

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE MEDICINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

LIARA RIZZI

MARCADORES INFLAMATÓRIOS NO COMPROMETIMENTO COGNITIVO LEVE

AMNÉSICO: ESTUDO CASO-CONTROLE

PORTO ALEGRE

2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE MEDICINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

MARCADORES INFLAMATÓRIOS NO COMPROMETIMENTO COGNITIVO LEVE

AMNÉSICO: ESTUDO CASO-CONTROLE

LIARA RIZZI

Orientador: Matheus Roriz-Cruz

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, UFRGS, como requisito para obtenção do título de Mestre.

PORTO ALEGRE

2014

CIP - Catalogação na Publicação

RIZZI, LIARA
MARCADORES INFLAMATÓRIOS NO COMPROMETIMENTO
COGNITIVO LEVE AMNÉSICO: ESTUDO CASO-CONTROLE /
LIARA RIZZI. -- 2014.
68 f.

Orientador: MATHEUS RORIZ CRUZ.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa
de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Porto
Alegre, BR-RS, 2014.

1. INFLAMAÇÃO. 2. DOENÇA DE ALZHEIMER. 3.
COMPROMETIMENTO COGNITIVO LEVE. 4. CITOCINAS. I.
RORIZ CRUZ, MATHEUS, orient. II. Título.

Dedicatória

“Dedico o presente trabalho aos acometidos pela Doença de Alzheimer e aos seus cuidadores, assim como aos voluntários que participaram desta pesquisa”.

Agradecimentos

Agradeço aos meus pais, que sempre primaram pela educação, pelo apoio incondicional, incentivo, amor e presença constante.

Às minhas irmãs, que mesmo longe, sempre estão ao meu lado.

Ao meu orientador pela confiança e autonomia conferidas e pela disposição em auxiliar sempre que necessário.

Ao Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas e à Universidade Federal do Rio Grande do Sul pelo acolhimento.

Ao Serviço de Neurologia, ao Hospital de Clínicas de Porto Alegre, ao CPDA e à UAMP pelo espaço para o desenvolvimento deste trabalho.

À CAPES/CNPq e ao FIPE pelo incentivo financeiro ao projeto.

À todos que de alguma forma auxiliaram, direta ou indiretamente, na realização desta dissertação e que contribuíram para a minha formação.

Muito Obrigada.

"No esforço para compreender a realidade, somos como um homem tentando entender o mecanismo de um relógio fechado. Ele vê o mostrador e os ponteiros, ouve o seu tique-taque, mas não tem meios para abrir a caixa. Se esse homem for habilidoso, poderá imaginar um mecanismo responsável pelos fatos que observa, mas nunca poderá ficar completamente seguro de que sua hipótese seja a única possível."

Albert Einstein

Resumo

Introdução: A Doença de Alzheimer (DA) é uma desordem neurodegenerativa e a forma mais comum de demência. Processos inflamatórios parecem desempenhar importante papel na fisiopatologia da DA. A neuroinflamação é caracterizada pela ativação da microglia e a liberação de citocinas inflamatórias, tais como IL-1 β , IL-6 e TNF- α . Porém, não se sabe qual é a real contribuição destes marcadores inflamatórios no desenvolvimento da DA.

Objetivos: A proposta deste estudo é avaliar a possível relação entre marcadores inflamatórios no líquido cefalorraquidiano de indivíduos com comprometimento cognitivo leve amnésico (CCL-a), com 60 anos ou mais, e comparar com controles saudáveis da mesma faixa etária.

Métodos: Foram examinadas as concentrações de IL-1 β , IL-6 e TNF- α no líquido cefalorraquidiano de sujeitos com CCL-a e em controles pelo método ELISA. Diagnósticos de CCL-a foram baseados na anamnese e nos critérios de Petersen, corroborados pela escala CDR. Para avaliar a função cognitiva o teste de memória e reconhecimento de palavras do CERAD e o Teste do Relógio foram aplicados aos participantes. Para a avaliação de sintomas depressivos usou-se o GDS.

Resultados: Este estudo demonstrou diminuição significativa nos níveis de IL-1 β (13.735 vs 22.932 pg/mL; p <0.001) e TNF- α (1.913 vs 2.627 pg/mL; p: 0.002), mas não nos níveis da IL-6 (4.178 vs 5.689 pg/mL; p: 0.106), entre casos e controles. Indivíduos com IL-1 β < 17 pg/mL possuem 7.2 (CI: 1.5-36; p: 0.016) mais chances de evoluírem à CCL-a. Além disso, houve correlação positiva entre IL-1 β e a pontuação da lista de palavras do CERAD (r_s : 0.299; p: 0.046). A análise de regressão linear mostrou que os níveis de IL-1 β podem explicar 13.7% (β : 24.545; p: 0.012) da variância da pontuação do CERAD, o que sugere uma dependência linear direta.

Conclusões: A neuroinflamação, mediada pela IL-1 β e pelo TNF- α , provavelmente possui importante papel na prevenção de CCL-a.

Palavras-chave: Inflamação; Doença de Alzheimer; Comprometimento Cognitivo Leve amnésico; IL-1 β ; IL-6; TNF- α .

Abstract

Introduction: Alzheimer Disease (AD) is a neurodegenerative disorder and the most common form of dementia. Inflammatory processes may play a significant role at the pathophysiology of AD. Neuroinflammation is characterized by activation of microglia and the release of inflammatory cytokines, such as IL-1 β , IL-6 and TNF- α . Although, it is unknown what is the real contribution of these inflammatory markers in the development of AD.

Aims: The purpose of this study is to assess the possibly relationship between inflammatory markers in CSF of amnesic MCI subjects, with sixty years or older, and compare to aged healthy controls.

Methods: We examined concentrations of IL-1 β , IL-6 and TNF- α at CSF of amnesic MCI subjects and controls by ELISA. MCI diagnoses were based on anamnesis and Petersen criteria, corroborated by CDR. To assess the cognitive function the word list memory test and word recognition of CERAD and Clock Drawing Test were applied to subjects, and to evaluated depression symptoms the GDS was used.

Results: This study demonstrated significant diminish in the levels of IL-1 β (13.735 vs 22.932 pg/mL; $p < 0.001$) and TNF- α (1.913 vs 2.627 pg/mL; $p: 0.002$), but not IL-6 (1.913 vs 2.627 pg/mL; $p: 0.002$), between cases and controls. Individuals with IL-1 $\beta < 17$ pg/mL were at a 7.2 (CI: 1.5-36; $p: 0.016$) increased odds of aMCI. Furthermore, there was a positive correlation between IL-1 β and the CERAD word list score ($r_s: 0.299$; $p: 0.046$). The linear regression analysis showed that IL-1 β levels can explain 13.7% ($\beta: 24.545$; $p: 0.012$) of the variance on this CERAD subscore, suggesting a direct linear dependence.

Conclusion: Neuroinflammation mediated by IL-1 β and TNF- α may play an important role in preventing aMCI.

Keywords: Inflammation; Alzheimer's disease; aMCI; IL-1 β ; IL-6; TNF- α .

Lista de Tabelas

Artigo

Table 1 - Subjects socio-demographic characteristics scores in accord with the baseline diagnosis.....	58
Table 2 - Cognitive and affective neuropsychological tests in accord with the baseline diagnosis.....	58
Table 3 - CSF levels of IL-1 β , IL-6 and TNF- α in MCI patients and healthy controls.....	58

Lista de Figuras

Artigo

Figure 1 - Boxplot of CERAD distribution in controls and MCI subjects.....59

Figure 2 - Boxplot of IL-1 β distribution in controls and MCI subjects.....60

Figure 3 - Linear regression analysis between CERAD and IL-1 β (pg/mL).....61

Lista de Abreviaturas e Siglas

AD – Alzheimer's disease

CCL- Comprometimento Cognitivo Leve

CCL-a - Comprometimento Cognitivo Leve amnésico

CCL-na - Comprometimento Cognitivo Leve não amnésico

CDR - Clinical Dementia Rating

CERAD - Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease

CSF – Cerebrospinal fluid

DA - Doença de Alzheimer

ELISA - Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

GDS - Geriatric Depression Scale

IL-1 β - Interleucina 1 Beta/ Interleukin 1 Beta

IL-6 - Interleucina 6/ Interleukin 6

IWG - International Working Group for New Research Criteria for the Diagnosis of Alzheimer's Disease

MCI - Mild Cognitive Impairment

NIA/AA - National Institute on Aging/ Alzheimer's Association

NINDS/ADRDA - National Institute of Neurological Disorders and Stroke/ Alzheimer's Disease and Related Disorders Association

PET - Positron Emission Tomography

TNF- α - Fator de Necrose Tumoral Alfa/ Tumor Necrosis Factor Alpha

Sumário

1. INTRODUÇÃO	12
2. REVISÃO DA LITERATURA	14
2.1 ESTRATÉGIAS PARA LOCALIZAR E SELECIONAR INFORMAÇÕES.....	14
2.2 A DOENÇA DE ALZHEIMER.....	15
2.2.1 CARACTERÍSTICAS ANATOMO-PATOLÓGICAS	16
2.2.2 DIAGNÓSTICO	17
2.2.3 COMPROMETIMENTO COGNITIVO LEVE AMNÉSICO.....	19
2.3 INFLAMAÇÃO.....	21
2.3.1 IL-1 β	23
2.3.2 TNF- α	24
2.3.3 IL-6.....	25
3. OBJETIVOS	26
3.1 OBJETIVOS GERAIS	26
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	26
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA REVISÃO	27
5. ARTIGO EM INGLÊS	38
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	62
7. ANEXOS	63
7.1 PROTOCOLO DE INVESTIGAÇÃO	63
7.2 TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	67

1. INTRODUÇÃO

A prevalência global de demência hoje é estimada em aproximadamente 35 milhões(1), sendo que desses casos cerca de 70% correspondem à Doença de Alzheimer (DA)(2). E, devido ao aumento da expectativa de vida, essa prevalência tende a aumentar nos próximos anos. A DA é uma desordem cerebral progressiva que causa perda gradual e irreversível de funções cerebrais superiores, incluindo memória, atenção, habilidades linguísticas, percepção e de tempo e espaço e, eventualmente, perda da habilidade de cuidar de si(3).

O quadro anatomopatológico da DA caracteriza-se pela atrofia cerebral difusa não uniforme, sendo que as áreas mais afetadas inicialmente são justamente as relacionadas à memória de curto prazo. A neuropatologia subjacente se inicia décadas antes dos primeiros sintomas clínicos. Sendo que as principais alterações patológicas observadas no tecido cerebral são depósitos de proteína β -amilóide, em difusas placas neuríticas, e acúmulos de proteína *Tau* hiperfosforilada intraneuronal, formando emaranhados neurofibrilares. A DA atualmente está definida em três principais estágios: pré-clínico, comprometimento cognitivo leve (CCL) e sintomático ou demencial(4).

CCL é, geralmente, mas não sempre, um estado de transição entre a cognição normal e a demência(5), em que as habilidades funcionais essenciais estão preservadas(6). CCL-amnésico (CCL-a) refere-se a indivíduos com comprometimento da memória episódica, podendo existir de forma isolada (único domínio), ou ser acompanhado por menores déficits cognitivos em outros domínios como linguagem, funções executivas, ou habilidades visuo-espaciais (múltiplos domínios)(5). Estudos demonstraram que indivíduos com CCL-a, tem um risco aumentado de desenvolver DA, com taxas de progressão anuais que variam de 5 a 40% por ano(7). Até o momento, não há métodos estabelecidos para prever a progressão para DA em pessoas com CCL(8).

