TNF- α -308G>A were associated.

In this study, there was no difference relative to low educational level among the groups, although poor education has previously been implicated as a risk factor for the occurrence of dementia (Chen, Lin e Chen, 2009; Beydoun *et al.*, 2014). This finding reflects the similar cultural and social contexts verified in Caeté, Minas Gerais, Brazil. We observed that demented individuals showed higher median age and frequency of APOE ϵ 4 allele, confirming the influence of these already known risk factors to dementia (Corder *et al.*, 1993; Chen, Lin e Chen, 2009). Differences found between the controls and patients in relation to

cognitive and functional performance are consistent with the knowledge of progressive cognitive and functional impairment in CIND and dementia (Giebel *et al.*, 2014; Schmitter-Edgecombe e Parsey, 2014).

Although some studies have not showed relationship between the polymorphisms in TGF- β 1 gene and AD (Rodriguez-Rodriguez *et al.*, 2007; Shawkatova *et al.*, 2010; Cousin *et al.*, 2011), we found that the 25 codon CC^{lower} genotype was associated with patients group ($p=0.018$), regardless ApoE ϵ 4 status. Important to note that when the patients' group were analyzed separately this association was not independent of ApoE ϵ 4 status, which was not observed for the other polymorphisms, and this may be due to a linkage imbalance between the two genes present both on chromosome 19. In 2005, Dickson *et al.* (40) described the possibility of polymorphisms in TGF- β 1 have a modifier effect on ApoE ϵ 4 risk and therefore we consider relevant to better investigate this influence. TGF- β 1 is a pleiotropic cytokine that exhibit anti-inflammatory properties (Lawrence, 1996). This cytokine also displays functions in brain tissue and has been described as a neurotrophic and neuroprotective factor (Henrich-Noack, Prehn e Krieglstein, 1994; Martinez-Canabal, 2015) involved in neurogenesis and brain development (Henrich-Noack, Prehn e Krieglstein, 1994; Rodriguez-Martinez e Velasco, 2012), protection against neuronal degeneration (Henrich-Noack, Prehn e Krieglstein, 1994; Ma *et al.*, 2008) and attenuation of neuroinflammation occasioned by peptide A β ₁₋₄₂ enhancing their uptake by microglia (Shen *et al.*, 2014). Furthermore, it has recently been described a dysfunction in TGF- β 1 production and signaling in AD individuals (Caraci *et al.*, 2011; Caraci *et al.*, 2012). All these evidences are consistent with our findings of association between TGF- β 1 25 codon CC^{lower} genotype and patients group (Table 2) and better cognitive performance of patients carriers of TGF- β 1 10 codon C^{higher} allele in comparison with non carriers (Figure 1). To the best of our knowledge, there is no report associating TGF- β 1 SNPs and cognitive performance of patients with CIND or dementia.

We found that TT^{higher} genotype of INF- γ +874T>A was less frequent in dementia group ($p=0.044$) but this finding was not independent of ApoE ϵ 4 status, probably due to small sample size. Among patients (CIND + dementia), and carriers of this genotype showed better cognitive performance (Figure 1). Although some studies investigating the involvement of INF- γ gene

polymorphisms in dementia contexts have not found positive results (Scola *et al.*, 2003; Galimberti *et al.*, 2004; Licastro *et al.*, 2004; Oda *et al.*, 2004; Juhász *et al.*, 2009; Feher *et al.*, 2010; Shawkatova *et al.*, 2010) our finding is in accordance with that recently reported by Charfeddine *et al.* (Charfeddine *et al.*, 2014) describing association between AA^{lower} genotype and AD occurrence (Charfeddine *et al.*, 2014). INF- γ is a very important pro-inflammatory cytokine produced mainly by lymphocytes (Schroder *et al.*, 2004). In CNS, INF- γ has been involved in both neurodegeneration and neuroprotection (Schroeter e Jander, 2005). Recently, Liu *et al.* demonstrated that T cells and their derived cytokines including INF- γ promote regeneration of progenitor neuronal cells in hippocampus of mice challenged with peptide A β ₁₋₄₂ (Liu *et al.*, 2014). Baron *et al.* also described that INF- γ enhances neurogenesis in brain of animal models of AD and improves their spatial learning and memory performance (Baron *et al.*, 2008). Furthermore, Jabbari *et al.* (Jabbari Azad *et al.*, 2014) recently described that INF- γ levels in AD patients were inversely correlated with Clinical Dementia Rating (CDR) score and that increased levels of INF- γ were associated with better performance of AD patients in MMSE, corroborating with our findings (Jabbari Azad *et al.*, 2014).

IL-10 is a potent anti-inflammatory cytokine crucial for regulation and resolution of inflammatory responses (Moore *et al.*, 2001). In CNS, IL-10 reduces microglia activation by proinflammatory cytokines and promotes neuronal survival (Strle *et al.*, 2001; Xie *et al.*, 2014). Regarding polymorphisms in IL-10 gene, the G allele of -1082 A>G, C allele of -819 C>T and -592 C>A polymorphisms are related to higher expression of IL-10 (Turner *et al.*, 1997). Although it was not found association for one polymorphism separately, we observed that IL-10 haplotypes associated with lower expression (see S2 Table) were more frequent in the patient group (p=0.035) regardless ApoE ϵ 4 status. In dementia group, individuals with genetic information in IL-10 SNPs associated with lower expression who showed significant worse performance than those carriers of alleles of higher expression (Figure 3). Some studies have suggested that SNPs in IL-10 gene are associated with AD (Lio *et al.*, 2003; Arosio *et al.*, 2004; Ma *et al.*, 2005; Bagnoli *et al.*, 2007; Combarros *et al.*, 2008; Vural *et al.*, 2009) and others could not find any association (Depboylu *et al.*, 2003; Culpan *et al.*, 2006; Giedraitis *et al.*, 2009; Cousin *et al.*, 2011). Supporting our finding, Di Bona

et al. (2012), concluded that the haplotype -1082G/-819C/-592C, associated with higher expression of IL-10, is associated to lower risk to develop AD (Di Bona *et al.*, 2012) and Lio *et al.* (Lio *et al.*, 2003) described that the haplotype -1082A/-819T/-592A associated to lower expression of IL-10 may be considered an independent risk factor to AD (Lio *et al.*, 2003). Krabbe *et al.* (2009) also demonstrated that IL-10-592 CC^{higher} genotype was related to better verbal performance at the age of 80.

In CIND group the A^{lower} allele of TNF- α -308G>A was associated with better performance both cognitive and functional. TNF- α is a proinflammatory cytokine produced mainly by activated macrophages, T and NK lymphocytes and its plasma elevation is a characteristic of chronic inflammation (Rink e Delves, 1998). In neurodegenerative diseases is observed an upregulation of TNF- α and other proinflammatory cytokines that is associated with apoptosis activation, excitotoxicity, cytotoxicity and neuronal death (Smith *et al.*, 2012). Medeiros *et al.* (2010) demonstrated the relationship between TNF- α and synaptic loss with subsequent cognitive decline through the injection of A β ₁₋₄₀ in mice brain, in a pathway that include cyclooxygenase-2 upregulation.

This study presents some limitations such as the absence of plasma levels of the studied cytokines and the small sample size. Further studies involving more subjects should be conducted to confirm the involvement of SNPs on occurrence of CIND and dementia and in cognitive and functional performance in these pathological contexts.

We demonstrated the association of TGF- β 1 codon + 25G>C, INF- γ +874T>A and IL-10 haplotypes with CIND and dementia in a sample of Brazilian aged 75+. Furthermore, we observed that SNPs in TGF- β 1, IL-10, INF- γ and TNF- α genes might influence the cognitive and functional performance of both CIND and dementia patients. Finally, cytokine genetic variants seem influence the occurrence of both CIND and dementia as well the cognitive and functional impairment of patients.

The data analyzed together are consistent with the idea that a proinflammatory profile is more common in individuals with a history of dementia states, while an anti-inflammatory profile would be associated with a better performance from the points of cognitive and functional view. Given the frequency

of certain polymorphisms of proinflammatory cytokines in the population, the combined influence of proinflammatory genotypes may result in a susceptibility profile increasing the chance of developing dementia.

Acknowledgements: Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). ALT, MGC, PC and KBG are grateful to CNPq Research Fellowship (PQ).

Conflict of interest statement: The authors disclose no conflict of interest.

REFERENCES

ALBERT, M. S.; BLACKER, D. Mild cognitive impairment and dementia. **Annu Rev Clin Psychol**, v. 2, p. 379-88, 2006.

AMOR, S. et al. Inflammation in neurodegenerative diseases. **Immunology**, v. 129, n. 2, p. 154-169, 2010.

AROSIO, B. et al. Interleukin-10 and interleukin-6 gene polymorphisms as risk factors for Alzheimer's disease. **Neurobiology of aging**, v. 25, n. 8, p. 1009-1015, 2004.

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION (APA). Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders 3 ed. Washington, DC: American Psychiatric Association, 1987.

BAGNOLI, S. et al. Association of IL10 promoter polymorphism in Italian Alzheimer's disease. **Neurosci. Lett.**, v. 418, n. 3, p. 262-265, 2007.

BARON, R. et al. IFN- gamma enhances neurogenesis in wild-type mice and in a mouse model of Alzheimer's disease. **FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 22, n. 8, p. 2843, 2008.

BAUNE, B. T. et al. Association between genetic variants of IL-1beta, IL-6 and TNF-alpha cytokines and cognitive performance in the elderly general population of the MEMO-study. **Psychoneuroendocrinology**, v.33, p.68-76, 2008.

BEYDOUN, M. A. et al. Epidemiologic studies of modifiable factors associated with cognition and dementia: systematic review and meta-analysis. **Bmc Public Health**, v. 14, p. 33, 2014.

CARACI, F. et al. TGF-beta1 pathway as a new target for neuroprotection in Alzheimer's disease. **CNS Neurosci Ther**, v. 17, n. 4, p. 237-49, 2011.

CARACI, F. et al. Dysfunction of TGF-beta1 signaling in Alzheimer's disease: perspectives for neuroprotection. **Cell Tissue Res**, v. 347, n. 1, p. 291-301, 2012.

CARAMELLI, P. et al. The Pieta study: epidemiological investigation on successful brain aging in Caete (MG), Brazil. Methods and baseline cohort characteristics. **Arq Neuropsiquiatr**, v. 69, n. 4, p. 579-84, 2011.

CARAMELLI, P. et al. Category fluency as a screening test for Alzheimer disease in illiterate and literate patients. **Alzheimer Disease & Associated Disorders**, v. 21, n. 1, p. 65-67, 2007.

CHANG, W. W. et al. Meta-analysis of the transforming growth factor-beta 1 polymorphisms and susceptibility to Alzheimer's disease. **Journal of Neural Transmission**, v. 120, n. 2, p. 353-360, 2013.

CHARFEDDINE, B. et al. Association study of interferon-gamma and interleukin 10 gene polymorphisms in Alzheimer's disease. **European Journal of Neurology**, v. 21, p. 390-390, 2014.

CHEN, J. H.; LIN, K. P.; CHEN, Y. C. Risk factors for dementia. **J Formos Med Assoc**, v. 108,n.10, p.754-764, 2009.

COMBARROS, O. et al. Aromatase and interleukin-10 genetic variants interactively modulate Alzheimer's disease risk. **J Neural Transm**, v. 115, n. 6, p. 863-7, 2008.

CORDER, E. H. et al. Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. **Science**, v. 261, n. 5123, p. 921-923, 1993.

COUSIN, E. et al. No replication of genetic association between candidate polymorphisms and Alzheimer's disease. **Neurobiol. Aging**, v. 32, n. 8, p. 1443-1451, 2011.

CULPAN, D. et al. Neither sequence variation in the IL-10 gene promoter nor presence of IL-10 protein in the cerebral cortex is associated with Alzheimer's disease. **Neurosci Lett**, v. 408, n. 2, p. 141-5, 2006.

DEPBOYLU, C. et al. Lack of association of interleukin-10 promoter region polymorphisms with Alzheimer's disease. **Neurosci Lett**, v. 342, n. 1-2, p. 132-4, 2003.

DI BONA, D. et al. Systematic review by meta-analyses on the possible role of TNF-alpha polymorphisms in association with Alzheimer's disease. **Brain Res Rev**, v.61, p.60-8, 2009.

DI BONA, D. et al. Association between interleukin-10 polymorphisms and alzheimer's disease: A systematic review and meta-analysis. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 29, n. 4, p. 751-759, 2012.

DICKSON, M. R. et al. Association studies of transforming growth factor-beta 1 and Alzheimer's disease. **Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet**, v. 139b, n. 1, p. 38-41, 2005.

DONZIS, E. J.; TRONSON, N. C. Modulation of learning and memory by cytokines: Signaling mechanisms and long term consequences. **Neurobiol Learn Mem**, v. 115c, p. 68-77, 2014.

FAN, Z. et al. Influence of microglial activation on neuronal function in Alzheimer's and Parkinson's disease dementia. **Alzheimers Dement**, 14p. (In press), 2014.

FEHER, A. et al. Association study of interferon-gamma, cytosolic phospholipase A2, and cyclooxygenase-2 gene polymorphisms in Alzheimer disease. **Am J Geriatr Psychiatry**, v. 18, n. 11, p. 983-7, 2010.

GAHTAN, E.; OVERMIER, J. B. Inflammatory pathogenesis in Alzheimer's disease: biological mechanisms and cognitive sequeli. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 23, n. 5, p. 615-633, 1999.

GALIMBERTI, D.; SCARPINI, E. Inflammation and oxidative damage in Alzheimer's disease: friend or foe? **Front Biosci (Schol Ed)**, v. 3, p. 252-66, 2011.

GALIMBERTI, L. et al. +874(T-->A) single nucleotide gene polymorphism does not represent a risk factor for Alzheimer's disease. **Immun Ageing**, v. 1, n. 1, p. 6, 2004.

GAUTHIER, S. et al. Mild cognitive impairment. **Lancet**, v. 367, n. 9518, p. 1262-70, 2006.

GIEBEL, C. M. et al. Deterioration of basic activities of daily living and their impact on quality of life across different cognitive stages of dementia: a European study. **International Psychogeriatrics**, v. 26, n. 8, p. 1283-1293, 2014.

GIEDRAITIS, V. et al. Genetic analysis of Alzheimer's disease in the Uppsala Longitudinal Study of Adult Men. **Dement Geriatr Cogn Disord**, v. 27, n. 1, p. 59-68, 2009.

GRAHAM, J. E. et al. Prevalence and severity of cognitive impairment with and without dementia in an elderly population. **Lancet**, v. 349, n. 9068, p. 1793-1796, 1997.

GUO, Z.; BINSWANGER, U.; KNOFLACH, A. Role of codon 10 and codon 25 polymorphisms on TGF- β 1 gene expression and protein synthesis in stable renal allograft recipients. **Transplantation Proceedings**, v. 34, n. 7, p. 2904-2906, 2002.

HELMIG, S. et al. TNF-alpha -308 genotypes are associated with TNF-alpha and TGF-beta(1) mRNA expression in blood leucocytes of humans. **Cytokine**, v.53, p.306-10, 2011.