Processos inflamatórios têm demonstrado estarem envolvidos com comprometimento da memória, prejuízo cognitivo e demência(9). Tais mecanismos são presumivelmente parte da resposta imune induzida pelo β -amilóide, o qual desencadeia reações pró-inflamatórias na microglia liberando mediadores imunológicos. Porém, sabe-se que citocinas pró-inflamatórias também podem estar envolvidas na neurodegeneração da DA(10). A associação de marcadores inflamatórios com alterações nas funções cognitivas tem sido base de diversos

estudos epidemiológicos. Diferentes marcadores inflamatórios têm sido estudados como possíveis mediadores da doença, entre os comumente referenciados destacam-se: a IL-1 β , o TNF- α e a IL-6, no entanto, os resultados ainda são inconsistentes.

A IL-1 β é uma citocina extremamente importante no início e no desenvolvimento da resposta imune inata e tem sido relatada por contribuir com a cascata pro-inflamatória e com a neurodegeneração. Essa interleucina tem sido comumente referenciada por aumentar a síntese e o processamento da proteína precursora amilóide pela via amiloidogênica(11).

TNF- α é um regulador chave de vários mecanismos fisiológicos de sinalização imune produzida pelas células gliais ou ainda por neurônios, macrófagos e outras células do sistema imunológico. No cérebro, serve como um gliotransmissor que circunda as sinapses e regula a comunicação entre os neurônios(12). No líquido cefalorraquidiano TNF- α é modulador da atividade sináptica e da potenciação de longo prazo. Além disso, na DA, TNF- α pode aumentar a produção de β -secretase, enzima que cliva a proteína precursora amilóide para a formação de peptídeos β (13).

Já a IL-6 é uma citocina pleiotrópica, a qual medeia respostas imunes e reações inflamatórias com a indução de proteínas da fase aguda e que afetam o crescimento das células do SNC. Normalmente é expressa durante o desenvolvimento e encontra-se em níveis quase indetectáveis no adulto, porém é fortemente induzida em condições patológicas(11). Há associações entre a IL-6 e comprometimento cognitivo em estudos populacionais(14).

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 ESTRATÉGIAS PARA LOCALIZAR E SELECIONAR INFORMAÇÕES

Foi realizada a revisão da literatura enfatizando-se os aspectos da fisiopatologia da Doença de Alzheimer, a abordagem da inflamação e a atuação de citocinas na patologia. A estratégia de busca envolveu as seguintes bases de dados: MEDLINE (PubMed) e Thomson Reuters (Web of Science). Foram selecionadas, principalmente, publicações dos últimos cinco anos, no entanto, não foram excluídos estudos comumente referenciados e conceituadas publicações mais antigas, nem foi feita restrição de idioma. As referências dos artigos utilizados foram revisadas de modo a encontrar outras não contempladas na busca. As buscas foram realizadas através de combinações dos termos: '*Alzheimer's disease*', '*Mild Cognitive Impairment*', '*CSF inflammation*', '*IL-1 β* ', '*Il-6*' e '*TNF- α* '.

2.2 A DOENÇA DE ALZHEIMER

Alois Alzheimer, psiquiatra clínico e neuroanatomista, descreveu pela primeira vez em 1906 a doença neurodegenerativa progressiva e fatal que hoje é denominada Doença de Alzheimer (DA), em sua homenagem(15). Ele foi pioneiro em reconhecer e correlacionar os sintomas da doença com as alterações cerebrais microscópicas que observou na época, densos depósitos ao redor das células nervosas (as placas amilóides) e fibras trançadas dentro das células nervosas (os emaranhados neurofibrilares)(16). Quando descobriu, Dr. Alzheimer achou que se tratava de uma doença rara, no entanto, atualmente a DA é considerada o tipo mais comum de demência senil, correspondendo a cerca de 70-80% dos casos(17), e afeta mais de 35 milhões de pessoas em todo o mundo (18, 19). A DA poderá ser considerada uma epidemia em 20 ou 30 anos se não for controlada, hoje já representa uma grande preocupação de saúde pública com desfechos sociais e econômicos importantes(20). Nos Estados Unidos corresponde à terceira causa *mortis*, atrás somente da doença cardíaca e do câncer(21). É considerada a doença geriátrica que mais acarreta anos de vida perdidos devido à incapacidade ou morte prematura(22). A DA é uma doença devastadora, os acometidos experimentam frustração e medo quando a doença começa a comprometer suas habilidades e memória. Já os cuidadores e familiares sofrem o estresse e a dor de vê-los padecer.

Desde o seu descobrimento, há mais de 100 anos, o relato do Dr. Alzheimer não perdeu significância clínica, no entanto, ainda há muitas descobertas a serem feitas acerca da patologia, prognóstico e diagnóstico da doença. A pesquisa nos sintomas, causas, fatores de risco e tratamentos somente ganhou impulso nos últimos 30 anos. Em 1960, muitos anos após a descoberta da doença, cientistas correlacionaram o declínio cognitivo com o número de placas amilóides no cérebro e consideraram, finalmente, que esse processo não fazia parte do envelhecimento normal. As proteínas que formavam as placas e os emaranhados neurofibrilares vistos por Alois Alzheimer foram identificadas somente mais tarde, em 1984(23) e 1986(24), respectivamente, sendo nomeadas de proteína β -amilóide e proteína *Tau*. No entanto, o incentivo para a padronização de marcadores químicos (biomarcadores) somente se iniciou em 2009. Em 2011 e 2012, finalmente, foram estabelecidos critérios e diretrizes para a DA e foi proposta uma agenda de pesquisa de modo a definir o estágio pré-clínico da doença(25-27).

O principal fator de risco conhecido para o desenvolvimento da DA é a idade, a partir dos 65 anos há um aumento na prevalência da doença, uma em cada nove pessoas com 65

anos ou mais (11%) tem a doença(28). Ressalta-se que a DA não faz parte do envelhecimento normal, assim somente idade avançada não é suficiente para causar a doença. Outro fator de risco é o genético, no entanto, mesmo que o indivíduo possua familiares de primeiro grau com a doença, fatores ambientais e estilo de vida tem papel fundamental no desenvolvimento ou não da patologia(29). Pessoas com comprometimento cognitivo, especialmente no quesito memória, também são prováveis de desenvolverem a DA ou outro tipo de demência(26). Fatores de risco cardiovasculares estão intimamente ligados ao desenvolvimento da DA, pois a saúde do cérebro está ligada à saúde do coração e dos vasos sanguíneos, que é nutrido por eles. Assim, fatores que aumentam o risco de complicações cardiovasculares(30) também aumentam o risco de desenvolver a DA, como: fumo(31), obesidade(32, 33), diabetes(34), hipertensão(35). Outros fatores modificáveis e que também são causa de DA são não estar socialmente nem mentalmente ativo, os quais, geralmente, estão relacionados com o nível educacional dos indivíduos. É sabido que quanto maior o nível de escolaridade do indivíduo, maior é sua reserva cognitiva, logo, o risco de desenvolver DA diminui(36), e que a variação individual na reserva cognitiva pode obscurecer a relação entre a gravidade da patologia e desempenho cognitivo(37).

2.2.1 CARACTERÍSTICAS ANATOMO-PATOLÓGICAS

O processo patológico costuma evoluir de forma lenta e a sobrevida média dos indivíduos após o diagnóstico é de quatro a sete anos, dependendo de fatores como estilo de vida e comorbidades associadas(38). O quadro anatomopatológico da DA se caracteriza por atrofia cerebral difusa não uniforme, sendo que as áreas mais afetadas inicialmente são as relacionadas à memória de curto prazo. Nos estágios iniciais, primariamente o lobo temporal medial é afetado, seguindo progressivamente para as áreas associativas neocorticais(39). Ao microscópio nota-se a perda de neurônios e a degeneração sináptica. A DA instala-se quando o processamento de proteínas do sistema nervoso central ocorre de maneira incorreta. Surgem, então, fragmentos de proteínas tóxicas dentro dos neurônios e nos espaços que existem entre eles. Como consequência dessa toxicidade, ocorre perda progressiva de neurônios e sinapses em certas regiões do cérebro, como o hipocampo, que controla a memória, e o córtex cerebral, essencial para a linguagem, arrazoamento, memória, reconhecimento de estímulos sensoriais e pensamento abstrato(40).

Duas principais alterações patológicas são encontradas em indivíduos acometidos pela doença: as placas senis, formadas pela proteína chamada de β -amilóide e são encontradas no meio extracelular, e os emaranhados neurofibrilares formados pela proteína *Tau*, a qual se deposita no interior dos neurônios. A proteína β -amilóide se deposita em placas que causam destruição de neurônios por criar um processo inflamatório crônico, interferir com a regulação de cálcio - essencial para a condução dos estímulos nervosos - e aumentar a produção de radicais livres, que tóxicos para as células nervosas(41). Os emaranhados neurofibrilares são compostos de formas hiperfosforiladas da proteína *Tau* e favorecem a degeneração neuronal e sináptica(20).

O quadro clínico se inicia com alterações na memória de curto prazo, secundárias à degeneração hipocampal, as quais evoluem com progressiva dependência para as atividades da vida diária, restrição ao leito e óbito. O processo é tipicamente insidioso, com queixas de dificuldade de memorização e desinteresse pelos acontecimentos diários. Inicialmente é comprometida a memória de trabalho, porém a perda de memória é progressiva e obedece a um gradiente temporal, segundo o qual a incapacidade para lembrar fatos recentes, contrasta com a facilidade para recordar o passado. Com o tempo a dificuldade de aprendizado se acentua, assim como a linguagem torna-se desprovida de significado, embora a fluência possa ser mantida. A orientação espaço-visual se deteriora, criando dificuldade de orientação e de reconhecimento de lugares anteriormente bem conhecidos(3). O quadro degenerativo se estende às funções motoras(42, 43). Na fase avançada, mutismo, desorientação espacial, incapacidade de reconhecer faces, de controlar esfíncteres, de realizar as tarefas de rotina, alteração do ciclo sono/vigília e dependência total de terceiros são sintomas característicos da doença.

2.2.2 DIAGNÓSTICO

Há décadas o diagnóstico definitivo da doença somente é possível após o óbito do paciente, na autópsia *post-mortem*, onde serão identificadas e quantificadas as marcas histológicas da doença: as placas amilóides, que são compostas de agregados da proteína β -amilóide cercadas por processos neuronais danificados e inflamação, mediada pela glia reativa; e agregados intraneuronais compostos pela proteína *Tau* associada aos microtúbulos, formando filamentos helicoidais emparelhados, evidentes em neurites distróficas e

emaranhados neurofibrilares(44). No entanto, clinicamente e *ante-mortem*, há a possibilidade de diagnóstico da DA possível ou provável, considerando as suas clássicas manifestações clínicas, caso preencham os critérios clínicos. Em 1984 foram estabelecidos os primeiros critérios para diagnóstico clínico da DA pelo NINDS/ADRDA (National Institute of Neurological Disorders and Stroke/ Alzheimer's Disease and Related Disorders Association)(45), os quais foram revisados e atualizados em 2011 pelo NIA/AA (National Institute on Aging/ Alzheimer's Association)(25). Outro grupo em 2010, o IWG (International Working Group for New Research Criteria for the Diagnosis of Alzheimer's Disease) propôs um léxico comum para as comunidades clínicas e de pesquisa(46). Em 2012, NIA/AA propuseram novas diretrizes para auxiliar patologistas a descreverem e categorizarem as mudanças cerebrais associadas à DA e a outras demências(27). Ambos critérios, do NIA/AA e IWG foram reunidos e têm como objetivo apoiar o diagnóstico *in vivo* com evidências da patologia - utilizando métodos de imagem e detecção de biomarcadores no líquido cefalorraquidiano - e enfatizar o diagnóstico etiológico nas fases prodrômicas da desordem(47).

Pesquisadores da Universidade de Washington, no ano de 1993, desenvolveram uma escala para auxiliar na avaliação da evolução clínica da doença, de modo a avaliar a cognição, a escala CDR – do inglês, Clinical Dementia Rating, em que a cognição é estimada com a ajuda de um informante. Com essa escala, largamente utilizada, pode-se classificar os indivíduos em cognitivamente normais (CDR: 0), com comprometimento cognitivo leve (CCL ou do inglês *MCI, Mild Cognitive Impairment*) (CDR: 0.5), com demência leve (CDR: 1), com demência moderada (CDR: 2) ou com demência severa (CDR: 3)(48). A partir dessas análises é feita a classificação evolutiva da doença, sem a verificação de marcas neuropatológicas ou evidência de marcadores da doença, em que a causa presumida da demência é fornecida pelo médico na exclusão de outras formas demenciais, em colaboração com a anamnese e o exame físico.

A neuropatologia subjacente à DA se inicia décadas antes dos primeiros sintomas clínicos da doença. A DA possui três principais estágios: 1) pré-clínico, 2) com comprometimento cognitivo leve (CCL), também chamada fase prodrômica e 3) sintomática ou demencial(4). Essas fases são acompanhadas de mudanças bioquímicas cerebrais, as quais são refletidas no líquido cefalorraquiano. Portanto, a busca de diagnóstico precoce é enfatizada no estágio de CCL da doença, onde intervenções, quando disponíveis, serão mais eficientes(49). Logo, a Doença de Alzheimer difere da Demência de Alzheimer porque a

primeira se refere a todo o *spectrum* da doença desde o seu início, décadas antes dos sintomas clínicos, enquanto o último conceito se restringe exclusivamente à fase demencial da doença(50).

Considerando que os primeiros sintomas aparecem como leves alterações no desempenho da memória episódica, mas que ainda não causam impacto cognitivo-funcional, indivíduos com CCL podem ser clinicamente confundidos com envelhecimento normal. Porém, caso haja prejuízo na testagem neuropsicológica objetiva quando comparados a valores normativos de indivíduos da mesma idade, frequentemente caracterizam o CCL(51). Significativa parte dos casos de CCL evoluem à DA a cada ano(52). Já o início do estágio demencial mais leve somente é observado quando houve perda neuronal e sináptica. Até o presente momento não há tratamento que cure a DA, porém há estudos com novas estratégias terapêuticas em diferentes alvos moleculares sendo testadas e presume-se que estas serão mais efetivas no estágio de CCL da doença(53).

Um dos objetivos do estudo de marcadores é identificar aqueles com as alterações patológicas da DA antes da emergência dos sinais clínicos, bem como prever as probabilidades que tais indivíduos têm em progredir clinicamente e em que ritmo. Por esse motivo o recente foco na definição do fenótipo pré-clínico busca a janela terapêutica em que o substrato neural seja responsivo ao possível tratamento da doença(54). O que não quer dizer que não há méritos no tratamento de indivíduos sintomáticos, visto que a neurodegeneração se acentua com o avanço da doença, portanto, tratamentos que possibilitem bloquear ou retardar a doença também são altamente desejáveis(55).

2.2.3 COMPROMETIMENTO COGNITIVO LEVE AMNÉSICO

CCL é, geralmente, mas não sempre, um estado de transição entre a cognição normal e a demência(5), em que as habilidades funcionais essenciais estão preservadas(6). Os critérios para CCL foram propostos por Petersen em 1999(56) e atualizados em 2004 no *Key Symposium on MCI* (57, 58), os quais se resumem em: a) queixa cognitiva, de preferência corroborada por informante; b) prova objetiva de perda cognitiva; c) funcionamento cognitivo geral essencialmente preservado; d) não estar demente. Os sujeitos que preencherem os critérios acima poderão ser classificados uma das seguintes categorias: CCL-a (CCL-amnésico) se o desempenho nos testes neuropsicológicos de memória episódica for

insatisfatório ou CCL-na (CCL-não amnésico) no caso de mau desempenho em testes neuropsicológicos relativos a outros domínios cognitivos, tais como as funções executivas, linguagem ou habilidades visuo-espaciais(5).

Estudos demonstraram que indivíduos com CCL-a, tem um risco aumentado de desenvolver DA, com taxas de progressão anuais que variam de 5 a 40% por ano(7). Em autopsias de casos com CCL foi constatado que mais de 70% das amostras obtiveram resultados que sugerem estarem em vias de desenvolvimento da DA(59). Entretanto, muitos indivíduos com CCL não evoluem para quadros demenciais, a maioria possui apenas depressão com sintomas cognitivos, o que é muito mais comum de ocorrer em idosos do que em adultos de meia idade. Ademais, esta entidade nem sempre é facilmente distinguível de quadros verdadeiramente pré-demenciais em idosos(5). Neste sentido, o desenvolvimento de métodos propedêuticos armados pode auxiliar a diferenciar o que vem sendo chamado de DA prodrômica de outras causas de CCL-a (60). A volumetria hipocampal (hipocampometria) e o PET (*Positron Emission Tomography*) já vem sendo utilizados para este fim com bons resultados(61). Não obstante, ambos os métodos são muito onerosos, não sendo viáveis na prática clínica diária. Além disso, o NIA-AA ressalta que técnicas de neuroimagem como ressonância magnética funcional, espectroscopia de ressonância magnética nuclear e ressonância magnética de difusão ou perfusão não são suficientemente validados para serem incluídos como biomarcadores(26).

Até o momento, não há métodos estabelecidos para prever a progressão para DA em pessoas com CCL(8). Duas questões fundamentais sobre indivíduos com CCL poderiam ser respondidas com o uso de biomarcadores: [1] o estabelecimento de suporte à etiologia da síndrome clínica em indivíduos com CCL, o que terá maior importância para a escolha da terapia mais adequada, quando tratamentos efetivos estiverem disponíveis e [2] a determinação da probabilidade da progressão cognitiva e funcional de um paciente com CCL a um estágio mais avançado ou à própria demência, juntamente com a chance de que essa progressão irá ocorrer em um definido período de tempo(26). Várias abordagens terapêuticas tem sido desenvolvidas e estão em fase de testes(62). Porém, paralelamente à busca de tratamentos há esforços canalizados para os biomarcadores, os quais podem, de fato, auxiliar no diagnóstico e prognóstico da doença antes do início dos sinais clínicos(63, 64).

2.3 INFLAMAÇÃO

A inflamação é um componente chave na resposta imune. A imunidade inata é um sistema altamente conservado que protege o hospedeiro de infecções, lesões de forma não específica e estímulos nocivos, como patógenos e resíduos metabólicos tóxicos. Processos inflamatórios têm demonstrado estarem envolvidos com prejuízo cognitivo e demência, sendo que a inflamação cerebral é uma das marcas da DA. A idéia de que neuroinflamação é associada à patogênese da DA não é nova (65). O próprio Alois Alzheimer, em 1899, foi o primeiro a descrever o envolvimento de células gliais na DA(66). Uma rede complexa de células, moléculas de sinalização e mediadores moleculares de respostas inflamatórias interagem no tecido cerebral. Componentes clássicos relacionados com a neuroinflamação incluem células cerebrais, como a microglia e os astrócitos - encontrados em abundância próximos aos neurônios e placas, presumivelmente na tentativa de fagocitar depósitos amilóides - o sistema de complemento, bem como as citocinas e as quimiocinas(67). Processos neurotóxicos mediados por essas citocinas - pequenas proteínas sinalizadoras com um amplo espectro de funções em processos inflamatórios e na regulação do sistema imune - podem incluir morte neuronal direta pelo aumento da apoptose, inibição da neurogênese, além da diminuição da função sináptica(68).

Mediadores inflamatórios e condições de stress aumentam o processamento de proteína precursora amilóide para a via amiloidogênica, via β -secretase, e induzem a formação e o acúmulo de peptídeos β -amilóide (1-42). Estas circunstâncias também inibem a formação da fração solúvel de proteína precursora amilóide que tem um efeito de proteção neuronal, que quando a clivagem da proteína precursora amilóide segue pela via da enzima α -secretase. Elevadas concentrações de mecanismos pró-inflamatórios podem ser tanto causa como consequência da neurodegeneração na DA(10). Portanto, β -amilóide também pode induzir a expressão de citocinas pró-inflamatórias em células da glia num ciclo vicioso, como: IL-1 β , IL-6, TNF- α , IL-8, MIP-1 α , entre outras (69). Considerando-se que a inflamação é um fenômeno de duas faces, neurodestrutiva e neuroprotetora, a hipótese de que a inflamação leva à demência implicaria em uma predominância da primeira sobre a segunda(70).

Quando um estímulo nocivo ocorre no sistema nervoso central, a microglia é ativada para gerar uma resposta defensiva com o objetivo de reparar o dano causado, ocorre então a inflamação aguda. Já quando o estímulo é persistente, uma condição inflamatória crônica se desenvolve, uma reação aos danos acumulados ao longo do tempo é acionada(71). A

microglia ativada pode participar de muitos processos celulares como proliferação celular, migração em resposta a moléculas de sinalização, liberação de mediadores inflamatórios e citotóxicos, pode atuar como célula efetora citotóxica, além de assumir propriedades de células fagocíticas. Embora possa fagocitar β -amilóide e alguns agregados, não está claro se consegue degradar fibrilas maiores com sucesso(72). Assim, a neuroinflamação pode ter resultados benéficos - demonstrou-se que fatores de crescimento da microglia podem aliviar neurotoxicidade por captação de glutamato(71) - ou prejudiciais ao cérebro, essa variação se deve principalmente à duração da resposta a mediadores inflamatórios(73). Em humanos, foi constatado que a microglia se torna senescente e deteriora com a idade, diminuindo sua capacidade fagocítica e favorecendo o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas(74).

Diferentes marcadores inflamatórios têm sido estudados como possíveis biomarcadores ou mediadores da DA, porém a maioria das pesquisas foram conduzidas no soro e/ou no plasma, enquanto no líquido cefalorraquidiano os estudos são escassos. Salienta-se que existem extensas diferenças nos componentes celulares e nas formas que a inflamação é mediada no cérebro (neuroinflamação) quando comparada com a periferia. Como o líquido cefalorraquidiano banha o cérebro e as trocas com o fluido extracelular, contém moléculas produzidas pelos neurônios, astrócitos e microglia, por conseguinte, pode fornecer um indicador bioquímico mais preciso de como essas células estão alteradas em DA(72). No entanto, os resultados até então obtidos, em geral, são bastante contraditórios e com implicações clínicas ainda obscuras. Até o momento, nenhuma citocina se destaca como um biomarcador útil para diagnosticar DA ou mesmo CCL.