HENRICH-NOACK, P.; PREHN, J. H.; KRIEGLSTEIN, J. Neuroprotective effects of TGF-beta 1. **J Neural Transm Suppl**, v. 43, p. 33-45, 1994.

HERRERA JR, E. et al. Epidemiologic survey of dementia in a community-dwelling Brazilian population. **Alzheimer Disease and Associated Disorders**, v. 16, n. 2, p. 103-108, 2002.

HOLMES, C. Dementia. **Medicine**, v. 36, n. 9, p. 467-470, 2008.

HUA, Y. et al. Association between interleukin-6 -174G/C polymorphism and the risk of Alzheimer's disease: A meta-analysis. **International Journal of Neuroscience**, v. 123, n. 9, p. 626-635, 2013.

JABBARI AZAD, F. et al. Association between Cytokine Production and Disease Severity in Alzheimer's Disease. **Iran J Allergy Asthma Immunol**, v. 13, n. 6, p. 433-9, 2014.

JUHÁSZ, A. et al. P01-95 Interferon gamma +874 T/A gene polymorphism is not a risk factor in the pathogenesis of Alzheimer's disease. **European Psychiatry**, v. 24, Supplement 1, n. 0, p. S483, 2009.

KRABBE, K. S. et al. Genetic priming of a proinflammatory profile predicts low IQ in octogenarians. **Neurobiol Aging**, v. 30, n. 5, p. 769-81, 2009.

LAWRENCE, D. A. Transforming growth factor-beta: a general review. **Eur Cytokine Netw**, v. 7, n. 3, p. 363-74, 1996.

LICASTRO, F. et al. A polymorphism of the interleukin-1 beta gene at position +3953 influences progression and neuro-pathological hallmarks of Alzheimer's disease. **Neurobiology of Aging**, v. 25, n. 8, p. 1017-1022, 2004.

LIO, D. et al. Interleukin-10 promoter polymorphism in sporadic Alzheimer's disease. **Genes Immun**, v. 4, n. 3, p. 234-8, 2003.

LIU, J. et al. T cells promote the regeneration of neural precursor cells in the hippocampus of Alzheimer's disease mice. **Neural Regen Res**, v. 9, n. 16, p. 1541-7, 2014.

MA, M. et al. Intranasal delivery of transforming growth factor-beta1 in mice after stroke reduces infarct volume and increases neurogenesis in the subventricular zone. **BMC Neurosci**, v. 9, p. 117, 2008.

MA, S. L. et al. The association between promoter polymorphism of the interleukin-10 gene and Alzheimer's disease. **Neurobiology of Aging**, v. 26, n. 7, p. 1005-1010, 2005.

MARIN, I.; KIPNIS, J. Learning and memory ... and the immune system. **Learn Mem**, v. 20, n. 10, p. 601-6, 2013.

MARTINEZ-CANABAL, A. Potential neuroprotective role of transforming growth factor beta1 (TGFbeta1) in the brain. **Int J Neurosci**, v. 125, n. 1, p. 1-9, 2015.

MCAFOOSE, J.; BAUNE, B. T. Evidence for a cytokine model of cognitive function. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 33, n. 3, p. 355-366, 2009.

MEDEIROS, R. et al. The role of TNF- α signaling pathway on COX-2 upregulation and cognitive decline induced by β -amyloid peptide. **Behavioural Brain Research**, v. 209, n. 1, p. 165-173, 2010.

MOORE, K. W. et al. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. **Annu Rev Immunol**, v. 19, p. 683-765, 2001.

MURPHY, G. M., JR. et al. Rate of cognitive decline in AD is accelerated by the interleukin-1 alpha -889 *1 allele. **Neurology**, v. 56, n. 11, p. 1595-7, 2001.

ODA, M. et al. Dinucleotide repeat polymorphism in interferon-gamma gene is not associated with sporadic Alzheimer's disease. **Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet**, v. 124b, n. 1, p. 48-9, 2004.

PRAVICA, V. et al. A single nucleotide polymorphism in the first intron of the human IFN-gamma gene: absolute correlation with a polymorphic CA microsatellite marker of high IFN-gamma production. **Hum Immunol**, v. 61, n. 9, p. 863-6, 2000.

RINK, L.; DELVES, P. J. Tumor Necrosis Factor α . **Encyclopedia of Immunology (Second Edition)**. Oxford: Elsevier, 1998. p.2435-2440.

RODRIGUEZ-MARTINEZ, G.; VELASCO, I. Activin and TGF-beta effects on brain development and neural stem cells. **CNS Neurol Disord Drug Targets**, v. 11, n. 7, p. 844-55, 2012.

RODRIGUEZ-RODRIGUEZ, E. et al. Serum levels and genetic variation of TGF-beta 1 are not associated with Alzheimer's disease. **Acta Neurologica Scandinavica**, v. 116, n. 6, p. 409-412, 2007.

SCHMITTER-EDGECOMBE, M.; PARSEY, C. M. Assessment of Functional Change and Cognitive Correlates in the Progression From Healthy Cognitive Aging to Dementia. **Neuropsychology**, v. 28, n. 6, p. 881-893, 2014.

SCHRODER, K. et al. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. **J Leukoc Biol**, v. 75, n. 2, p. 163-89, 2004.

SCHROETER, M.; JANDER, S. T-cell cytokines in injury-induced neural damage and repair. **Neuromolecular Med**, v. 7, n. 3, p. 183-95, 2005.

SCOLA, L. et al. Allele frequencies of +874T -> A single nucleotide polymorphism at the first intron of IFN-gamma gene in Alzheimer's disease patients. **Aging Clinical and Experimental Research**, v. 15, n. 4, p. 292-295, Aug 2003.

SHAWKATOVA, I. et al. No association between cytokine gene polymorphism and risk of Alzheimer's disease in Slovaks. **Acta Neurobiol Exp**, v. 70, n. 3, p. 303-7, 2010.

SHEN, W. X. et al. TGF-beta1 Protection against Abeta1-42-Induced Neuroinflammation and Neurodegeneration in Rats. **Int J Mol Sci**, v. 15, n. 12, p. 22092-108, 2014.

SMITH, J. A. et al. Role of pro-inflammatory cytokines released from microglia in neurodegenerative diseases. **Brain research bulletin**, v. 87, n. 1, p. 10-20, 2012.

STRLE, K. et al. Interleukin-10 in the brain. **Critical Reviews in Immunology**, v. 21, n. 5, p. 427-449, 2001.

SUSIANTI, H. et al. Changes to signal peptide and the level of transforming growth factor- beta1 due to T869C polymorphism of TGF beta 1 associated with lupus renal fibrosis. **Springerplus**, v. 3, p. 514, 2014.

TAKADA, L. T. et al. Comparison between two tests of delayed recall for the diagnosis of dementia. **Arquivos De Neuro-Psiquiatria**, v. 64, n. 1, p. 35-40, 2006.

TENG, E. et al. Utility of the Functional Activities Questionnaire for Distinguishing Mild Cognitive Impairment From Very Mild Alzheimer Disease. **Alzheimer Disease & Associated Disorders**, v. 24, n. 4, p. 348-353, 2010.

TOTARO, F. et al. Impact of interleukin-6 -174 G>C gene promoter polymorphism on neuroblastoma. **PLoS One**, v. 8, n. 10, p. e76810, 2013.

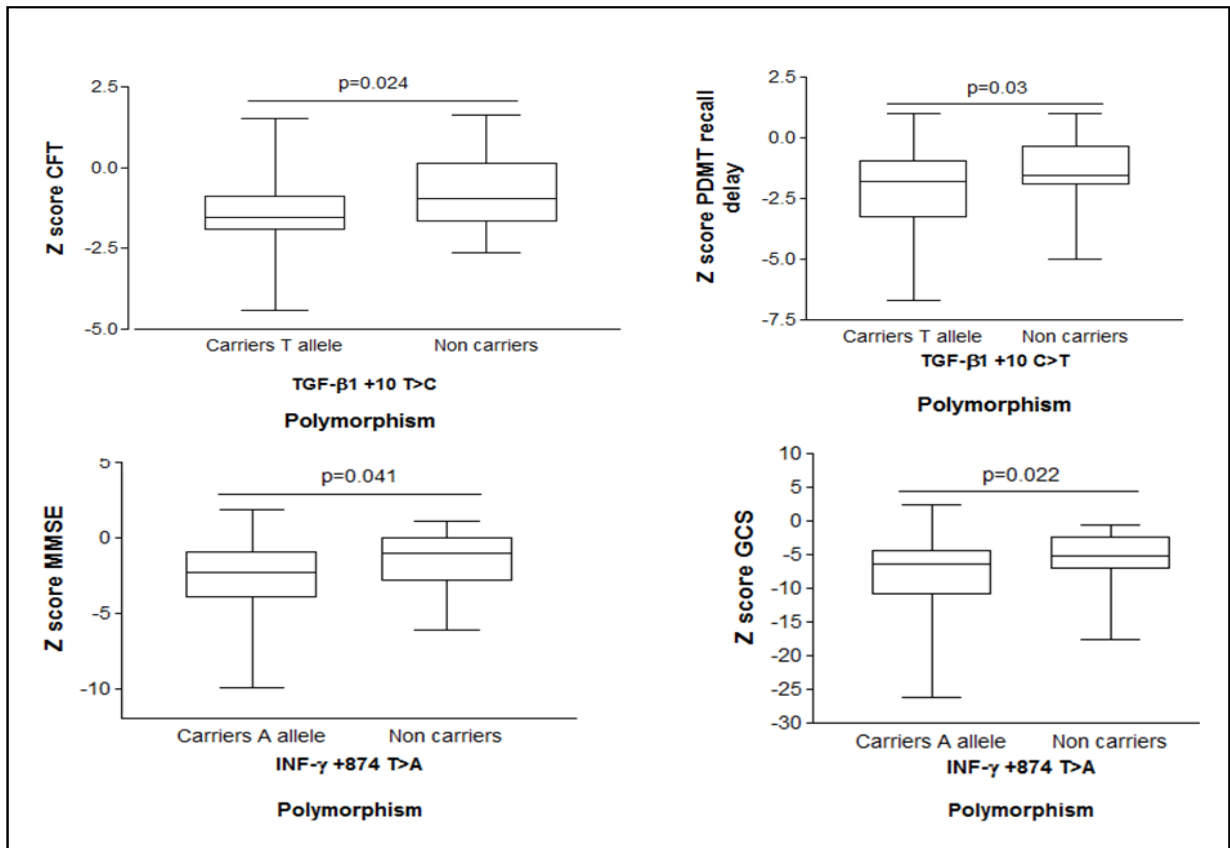
TURNER, D. M. et al. An investigation of polymorphism in the interleukin-10 gene promoter. **Eur J Immunogenet**, v. 24, n. 1, p. 1-8, 1997.

VURAL, P. et al. The combinations of TNFalpha-308 and IL-6 -174 or IL-10 -1082 genes polymorphisms suggest an association with susceptibility to sporadic late-onset Alzheimer's disease. **Acta Neurol Scand**, v. 120, n. 6, p. 396-401, 2009.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Dementia: a public health priority. 112 p., 2012.

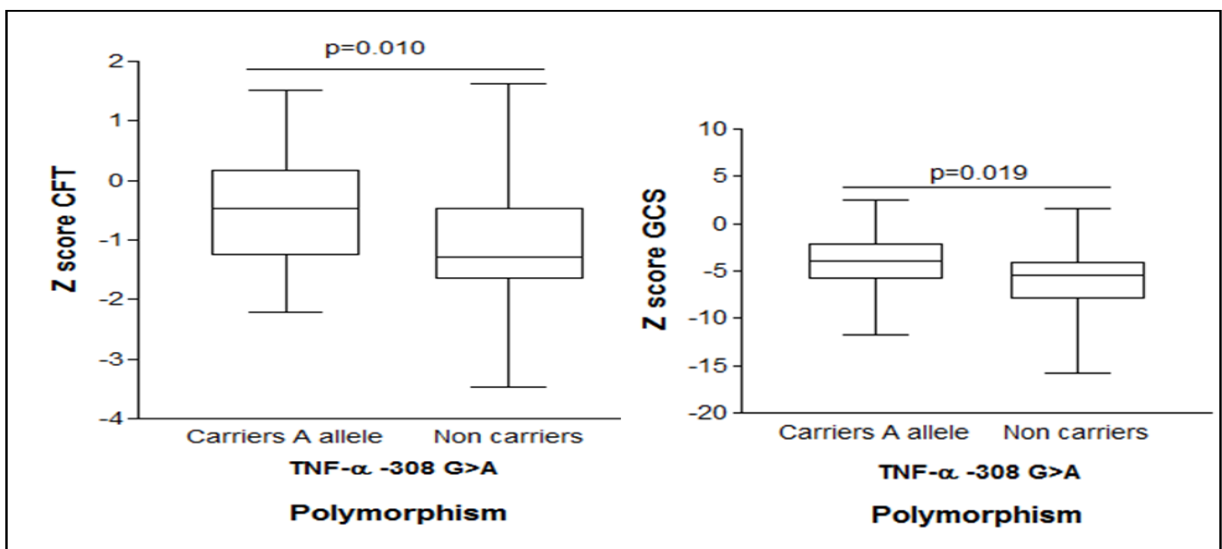
XIE, L. et al. Cerebral regulatory T cells restrain microglia/macrophage-mediated inflammatory responses via IL-10. **Eur J Immunol**, v. 45, n. 1, p. 180-191, 2014.

Figure 1: Cognitive performance of patients group (CIND+dementia) and polymorphisms in cytokine genes.