Exames *post-mortem* realizados em indivíduos com DA revelaram presença abundante de mediadores inflamatórios, aumento da expressão de proteínas de fase aguda e citocinas pró-inflamatórias, que são dificilmente evidenciados em cérebros de indivíduos considerados cognitivamente normais. É provavelmente essa resposta secundária, proporcionada pela inflamação, que provoca a maior perda de neurônios ao longo do tempo em comparação ao prejuízo inicial da própria DA(11). Portanto, tem sido sugerido que o efeito líquido da ativação da microglia possa ser o aumento da deposição β -amilóide e a perpetuação da cascata neurodegenerativa(75).

A associação desses marcadores com alterações nas funções cognitivas tem sido base de diversos estudos epidemiológicos, no entanto, os resultados ainda não são consistentes. Com efeito, alguns estudos retrospectivos evidenciam uma associação entre uso de anti-

inflamatórios e a diminuição do risco de demência(76), embora estudos prospectivos não tenham conseguido confirmar essas evidências(77). Os níveis de expressão de citocinas no líquido cefalorraquidiano de indivíduos com DA são muito heterogêneos, o que demonstra a diversidade patológica da doença (78).

Citocinas e outras moléculas sinalizadoras estão frequentemente presentes em níveis muito baixos. Estudos sobre proteínas envolvidas na sinalização e regulação imune muitas vezes apresentam um quadro heterogêneo. A detecção em fluidos corporais requer ensaios sensíveis, como ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), que são produzidos de modo a detectar concentrações muito baixas, em picogramas. Moléculas de sinalização inflamatórias podem se espalhar para curtas distâncias entre as redes de células e contribuir localmente para a inflamação, sem necessariamente se difundirem para o líquido cefalorraquidiano em quantidades detectáveis. Portanto, a falha na detecção de uma citocina ou molécula semelhante não exclui o potencial dessa molécula na patogênese da DA.

Uma recente revisão, que incluiu 118 estudos com diferentes citocinas, concluiu que as mais frequentemente investigadas são TNF- α e IL-6, descritas em 20-25% dos artigos e são relatadas como hiper-reguladas, não reguladas ou hiporreguladas no sangue ou líquido cefalorraquidiano de indivíduos com DA. Uma explicação para os resultados conflitantes são as diferenças entre as abordagens técnicas dos estudos(9). Todavia, também não se sabe se esses marcadores são eventos precoces na DA e/ou são obrigatórios para danos teciduais.

Estudos em modelos celulares e animais sugerem que um estado pró-inflamatório é capaz tanto de ativar a oligomerização do β -amilóide quanto a hiperfosforilação da proteína *Tau*. Por outro lado, a oligomerização do β -amilóide também desencadeia aumento do estresse oxidativo, com aumento de mediadores inflamatórios e a também hiperfosforilação da proteína *Tau*(79). Desconhece-se o quanto da relação entre o depósito de β -amilóide 1-42 e a hiperfosforilação da *Tau* é mediado por fatores inflamatórios. Painéis de moléculas inflamatórias ainda não foram estudados sistematicamente em casos CCL de modo a clarificar os resultados.

2.3.1 IL-1 β

A IL-1 β é uma citocina de 31 kDa, extremamente importante no início e no desenvolvimento da resposta imune, além de contribuir com a cascata pro-inflamatória e a neurodegeneração. IL-1 β e TNF- α regulam a transcrição de genes no interior do cérebro, incluindo produtos pró-inflamatórios da cascata do ácido araquidônico, o qual juntamente com seus metabólitos influenciar a transdução de sinal, a transcrição de genes, a atividade neuronal, a apoptose, entre outros processos(80). IL-1 β ainda pode estimular a proliferação de astrócitos e regular a síntese do fator de crescimento do nervo(81). IL-1 β promove a síntese e o processamento da proteína precursora amilóide e pode promover a produção e deposição do β -amilóide em placas, assim como uma relação recíproca pode ocorrer, com a ativação da microglia, pela proteína precursora amilóide, e a expressão de IL-1 β (11).

Estudos patológicos demonstram que essa citocina imunorregulatória se encontra superexpressada no cérebro de casos de DA, especialmente próximo às placas amilóides(81, 82), no entanto outros não demonstraram diferença significativa(83-85), ou ainda mostram a sua diminuição(86). Curiosamente, a IL-1 β é principalmente descrita como não significativamente regulada no líquido cefalorraquidiano de indivíduos com a DA(9). Um interessante estudo detectou que a concentração do receptor de IL-1 β (sIL-1R tipo II), estava aumentada no líquido cefalorraquidiano de indivíduos com DA, sugerindo um mecanismo de compensação para equilibrar um aumento de IL-1 β no cérebro(87). Assim, a IL-1 β só é elevada em subgrupos de indivíduos ou durante certas fases da doença.

2.3.2 TNF- α

TNF- α é uma proteína de 17.5 kDa, com 157 aminoácidos, foi o primeiro membro identificado de uma grande família de citocinas envolvidas em atividades celulares inflamatórias. É um regulador chave de vários mecanismos fisiológicos de sinalização imune, é produzida pelas células gliais ou ainda pelos neurônios, macrófagos e outras células do sistema imunológico. No cérebro, serve como um gliotransmissor que circunda as sinapses e regula a comunicação entre os neurônios(12). No líquido cefalorraquidiano TNF- α tem sido implicado como um modulador da atividade sináptica e da potenciação de longo prazo. Além disso, TNF- α aumenta a produção de β -secretase, que pode assim aumentar a produção de peptídeos β -amilóide, à favor da via amiloidogênica(13). TNF- α e IL-1 β podem mediar sinergicamente a neurotoxicidade β -amilóide pelo aumento da produção de óxido nítrico(88).

TNF- α mostra-se significativamente elevada em casos de CCL em alguns estudos, especialmente aqueles que tendem a progredir para a DA(83) e em sujeitos com a DA instalada(89). Porém, em outros não foi observada alteração significativa(87, 90) ou ainda diminuição na concentração de TNF- α (86, 91). Em um estudo recente de revisão foram encontradas três análises demonstrando hiper-regulação de TNF- α , uma com hiporregulação e cinco sem regulação, todas mensuradas no líquido cefalorraquidiano de indivíduos com DA(9). Constatou-se que em cérebros de indivíduos com DA os níveis TNFRI (Receptor TNF tipo I) estão aumentados em comparação a cérebros de não dementes e que a afinidade de ligação de TNF- α para TNFRI é grande(92). Outros estudos demonstraram que os níveis dos receptores solúveis TNFRI e TNFRII (Receptor de TNF Tipo II) no líquido cefalorraquidiano de indivíduos com CCL se apresentavam elevados, logo a suprarregulação destes receptores poderia diminuir os níveis de TNF- α no líquido nesta fase da doença(93, 94).

2.3.3 IL-6

IL-6 é uma citocina pleiotrópica, com 22-27 kDA e 184 aminoácidos, que medeia as respostas imunes e reações inflamatórias, com a indução de proteínas da fase aguda, e que afetam o crescimento das células do SNC e a diferenciação. Normalmente é expressa durante o desenvolvimento e encontra-se em níveis quase indetectáveis no adulto, porém é fortemente induzida em condições patológicas(11). É capaz de atravessar a barreira hematoencefálica. Há associações entre a IL-6 e comprometimento cognitivo em estudos populacionais(14). Além disso, demonstrou-se que o β -amilóide e a IL-6 diminuíram a neurogênese no hipocampo de camundongos transgênicos, levando à diminuição da plasticidade e capacidade de remodelar as redes neurais, o que pode explicar os déficits na memória episódica, um primeiros sintomas clínicos da DA(95).

A IL-6 foi analisada com frequência semelhante ao TNF- α em casos de DA e CCL e apresentou resultados contraditórios similares. Há estudos que demonstram aumento de IL-6 no líquido cefalorraquidiano(81, 96), diminuição (86, 90, 97) ou ainda sem alterações significativas(85, 87, 98-100).

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVOS GERAIS

- Avaliar os níveis e a possível relação de marcadores inflamatórios em indivíduos com comprometimento cognitivo leve amnésico e controles (cognitivamente saudáveis), de modo a verificar de que forma se relacionam com a DA.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Dosar as concentrações da IL-1 β , da IL-6 e do TNF- α em indivíduos com comprometimento cognitivo leve amnésico e controles e compará-las;
- Correlacionar e verificar a associação dos marcadores inflamatórios com a performance obtida na testagem cognitiva;
- Estabelecer suporte à etiopatogenia da síndrome clínica em indivíduos com comprometimento cognitivo leve amnésico com o uso de marcadores inflamatórios.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA REVISÃO

1. Prince M, Bryce R, Albanese E, Wimo A, Ribeiro W, Ferri CP. The global prevalence of dementia: a systematic review and metaanalysis. *Alzheimers Dement*. 2013;9(1):63-75.e2.
2. Reitz C, Mayeux R. Alzheimer disease: epidemiology, diagnostic criteria, risk factors and biomarkers. *Biochem Pharmacol*. 2014;88(4):640-51.
3. Association As. 2014 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimers Dement*. 2014;10(2):e47-92.
4. Dubois B, Feldman HH, Jacova C, Dekosky ST, Barberger-Gateau P, Cummings J, et al. Research criteria for the diagnosis of Alzheimer's disease: revising the NINCDS-ADRDA criteria. *Lancet Neurol*. 2007;6(8):734-46.
5. Petersen RC, Caracciolo B, Brayne C, Gauthier S, Jelic V, Fratiglioni L. Mild cognitive impairment: a concept in evolution. *J Intern Med*. 2014;275(3):214-28.
6. Hugo J, Ganguli M. Dementia and cognitive impairment: epidemiology, diagnosis, and treatment. *Clin Geriatr Med*. 2014;30(3):421-42.
7. Bruscoli M, Lovestone S. Is MCI really just early dementia? A systematic review of conversion studies. *Int Psychogeriatr*. 2004;16(2):129-40.
8. Tang W, Huang Q, Wang Y, Wang ZY, Yao YY. Assessment of CSF A β 42 as an aid to discriminating Alzheimer's disease from other dementias and mild cognitive impairment: A meta-analysis of 50 studies. *J Neurol Sci*. 2014;345(1-2):26-36.
9. Brosseron F, Krauthausen M, Kummer M, Heneka MT. Body fluid cytokine levels in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease: a comparative overview. *Mol Neurobiol*. 2014;50(2):534-44.
10. Johnston H, Boutin H, Allan SM. Assessing the contribution of inflammation in models of Alzheimer's disease. *Biochem Soc Trans*. 2011;39(4):886-90.

11. Akiyama H, Barger S, Barnum S, Bradt B, Bauer J, Cole GM, et al. Inflammation and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 2000;21(3):383-421.
12. Tobinick E. Tumour necrosis factor modulation for treatment of Alzheimer's disease: rationale and current evidence. *CNS Drugs*. 2009;23(9):713-25.
13. Yamamoto M, Kiyota T, Horiba M, Buescher JL, Walsh SM, Gendelman HE, et al. Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha regulate amyloid-beta plaque deposition and beta-secretase expression in Swedish mutant APP transgenic mice. *Am J Pathol*. 2007;170(2):680-92.
14. Yaffe K, Lindquist K, Penninx BW, Simonsick EM, Pahor M, Kritchevsky S, et al. Inflammatory markers and cognition in well-functioning African-American and white elders. *Neurology*. 2003;61(1):76-80.
15. Alzheimer A. Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde Band, Verlag von Georg Reimer: Allgemeine Zeitschrift für Psychiatrie und psychisch-gerichtliche Medizin; 1907.
16. Hippus H, Neundörfer G. The discovery of Alzheimer's disease. *Dialogues Clin Neurosci*. 2003;5(1):101-8.
17. Yoshiyama Y, Lee VM, Trojanowski JQ. Therapeutic strategies for tau mediated neurodegeneration. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2013;84(7):784-95.
18. Fagan AM, Shaw LM, Xiong C, Vanderstichele H, Mintun MA, Trojanowski JQ, et al. Comparison of analytical platforms for cerebrospinal fluid measures of β -amyloid 1-42, total tau, and p-tau181 for identifying Alzheimer disease amyloid plaque pathology. *Arch Neurol*. 2011;68(9):1137-44.
19. Ferri CP, Prince M, Brayne C, Brodaty H, Fratiglioni L, Ganguli M, et al. Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. *Lancet*. 2005;366(9503):2112-7.
20. Fagan AM, Holtzman DM. Cerebrospinal fluid biomarkers of Alzheimer's disease. *Biomark Med*. 2010;4(1):51-63.

21. James BD, Leurgans SE, Hebert LE, Scherr PA, Yaffe K, Bennett DA. Contribution of Alzheimer disease to mortality in the United States. *Neurology*. 2014;82(12):1045-50.
22. Schmidtke K, Hermeneit S. High rate of conversion to Alzheimer's disease in a cohort of amnesic MCI patients. *Int Psychogeriatr*. 2008;20(1):96-108.
23. Glenner GG, Wong CW. Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem Biophys Res Commun*. 1984;120(3):885-90.
24. Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Quinlan M, Tung YC, Zaidi MS, Wisniewski HM. Microtubule-associated protein tau. A component of Alzheimer paired helical filaments. *J Biol Chem*. 1986;261(13):6084-9.
25. McKhann GM, Knopman DS, Chertkow H, Hyman BT, Jack CR, Kawas CH, et al. The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement*. 2011;7(3):263-9.
26. Albert MS, DeKosky ST, Dickson D, Dubois B, Feldman HH, Fox NC, et al. The diagnosis of mild cognitive impairment due to Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement*. 2011;7(3):270-9.
27. Hyman BT, Phelps CH, Beach TG, Bigio EH, Cairns NJ, Carrillo MC, et al. National Institute on Aging-Alzheimer's Association guidelines for the neuropathologic assessment of Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement*. 2012;8(1):1-13.
28. Hebert LE, Weuve J, Scherr PA, Evans DA. Alzheimer disease in the United States (2010-2050) estimated using the 2010 census. *Neurology*. 2013;80(19):1778-83.
29. Bekris LM, Yu CE, Bird TD, Tsuang DW. Genetics of Alzheimer disease. *J Geriatr Psychiatry Neurol*. 2010;23(4):213-27.

30. Intiaz B, Tolppanen AM, Kivipelto M, Soininen H. Future directions in Alzheimer's disease from risk factors to prevention. *Biochem Pharmacol.* 2014;88(4):661-70.
31. Rusanen M, Kivipelto M, Quesenberry CP, Zhou J, Whitmer RA. Heavy smoking in midlife and long-term risk of Alzheimer disease and vascular dementia. *Arch Intern Med.* 2011;171(4):333-9.
32. Kivipelto M, Ngandu T, Fratiglioni L, Viitanen M, Kåreholt I, Winblad B, et al. Obesity and vascular risk factors at midlife and the risk of dementia and Alzheimer disease. *Arch Neurol.* 2005;62(10):1556-60.
33. Luchsinger JA, Cheng D, Tang MX, Schupf N, Mayeux R. Central obesity in the elderly is related to late-onset Alzheimer disease. *Alzheimer Dis Assoc Disord.* 2012;26(2):101-5.
34. Ohara T, Doi Y, Ninomiya T, Hirakawa Y, Hata J, Iwaki T, et al. Glucose tolerance status and risk of dementia in the community: the Hisayama study. *Neurology.* 2011;77(12):1126-34.
35. Debette S, Seshadri S, Beiser A, Au R, Himali JJ, Palumbo C, et al. Midlife vascular risk factor exposure accelerates structural brain aging and cognitive decline. *Neurology.* 2011;77(5):461-8.
36. Stern Y. Cognitive reserve in ageing and Alzheimer's disease. *Lancet Neurol.* 2012;11(11):1006-12.
37. Rentz DM, Locascio JJ, Becker JA, Moran EK, Eng E, Buckner RL, et al. Cognition, reserve, and amyloid deposition in normal aging. *Ann Neurol.* 2010;67(3):353-64.
38. Helzner EP, Scarmeas N, Cosentino S, Tang MX, Schupf N, Stern Y. Survival in Alzheimer disease: a multiethnic, population-based study of incident cases. *Neurology.* 2008;71(19):1489-95.
39. Blennow K, de Leon MJ, Zetterberg H. Alzheimer's disease. *Lancet.* 2006;368(9533):387-403.

40. Humpel C, Hochstrasser T. Cerebrospinal fluid and blood biomarkers in Alzheimer's disease. *World J Psychiatry*. 2011;1(1):8-18.
41. Forlenza OV, Diniz BS, Gattaz WF. Diagnosis and biomarkers of predementia in Alzheimer's disease. *BMC Med*. 2010;8:89.
42. Candy B, Sampson EL, Jones L. Enteral tube feeding in older people with advanced dementia: findings from a Cochrane systematic review. *Int J Palliat Nurs*. 2009;15(8):396-404.
43. Verghese J, Wang C, Lipton RB, Holtzer R, Xue X. Quantitative gait dysfunction and risk of cognitive decline and dementia. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2007;78(9):929-35.
44. Hampel H, Lista S, Teipel SJ, Garaci F, Nisticò R, Blennow K, et al. Perspective on future role of biological markers in clinical therapy trials of Alzheimer's disease: a long-range point of view beyond 2020. *Biochem Pharmacol*. 2014;88(4):426-49.
45. McKhann G, Drachman D, Folstein M, Katzman R, Price D, Stadlan EM. Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease. *Neurology*. 1984;34(7):939-44.
46. Dubois B, Feldman HH, Jacova C, Cummings JL, Dekosky ST, Barberger-Gateau P, et al. Revising the definition of Alzheimer's disease: a new lexicon. *Lancet Neurol*. 2010;9(11):1118-27.
47. Morris JC, Blennow K, Froelich L, Nordberg A, Soininen H, Waldemar G, et al. Harmonized diagnostic criteria for Alzheimer's disease: recommendations. *J Intern Med*. 2014;275(3):204-13.
48. Morris JC. The Clinical Dementia Rating (CDR): current version and scoring rules. *Neurology*. 1993;43(11):2412-4.

49. Blennow K, Dubois B, Fagan AM, Lewczuk P, de Leon MJ, Hampel H. Clinical utility of cerebrospinal fluid biomarkers in the diagnosis of early Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement*. 2014.
50. Jalbert JJ, Daiello LA, Lapane KL. Dementia of the Alzheimer type. *Epidemiol Rev*. 2008;30:15-34.
51. Hansson O, Zetterberg H, Buchhave P, Londos E, Blennow K, Minthon L. Association between CSF biomarkers and incipient Alzheimer's disease in patients with mild cognitive impairment: a follow-up study. *Lancet Neurol*. 2006;5(3):228-34.
52. Jessen F, Wolfsgruber S, Wiese B, Bickel H, Mösch E, Kaduszkiewicz H, et al. AD dementia risk in late MCI, in early MCI, and in subjective memory impairment. *Alzheimers Dement*. 2014;10(1):76-83.
53. Sarazin M, Dorothée G, de Souza LC, Aucouturier P. Immunotherapy in Alzheimer's disease: do we have all the pieces of the puzzle? *Biol Psychiatry*. 2013;74(5):329-32.
54. Fiandaca MS, Mapstone ME, Cheema AK, Federoff HJ. The critical need for defining preclinical biomarkers in Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement*. 2014;10(3 Suppl):S196-212.
55. Sutphen CL, Fagan AM, Holtzman DM. Progress update: fluid and imaging biomarkers in Alzheimer's disease. *Biol Psychiatry*. 2014;75(7):520-6.
56. Petersen RC, Smith GE, Waring SC, Ivnik RJ, Tangalos EG, Kokmen E. Mild cognitive impairment: clinical characterization and outcome. *Arch Neurol*. 1999;56(3):303-8.
57. Petersen RC. Mild cognitive impairment as a diagnostic entity. *J Intern Med*. 2004;256(3):183-94.
58. Winblad B, Palmer K, Kivipelto M, Jelic V, Fratiglioni L, Wahlund LO, et al. Mild cognitive impairment--beyond controversies, towards a consensus: report of the International Working Group on Mild Cognitive Impairment. *J Intern Med*. 2004;256(3):240-6.

59. Markesbery WR. Neuropathologic alterations in mild cognitive impairment: a review. *J Alzheimers Dis.* 2010;19(1):221-8.
60. Forlenza OV, Diniz BS, Talib LL, Radanovic M, Yassuda MS, Ojopi EB, et al. Clinical and biological predictors of Alzheimer's disease in patients with amnesic mild cognitive impairment. *Rev Bras Psiquiatr.* 2010;32(3):216-22.
61. Ballard C, Gauthier S, Corbett A, Brayne C, Aarsland D, Jones E. Alzheimer's disease. *Lancet.* 2011;377(9770):1019-31.
62. Schneider LS, Mangialasche F, Andreasen N, Feldman H, Giacobini E, Jones R, et al. Clinical trials and late-stage drug development for Alzheimer's disease: an appraisal from 1984 to 2014. *J Intern Med.* 2014;275(3):251-83.
63. Molinuevo JL, Blennow K, Dubois B, Engelborghs S, Lewczuk P, Perret-Liaudet A, et al. The clinical use of cerebrospinal fluid biomarker testing for Alzheimer's disease diagnosis: A consensus paper from the Alzheimer's Biomarkers Standardization Initiative. *Alzheimers Dement.* 2014.
64. Lobello K, Ryan JM, Liu E, Rippon G, Black R. Targeting Beta amyloid: a clinical review of immunotherapeutic approaches in Alzheimer's disease. *Int J Alzheimers Dis.* 2012;2012:628070.
65. Pimplikar SW. Neuroinflammation in Alzheimer's disease: from pathogenesis to a therapeutic target. *J Clin Immunol.* 2014;34 Suppl 1:S64-9.
66. Alzheimer A. A contribution concerning the pathological anatomy of mental disturbances in old age, 1899. *Alzheimer Dis Assoc Disord.* 1991;5(2):69-70.
67. Rubio-Perez JM, Morillas-Ruiz JM. A review: inflammatory process in Alzheimer's disease, role of cytokines. *ScientificWorldJournal.* 2012;2012:756357.
68. Rosenberg PB. Clinical aspects of inflammation in Alzheimer's disease. *Int Rev Psychiatry.* 2005;17(6):503-14.