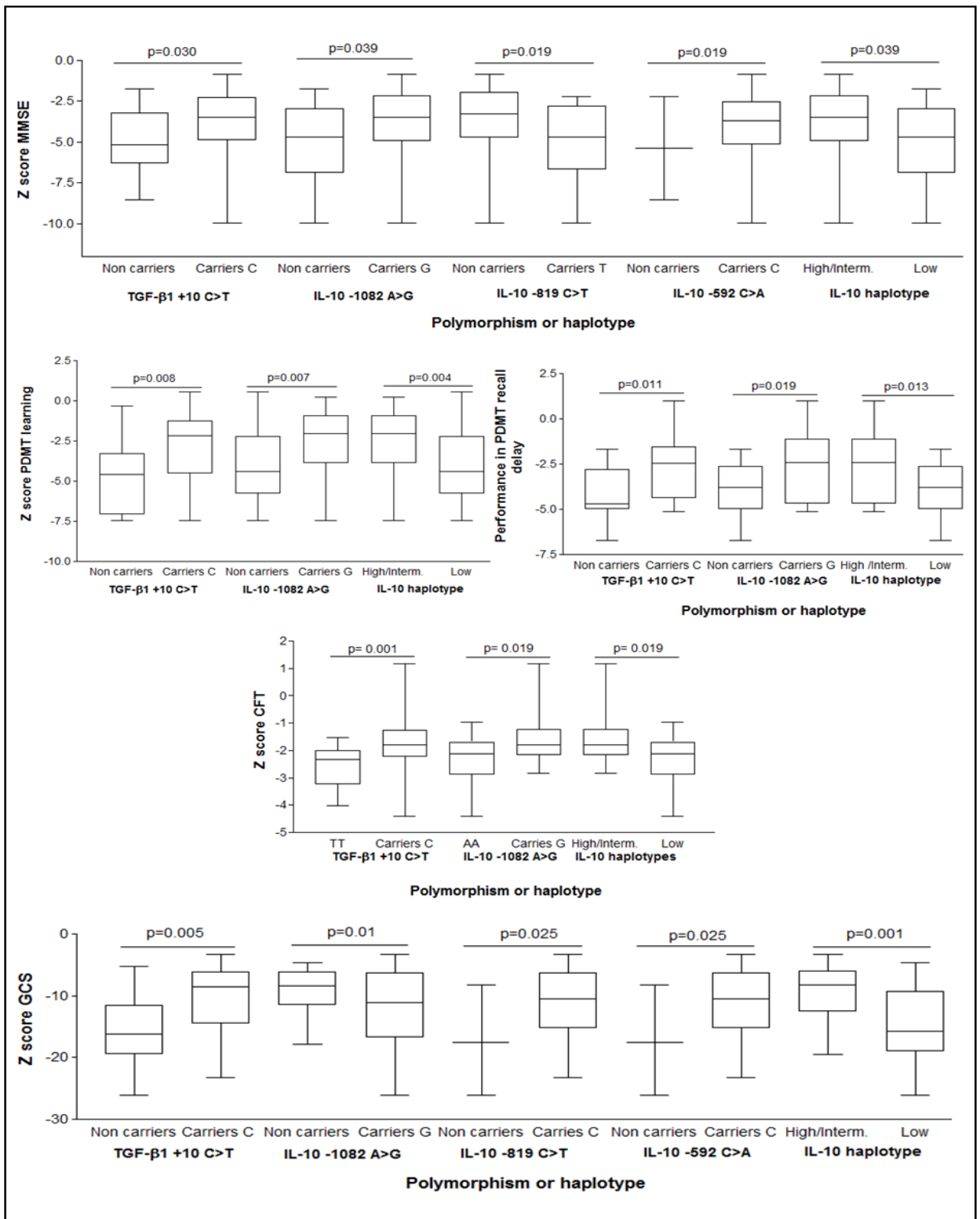
CFT: animal category fluency test; PDMT: picture drawings memory test; MMSE: Mini-Mental State Examination; GCS: global cognitive score.

Figure 2: Cognitive performance of CIND group and polymorphisms in cytokine genes.



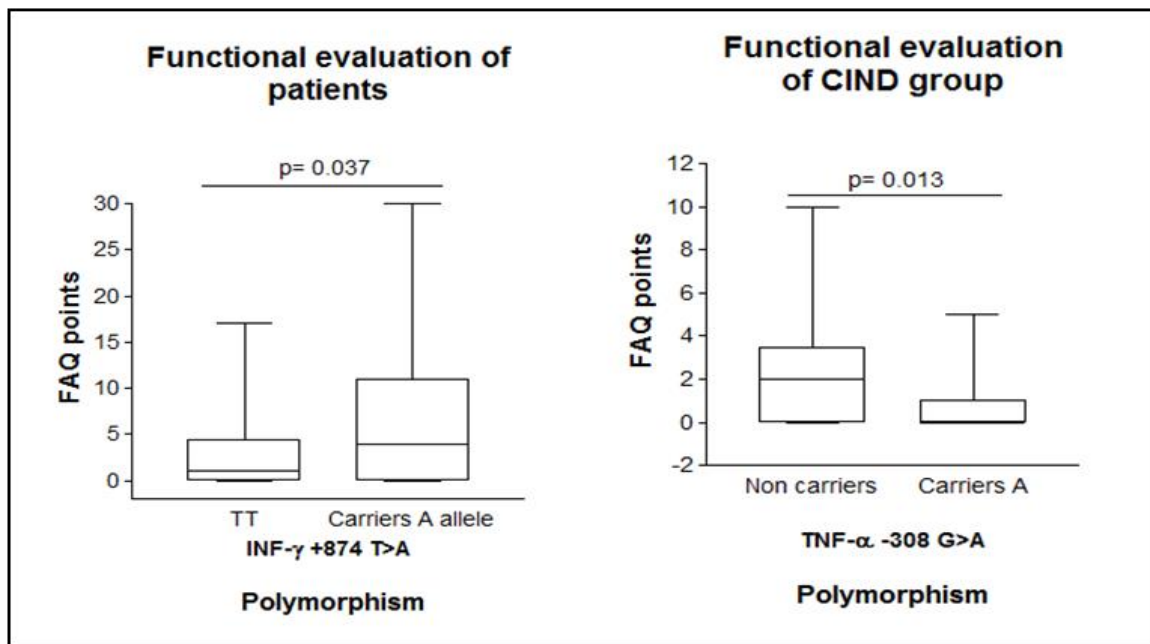
CFT: animal category fluency test; GCS: global cognitive score.

Figure 3: Cognitive performance of dementia group and polymorphisms or haplotypes in cytokine genes.



CFT: animal category fluency test; PDMT: picture drawings memory test; MMSE: Mini-Mental State Examination; GCS: global cognitive score.

Figure 4: Functional evaluation and polymorphisms in patients and CIND groups.



Functional Activities Questionnaire

Table 1: Baseline characteristics of participants.

Variable	Control (n=124)	CIND (n=81)	Dementia (n=54)	p Value
Men/Women	51/73 (41/59%)	30/51(37/63%)	19/35(35/65%)	p=0.710
Age, years	78.0 (5.0)	80.0 (6.0)	82.5 (8.0)	p<0.001* p ^a =0.027 p ^b <0.001 p ^c = 0.023
BMI (Kg/m ²)	26.0 (6.0)	24.3 (6.0)	25.0 (6.0)	p=0.126
ε4 carriers	26** (22%)	18 (24.7%)	22*** (46.8%)	p=0.005*
<4 years of schooling	83 (66.9%)	49 (60.5%)	39 (73.6%)	p=0.286
MMSE (points)	24.0 (5.0)	21.0 (8.0)	15.0 (5.0)	p<0.001* p ^a ,p ^b ,p ^c <0.001
FAQ (points)	0.0 (1.0)	0.0 (3.0)	13.0 (15.0)	p<0.001* p ^a =0.002 p ^b <0.001 p ^c <0.001

* Statistical difference p<0.05. p^a Controls x CIND p^b Controls x Dementia p^c CIND x Dementia. Variables: showed in absolute number (n) and frequency (%) or median (IQ). Significance verified by χ^2 test or Kruskal-Wallis followed by Bonferroni correction. ** less frequent; *** more frequent.

Table 2: Distribution of genotypic and allelic frequencies in controls, CIND and dementia groups.

Polymorphisms		Control (n=124)	CIND (n=81)	Dementia (n=54)	CIND + Dementia (n=135)	p ^a value p ^b value
TNF-α -308G>A (rs1800629)	Genotypes					
	GG	91 (73.4)	48(59.3)	36(66.7)	84(62.2)	p ^a =0.328
	GA	27(21.8)	26(32.1)	14(25.9)	40(29.6)	p ^b =0.149
	AA	6 (4.8)	7(8.6)	4(7.4)	11(8.1)	
	Alleles					
	G	209(84.3)	122(75.3)	86(79.6)	208(77.0)	p ^a =0.607
A	39(15.7)	40 (24.7)	22(20.4)	62(23.0)	p ^b =0.453	
TGF-β1 +10 C>T (rs1800470)	Genotypes					
	CC	22(17.7)	16(19.8)	5(9.3)	21(15.6)	p ^a =0.470
	CT	65(52.4)	45(55.6)	34(63.0)	79(58.5)	p ^b =0.614
	TT	37(29.8)	20(24.7)	15(27.8)	35(25.9)	
	Alleles					
	C	109(44.0)	77(47.5)	44(40.7)	121(44.8)	p ^a =0.723
T	139 (56.0)	85 (52.5)	64(59.3)	149(55.2)	p ^b =1.000	
TGF-β1 +25 G>C (rs1800471)	Genotypes					
	GG	117(94.4)**	66(81.5)*	48(88.9)	114(84.4)*	p ^a =0.033
	GC	6(4.8)	8(9.9)	4(7.4)	12(8.9)	p ^b =0.018
	CC	1(0.8)*	7(8.6)**	2(3.7)	9(6.7)**	
	Alleles					
	G	240(96.8)	140(86.4)	100(92.6)	240(88.9)	p ^a =0.202
C	8(3.2)	22(13.6)	8(7.4)	30(11.1)	p ^b =0.269	
IL-10 -1082A>G (rs1800896)	Genotypes					
	AA	40(32.3)	37(45.7)	24(44.4)	61(45.2)	p ^a =0.155
	AG	61(49.2)	37(45.7)	22(40.7)	59(43.7)	p ^b =0.060
	GG	23(18.5)	7(8.6)	8(14.8)	15(11.1)	
	Alleles					
	A	141(56.9)	111(68.5)	70(64.8)	181(67.0)	p ^a =0.450
G	107(43.1)	51(31.5)	38(35.2)	89(33.0)	p ^b =0.303	
IL-10 -819C>T (rs1800871)	Genotypes					
CC	60(48.4)	33(40.7)	30(55.6)	63(46.7)	p ^a =0.436	

	CT	56(45.2)	41(50.6)	19(35.2)	60(44.4)	$p^b=0.762$
	TT	8(6.5)	7(8.6)	5(9.3)	12(8.9)	
	Alleles					
	C	176(71.0)	107(66.1)	79(73.2)	186(68.9)	$p^a=0.658$
	T	72(29.0)	55(33.9)	29(26.8)	84(31.1)	$p^b=0.827$
IL-10 -592C>A (rs1800872)	Genotypes					
	CC	60(48.4)	33(40.7)	30(55.6)	63(46.7)	$p^a=0.436$
	CA	56(45.2)	41(50.6)	19(35.2)	60(44.4)	$p^b=0.762$
	AA	8(6.5)	7(8.6)	5(9.3)	12(8.9)	
	Alleles					
	C	176(71.0)	107(66.1)	79(73.2)	186(68.9)	$p^a=0.658$
	A	72(29.0)	55(33.9)	29(26.8)	84(31.1)	$p^b=0.827$
IL-6 -174G>C¹ (rs1800795)	Genotypes					
	GG	59(55.1)	40(59.7)	28(51.9)	68(56.2)	$p^a=0.407$
	GC	22(20.6)	16(23.9)	9(16.7)	25(20.7)	$p^b=0.978$
	CC	26(24.3)	11(16.4)	17(31.5)	28(23.1)	
	Alleles					
	G	140(65.4)	96(71.6)	65(60.2)	161(66.5)	$p^a=0.448$
	C	74(34.6)	38(28.4)	43(39.8)	81(33.5)	$p^b=1.000$
INF-γ +874T>A (rs2430561)	Genotypes					
	TT	19(15.3)	17(21.0)	3(5.6)*	20(14.8)	$p^a=0.044$
	TA	61(49.2)	28(34.4)*	30(55.6)	58(43.0)	$p^b=0.520$
	AA	44(35.5)	36(44.4)	21(38.9)	57(42.2)	
	Alleles					
	T	99(39.9)	62(38.3)	36(33.3)	98(36.3)	$p^a=0.819$
	A	149(60.1)	100(61.7)	72(66.7)	172(63.7)	$p^b=0.837$
IL-10 haplotype	Expression level of IL-10					
	High	23(18.5)	7(8.6)	8(14.8)	15(11.1)	$p^a=0.102$
	Intermediate	63(50.9)	37(45.7)	22(40.7)	59(43.7)	$p^b=0.035$
	Low	38(30.6)*	37(45.7)	24(44.4)	61(45.2)**	

* $p < 0.05$ was considered statistically significant. $p^a =$ (Control x CIND x Dementia). $p^b =$ (Control x CIND + Dementia). Significance verified by χ^2 test. Significance by residual test: * less frequent; ** more frequent.

¹ The sample size for IL-6 -174G/C analyze was: Control (n=107), CIND (n=67), Dementia (n=54).

Supplementary data

Table 1S: Details of polymorphisms in the gene of the studied cytokines.

Gene	Chromosome position	SNP	Position in gene	Ancestral allele	Minor allele	Allele associated with higher gene expression
TNF-α	6p21.3	rs1800629	Promoter	G	A	G (Helmig <i>et al.</i> , 2011)
			-308			
IL-6	7p21	rs1800795	Promoter	G	C	G (Totaro <i>et al.</i> , 2013)
			-174			
INF-γ	12q14	rs2430561	Intron 1	T	A	T (Pravica <i>et al.</i> , 2000)
			+874			
TGF-β1	19q13.1	rs1800470	Exon 1	C	T	C (Susianti <i>et al.</i> , 2014)
			+869			
			Exon 1			
IL-10	1q32	rs1800871	Exon 1	G	C	G (Guo, Binswanger e Knoflach, 2002)
			+915			
			Promoter			
			-1082			
IL-10	1q32	rs1800871	Promoter	C	T	C (Turner <i>et al.</i> , 1997)
			-819			
IL-10	1q32	rs1800872	Promoter	C	A	C (Turner <i>et al.</i> , 1997)
			-592			

Table 2S: Details of haplotypes in the gene of the studied cytokine (IL-10).

Haplotype	Phenotype of expression	Nucleotide Sequence
IL-10 -1082 A>G/ -819 C>T/ -592 C>A	High (Turner <i>et al.</i> , 1997)	GCC/GCC
	Intermediate (Turner <i>et al.</i> , 1997)	GCC/ACC
		GCC/ATA
	Low (Turner <i>et al.</i> , 1997)	ACC/ACC
		ACC/ATA
		ATA/ATA

Table 3S: Cognitive evaluation results for CIND, dementia and patients as a whole (CIND+dementia) groups.

Cognitive evaluation test	CIND (n=81)	Dementia (n=54)	Patients (n=135)	p value
MMSE ^a	-1.380 (2.222)	-3.666 (2.857)	-2.280 (2.887)	p<0.001*
CFT ^b	-0.917 ±1.383	-2.925 ±3.624	-1.273 ± 1.115	p<0.001*
PDMT learning ^a	-1.133 (2.068)	-1.915 (0.976)	-1.710 (2.308)	p<0.001*
PDMT recall delay ^a	-1.562 (1.720)	-2.812 (3.020)	-1.666 (1.875)	p<0.001*
Cognitive global score ^a	-4.653 (4.271)	-10.669 (10.044)	-6.091 (6.722)	p<0.001*

* Statistical difference p<0.05. p = CIND x Dementia. Variables ^a: showed in median (IQ). Variable ^b: showed in mean ± SD. Significance verified by Mann-Whitney test or T-student test.

5.2 Capítulo 2

LETTER

IL-6 -174 G>C PREDICTS SHORT-TERM GLOBAL COGNITIVE DECLINE IN OLDEST-OLD WITH COGNITIVE IMPAIRMENT NO DEMENTIA: THE PIETÀ STUDY

FRAGA, V. G.^a; GUIMARÃES, H.C.^b; TEIXEIRA, A.L.^b; BARBOSA, M.T.^b; MATEO, E.C.C.^c; CARVALHO, M.G.^a; CARAMELLI, P.^b; BORGES, K.B.G.^a

^a*Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.*

^b*Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.*

^c*Setor de Pesquisa e Desenvolvimento, Laboratório Hermes Pardini, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.*

*Corresponding author:

Karina Braga Gomes - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais.

Avenida Antônio Carlos, 6627, Pampulha. Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

Zip Code: 31270-901.

Tel: 55 31 3409-6895, Fax: 55 31 3409-6985.

E-mail address: karinabqb@gmail.com

Cognitive impairment no dementia (CIND) is a clinical state characterized by measurable impairment in cognitive domains, higher than expected for age and educational level, but not severe enough to compromise functional performance in activities of daily living (ADLs) (Gauthier *et al.*, 2006; Langa e Levine, 2014). Frequently defined as a transition phase between healthy aging and dementia, CIND is, however, a complex entity that can evolve to different outcomes.

In population-based settings, and especially in oldest-old individuals, where multiple factors and pathological findings contribute to brain disorder (Boyle *et al.*, 2013), CIND may be a valuable concept, in opposition to mild cognitive impairment, which loosely predicts the pathological background that underpins cognitive deficits in the elderly (Schneider *et al.*, 2009). Although subjects with CIND can display increased risk of dementia conversion (Vega e Newhouse, 2014), some individuals may remain stable or even show remission of CIND state (Manly *et al.*, 2008). The pathophysiological mechanisms that mediate the transition between CIND and dementia still remain poorly understood. Since inflammation is implicated in several neurodegenerative disorders, irrespective of the specific pathological background (Amor *et al.*, 2014), it seems reasonable to investigate inflammatory pathways and its influence in CIND outcomes.

Interleukin-6 (IL-6) is a pleiotropic proinflammatory cytokine, which has been considered the major cytokine in central nervous system (Erta, Quintana e Hidalgo, 2012). It participates in several brain processes, such as neurogenesis, synaptic plasticity, and inflammatory and neurotrophic pathways (Mcafoose e Baune, 2009; Spooren *et al.*, 2011; Erta, Quintana e Hidalgo, 2012). Imbalances between IL-6 concentrations in serum and cerebrospinal fluid are observed in CIND and dementia (Magaki *et al.*, 2007; Schuitemaker *et al.*, 2009). The increase of IL-6 production has been associated with disease progression and severity of symptoms in Alzheimer's disease (Kálmán *et al.*, 1997; Brosseron *et al.*, 2014).

The polymorphism -174 G>C (rs1800795) in IL-6 gene may affect its expression. The C allele is associated with increased transcriptional activity and higher IL-6 serum levels compared with G allele (Bruunsgaard *et al.*, 2004; Boiardi *et al.*, 2006; Totaro *et al.*, 2013). In this study we evaluated the influence of this polymorphism on short-term global cognitive decline in a sample of Brazilian oldest-

old categorized as CIND. To the best of our knowledge, this is the first study to address this issue.

This prospective investigation was done with a subset of participants from the Pietà Study, a Brazilian population-based study on brain aging in subjects aged 75+ years. Diagnostic criteria, methods and baseline characteristics were previously reported (Caramelli *et al.*, 2011). The cognitive performance of 27 oldest-old individuals with CIND [median age (IQ)= 78 (7) years] was evaluated with brief cognitive tests, consisting of the Mini-Mental State Examination (MMSE), animal category fluency test (CF) and picture drawings memory test (PDMT) with learning and delayed recall tasks. These measures were obtained twice over one-year time window between them. The obtained results were normalized according to educational attainment as Z-scores. All the results from the cognitive tests were used to calculate a composite cognitive measurement, the global cognitive score (GCS). Afterwards the participants were categorized into two distinct groups: those with short-term decline in GCS and those demonstrating short-term stability or improvement (non decliners). Genotyping of the SNP IL-6 -174G>C was made using genomic DNA extracted from peripheral blood samples collected in EDTA and the kit Cytokine Genotyping Tray™ (OneLambda). Genotyping data according to GCS outcomes are shown in Table 1.

We observed on follow-up that 51.8% of CIND subjects evolved to decline in GCS, while 48.2% remained stable or improved. CIND carriers of at least one C^{higher} allele were more frequent in the group with short-term global cognitive decline ($p=0.012$). These subjects showed a 3-fold higher risk of decline than individuals with GG^{lower} genotype (RR=3.095 CI_{95%}=1.087-8.812). This finding was independent of gender, age and ApoE ε4 carrier status in a logistic regression model (all $p>0.05$).

Our results indicate that even a heterozygous genetic predisposition to higher production of IL-6 is an independent risk factor for cognitive decline among CIND individuals. According to our findings, (Saykin *et al.*, July,2005) showed that carriers of CC^{higher} genotype for IL-6 -174 G>C, among elderly with cognitive impairment, exhibited the most pronounced gray matter reduction in medial temporal lobe, mainly in left hippocampus. Economos *et al.* (Economos *et al.*, 2013) demonstrated that increased serum levels of IL-6 were associated with cognitive decline in a cohort of elderly participants with diverse ethnical backgrounds. In addition, Zhao *et al.*

(Zhao *et al.*, 2012) observed a weak but significant association between higher serum levels of IL-6 and worse cognitive performance in a group of Chinese individuals with amnesic mild cognitive impairment.

In addition to the proposed role of IL-6 in cognitive processes, there is a growing body of evidence pointing to the involvement of this cytokine in age-associated functional performance. Palta *et al.* (Palta *et al.*, 2014) observed that higher serum levels of IL-6 were a risk factor for a faster decline in psychomotor speed in a cohort of aged women. IL-6 serum concentrations were also associated with a slower gait speed in a community-based cohort of older adults, and predicted risk of gait speed decline (Verghese *et al.*, 2011). In a community-based cohort of older women, Ferrucci *et al.* (Ferrucci *et al.*, 2002) have proposed that physical disability associated with higher levels of IL-6 were mediated by muscle strength decline. More recently, Adriansen *et al.* (Adriaensen *et al.*, 2014) studied global functional decline in a population-based cohort of Belgium oldest-old using an extensive panel of inflammatory markers. According to their findings, IL-6 was the only inflammatory marker with an independent association with functional decline, in a dose-dependent manner.

Event though there are conflicting results regarding the role of IL-6 levels and age-associated cognitive and functional performance (Ozturk *et al.*, 2007; Karim *et al.*, 2014), our findings stand in accordance with a growing set of studies that reinforce the association between this cytokine and age-related outcomes.

Some methodological limitations are found in this study, such as the absence of IL-6 levels data and the small sample size. However, we could not find another study similar to ours that approached the influence of IL-6 -174 G>C on cognitive decline in CIND. Therefore we considered this investigation an initial study that indicates the need for further research in this direction.

Acknowledgements: Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). ALT, MGC, PC and KBG are grateful to CNPq Research Fellowship (PQ).

Conflict of interest statement: The authors disclose no conflict of interest.

Table 1 - Short-term cognitive outcome in CIND participants according to IL-6 174 G>C genotype

SNP IL-6	Decliners	Non-decliners	
-174 G>C	(n=14)	(n=13)	p-value*
GG, n (%)	4 (28.6)	10 (71.4)	0.012
C carriers, n(%)	10 (71.4)	3 (23.1)	

* χ^2 test

REFERENCES

ADRIAENSEN, W. et al. Interleukin-6 predicts short-term global functional decline in the oldest old: results from the BELFRAIL study. **Age**, v. 36, n. 6, p. 9723, 2014.

AMOR, S. et al. Inflammation in neurodegenerative diseases-an update. **Immunology**, v. 142, n. 2, p. 151-66, 2014.

BOIARDI, L. et al. Relationship between interleukin 6 promoter polymorphism at position-174, IL- 6 serum levels, and the risk of relapse/recurrence in polymyalgia rheumatica. **J. Rheumatol**, v. 33, n. 4, p. 703-708, 2006.

BOYLE, P. A. et al. Much of late life cognitive decline is not due to common neurodegenerative pathologies. **Ann Neurol**, v. 74, n. 3, p. 478-89, 2013.

BROSSERON, F. et al. Body fluid cytokine levels in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease: a comparative overview. **Mol Neurobiol**, v. 50, n. 2, p. 534-44, 2014.

BRUUNSGAARD, H. et al. The IL- 6 - 174G > C polymorphism is associated with cardiovascular diseases and mortality in 80- year- old humans. **Experimental Gerontology**, v. 39, n. 2, p. 255-261, 2004.

CARAMELLI, P. et al. The Pieta study: epidemiological investigation on successful brain aging in Caete (MG), Brazil. Methods and baseline cohort characteristics. **Arq Neuropsiquiatr**, v. 69, n. 4, p. 579-84, 2011.

ECONOMOS, A. et al. Interleukin 6 plasma concentration associates with cognitive decline: the northern Manhattan study. **Neuroepidemiology**, v. 40, n. 4, p. 253-9, 2013.

ERTA, M.; QUINTANA, A.; HIDALGO, J. Interleukin-6, a major cytokine in the central nervous system. **Int J Biol Sci**, v. 8, n. 9, p. 1254-66, 2012.

FERRUCCI, L. et al. Change in muscle strength explains accelerated decline of physical function in older women with high interleukin-6 serum levels. **J Am Geriatr Soc**, v. 50, n. 12, p. 1947-54, 2002.

GAUTHIER, S. et al. Mild cognitive impairment. **Lancet**, v. 367, n. 9518, p. 1262-70, 2006.

KARIM, S. et al. Peripheral inflammatory markers in amnesic mild cognitive impairment. **International Journal of Geriatric Psychiatry**, v. 29, n. 3, p. 221-226, 2014.

KÁLMÁN, J. et al. Serum interleukin- 6 levels correlate with the severity of dementia in Down syndrome and in Alzheimer's disease. **Acta Neurologica Scandinavica**, v. 96, n. 4, p. 236-240, 1997.

LANGA, K. M.; LEVINE, D. A. The diagnosis and management of mild cognitive impairment: A clinical review. **JAMA - Journal of the American Medical Association**, v. 312, n. 23, p. 2551-2561, 2014.

MAGAKI, S. et al. Increased production of inflammatory cytokines in mild cognitive impairment. **Experimental Gerontology**, v. 42, n. 3, p. 233-240, 2007.

MANLY, J. J. et al. Frequency and course of mild cognitive impairment in a multiethnic community. **Annals of Neurology**, v. 63, n. 4, p. 494-506, 2008.

MCAFOOSE, J.; BAUNE, B. T. Evidence for a cytokine model of cognitive function. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 33, n. 3, p. 355-366, 2009.

OZTURK, C. et al. The diagnostic role of serum inflammatory and soluble proteins on dementia subtypes: Correlation with cognitive and functional decline. **Behavioural Neurology**, v. 18, n. 4, p. 207-215, 2007.

PALTA, P. et al. Interleukin-6 and C-Reactive Protein Levels and 9-Year Cognitive Decline in Community-Dwelling Older Women: The Women's Health and Aging Study II. **J Gerontol A Biol Sci Med Sci**, p. 1-6, 2014.

SAYKIN, A. J. et al. IL-6 allelic variation and medial temporal morphology in MCI and older adults with memory complaints. **Alzheimer's & Dementia**, v. 1, n. 1, Supplement, p. S82-S83, 2005.

SCHNEIDER, J. A. et al. The neuropathology of probable Alzheimer disease and mild cognitive impairment. **Ann Neurol**, v. 66, n. 2, p. 200-8, 2009.

SCHUITEMAKER, A. et al. Inflammatory markers in AD and MCI patients with different biomarker profiles. **Neurobiol Aging**. United States, v.30, 2009. p.1885-9.

SPOOREN, A. et al. Interleukin-6, a mental cytokine. **Brain Research Reviews**, v. 67, n. 1 2, p. 157, 2011.

TOTARO, F. et al. Impact of interleukin-6 -174 G>C gene promoter polymorphism on neuroblastoma. **PLoS One**, v. 8, n. 10, p. e76810, 2013.

VEGA, J.; NEWHOUSE, P. A. Mild Cognitive Impairment: Diagnosis, Longitudinal Course, and Emerging Treatments. **Current Psychiatry Reports**, v. 16, p.490-510, n. 10, 2014.

VERGHESE, J. et al. Inflammatory markers and gait speed decline in older adults. **J Gerontol A Biol Sci Med Sci**, v. 66, n. 10, p. 1083-9, 2011.

ZHAO, S. J. et al. Serum levels of inflammation factors and cognitive performance in amnesic mild cognitive impairment: a Chinese clinical study. **Cytokine**, v. 57, n. 2, p. 221-5, 2012.

5.3 Capítulo 3

LETTER

TGF- β 1 CODON 10 T>C INFLUENCES SHORT-TERM FUNCTIONAL AND COGNITIVE DECLINE IN HEALTHY OLDEST-OLD INDIVIDUALS: THE PIETÀ STUDY

FRAGA, V. G.^a; GUIMARÃES, H.C.^b; LARA, V.P.^a; TEIXEIRA, A.L.^b; BARBOSA, M.T.^b; CARVALHO, M.G.^a; CARAMELLI, P.^b; GOMES, K.B.^a

^a*Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.*

^b*Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.*

*Corresponding author:

Karina Braga Gomes - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais.

Avenida Antônio Carlos, 6627, Pampulha. Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

Zip Code: 31270-901.

Tel: 55 31 3409-6895, Fax: 55 31 3409-6985.

E-mail address: karinabgb@gmail.com

The concept of healthy aging is associated with maintenance of an independent life in the elderly, despite the physiological limitations of aging. This independence includes autonomy in daily-life activities and personal care, together with social insertion and preservation of a current sense of purpose (Desai, Grossberg e Chibnall, 2010; Park e Yeo, 2013). Therefore, maintaining cognitive and functional abilities is a key point for healthy aging and good quality of life. The epidemiological situation of world population aging (WHO, 2011) demonstrates a clear need of a better understanding related to the process of preservation of both cognitive and functional performance, focusing mainly on genetic and environmental factors related to this condition.

Cytokines have been implicated in brain physiology, playing roles in synaptic plasticity, neurogenesis and neuromodulation, besides acting on cholinergic and dopaminergic pathways, and influencing cognitive complex processes such as memory and learning (Wilson, Finch e Cohen, 2002; Mcafoose e Baune, 2009). Changes in cytokine production are a common finding in aging and a tendency of overexpression of proinflammatory mediators is observed (Michaud *et al.*, 2013). These alterations probably exert influence on cognitive and functional abilities in elderly people, although this issue still remains poorly understood.

TGF- β 1 is an important multifunctional anti-inflammatory cytokine that displays immunomodulatory activities and regulates cell proliferation, growth and differentiation (Kajdaniuk *et al.*, 2013). Recently, TGF- β 1 was described as a neurotrophic and neuroprotective factor (Martinez-Canabal, 2015) involved in process of neurogenesis, brain development, differentiation of adult neural progenitors into functional neurons and in neuroinflammatory process (Rodriguez-Martinez e Velasco, 2012).