69. Moore AH, O'Banion MK. Neuroinflammation and anti-inflammatory therapy for Alzheimer's disease. *Adv Drug Deliv Rev.* 2002;54(12):1627-56.
70. Enciu AM, Popescu BO. Is there a causal link between inflammation and dementia? *Biomed Res Int.* 2013;2013:316495.
71. Schwab C, McGeer PL. Inflammatory aspects of Alzheimer disease and other neurodegenerative disorders. *J Alzheimers Dis.* 2008;13(4):359-69.
72. Galasko D, Montine TJ. Biomarkers of oxidative damage and inflammation in Alzheimer's disease. *Biomark Med.* 2010;4(1):27-36.
73. Morales I, Guzmán-Martínez L, Cerda-Troncoso C, Farías GA, Maccioni RB. Neuroinflammation in the pathogenesis of Alzheimer's disease. A rational framework for the search of novel therapeutic approaches. *Front Cell Neurosci.* 2014;8:112.
74. Streit WJ. Microglial senescence: does the brain's immune system have an expiration date? *Trends Neurosci.* 2006;29(9):506-10.
75. Perry VH, Newman TA, Cunningham C. The impact of systemic infection on the progression of neurodegenerative disease. *Nat Rev Neurosci.* 2003;4(2):103-12.
76. Tobinick EL, Gross H. Rapid cognitive improvement in Alzheimer's disease following perispinal etanercept administration. *J Neuroinflammation.* 2008;5:2.
77. Wang J, Tan L, Wang HF, Tan CC, Meng XF, Wang C, et al. Anti-Inflammatory Drugs and Risk of Alzheimer's Disease: An Updated Systematic Review and Meta-Analysis. *J Alzheimers Dis.* 2014.
78. Olson L, Humpel C. Growth factors and cytokines/chemokines as surrogate biomarkers in cerebrospinal fluid and blood for diagnosing Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Exp Gerontol.* 2010;45(1):41-6.

79. Butterfield DA, Griffin S, Munch G, Pasinetti GM. Amyloid beta-peptide and amyloid pathology are central to the oxidative stress and inflammatory cascades under which Alzheimer's disease brain exists. *J Alzheimers Dis.* 2002;4(3):193-201.
80. Rao JS, Kellom M, Kim HW, Rapoport SI, Reese EA. Neuroinflammation and synaptic loss. *Neurochem Res.* 2012;37(5):903-10.
81. Blum-Degen D, Müller T, Kuhn W, Gerlach M, Przuntek H, Riederer P. Interleukin-1 beta and interleukin-6 are elevated in the cerebrospinal fluid of Alzheimer's and de novo Parkinson's disease patients. *Neurosci Lett.* 1995;202(1-2):17-20.
82. Swardfager W, Lanctôt K, Rothenburg L, Wong A, Cappell J, Herrmann N. A meta-analysis of cytokines in Alzheimer's disease. *Biol Psychiatry.* 2010;68(10):930-41.
83. Tarkowski E, Andreasen N, Tarkowski A, Blennow K. Intrathecal inflammation precedes development of Alzheimer's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2003;74(9):1200-5.
84. Pirttila T, Mehta PD, Frey H, Wisniewski HM. Alpha 1-antichymotrypsin and IL-1 beta are not increased in CSF or serum in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* 1994;15(3):313-7.
85. Gómez-Tortosa E, Gonzalo I, Fanjul S, Sainz MJ, Cantarero S, Cemillán C, et al. Cerebrospinal fluid markers in dementia with lewy bodies compared with Alzheimer disease. *Arch Neurol.* 2003;60(9):1218-22.
86. Richartz E, Stransky E, Batra A, Simon P, Lewczuk P, Buchkremer G, et al. Decline of immune responsiveness: a pathogenetic factor in Alzheimer's disease? *J Psychiatr Res.* 2005;39(5):535-43.
87. Garlind A, Brauner A, Höjeberg B, Basun H, Schultzberg M. Soluble interleukin-1 receptor type II levels are elevated in cerebrospinal fluid in Alzheimer's disease patients. *Brain Res.* 1999;826(1):112-6.

88. Combs CK, Karlo JC, Kao SC, Landreth GE. beta-Amyloid stimulation of microglia and monocytes results in TNF α -dependent expression of inducible nitric oxide synthase and neuronal apoptosis. *J Neurosci*. 2001;21(4):1179-88.
89. Tarkowski E, Blennow K, Wallin A, Tarkowski A. Intracerebral production of tumor necrosis factor- α , a local neuroprotective agent, in Alzheimer disease and vascular dementia. *J Clin Immunol*. 1999;19(4):223-30.
90. Popp J, Bacher M, Kölsch H, Noelker C, Deuster O, Dodel R, et al. Macrophage migration inhibitory factor in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *J Psychiatr Res*. 2009;43(8):749-53.
91. Lanzrein AS, Johnston CM, Perry VH, Jobst KA, King EM, Smith AD. Longitudinal study of inflammatory factors in serum, cerebrospinal fluid, and brain tissue in Alzheimer disease: interleukin-1 β , interleukin-6, interleukin-1 receptor antagonist, tumor necrosis factor- α , the soluble tumor necrosis factor receptors I and II, and alpha1-antichymotrypsin. *Alzheimer Dis Assoc Disord*. 1998;12(3):215-27.
92. Cheng X, Yang L, He P, Li R, Shen Y. Differential activation of tumor necrosis factor receptors distinguishes between brains from Alzheimer's disease and non-demented patients. *J Alzheimers Dis*. 2010;19(2):621-30.
93. Buchhave P, Zetterberg H, Blennow K, Minthon L, Janciauskiene S, Hansson O. Soluble TNF receptors are associated with A β metabolism and conversion to dementia in subjects with mild cognitive impairment. *Neurobiol Aging*. 2010;31(11):1877-84.
94. Jiang H, Hampel H, Prvulovic D, Wallin A, Blennow K, Li R, et al. Elevated CSF levels of TACE activity and soluble TNF receptors in subjects with mild cognitive impairment and patients with Alzheimer's disease. *Mol Neurodegener*. 2011;6:69.
95. Vallières L, Campbell IL, Gage FH, Sawchenko PE. Reduced hippocampal neurogenesis in adult transgenic mice with chronic astrocytic production of interleukin-6. *J Neurosci*. 2002;22(2):486-92.

96. Martínez M, Fernández-Vivancos E, Frank A, De la Fuente M, Hernanz A. Increased cerebrospinal fluid fas (Apo-1) levels in Alzheimer's disease. Relationship with IL-6 concentrations. *Brain Res.* 2000;869(1-2):216-9.
97. Yamada K, Kono K, Umegaki H, Iguchi A, Fukatsu T, Nakashima N, et al. Decreased interleukin-6 level in the cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer-type dementia. *Neurosci Lett.* 1995;186(2-3):219-21.
98. Schuitemaker A, Dik MG, Veerhuis R, Scheltens P, Schoonenboom NS, Hack CE, et al. Inflammatory markers in AD and MCI patients with different biomarker profiles. *Neurobiol Aging.* 2009;30(11):1885-9.
99. Galimberti D, Venturelli E, Fenoglio C, Guidi I, Villa C, Bergamaschini L, et al. Intrathecal levels of IL-6, IL-11 and LIF in Alzheimer's disease and frontotemporal lobar degeneration. *J Neurol.* 2008;255(4):539-44.
100. Hampel H, Schoen D, Schwarz MJ, Kötter HU, Schneider C, Sunderland T, et al. Interleukin-6 is not altered in cerebrospinal fluid of first-degree relatives and patients with Alzheimer's disease. *Neurosci Lett.* 1997;228(3):143-6.

5. ARTIGO EM INGLÊS

CSF inflammatory markers in aMCI: a case-control study

Liara Rizzi; BMSc¹

Matheus Roriz-Cruz; MD, PhD¹

¹Division of Geriatric Neurology, Service of Neurology, 'Hospital de Clínicas de Porto Alegre' 'Universidade Federal do Rio Grande do Sul', Brazil. Ramiro Barcelos Street 2.350, 90035-903, Porto Alegre, RS, Brazil;

Email addresses:

¥ LR: liaraa@yahoo.com.br

MRC: matheusroriz@hotmail.com

¥ Corresponding author

Abstract

Inflammatory processes seem to play a significant role in the pathophysiology of Alzheimer's disease (AD). Neuroinflammation is characterized by activation of microglia and the release of inflammatory cytokines, such as IL-1 β , IL-6 and TNF- α . It is unknown what is the contribution of these inflammatory markers in the development of AD. We evaluated the possible relationship between these inflammatory markers in the CSF of amnesic MCI (aMCI) subjects as compared to aged healthy controls. We measured concentrations of IL-1 β , IL-6 and TNF- α in the CSF of subjects referred to a memory clinic of a Southern Brazilian University hospital. All individuals were 60 years and older and otherwise healthy. CSF levels of IL-1 β (13.735 vs 22.932 pg/mL; $p < 0.001$) and TNF- α (1.913 vs 2.627 pg/mL; $p: 0.002$), but not IL-6 (4.178 vs 5.689 pg/mL; $p: 0.106$), were significantly reduced in the aMCI samples as compared to controls. Individuals with IL-1 $\beta < 17$ pg/mL were at a 7.2 (CI: 1.5-36; $p: 0.016$) increased odds of aMCI. There was a positive correlation between IL-1 β levels and the CERAD word list score ($r_s: 0.299$; $p: 0.046$). The linear regression analysis showed that IL-1 β levels may explain 13.7% ($\beta: 24.545$; $p: 0.012$) of the variance on this CERAD subscore. Neuroinflammation mediated by IL-1 β and TNF- α may play an important role in preventing aMCI.

Keywords: Inflammation; Alzheimer's disease; aMCI; IL-1 β ; IL-6; TNF- α .

Introduction

Alzheimer's disease (AD) is the most common form of neurodegenerative disease in the elderly. Nowadays it corresponds to about 70-80% of the 35 million cases of dementia worldwide, and its prevalence is increasing (1, 2). The hallmark pathologies of AD in brain tissue are plaques and tangles. The senile plaques, that progressively accumulate, are abnormal clumps of toxic fragments of β -amyloid protein found outside neurons, in the space between nerve cells. Abnormal masses of twisted strands of a modified form of *Tau* protein form the neurofibrillary tangles, inside cells(3, 4). The tangles disrupt processes in neurons, causing them to die. These changes are eventually accompanied by the damage and death of neurons in regions like hippocampus, which controls the memory, and in the cerebral cortex, essential for language, reasoning and abstract thought(5). However, to date, the exactly mechanisms that lead to neurodegeneration are still under investigation.

MCI is usually, but not always, a transitional state between normal cognition and dementia, wherein the essential functional abilities are preserved (6, 7). Studies shows that at least 70% of MCI autopsied individuals have findings that suggest they are on a pathway toward to AD(8). Although, this entity is not always easily distinguishable from truly pre-dementia in the elderly(9). Despite extensive research, there are no effective therapies for preventing AD or slowing its progression. Experts believe that successful treatment will depend on forehand intervention, before the first symptoms appear, on MCI stage or early. In this sense, the development of new examination methods may help differentiate what is being called prodromal AD from other causes of MCI.

Inflammatory processes have shown to be involved with cognitive impairment and dementia and brain inflammation is known as one of the hallmarks of AD(10). This idea, that neuroinflammation is associated with the pathogenesis of AD is not new. Alois Alzheimer, in 1899, was the first to describe the involvement of glial cells(11) in the disease that would bear his name later, in 1906(12). A complex network of cell signaling molecules and molecular mediators of inflammatory responses interact in brain tissue as microglia, astrocytes, the complement system, as well cytokines and chemokines. They're abundantly found near neurons and plaques, presumably in attempt to phagocyte amyloid deposits(13). Despite neurotoxic processes may be mediated by cytokines that include direct neuronal death by increase apoptosis, inhibition neurogenesis and decrease synaptic function(14).