Single nucleotide gene polymorphism (SNPs) in TGF- β 1 gene determines different levels of expression of this cytokine. TGF- β 1 codon 10 T>C (rs1800470 or T869C) polymorphism determines the change (Leu \rightarrow Prol) in codon 10 of the gene. The C allele is associated with higher expression of TGF- β 1 in comparison to T allele because the replacement of leucine to proline in signal peptide of TGF- β 1 probably increases the cytokine production (Yamada *et al.*, 1998; Suthanthiran *et al.*, 2000; Wood *et al.*, 2000; Dunning *et al.*, 2003; Susianti *et al.*, 2014).

This prospective investigation is derived from the Pietà Study, a Brazilian population-based study on brain aging in subjects aged 75+ years. Baseline characteristics of sample, diagnostic criteria and methods were described elsewhere (Caramelli *et al.*, 2011). The functional performance of 49 subjects [median age (IQ)= 78 (5) years] was assessed by the Functional Activities Questionnaire (FAQ) (Pfeffer *et al.*, 1982). The cognitive evaluation of 57 elderly [median age (IQ)= 78 (5) years] was evaluated through brief cognitive tests, consisting of the Mini-Mental State Examination (MMSE), animal category fluency test (CF) and picture drawings memory test (PDMT) with learning and delayed recall phases. All cognitive tests were administered twice, with a one-year interval, and were normalized by schooling level. Z scores derived from the cognitive tests were used to calculate a global cognitive score (GCS). The subjects were then categorized in two distinct groups: decliners, those who showed short-term cognitive and functional decline; and non decliners, those who demonstrated short-term stability or even improvement in cognitive and functional abilities on follow-up evaluation.

The main results for functional and cognitive evaluations are shown in Tables 1 and 2. We found that carriers of T^{lower} allele showed significant short-term decline in functional performance, while individuals with CC^{higher} genotype of TGF-β1 codon 10 T>C remain stable or showed improvement (RR=1.535, CI_{95%}=1.094-2.155; p=0.017). Consistent with this observation, the carriers of at least one T^{lower} allele also showed short-term decline in GCS, while non-carriers demonstrated stability or improvement (RR=1.420, CI_{95%}=1.019-1.978; p=0.029). Logistic regression analysis confirmed that these findings were independent from age, sex and presence of ApoE ε4 allele (all p>0.05).

Ours findings indicate that the genetic variant TGF-β1 codon 10 T>C may exert a negative impact on functional and cognitive performance in normal aging. Hence, the lower production of TGF-β1 could predict a longitudinal functional and cognitive decline.

The impairment in TGF-β1 signaling in subjects with Alzheimer disease, characterized by reduction of its plasma levels and decreased expression of the TGF-β1 receptor in neurons, has highlighted the importance of this mediator in brain

physiology and cerebral functions preservation (Caraci *et al.*, 2012; Bosco *et al.*, 2013).

Furthermore, there is evidence of the importance of TGF- β 1 in periphery musculoskeletal system, which could influence disability and functional features. Fuku *et al.* (Fuku *et al.*, 2012) reported that carriers of the T^{lower} allele are more likely to present sarcopenia, an important component of frailty and functional decline in aging. Hussein *et al.* (Hussein *et al.*, 2014) demonstrated that carriers of T^{lower} allele show more susceptibility to develop rheumatoid arthritis, osteoporosis and bone erosion. Indeed, Mori *et al.* (Mori *et al.*, 2010) also observed the protective role of C^{higher} allele against vertebral fracture prevalence in post-menopause women.

In conclusion, carriers of CC^{higher} genotype showed prospective stability or even improvement in cognition and functional abilities, suggesting an impact of TGF- β 1 polymorphism in healthy aging. Further studies on this topic are necessary, including the elucidation of mechanisms of TGF- β 1 interaction in central and peripheral nervous systems in the aging context. Some methodological limitations are present in this study, such as the TGF- β 1 levels were not quantified and the sample size was limited. However, to the best of our knowledge, this was the first study evaluating the influence of the SNP TGF- β 1 codon 10 T>C on cognition and functional skills of healthy elderly in a longitudinal design. This finding highlights the potential value of determining gene polymorphisms to tailor strategies for health-related risk factor management in oldest-old individuals. Finally, our data reinforces the importance of genetic studies as an auxiliary approach, seeking to better understand the range of factors involved in cognitive and functional processes in later life.

Table 1 - Short-term functional outcome in healthy oldest-old according to TGF- β 1 codon 10 T>C genotype

SNP TGF-β1 codon 10 T>C	Decliners (n=20)	Non-decliners (n=29)	p-value*
CC, n (%)	2 (10.0)	12 (41.4)	0.017
T carriers, n(%)	18 (90.0)	17 (58.6)	

* χ^2 test

Table 2 - Short-term cognitive outcome in healthy oldest-old according to TGF- β 1 codon 10 T>C genotype

SNP TGF-β1 codon 10 T>C	Decliners (n=29)	Non-decliners (n=28)	p-value*
CC, n (%)	4 (13.8)	11 (39.3)	0.029
T carriers, n(%)	25 (86.2)	17 (60.7)	

* χ^2 test

REFERENCES

BOSCO, P. et al. Role of the transforming-growth-factor- β 1 gene in late-onset alzheimer's disease: Implications for the treatment. **Current Genomics**, v. 14, n. 2, p. 147-156, 2013.

CARACI, F. et al. Dysfunction of TGF-beta1 signaling in Alzheimer's disease: perspectives for neuroprotection. **Cell Tissue Res**, v. 347, n. 1, p. 291-301, 2012.

CARAMELLI, P. et al. The Pieta study: epidemiological investigation on successful brain aging in Caete (MG), Brazil. Methods and baseline cohort characteristics. **Arq Neuropsiquiatr**, v. 69, n. 4, p. 579-84, 2011.

DESAI, A. K.; GROSSBERG, G. T.; CHIBNALL, J. T. Healthy Brain Aging: A Road Map. **Clinics in Geriatric Medicine**, v. 26, n. 1, 16 p., 2010.

DUNNING, A. M. et al. A transforming growth factorbeta1 signal peptide variant increases secretion in vitro and is associated with increased incidence of invasive breast cancer. **Cancer Res**, v. 63, n. 10, p. 2610-5, 2003.

FUKU, N. et al. Association of 29C>T polymorphism in the transforming growth factor-beta1 gene with lean body mass in community-dwelling Japanese population. **Geriatr Gerontol Int**, v. 12, n. 2, p. 292-7, 2012.

HUSSEIN, Y. M. et al. Interaction between TGF-beta1 (869C/T) polymorphism and biochemical risk factor for prediction of disease progression in rheumatoid arthritis. **Gene**, v. 536, n. 2, p. 393-7, 2014.

KAJDANIUK, D. et al. Transforming growth factor beta1 (TGFbeta1) in physiology and pathology. **Endokrynol Pol**, v. 64, n. 5, p. 384-96, 2013.

MARTINEZ-CANABAL, A. Potential neuroprotective role of transforming growth factor beta1 (TGFbeta1) in the brain. **Int J Neurosci**, v. 125, n. 1, p. 1-9, 2015.

MCAFOOSE, J.; BAUNE, B. T. Evidence for a cytokine model of cognitive function. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 33, n. 3, p. 355-366, 2009.

MICHAUD, M. et al. Proinflammatory cytokines, aging, and age-related diseases. **Journal of the American Medical Directors Association**, v. 14, n. 12, p. 877-882, 2013.

MORI, S. et al. Cooperative effect of serum 25-hydroxyvitamin D concentration and a polymorphism of transforming growth factor-beta1 gene on the prevalence of vertebral fractures in postmenopausal osteoporosis. **J Bone Miner Metab**, v. 28, n. 4, p. 446-50, 2010.

PARK, D. C.; YEO, S. G. Aging. **Korean J Audiol**, v. 17, n. 2, p. 39-44, 2013.

PFEFFER, R. I. et al. Measurement of functional activities in older adults in the community. **J Gerontol**, v. 37, n. 3, p. 323-9, 1982.

RODRIGUEZ-MARTINEZ, G.; VELASCO, I. Activin and TGF-beta effects on brain development and neural stem cells. **CNS Neurol Disord Drug Targets**, v. 11, n. 7, p. 844-55, 2012.

SUSIANTI, H. et al. Changes to signal peptide and the level of transforming growth factor- beta1 due to T869C polymorphism of TGF beta1 associated with lupus renal fibrosis. **Springerplus**, v. 3, p. 514, 2014.

SUTHANTHIRAN, M. et al. Transforming growth factor-beta 1 hyperexpression in African-American hypertensives: A novel mediator of hypertension and/or target organ damage. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 97, n. 7, p. 3479-84, 2000.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Global health and ageing. 32 p., 2011.

WILSON, C. J.; FINCH, C. E.; COHEN, H. J. Cytokines and cognition--the case for a head-to-toe inflammatory paradigm. **J Am Geriatr Soc**, v. 50, n. 12, p. 2041-56, 2002.

WOOD, N. A. et al. Identification of human TGF-beta1 signal (leader) sequence polymorphisms by PCR-RFLP. **J Immunol Methods**, v. 234, n. 1-2, p. 117-22, 2000.

YAMADA, Y. et al. Association of a polymorphism of the transforming growth factor-beta1 gene with genetic susceptibility to osteoporosis in postmenopausal Japanese women. **J Bone Miner Res**, v. 13, n. 10, p. 1569-76, 1998.

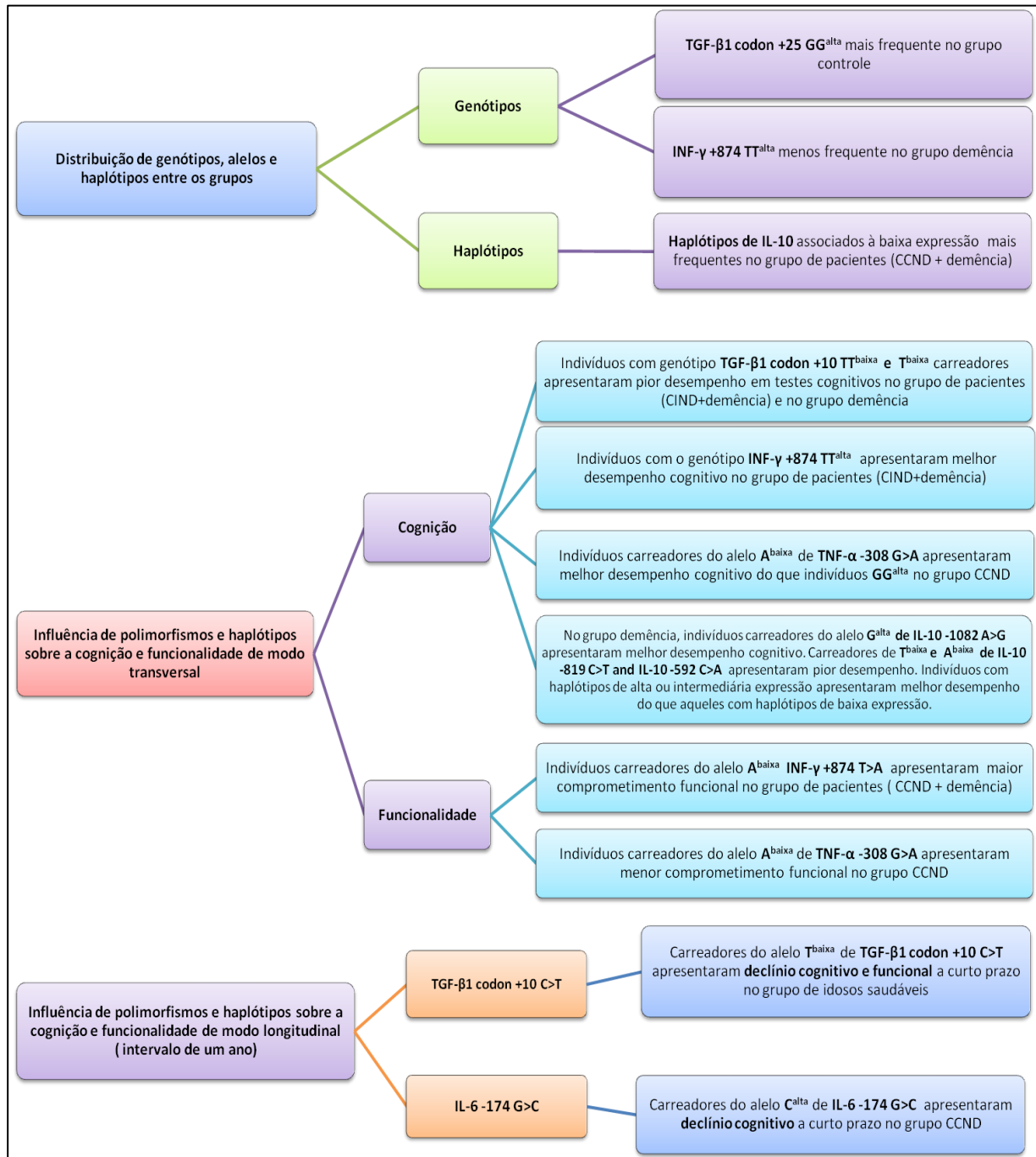
6 DISCUSSÃO

Os principais resultados obtidos no presente trabalho estão resumidos na Figura 5. Nossos achados apontam para a associação entre os SNPs TGF- β 1 codon +25 G>C, INF- γ +874 T>A e os haplótipos de IL-10 e a ocorrência de CCND/demência. Evidenciou-se também que os SNPs TGF- β 1 codon +10 C>T, INF- γ +874 T>A, TNF- α -308 G>A, IL-10 -1082 A>G, -819C>T e -592 C>A e haplótipos de IL-10 relacionaram-se ao desempenho cognitivo dos pacientes. Quanto ao desempenho funcional, observou-se que TNF- α -308 G>A e INF- γ +874 T>A foram variantes associadas. Além disso, o SNP TGF- β 1 codon +10 C>T relacionou-se ao comprometimento cognitivo e funcional observado em idosos saudáveis, enquanto IL-6 -174G>C à redução da capacidade cognitiva em idosos com CCND, avaliados em um período de um ano.

Nosso estudo demonstrou que polimorfismos ligados à expressão aumentada de citocinas pró-inflamatórias ou reduzida de citocinas anti-inflamatórias estão associados aos quadros de CCND e demência e, além disso, contribui para a deterioração de habilidades cognitivas e funcionais, em idosos saudáveis e doentes. A única exceção a esta regra diz respeito à citocina pró-inflamatória INF- γ , pois o alelo T de INF- γ +874 T>A, relacionado a mais elevados níveis desta citocina (Guo, Binswanger e Knoflach, 2002), associou-se ao grupo controle e ao melhor desempenho cognitivo entre os pacientes, enquanto o alelo A associou-se ao maior comprometimento funcional no grupo de doentes. Isto ilustra a complexidade da interação entre mecanismos imunes e o desempenho cognitivo, já que as citocinas podem exercer diretamente tanto ações neuroprotetivas quanto neurodegenerativas, que algumas vezes suplantam suas propriedades imunorregulatórias (Schroeter e Jander, 2005).

É interessante ressaltar que, com o envelhecimento, há redução da capacidade de produção de INF- γ pelos linfócitos *natural killer*, o que explica parcialmente a maior suscetibilidade dos idosos às infecções, principalmente virais. Há também relatos de que níveis aumentados de INF- γ não foram observados no líquido cefalorraquidiano de indivíduos demenciados (Rota *et al.*, 2006) e nem no tecido cerebral de indivíduos com DA (Luterman *et al.*, 2000), conforme esperado.

Figura 5 – Resumo dos principais resultados.



^{alta}: alelo associado à alta expressão gênica. ^{baixa}: alelo associado à baixa expressão gênica.

Recentemente, Flex *et al.* (Flex *et al.*, 2014) descreveram que genótipos pró-inflamatórios constituem fator de risco independente ao desenvolvimento de DA e provavelmente atuam em sinergismo, com amplificação do risco em indivíduos que carregam maior número de alelos que conduzem ao perfil pró-inflamatório. De forma análoga, Licastro *et al.* (Licastro *et al.*, 2007) descreveram que, em conjunto, SNPs

que conduzem a um perfil pró-inflamatório associam-se à ocorrência de DA em idade anterior aos 65 anos mesmo na ausência do fator de risco ApoE ϵ 4. Estes mesmos autores destacam que um perfil genético pró-inflamatório também pode influenciar a rapidez do declínio cognitivo observado em pacientes com DA (Licastro *et al.*, 2007). Estes estudos corroboram com nossa observação de pior desempenho cognitivo e funcional em idosos carreadores de alelos de alta expressão de citocinas pró-inflamatórias ou de baixa expressão de citocinas antiinflamatórias.

Outra evidência interessante e consistente com nossos resultados é a relação existente entre SNPs em genes de citocinas e longevidade. Sabe-se que indivíduos geneticamente predispostos à maior produção de IL-6 possuem menor chance de atingir os extremos de idade da vida (Caruso *et al.*, 2004). Hurme *et al.* (Hurme *et al.*, 2005) observaram, por exemplo, que em uma coorte de nonagenários, a frequência do alelo G^{baixa} de IL-6 -174 G>C foi claramente mais elevada entre indivíduos sobreviventes. Já os indivíduos carreadores de alelos associados a uma maior produção da citocina antiinflamatória IL-10 são mais frequentes entre centenários (Caruso *et al.*, 2004). Em nosso estudo observamos relação entre SNPs de IL-6 e IL-10 e respectiva deterioração e preservação da capacidade cognitiva. Considerando que a longevidade está associada a envelhecimento bem sucedido ou saudável (Shadyab e Lacroix, 2015), e isso pressupõe a manutenção do potencial cognitivo e funcional, podemos identificar que variantes em genes de citocinas que conduzem à amenização do perfil inflamatório podem influenciar na maior expectativa de vida.

Citocinas pró-inflamatórias em níveis basais ou fisiológicos estão envolvidas com a cognição. Embora o conhecimento atual acerca destes mecanismos seja restrito, algumas evidências despontam, sobretudo relacionadas à memória e aprendizado (McAfoose e Baune, 2009). O TNF- α secretado por astrócitos em condições basais pode aumentar a força sináptica em neurônios com prolongada inatividade, ajudando na manutenção das funções de memória e aprendizado (McAfoose e Baune, 2009). Recentemente, Naude *et al.* (Naude *et al.*, 2014) evidenciaram que camundongos deficientes para o receptor de TNF- α tipo II apresentam comprometimento no reconhecimento de objetos, déficits de memória espacial, desempenho motor e intensificação do comportamento associado à ansiedade. Similarmente, IL-6 em baixas concentrações subsidia processos de neurogênese e plasticidade sináptica, contribuindo com a função cognitiva (McAfoose

e Baune, 2009). Entretanto, estas mesmas citocinas estão associadas à neurodegeneração (Smith *et al.*, 2012; Niranjana, 2013). Sendo assim, a influência de citocinas sobre a cognição parece depender, portanto, de um equilíbrio na produção destes mediadores. Desta forma, os níveis das citocinas produzidas talvez seja um dos grandes determinantes da neurotoxicidade, mas poucos estudos são encontrados atualmente associando polimorfismos em genes de citocinas e o desempenho cognitivo. Baune *et al.* (Baune *et al.*, 2008) demonstraram que carreadores do alelo A^{baixa} de TNF- α -308 G>A apresentam maior velocidade de processamento cognitivo do que indivíduos com genótipo GG^{alta} e indivíduos carreadores do alelo C^{alta} de IL-6 - 174 G>C apresentam pior desempenho motor do que indivíduos GG^{baixa}.

Sabe-se que o envelhecimento normal caracteriza-se pelo aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias e por uma redução paradoxal na eficiência de processos como fagocitose (Panda *et al.*, 2009). Isso contribui para a perda de homeostase cérebro-imunidade e reconhece-se que um acréscimo, mesmo modesto do perfil inflamatório no SNC durante o envelhecimento fisiológico, está associado aos déficits de coordenação motora, cognição e plasticidade sináptica (Norden e Godbout, 2013). Em contextos patológicos, por sua vez, o estabelecimento de uma inflamação crônica acentua tal desequilíbrio e a quantidade de citocinas pró-inflamatórias aumenta a ponto de induzir dano tissular e acentuar a neurodegeneração (Arisi, 2014). Corroborando com estas evidências, nós verificamos no grupo demência que indivíduos com alelos associados a maior produção das citocinas anti-inflamatórias TGF- β 1 e IL-10 apresentaram melhor desempenho cognitivo.

A constatação de que indivíduos com CCND carreadores do alelo A^{baixa} de TNF- α -308 G>A apresentaram melhor desempenho cognitivo e funcional do que indivíduos com genótipo GG^{alta} indica possível associação desta citocina pró-inflamatória e CCND. O TNF- α é secretado pela micróglia ativada e associa-se à neurodegeneração e apoptose (Smith *et al.*, 2012). Foi demonstrado em camundongos e macacos que o TNF- α induz perda sináptica e comprometimento de memória em resposta ao desafio com peptídeo β A (Lourenco *et al.*, 2013). (Buchhave *et al.*, 2010) também observaram que elevadas quantidades de receptores solúveis de TNF (TNFR1 e TNFR2) presentes no líquido e soro de indivíduos com comprometimento cognitivo leve constitui fator de risco para a conversão para demência e relataram que a sinalização da via de tais receptores pode envolver-se

com estágios iniciais de DA e demência vascular. Similarmente, observamos um envolvimento prospectivo do alelo C^{alta} do SNP IL-6 -174G>C, citocina pró-inflamatória e o declínio cognitivo observado no grupo CCND. Muitas evidências apontam que níveis elevados de IL-6 relacionam-se a limitações cognitivas e funcionais em idosos (Ferrucci *et al.*, 2002; Verghese *et al.*, 2011; Adriaensen *et al.*, 2014; Palta *et al.*, 2014). A quantidade de IL-6 no parênquima cerebral está elevada em indivíduos com demência grave e relaciona-se com a quantidade de emaranhados neurofibrilares presentes, indicando envolvimento desta citocina na progressão da neurodegeneração (Luterman *et al.*, 2000).

Os alelos G e T dos SNPs TGF- β 1 codon +25 G>C e TGF- β 1 codon +10 C>T, associados à alta expressão de TGF- β 1, foram associados ao grupo controle e ao melhor desempenho cognitivo e funcional entre idosos saudáveis e dementes. Nossos achados são consistentes com trabalhos que reportam esta citocina como sendo um agente neurotrófico e neuroprotetor associado à neurogênese (Henrich-Noack, Prehn e Krieglstein, 1994; Caraci *et al.*, 2011; Bosco *et al.*, 2013; Martinez-Canabal, 2015), cuja produção e sinalização estão comprometidas em indivíduos com DA (Caraci *et al.*, 2012). Luterman *et al.* (2000) descreveram que a quantidade de mRNA de TGF- β 1 mensurada no giro temporal superior do cérebro de indivíduos com DA foi inversamente relacionada à quantidade de emaranhados neurofibrilares encontrados. Diversas ações associadas ao TGF- β 1 no sentido da neuroproteção já foram descritas e incluem: o estímulo ao *clearance* do peptídeo β A (Tichauer e Von Bernhardt, 2012) e amenização da neuroinflamação desencadeada pela deposição de placas senis (Shen *et al.*, 2014); proteção contra neurodegeneração, isquemia e excitotoxicidade *in vitro* e *in vivo* (Henrich-Noack, Prehn e Krieglstein, 1994; Ma *et al.*, 2008).

De maneira análoga, as variantes alélicas A, T e A dos SNPs IL-10 -1082 A>G, -819C>T e -592 C>A, respectivamente, relacionadas à baixa expressão de IL-10, associaram-se ao grupo doente na análise haplotípica de distribuição, enquanto os alelos G, C e C dos referidos polimorfismos associaram-se ao melhor desempenho cognitivo no grupo demência. Estes achados reiteram dados que apontam a citocina anti-inflamatória IL-10 como fator neuroprotetor em condições patológicas. Sabe-se ainda que os níveis de IL-10 aumentam durante várias patologias no SNC, promovendo a sobrevivência dos neurônios e células gliais por bloqueio de citocinas pró-apoptóticas e redução de síntese de mediadores pró-inflamatórios, supressão de

receptores de citocinas e a inibição da sua ativação (Strle *et al.*, 2001). Recentemente, (Xie *et al.*, 2014) descreveram que linfócitos T reguladores podem controlar a neuroinflamação, evitando danos no tecido cerebral, por intermédio da inibição da microglia pela IL-10. Além disso, corroborando com nossos resultados, estudos sobre o envolvimento destes SNPs de IL-10 na demência indicam que os alelos relacionados à alta expressão de IL-10 estão associados ao baixo risco de desenvolvimento de DA (Di Bona *et al.*, 2012) e os associados à baixa expressão constituem fatores de risco independentes para esta demência (Lio *et al.*, 2003).

A observação de que indivíduos carreadores do genótipo TT^{alta} de INF- γ +874 T>A foram associados ao grupo controle e melhor desempenho cognitivo e funcional entre pacientes sugere que esta citocina pró-inflamatória possa exibir funções benéficas no SNC. Sabe-se que INF- γ em pequenas quantidades é requerida no processo de neurogênese e por isso possivelmente se envolva no desenvolvimento e reparo do SNC (Kim *et al.*, 2007). Em camundongos foi demonstrado que INF- γ e outras citocinas secretadas por linfócitos T promovem regeneração de células progenitoras neurais no hipocampo em resposta à injúria com peptídeo β A (Liu *et al.*, 2014). Baron (Baron *et al.*, 2008) relataram que INF- γ promove a neurogênese e melhora na memória e aprendizado espacial em camundongos modelos de DA. Ainda, em consonância com nossos achados, Jabbari *et al.* (Jabbari Azad *et al.*, 2014) recentemente descreveram que níveis de INF- γ secretados por linfócitos T de indivíduos com DA são inversamente relacionados com a pontuação obtida no MEEM e no *Clinical Dementia Rating* (CDR), uma ferramenta clínica que avalia simultaneamente comprometimentos funcionais e cognitivos, permitindo o estadiamento da síndrome demencial. Além disso, um estudo recente descreveu a associação entre o genótipo AA^{baixa} de INF- γ +874 T>A e a ocorrência de DA (Charfeddine *et al.*, 2014).

Por fim, embora nosso conhecimento sobre a interação entre os sistemas nervoso e imune tenham avançado consideravelmente nas últimas décadas, ainda são necessários muitos esclarecimentos acerca do papel da inflamação e de seus mediadores na fisiopatologia de doenças cerebrais. Elucidar a maneira como citocinas podem se envolver no envelhecimento bem sucedido e nas doenças neurodegenerativas pode ajudar a preencher uma lacuna sobre a etiologia das demências. Associado a isto, a possibilidade técnica atual de se determinar perfis

genéticos de suscetibilidade ao declínio cognitivo e funcional pode ajudar a traçar estratégias de manejo e controle de demências, condições cuja prevalência e incidência tendem ao aumento em todo mundo, inclusive no Brasil.

Embora nosso trabalho apresente limitações, como o reduzido tamanho amostral, seus resultados são importantes para abrir novas perspectivas de melhor compreensão dos mecanismos inflamatórios subjacentes à neurodegeneração, podendo no futuro auxiliar na busca de terapias modificadoras do curso das demências pela identificação de novos alvos terapêuticos.

7 CONCLUSÕES

Os polimorfismos nos genes das citocinas IL-6, IL-10, INF- γ , TGF- β 1 e TNF- α estão associados à ocorrência de CCND e demência, e podem regular o declínio cognitivo e funcional em idosos. Alta expressão de TGF- β 1, INF- γ e IL-10 associaram-se ao envelhecimento saudável. Baixa expressão de TGF- β 1 foi associado ao pior desempenho cognitivo entre pacientes e a alta expressão de INF- γ associou-se à melhor performance cognitiva e funcional entre doentes. No grupo demência, alta expressão de IL-10 determinou melhor desempenho cognitivo. No grupo CCND, menor expressão de TNF- α associou-se ao melhor desempenho cognitivo e menor comprometimento funcional. O grupo CCND associou-se à alta expressão de IL-6, que determinou declínio cognitivo em curto prazo. Entre os controles, menor expressão de TGF- β 1 associou-se à redução das habilidades cognitivas e funcionais em um ano.

8 PERSPECTIVAS

- Avaliar a expressão dos genes das citocinas estudadas e compará-las com os genótipos.
- Quantificar os níveis séricos das citocinas em cada grupo diagnóstico.
- Validar os resultados em outras populações com diferentes *backgrounds* genéticos.

REFERÊNCIAS

ADRIAENSEN, W. et al. Interleukin-6 predicts short-term global functional decline in the oldest old: results from the BELFRAIL study. **Age**, v. 36, n. 6, p. 9723, 2014.

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

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION (APA). Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders. 4^{ed}. Washington, DC: American Psychiatric Association, 1994.

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION (APA). Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders. 5^{ed}. Washington, DC: American Psychiatric Association, 2013.

AMOR, S. et al. Inflammation in neurodegenerative diseases. **Immunology**, v. 129, n. 2, p. 154-169, 2010.

ARARIA-GOUMIDI, L. et al. Association study of three polymorphisms of TGF-beta1 gene with Alzheimer's disease. **J Neurol Neurosurg Psychiatry**, v. 73, n. 1, p. 62-4, 2002.

ARISI, G. M. Nervous and immune systems signals and connections: Cytokines in hippocampus physiology and pathology. **Epilepsy and Behavior**, 5 p. (In press), 2014.

AROSIO, B. et al. Interleukin-10 and interleukin-6 gene polymorphisms as risk factors for Alzheimer's disease. **Neurobiol Aging**, v. 25, n. 8, p. 1009-15, 2004.