Inflammatory mechanisms may be both the cause or the consequence of the neurodegeneration(15). Mediators of inflammation and stress conditions enhance the processing of amyloid precursor protein (APP) to amyloidogenic pathway, promote cleavage by β -secretase enzyme and induce the formation of β -amyloid peptide(16). Alternatively, β -amyloid may induce the expression of pro-inflammatory cytokines in microglial cells in a vicious cycle(17). Microglia may also phagocyte β -amyloid but it is unclear if it may successfully degrade larger fibrils(18). Thus, considering that neuroinflammation is a phenomenon of two faces, destructive and protective(19) the variation in the actions is due to the duration of the inflammatory response(20).

There are extensive differences in cellular components that mediate inflammation in the brain and that observed in periphery. Peripheral measurements are limited and may not specifically reflect inflammatory activity within the central nervous system(CNS). The cerebrospinal fluid (CSF), that bathes the brain and the extracellular fluid, contains molecules produced by neurons, astrocytes and microglia, therefore, may provide precise biochemical indicators of how these cells are altered in AD(18). Different inflammatory markers have been studied as possible mediators of AD, although the vast majority of surveys were conducted in serum or plasma, while CSF studies are scarce. The results, in general, are quite contradictory and clinical implications still unclear. So far, no cytokine stands as a useful tool for diagnosing AD or MCI. In the present study we measured some cytokines concentrations, IL-1 β , IL-6 and TNF- α , in the pursuit of their involvement in the disease related to neuroinflammatory process.

Methods

Sample size

Due to study originality, sample size was based in a conservative estimation of AD's pathology among aMCI cases (70%) and controls (10%)(8). Considering a power of 90% and a significance of 5%, necessary sample size was estimated in 24 cases and 9 controls. Considering losses, this initial number was increased by 1/3, resulting in 33 cases and 12 controls. (Calculated at http://www.lee.dante.br/pesquisa/amostragem/di_cas_con.html#raz).

Subjects

Thirty three subjects with MCI and twelve with normal cognition were included at the study. All participants were referred to the Ambulatory of Geriatric Neurology of the 'Hospital de Clínicas de Porto Alegre', Brazil. All individuals were 60 years or older. People who met the following criteria: dementia, stroke, Parkinson's disease, depression or other neurological disease that potentially cause cognitive impairment, were excluded at the baseline. We also excluded those with the slightest sign of infection or other medical disease, because any comorbidity could influence the cytokine production.

MCI was defined as evidence of impairment on objective cognitive tasks, with preserved activities of daily living, but not fulfilling the diagnosis criteria of dementia. The MCI diagnoses were based on clinical evaluation and Petersen *et al.* criteria(9), corroborated by CDR (Clinical Dementia Rating)(21). The criteria for MCI can be summarized as: a) cognitive impairment, preferably corroborated by an informant; b) objective evidence of cognitive impairment; c) normal general cognitive function; d) not demented(9, 22). Subjects who meet above criteria were classified into the following categories: aMCI (amnestic MCI) whether performance on neuropsychological tests of episodic memory is unsatisfactory or non aMCI (non amnestic MCI) whether the poor performance in neuropsychological tests were related to other cognitive domains such as executive functions, language and visuo-spatial skills(6).

The CDR is a 5-point scale used to characterize domains of cognitive and functional performance like: memory, orientation, judgment and problem solving, community affairs, home and hobbies, and personal care. To rate each domain, overall CDR score was calculated through the use of an algorithm. Qualitative equivalences are as follows: 0 – none cognitive impairment, 0.5 – mild cognitive impairment, 1 – mild dementia, 2 - moderate dementia or 3 – severe dementia. All participants with MCI had memory impairment (CDR: 0.5) and fulfilled the criteria of aMCI(9, 22). Participants without cognitive impairment were subjects had no history or evidence of cognitive decline (CDR: 0).

A questionnaire was applied in order to assess the following socio demographic data: age, sex, occupation, retirement and years of schooling.

Assessment of Cognitive Function

To assess the cognitive function, the verbal memory test of the Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease (CERAD)(23), Brazilian adaptation(24), was

used. Neuropsychological battery composed by 10-item word list, three presentations, and delayed recall after 10 minutes was administered. Subjects also performed the word list recognition task of the CERAD battery. The final score was composed by 30 points to word list learning, 10 points to word list recall and 10 points for word list recognition (the recognition discriminability was calculated by subtracting the number of false positives from the number of true positives)(25).

Another test performed was the clock-drawing test(26), that is a simple and effective test for assessing functional neuropsychiatric status and widespread used as a screening instrument for cognitive capabilities in the senile population. Clock-drawing test evaluate functional capabilities, including visuospatial organization, integrative functions and abstract thinking. The test is easily administrable, requires little time, and shows a good sensitivity in measuring these functions in the elderly. The score varies by 0 to 5 points.

Assessment of Geriatric Depression

To assess depression symptoms, the GDS (Geriatric Depression Scale), developed by Yesavage *et al.*(27), translated and validated for Brazilian population(28) was applied. Depressive symptoms were assessed with the 15-item version of the GDS. Presence of significant depressive symptomatology was considered for all subjects who scored ≥ 6 points in the scale.

CSF Collection

Lumbar punctures were performed; subjects were fasted for 8 hours. A standardized technique with an atraumatic spinal needle for the patient was applied in a fetal position. CSF (approximately 5 ml) was removed in a polypropylene tube for analysis. After the lumbar puncture, individuals were placed at bed rest for 30 minutes. CSF samples were centrifuged at 4000G and 4°C for 10 minutes and after aliquoted and stored at -80°C until assay.

CSF Analysis

Cytokines were quantified: IL-1 β , IL-6 and TNF- α . For measurement of the cytokines TNF- α and IL-6 in CSF samples were used ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) from Invitrogen, Camarillo, USA. The tests are a solid phase sandwich ELISA that uses a monoclonal antibody. To determine IL-1 β concentrations the EASIA assay (Enzyme Amplified Sensitivity Imunoassay) (BioSource Europe S.A., Nivelles, Belgium) was applied.

The assay is based on an oligoclonal system in which blends of monoclonal antibodies direct against distinct epitopes of IL-1 β . All assays were performed according to the instructions of the manufacturer and the results were displayed in pg/mL. Tests were performed in duplicate. Correlations between the two measurements were 0.9, 0.99 and 0.89 for TNF- α , IL-6 and IL-1 β , respectively. Who performed the assay was blinded for any clinical or demographic information about the study participants.

Statistical Analysis

We used the Mann-Whitney U-test to test group's differences in concentrations of IL-1 β , IL-6 and TNF- α . Spearman's correlation was used to correlate the levels of cytokines and measurements in neuropsychological tests. Categorical variables were compared by Chi-square test. A linear regression analysis was done to verify the relationship between cytokines levels and CERAD. Results were showed as 95% C.I. and p value <0.05 was considered significant. The statistical analysis was performed using the Statistical Package for Social Sciences (SPSS version 20).

Ethical Aspects

The study was approved by the local ethics committee, number 13-0009, and written informed consent was obtained from all study participants. The experiments were undertaken with the understanding and consent of each subject. This study was conducted in accord with the Declaration of Helsinki.

Results

The table 1 lists detailed socio-demographic information about the groups. The mean age of the participants was 67.91 \pm 5.42 years and the majority was women (71.11%).

Assessing cognitive and affective neuropsychological tests, in accord with the baseline diagnosis, we found significant differences in the distribution of CERAD between cases (MCI) and controls (p: 0.041), when adjusted for age the result was still significant (p: 0.031) (Figure 1).

No differences were found when we analyzed scores between MCI and controls subjects in relation to GDS ($p: 0.724$) and no differences were found in relation to the Clock Drawing Test ($p: 0.825$) either (Table 2), even when adjusted for age (0.860 and 0.823, respectively).

About the measurement of cytokines we found significant decrease in IL-1 β (13.735 vs 22.932; $p < 0.001$) (Figure 2) and TNF- α (1.913 vs 2.627; $p: 0.002$) in CSF concentration of MCI subjects in comparison to controls. The difference between aMCI and controls subjects was not significant for the levels of IL-6 (4.178 vs 5.689; $p: 0.106$). Even when adjusted for age the concentrations demonstrated significance at IL-1 β ($p: 0.001$) and at TNF- α ($p < 0.001$), but not for IL-6 ($p: 0.387$) (Table 3). The absolute difference between median of cases (aMCI) and controls for IL-1 β was about 60%, for TNF- α and IL-6 was about 73%.

Evaluating Spearman's correlation coefficients, we found no correlation between GDS and CERAD ($r_s: -0.260$; $p: 0.085$), but a positive correlation between IL-1 β and CERAD ($r_s: 0.299$; $p: 0.046$). Assessing the linear regression we found that the IL-1 β levels may explain 13.7% (R^2 linear: 0.0137) of the variance of CERAD. There was a direct linear dependence between these variables ($\beta: 24.545$; $p: 0.012$) (Figure 3). The adjusted logistic regression analysis demonstrated that individuals with IL-1 $\beta < 17$ pg/mL were at a 7.2 (CI: 1,5-36; $p: 0.016$) increased odds of aMCI.

Discussion

When comparing aMCI cases with controls, we found significant decrease of IL-1 β and TNF- α concentrations in the former group, but no significant differences in IL-6 levels between the groups. In contrast to our results, some investigations detected higher cytokine levels in CSF, but the most of the results were performed at AD in clinical stage, not valued at the MCI subjects. Evidently methodological differences among studies, including inclusion criteria, technical variations on the measurements and on sensibility of the different tests contribute to the great variability of data. The lack of measurable anti-inflammatory signaling, that could imply in a proinflammatory immune imbalance, may also contribute to the discrepancies observed among reports.

The results showed that there was a positive correlation between IL-1 β and CERAD. Lower score on CERAD correlates with lower levels of IL-1 β in aMCI cases. Corroborating with this, the linear regression showed a direct linear dependence between CERAD and IL-1 β (β : 24.545; p : 0.012). IL-1 β levels may explain 13.7% of the variance of CERAD. Individuals with IL-1 β < 17 pg/mL were at a 7.2 increased odds of aMCI. Even though we have not measured β -amyloid in the CSF, this result suggests that the decrease of this cytokine in the CSF is involved in the clearing of β -amyloid in the brain. Thus, due the initial deposits of β -amyloid in plaques, such individuals would present a greater cognitive decline, as may evidenced by the low score in CERAD among aMCI cases.

Neuroinflammation: protective versus deleterious effects.

Some aspects of microglia can be beneficial, since activated microglia is able to reduce plaque formation by increasing clearance and degradation of β -amyloid peptides. For example, the classical pro-inflammatory TNF- α in low concentrations may confer neuroprotection rather than destruction in the brain and therefore constitute a defense mechanism against local inflammatory reactions(29). Thus, purported role of CNS microglia as recruiters of cytokines and macrophages from CSF to the sites of senile plaques accumulation may be an important mechanism of β -amyloid clearance. Agreeing with this, the depletion of microglia in animal models may cause an increase in β -amyloid load, confirming that it play a role in the clearance of senile plaques by phagocytosis(30).