BARBOSA, M. T. et al. Parkinsonism and Parkinson's disease in the elderly: A community-based survey in Brazil (the Bambuí Study). **Movement Disorders**, v. 21, n. 6, p. 800-808, 2006.

BARON, R. et al. IFN- gamma enhances neurogenesis in wild-type mice and in a mouse model of Alzheimer's disease. **FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 22, n. 8, p. 2843, 2008.

BARRES, B. A. The Mystery and Magic of Glia: A Perspective on Their Roles in Health and Disease. **Neuron**, v. 60, n. 3, p. 430-440, 2008.

BAUNE, B. T. et al. Association between genetic variants of IL-1beta, IL-6 and TNF-alpha cytokines and cognitive performance in the elderly general population of the MEMO-study. **Psychoneuroendocrinology**, v. 33, n. 1, p. 68-76, 2008.

BERNARD, B. A. et al. MMSE - Mini-Mental State Examination. In: (Ed.). **Encyclopedia of Movement Disorders**. Oxford: Academic Press, 2010. p.187-189.

BLAY, S. L. et al. Depression morbidity in later life: Prevalence and correlates in a developing country. **American Journal of Geriatric Psychiatry**, v. 15, n. 9, p. 790-799, 2007.

BLENNOW, K.; DE LEON, M. J.; ZETTERBERG, H. Alzheimer's disease. **The Lancet**, v. 368, n. 9533, p. 387-403, 2006.

BOSCO, P. et al. Role of the transforming-growth-factor- β 1 gene in late-onset alzheimer's disease: Implications for the treatment. **Current Genomics**, v. 14, n. 2, p. 147-156, 2013.

BRUCKI, S. M. D. et al. Sugestões para o uso do mini- exame do estado mental no Brasil. **Suggestions for utilization of the mini-mental state examination in Brazil**, v. 61, n. 3B, p. 777-781, 2003.

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

BURLÁ, C. et al. A perspective overview of dementia in Brazil: a demographic approach. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 18, n. 10, p. 2949-2956, 2013.

BYGBJERG, I. C. Double burden of noncommunicable and infectious diseases in developing, countries. **Science**, v. 337, n. 6101, p. 1499, 2012.

CAMARANO, A. A.; KANSO, S. Perspectivas de crescimento para a população brasileira: velhos e novos resultados. Texto para discussão número 1426, **Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada**. 31 p., 2009.

CAMPBELL, N. L. et al. Risk Factors for the Progression of Mild Cognitive Impairment to Dementia. **Clinics in Geriatric Medicine**, v. 29, n. 4, p. 873-893, 2013.

CARACI, F. et al. TGF-beta1 pathway as a new target for neuroprotection in Alzheimer's disease. **CNS Neurosci Ther**, v. 17, n. 4, p. 237-49, 2011.

CARACI, F. et al. Dysfunction of TGF-beta1 signaling in Alzheimer's disease: perspectives for neuroprotection. **Cell Tissue Res**, v. 347, n. 1, p. 291-301, 2012.

CARAMELLI, P. et al. The Pieta study: epidemiological investigation on successful brain aging in Caete (MG), Brazil. Methods and baseline cohort characteristics. **Arq Neuropsiquiatr**, v. 69, n. 4, p. 579-84, 2011.

CARUSO, C. et al. Aging, longevity, inflammation, and cancer. **Signal Transduction and Communication in Cancer Cells**, v. 1028, p. 1-13, 2004.

CARVALHO, J. A. M. D.; GARCIA, R. A. O envelhecimento da população brasileira: um enfoque demográfico. **Cad. Saúde Pública**, v. 19, n. 3, p. 725-733, 2003.

CHANG, W. et al. Meta-analysis of the transforming growth factor-beta 1 polymorphisms and susceptibility to Alzheimer's disease. **Journal of Neural Transmission**, v. 120, n. 2, p. 353-360, 2013.

CHARFEDDINE, B. et al. Association study of interferon-gamma and interleukin 10 gene polymorphisms in Alzheimer's disease. **European Journal of Neurology**, v. 21, p. 390-390, 2014.

CHEN, J. H.; LIN, K. P.; CHEN, Y. C. **Risk factors for dementia**, p. 754-764, 2009.

CORDER, E. H. et al. Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. **Science**, v. 261, n. 5123, p. 921-923, 1993.

DECARLI, C. Mild cognitive impairment: prevalence, prognosis, aetiology, and treatment. **Lancet Neurol**, v. 2, n. 1, p. 15-21, 2003.

DESAI, A. K.; GROSSBERG, G. T.; CHIBNALL, J. T. Healthy Brain Aging: A Road Map. **Clinics in Geriatric Medicine**, v. 26, n. 1, 16 p., 2010.

DI BONA, D. et al. Systematic review by meta-analyses on the possible role of TNF-alpha polymorphisms in association with Alzheimer's disease. **Brain Res Rev**, v.61, p.60-8, 2009.

DI BONA, D. et al. Association between interleukin-10 polymorphisms and alzheimer's disease: A systematic review and meta-analysis. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 29, n. 4, p. 751-759, 2012.

EROGLU, C.; BARRES, B. A. Regulation of synaptic connectivity by glia. **Nature**, v. 468, n. 7321, p. 223-231, 2010.

FERRUCCI, L. et al. Change in muscle strength explains accelerated decline of physical function in older women with high interleukin-6 serum levels. **J Am Geriatr Soc**, v. 50, n. 12, p. 1947-54, 2002.

FILIANO, A. J.; GADANI, S. P.; KIPNIS, J. Interactions of innate and adaptive immunity in brain development and function. **Brain Research**, 10 p. (In press), 2009.

FJELL, A. M.; WALHOVD, K. B. Structural brain changes in aging: courses, causes and cognitive consequences. **Rev Neurosci**, v. 21, n. 3, p. 187-221, 2010.

FLEX, A. et al. Effect of proinflammatory gene polymorphisms on the risk of Alzheimer's disease. **Neurodegener Dis**, v.13,p.230-6, 2014.

FORLENZA, O. V.; CHIU, E. Mild cognitive impairment: a concept ready to move on? **Curr Opin Psychiatry**, v.21, p.529-32, 2008.

FRANKLIN, ROBIN J. M.; BUSSEY, TIMOTHY J. Do your glial cells make you clever? **Cell Stem Cell**, v. 12, n. 3, p. 265-266, 2013.

GAHTAN, E.; OVERMIER, J. B. Inflammatory pathogenesis in Alzheimer's disease: biological mechanisms and cognitive sequeli. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 23, n. 5, p. 615-633, 1999.

GALIMBERTI, D.; SCARPINI, E. Inflammation and oxidative damage in Alzheimer's disease: friend or foe? **Front Biosci (Schol Ed)**, v. 3, p. 252-66, 2011.

GAUTHIER, S. et al. Mild cognitive impairment. **Lancet**, v. 367, n. 9518, p. 1262-70, 2006.

GIEBEL, C. M. et al. Deterioration of basic activities of daily living and their impact on quality of life across different cognitive stages of dementia: a European study. **International Psychogeriatrics**, v. 26, n. 8, p. 1283-1293, 2014.

GODINHO, C. et al. Estimation of the risk of conversion of mild cognitive impairment of Alzheimer type to Alzheimer's disease in a south Brazilian population-based elderly cohort: The PALA study. **International Psychogeriatrics**, v. 24, n. 4, p. 674-681, 2012.

GRAHAM, J. E. et al. Prevalence and severity of cognitive impairment with and without dementia in an elderly population. **Lancet**, v. 349, n. 9068, p. 1793-1796, 1997.

GUO, Z.; BINSWANGER, U.; KNOFLACH, A. Role of codon 10 and codon 25 polymorphisms on TGF- β 1 gene expression and protein synthesis in stable renal allograft recipients. **Transplantation Proceedings**, v. 34, n. 7, p. 2904-2906, 2002.

HENDRIE, H. C. et al. The NIH Cognitive and Emotional Health Project. Report of the Critical Evaluation Study Committee. **Alzheimers Dement**, v. 2, n. 1, p. 12-32, 2006.

HENDRIE, H. C. et al. APOE epsilon 4 and the risk for Alzheimer disease and cognitive decline in African Americans and Yoruba. **International Psychogeriatrics**, v. 26, n. 6, p. 977-985, 2014.

HENRICH-NOACK, P.; PREHN, J. H.; KRIEGLSTEIN, J. Neuroprotective effects of TGF-beta 1. **J Neural Transm Suppl**, v. 43, p. 33-45, 1994.

HERRERA JR, E. et al. Epidemiologic survey of dementia in a community- dwelling Brazilian population. **Alzheimer Disease and Associated Disorders**, v. 16, n. 2, p. 103-108, 2002.

HJORTH, E.; ZHU, M.; SCHULTZBERG, M. STIMULATE RESOLUTION OF INFLAMMATION AS A STRATEGY FOR ALZHEIMER'S DISEASE. **Alzheimer's & Dementia**, v. 10, n. 4, Supplement, p. P860, 2014.

HOLMES, C. Dementia. **Medicine**, v. 36, n. 9, p. 467-470, 2008.

HUA, Y. et al. Association between interleukin-6 -174G/C polymorphism and the risk of Alzheimer's disease: A meta-analysis. **International Journal of Neuroscience**, v. 123, n. 9, p. 626-635, 2013.

HURME, M. et al. Interleukin-6 -174G/C polymorphism and longevity: a follow-up study. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 126, n. 3, p. 417-418, 2005.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). Censo demográfico de 2000. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/censo2000/>>. Acesso em: 15 de novembro de 2014.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). Censo demográfico de 2010. Disponível em: <<http://censo2010.ibge.gov.br/resultados>>. Acesso em: 15 de novembro de 2014.

JABBARI AZAD, F. et al. Association between Cytokine Production and Disease Severity in Alzheimer's Disease. **Iran J Allergy Asthma Immunol**, v. 13, n. 6, p. 433-9, 2014.

KETTENMANN, H. et al. Physiology of microglia. **Physiological Reviews**, v. 91, n. 2, p. 461-553, 2011.

KETTENMANN, H.; KIRCHHOFF, F.; VERKHRATSKY, A. Microglia: New Roles for the Synaptic Stripper. **Neuron**, v. 77, n. 1, p. 10-18, 2013.

KIM, S. J. et al. Interferon-gamma promotes differentiation of neural progenitor cells via the JNK pathway. **Neurochem Res**, v. 32, n. 8, p. 1399-406, 2007.

LANGA, K. M.; LEVINE, D. A. The diagnosis and management of mild cognitive impairment: A clinical review. **JAMA - Journal of the American Medical Association**, v. 312, n. 23, p. 2551-2561, 2014.

LICASTRO, F. et al. Genetic risk profiles for Alzheimer's disease: Integration of APOE genotype and variants that up-regulate inflammation. **Neurobiology of Aging**, v. 28, n. 11, p. 1637-1643, 2007.

LIO, D. et al. Interleukin-10 promoter polymorphism in sporadic Alzheimer's disease. **Genes Immun**, v. 4, n. 3, p. 234-8, 2003.

LIU, J. et al. T cells promote the regeneration of neural precursor cells in the hippocampus of Alzheimer's disease mice. **Neural Regen Res**, v. 9, n. 16, p. 1541-7, 2014.

LOURENCO, M. V. et al. TNF-alpha mediates PKR-dependent memory impairment and brain IRS-1 inhibition induced by Alzheimer's beta-amyloid oligomers in mice and monkeys. **Cell Metab**, v.18, n.6, p. 831-43, 2013.

LUO, X. G.; DING, J. Q.; CHEN, S. D. Microglia in the aging brain: relevance to neurodegeneration. **Mol Neurodegener**, v.5, p.1-9, 2010.

LUTERMAN, J. D. et al. Cytokine gene expression as a function of the clinical progression of Alzheimer disease dementia. **Archives of Neurology**, v. 57, n. 8, p. 1153-1160, 2000.

MA, M. et al. Intranasal delivery of transforming growth factor-beta1 in mice after stroke reduces infarct volume and increases neurogenesis in the subventricular zone. **BMC Neurosci**, v. 9, p.117-127, 2008.

MAIER, S. F.; WATKINS, L. R. Cytokines for psychologists: Implications of bidirectional immune-to-brain communication for understanding behavior, mood, and cognition. **Psychological Review**, v. 105, n. 1, p. 83-107, 1998.

MANLY, J. J. et al. Frequency and course of mild cognitive impairment in a multiethnic community. **Annals of Neurology**, v. 63, n. 4, p. 494-506, 2008.

MARIN, I.; KIPNIS, J. Learning and memory ... and the immune system. **Learn Mem**, v. 20, n. 10, p. 601-6, 2013.

MARTINEZ-CANABAL, A. Potential neuroprotective role of transforming growth factor beta1 (TGFbeta1) in the brain. **Int J Neurosci**, v. 125, n. 1, p. 1-9, 2015.

MCAFOOSE, J.; BAUNE, B. T. Evidence for a cytokine model of cognitive function. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 33, n. 3, p. 355-366, 2009.

MCGEER, P. L.; MCGEER, E. G. The amyloid cascade-inflammatory hypothesis of Alzheimer disease: implications for therapy. **Acta Neuropathologica**, v. 126, n. 4, p. 479-497, 2013.

MICHAUD, M. et al. Proinflammatory cytokines, aging, and age-related diseases. **Journal of the American Medical Directors Association**, v. 14, n. 12, p. 877-882, 2013.

MORA, F. Successful brain aging: plasticity, environmental enrichment, and lifestyle. **Dialogues Clin Neurosci**, v. 15, n. 1, p. 45-52, 2013.

NAUDE, P. J. W. et al. Analysis of cognition, motor performance and anxiety in young and aged tumor necrosis factor alpha receptor 1 and 2 deficient mice. **Behavioural Brain Research**, v. 258, p. 43-51, 2014.

NIRANJAN, R. Molecular Basis of Etiological Implications in Alzheimer's Disease: Focus on Neuroinflammation. **Molecular Neurobiology**, v. 48, n. 3, p. 412-428, 2013.

NITRINI, R. et al. Diagnosis of Alzheimer's disease in Brazil: cognitive and functional evaluation. Recommendations of the Scientific Department of Cognitive Neurology and Aging of the Brazilian Academy of Neurology. **Arq Neuropsiquiatr**, v.63, p.720-7, 2005.

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, 1994.

NORDEN, D. M.; GODBOUT, J. P. Review: Microglia of the aged brain: primed to be activated and resistant to regulation. **Neuropathology and Applied Neurobiology**, v. 39, n. 1, p. 19-34, 2013.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS). Dementia: a public health priority. 112 p., 2012.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS). Global health and ageing. 32 p., 2011.

PALTA, P. et al. Interleukin-6 and C-Reactive Protein Levels and 9-Year Cognitive Decline in Community-Dwelling Older Women: The Women's Health and Aging Study II. **J Gerontol A Biol Sci Med Sci**, p. 1-6, 2014.

PANDA, A. et al. Human innate immunosenescence: causes and consequences for immunity in old age. **Trends in Immunology**, v. 30, n. 7, p. 325-333, 2009.

PARK, D. C.; YEO, S. G. Aging. **Korean J Audiol**, v. 17, n. 2, p. 39-44, 2013.

PATTERSON, C. et al. General risk factors for dementia: A systematic evidence review. **Alzheimer's & Dementia**, v. 3, n. 4, p. 341-347, 2007.

PAYAO, S. L. et al. Association of interleukin 1beta polymorphisms and haplotypes with Alzheimer's disease. **J Neuroimmunol**, v. 247, n. 1-2, p. 59-62, 2012.

PFEFFER, R. I. et al. Measurement of functional activities in older adults in the community. **J Gerontol**, v. 37, n. 3, p. 323-9, 1982.

PFRIEGER, F. W. Role of glial cells in the formation and maintenance of synapses. **Brain Research Reviews**, v. 63, n. 1-2, p. 39-46, 2010.

PLASSMAN, B. L. et al. Prevalence of cognitive impairment without dementia in the United States. **Ann Intern Med**, v. 148, n. 6, p. 427-34, 2008.

PRESTON, S. H.; STOKES, A. Sources of population aging in more and less developed countries. **Population and Development Review**, v. 38, n. 2, p. 221-236, 2012.

READ, J.; BRENNER, S.; MILLER, S. B. H. Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs). **Encyclopedia of Genetics**. New York: Academic Press, 2001.1838 p.

RODRIGUEZ-MARTINEZ, G.; VELASCO, I. Activin and TGF-beta effects on brain development and neural stem cells. **CNS Neurol Disord Drug Targets**, v. 11, n. 7, p. 844-55, 2012.

ROGERS, J. et al. Inflammation and Alzheimer's disease pathogenesis. **Neurobiol. Aging**, v. 17, n. 5, p. 681-686, 1996.

ROSES, A. D. Apolipoprotein E alleles as risk factors in Alzheimer's disease. **Annual Review of Medicine**,v.47, p.387-400,1996.

ROSSINI, P. M. et al. Clinical Neurophysiology of Brain Plasticity in Aging Brain. **Current Pharmaceutical Design**, v. 19, n. 36, p. 6426-6439, 2013.

ROTA, E. et al. Increased intrathecal TGF-beta1, but not IL-12, IFN- gamma and IL-10 levels in Alzheimer's disease patients. **Neurological sciences : official journal of the Italian Neurological Society and of the Italian Society of Clinical Neurophysiology**, v. 27, n. 1, p. 33, 2006.

SCHNEIDER, J. A. et al. The neuropathology of probable Alzheimer disease and mild cognitive impairment. **Ann Neurol**, v. 66, n. 2, p. 200-8, 2009.

SCHOENI, R. F.; OFSTEDAL, M. B. Keythemes in research on the demography of aging. **Demography**, v. 47, p. S5-S15, 2010.

SCHROETER, M.; JANDER, S. T-cell cytokines in injury-induced neural damage and repair. **Neuromolecular Med**, v. 7, n. 3, p. 183-95, 2005.

SCHWARTZ, M.; KIPNIS, J. A conceptual revolution in the relationships between the brain and immunity. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 25, n. 5, p. 817-819, 2011.

SHADYAB, A. H.; LACROIX, A. Z. Genetic factors associated with longevity: A review of recent findings. **Ageing Research Reviews**, v. 19, n. 0, p. 1-7, 2015.

SHANKAR, S. K. Biology of aging brain. **Indian Journal of Pathology and Microbiology**, v. 53, n. 4, p. 595-604, 2010.

SHEN, W. X. et al. TGF-beta1 Protection against Abeta1-42-Induced Neuroinflammation and Neurodegeneration in Rats. **Int J Mol Sci**, v. 15, n. 12, p. 22092-108, 2014.

SMITH, J. A. et al. Role of pro-inflammatory cytokines released from microglia in neurodegenerative diseases. **Brain research bulletin**, v. 87, n. 1, p. 10-20, 2012.

SOUSA, R. M. et al. Contribution of chronic diseases to disability in elderly people in countries with low and middle incomes: a 10/66 Dementia Research Group population-based survey. **Lancet**, v. 374, n. 9704, p. 1821-1830, 2009.

STRLE, K. et al. Interleukin-10 in the brain. **Critical Reviews in Immunology**, v. 21, n. 5, p. 427-449, 2001.

SWARDFAGER, W. et al. A Meta-Analysis of Cytokines in Alzheimer's Disease. **Biological Psychiatry**, v. 68, n. 10, p. 930-941, 2010.

TICHAUER, J. E.; VON BERNHARDI, R. Transforming growth factor-beta stimulates beta amyloid uptake by microglia through Smad3-dependent mechanisms. **J Neurosci Res**, v. 90, n. 10, p. 1970-80, 2012.

TUOKKO, H. et al. Five-year follow-up of cognitive impairment with no dementia. **Arch Neurol**, v. 60, n. 4, p. 577-82, 2003.

TWYMAN, R. M.; SQUIRE, L. R. Single-Nucleotide Polymorphism (SNP) Analysis. **Encyclopedia of Neuroscience**. Oxford: Academic Press, 2009. p.871-875.

VEGA, J. N.; NEWHOUSE, P. A. Mild Cognitive Impairment: diagnosis, longitudinal course, and emerging treatments. **Current Psychiatry Reports**, v. 16, p.490-501, n. 10, 2014.

VERAS, R. Envelhecimento populacional contemporâneo: demandas, desafios e inovações. **Rev Saúde Pública**, v. 43, n. 3, p. 548-54, 2009.

VERGHESE, J. et al. Inflammatory markers and gait speed decline in older adults. **J Gerontol A Biol Sci Med Sci**, v. 66, n. 10, p. 1083-9, 2011.

WAKE, H. et al. Microglia: Actively surveying and shaping neuronal circuit structure and function. **Trends in Neurosciences**, v. 36, n. 4, p. 209-217, 2013.

WANG, X. et al. Resolution of inflammation is altered in Alzheimer's disease. **Alzheimer's & Dementia**, v. 11, n. 1, p. 40-50, 2015.

WARD, A. et al. Mild cognitive impairment: disparity of incidence and prevalence estimates. **Alzheimers Dement**, v. 8, n. 1, p. 14-21, 2012.

WEBSITE: <<http://capitalnanet.blogspot.com.br/2013/05/300-anos-de-caete.html>>. Acesso em 10 de dezembro de 2014.

WERNER, P.; KORCZYN, A. D. Mild cognitive impairment: conceptual, assessment, ethical, and social issues. **Clinical Interventions in Aging**, v. 3, n. 3, p. 413-420, 2008.

WORTMANN, M. Dementia: a global health priority - highlights from an ADI and World Health Organization report. **Alzheimers Res Ther**, v. 4, n. 5, p. 40, 2012.

WYSS-CORAY, T.; ROGERS, J. Inflammation in Alzheimer Disease-A Brief Review of the Basic Science and Clinical Literature. **Cold Spring Harbor Perspectives In Medicine**, v. 2, n. 1, 2012.


WYSS-CORAY, T. Inflammation in Alzheimer disease: driving force, bystander or beneficial response? **Nature Medicine**, v. 12, n. 9, p. 1005-1015, 2006.

XIE, L. et al. Cerebral regulatory T cells restrain microglia/macrophage-mediated inflammatory responses via IL-10. **Eur J Immunol**, v. 45, n. 1, p. 180-191, 2014.

YIRMIYA, R.; GOSHEN, I. Immune modulation of learning, memory, neural plasticity and neurogenesis. **Brain Behav Immun**, v. 25, n. 2, p. 181-213, 2011.

ZHU, M. et al. Differential regulation of resolution in inflammation induced by amyloid-beta42 and lipopolysaccharides in human microglia. **J Alzheimers Dis. Netherlands**, v.43, p.1237-50, 2015.

APÊNDICE A – Parecer do Comitê de Ética

	Universidade Federal de Minas Gerais <i>Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG - COEP</i>
---	--

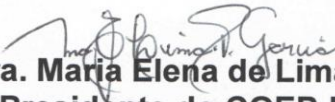
Parecer nº. ETIC 126/07

Interessado(a): Prof. Paulo Caramelli
Depto. Clínica Médica
Fac. Medicina -UFMG

DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 27 de abril de 2007, após atendidas as solicitações de diligência, o projeto de pesquisa intitulado **“Estudo Pietá: investigação epidemiológica sobre envelhecimento cerebral bem sucedido em Caeté (MG)”** bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.


Profa. Dra. Maria Elena de Lima Perez Garcia
Presidente do COEP-UFMG

APÊNDICE B – Artigo publicado durante o mestrado

Journal of Pediatric Genetics 3 (2014) 17–28
 DOI 10.3233/JPG-140084
 IOS Press

17

Adiponectin gene polymorphisms: Association with childhood obesity

Vanêssa Gomes Fraga and Karina Braga Gomes*

Department of Clinical and Toxicological Analysis, Faculty of Pharmacy, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

Received 24 April 2014

Revised 24 May 2014

Accepted 10 July 2014

Abstract. The current childhood obesity epidemic represents a particular challenge for public health. Understanding of the etiological mechanisms of obesity remains integral in treating this complex disorder. In recent years, studies have elucidated the influence of hormones secreted by adipose tissue named adipokines. Adiponectin is a adipokine that exhibits important anti-inflammatory, insulin-sensitizing and anti-atherogenic properties and it is strongly associated to obesity development. It is well known that adiponectin levels decrease with obesity. Furthermore, studies show that some single nucleotide polymorphisms in the gene encoding adiponectin, *ADIPOQ*, may influence the expression of this protein. The objective of this paper is to provide an up-to-date review of *ADIPOQ* polymorphisms in the context of childhood obesity.

Keywords: Adiponectin, adipokines, childhood obesity, polymorphisms

1. Introduction

Childhood obesity is a significant challenge to global public health in the 21st century. Current estimates show that, worldwide, over 43 million children are overweight or obese [1]. The prevalence of overweight and obese children had increased from 4.2% in 1990 to 6.7% in 2010 worldwide and is expected to reach 9.1%, or about 60 million in 2020 [2]. According to World Health Organization, in 2012 the prevalence of overweight children varies from 6.4% in Africa to 12.1% in Europe [3]. In USA, the prevalence of obese and overweight children and adolescents reaches 31.8% [4]. It is known that overweight and obesity are risk factors for several complications for life, such as cardiovascular diseases [5–7], metabolic syndrome [8–10], type

2 diabetes mellitus [11, 12] and dyslipidemia [12–14], including those occurring in childhood.

In order to reduce the prevalence of obesity, its underlying etiology must be well understood. Sedentary behavior and high calorie diets are certainly important as environmental risk factors. However, it is also necessary to understand the role of predisposing factors, such as genetic and epigenetic mechanisms. Family studies have demonstrated the influence of genes on the occurrence of obesity, and today at least 52 genetic loci are associated with obesity-related traits [15]. However, little is known about the genetic basis of obesity in the pediatric population. Thus, the current understanding is that pediatric obesity largely corresponds to a complex phenotype modulated by gene-environment interactions that influence health in adulthood [16].

For many years, it was believed that adipose tissue was mainly for lipid storage, mechanical protection and thermal balance of the body. However, numerous studies throughout the last several decades have

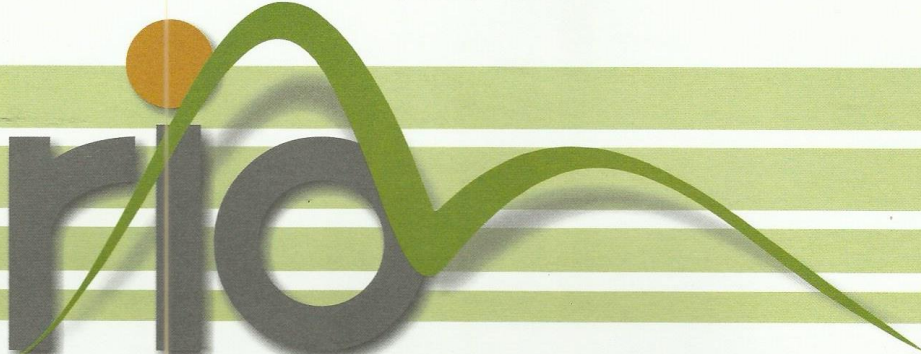
*Corresponding author: Karina Braga Gomes, PhD, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Avenida Antônio Carlos, 6627, Pampulha, Belo Horizonte, Minas Gerais, 31270-901, Brazil. Tel: +55 31 3409 6895; Fax: +55 31 3409 6985; E-mail: karinabgb@gmail.com.

APÊNDICE C – Apresentação de trabalhos em encontros científicos

Certificamos que

VANÊSSA GOMES FRAGA

participou do






**48º Congresso Brasileiro de Patologia Clínica
Medicina Laboratorial** *Exposição Técnico-Científica*

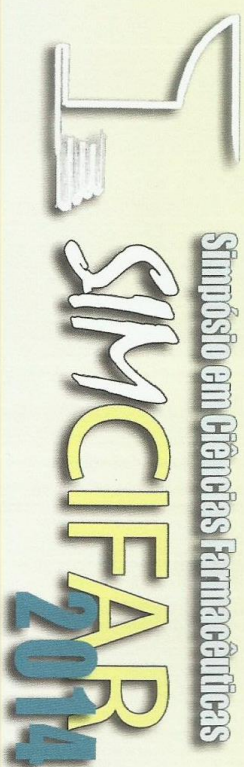
**A evolução do conhecimento científico
e as contribuições da Medicina Laboratorial**

2014
setembro
9 a 12

Centro de Convenções SulAmérica
www.cbpcml.org.br

na qualidade de autor responsável do tema livre "**MENOR EXPRESSÃO DO GENE TGF- β 1
ESTÁ ASSOCIADA AO COMPROMETIMENTO COGNITIVO NÃO DEMÊNCIA E À
DEMÊNCIA EM IDOSOS**", tendo como co-autores "GUIMARAES, H. C., CARAMELLI, P.,
BORGES, K. B. G."

realização:   



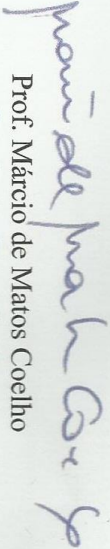
Certificação


Certificamos que o resumo **MENOR EXPRESSÃO DO GENE TGF-BETA1 ESTÁ ASSOCIADA À DEMÊNCIA E AO COMPROMETIMENTO COGNITIVO NÃO DEMÊNCIA EM IDOSOS**

dos autores **FRAGA, V.G.; GUIMARÃES, H.C.; CARAMELLI, P.; BORGES, K. B. G.**

foi apresentado por **Vanêssa Gomes Fraga** durante sessão de painéis no Simposio em Ciências Farmacêuticas (SIMCIFAR 2014) realizado pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, no período de 28 a 30 de agosto de 2014, na Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais.

Belo Horizonte, 30 de agosto de 2014.


Prof. Márcio de Matos Coelho
Comissão Organizadora


Ana Luíza Chaves Maia
Comissão Organizadora