Alternatively, the localized inflammation occurring in the AD brain may leads to microglial activation and to the chronic release of inflammatory mediators. They can have deleterious effects on neuronal function and directly or indirectly contribute to the AD pathophysiology. Probably this secondary response, provided by inflammation, causes greater loss of neurons over time compared to the initial injury(31). Studies in cellular and animal models suggest that the pro-inflammatory status is able to activate both the β -amyloid oligomerization and the hyperphosphorylation of *Tau* protein(32). Although, the net effect of microglia activation may be increased by β -amyloid deposition(33) and perpetuation of the neurodegenerative cascade(34), several amyloid peptides and APP may act as potent glial activators triggering increased oxidative stress and inflammatory mediators(29). Taken together, it shows the crucial role of inflammation in AD pathogenesis and emerging evidence that neuroinflammation may be both the cause and the consequence of AD(35). Until now,

despite the best efforts of clinicians and researchers, it is unknown whether these inflammatory markers are early events in AD and/or they're required for the damage.

Surveys evince that neuroinflammation plays an important role in the early stage of AD pathology(36). But panels of inflammatory markers have not been studied systematically in MCI cases. In CSF of AD subjects were demonstrated that IL-1 β and TNF- α synergistically mediate neurotoxicity of senile plaques by increase the production of nitric oxide(37). Also, they may regulate transcription gene within the brain, including pro-inflammatory products of the arachidonic acid cascade and influence signal transduction, gene transcription, neuronal activity and apoptosis(38). Associations between IL-6 and cognitive impairment were found in population studies(39). IL-1 β , in particular, is known to stimulate the proliferation of astrocytes and regulate the synthesis of nerve growth factor(40). TNF- α in the brain serves as a gliotransmitter surrounding the synapses and regulating the communication between neurons(41). In addition, TNF- α increases the production of β -secretase, that upregulate the production of β -amyloid peptide to the amyloidogenic pathway(42). It was demonstrated that β -amyloid and IL-6 decreased neurogenesis at the hippocampus of transgenic mice, leading to the reduction of plasticity and ability to recast neural networks, it could explain, in part, the episodic memory deficits(43). All these intend to relate the overlapping biologic effects of these cytokines and their contribution in pathologic states that may lead to AD.

A recent review that included 118 trials with different cytokines, concluded that the most frequently investigated are TNF- α and IL-6, they were reported in 20-25% of articles. At this review three studies demonstrated upregulation of TNF- α , one downregulation and five related no changes in the concentration of this cytokine in CSF of AD individuals(44). TNF- α appeared to be elevated and in subjects with AD(45, 46). However, no significant changes (10, 47) or reduced concentrations were reported in other studies(48, 49). Pathological studies have shown that IL-1 β is expressed in the brain of cases of AD, especially close to amyloid plaques(40, 50), although others showed no significant expression(46, 51, 52), or a decrease in CSF samples(48). About IL-6 reports are also inconclusive, were reported increase (40, 53), decrease (10, 48, 54) or without significant changes in the levels of this cytokine on CSF (47, 51, 55-57).

Considering that in brains of people with AD the TNFRI levels (TNF Receptor Type I) are increased compared with non demented brains, it may try to explain because levels of TNF- α were diminished. The binding affinity of TNF- α to TNFRI is great, thus its availability

would be low in the CSF(58). Another study that analyzed soluble TNFRI and TNFRII (TNF Receptor Type II) levels in CSF of MCI individuals also showed elevated levels of these receptors. The upregulation of these receptors could be decreasing levels of TNF- α in CSF at this stage of the disease, corroborating with our results(59). Unexpectedly, another found significantly higher levels of soluble TNFRs in the MCI group than that in AD individuals(60). The same was observed about the concentration of IL-1 β receptors (sIL-1R type II), they were upregulated, suggesting a compensatory mechanism to balance the concentrations of IL-1 β in the cerebral tissue(47), in detriment of a reduced CSF levels. Taken these reports together, the diminished cytokines in CSF of aMCI subjects may be that the initial formation of senile plaques are recruiting cytokines from CSF to brain tissue to phagocyte the deposits of β -amyloid initially formed.

Immunosenescence is a heterogenous process that may predispose some older people to accumulate β -amyloid in the brain by reducing its clearing(61). Considering that systemic attenuation of immune response may be related to the cerebral pathology in AD, in terms of impaired phagocytosis and resulting neurotoxic effects, immunosenescence may contribute to diminished cytokines levels in aMCI cases(31). Decreased production of TNF- α and other cytokines at prodromal stage of AD has been interpreted as a sign of defective immune functions (62). A decline of phagocytic activity may constitute an early event in the pathogenetic chain. Thus, observed decrease in cytokine levels at the aMCI group may reflect a selective loss of glial cells with the aging process.

Epidemiological studies have identified advanced age as the major risk factor for developing AD(63). In humans, the microglia become senescent and deteriorates with age, reducing the phagocytic capacity and favoring the development of neurodegenerative diseases(61). Immunological alterations in AD individuals are more pronounced than in age-related healthy individuals(48). The local increasing in the production of proinflammatory cytokines has been attributed to a secondary reaction to the accumulation amyloid burden that overtaxes the phagocytic capacities of the AD brain(48). About the role of aging in the pathogenesis of AD our data suggest a general decline of immune responsiveness in aMCI. Immunosenescence may contribute to the development of AD. But, determination of microglia senescence requires a more detailed assessment.

Strengths and limitations

Strengths include simultaneous measurement of inflammatory biomarkers and neuropsychological evaluation in a group of high risk to developing AD. Moreover, measurements of cytokines and cognitive and affective tests were conducted by a blind rater, using previously validated methods. Depression may be a cause of cognitive deficits or simulate aMCI(17). Analyzing Spearman's correlations coefficients, we found no correlation between GDS and CERAD, which suggests that depressive individuals were adequately identified and excluded from the sample.

No differences were verified in relation to Clock-drawing Test (p: 0.825) between aMCI cases and controls. Because this simple test evaluate more executive function and visuospatial organization than memory itself(26), this negative finding was not a surprise. In fact, our sample comprised only aMCI subjects, in whom only the performance on neuropsychological tests of episodic memory was unsatisfactory. Non aMCI cases were not included at the study; therefore there were not significant differences between cases and controls.

One limitation of this study is that measurement of the cytokines was performed only once, even though the strong correlations between duplicates support within-person replicability. Another limitation of analyzing neuroinflammation through CSF is that its inflammatory parameters do not necessarily reflect local inflammation in the brain.

Final considerations

Our findings indicate that the inflammatory cytokines IL-1 β and TNF- α are not increased in aMCI, but in fact diminished, suggesting that the decrease of these cytokines in the CSF of these individuals is involved in age-related memory impairment. Even though we have not measured CSF β -amyloid, we hypothesize that IL-1 β and TNF- α are involved in clearing β -amyloid from the brain.

Substantial progress has been made over the past few decades in understanding AD. Overall, there's substantial lack of data about cytokine levels in CSF in AD cases, and fewer in MCI stage, which might account for much of the contradictory results. Ideally, studies with initial or serial measurements of inflammatory markers, β -amyloid and Tau protein, along with clinical and neuropsychological evaluations serve to further elucidate the inflammatory

mechanisms related to the pathogenesis of the disease. Once such studies are performed, they will provide important information and allow for the right role of cytokines during AD development. Nonetheless, the present study reveals a pattern of IL-1 β and TNF- α cytokine expression in the CSF of aMCI subjects that may be relevant to prodromal AD.

Conflict of interest

All authors declare no actual or potential conflict of interests including any financial, personal or other relationships with other people or organizations.

Role of funding source

This study was supported by CAPES-CNPQ and FIPE. All authors declare that funding source had no role in the study design, in the collection, analysis and interpretation of data, in the writing of the report, and in the decision to submit the paper for publication.

References

1. Fagan AM. CSF Biomarkers of Alzheimer's Disease: Impact on Disease Concept, Diagnosis, and Clinical Trial Design. *Advances in Geriatrics*; 2014. p. 14.
2. Fagan AM, Shaw LM, Xiong C, Vanderstichele H, Mintun MA, Trojanowski JQ, et al. Comparison of analytical platforms for cerebrospinal fluid measures of β -amyloid 1-42, total tau, and p-tau181 for identifying Alzheimer disease amyloid plaque pathology. *Arch Neurol*. 2011;68(9):1137-44.
3. Fagan AM, Holtzman DM. Cerebrospinal fluid biomarkers of Alzheimer's disease. *Biomark Med*. 2010;4(1):51-63.
4. Forlenza OV, Diniz BS, Gattaz WF. Diagnosis and biomarkers of predementia in Alzheimer's disease. *BMC Med*. 2010;8:89.

5. Humpel C, Hochstrasser T. Cerebrospinal fluid and blood biomarkers in Alzheimer's disease. *World J Psychiatry*. 2011;1(1):8-18.
6. Petersen RC, Caracciolo B, Brayne C, Gauthier S, Jelic V, Fratiglioni L. Mild cognitive impairment: a concept in evolution. *J Intern Med*. 2014;275(3):214-28.
7. Hugo J, Ganguli M. Dementia and cognitive impairment: epidemiology, diagnosis, and treatment. *Clin Geriatr Med*. 2014;30(3):421-42.
8. Markesbery WR. Neuropathologic alterations in mild cognitive impairment: a review. *J Alzheimers Dis*. 2010;19(1):221-8.
9. Petersen RC. Mild cognitive impairment as a diagnostic entity. *J Intern Med*. 2004;256(3):183-94.
10. Popp J, Bacher M, Kölsch H, Noelker C, Deuster O, Dodel R, et al. Macrophage migration inhibitory factor in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *J Psychiatr Res*. 2009;43(8):749-53.
11. Alzheimer A. A contribution concerning the pathological anatomy of mental disturbances in old age, 1899. *Alzheimer Dis Assoc Disord*. 1991;5(2):69-70.
12. Alzheimer A. Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde Band, Verlag von Georg Reimer: Allgemeine Zeitschrift für Psychiatrie und psychisch-gerichtliche Medizin; 1907. p. 146-8.
13. Rubio-Perez JM, Morillas-Ruiz JM. A review: inflammatory process in Alzheimer's disease, role of cytokines. *ScientificWorldJournal*. 2012;2012:756357.
14. Rosenberg PB. Clinical aspects of inflammation in Alzheimer's disease. *Int Rev Psychiatry*. 2005;17(6):503-14.
15. Johnston H, Boutin H, Allan SM. Assessing the contribution of inflammation in models of Alzheimer's disease. *Biochem Soc Trans*. 2011;39(4):886-90.

16. Pearson HA, Peers C. Physiological roles for amyloid beta peptides. *J Physiol.* 2006;575(Pt 1):5-10.
17. Moore AH, O'Banion MK. Neuroinflammation and anti-inflammatory therapy for Alzheimer's disease. *Adv Drug Deliv Rev.* 2002;54(12):1627-56.
18. Galasko D, Montine TJ. Biomarkers of oxidative damage and inflammation in Alzheimer's disease. *Biomark Med.* 2010;4(1):27-36.
19. Enciu AM, Popescu BO. Is there a causal link between inflammation and dementia? *Biomed Res Int.* 2013;2013:316495.
20. Morales I, Guzmán-Martínez L, Cerda-Troncoso C, Farías GA, Maccioni RB. Neuroinflammation in the pathogenesis of Alzheimer's disease. A rational framework for the search of novel therapeutic approaches. *Front Cell Neurosci.* 2014;8:112.
21. Morris JC. The Clinical Dementia Rating (CDR): current version and scoring rules. *Neurology.* 1993;43(11):2412-4.
22. Winblad B, Palmer K, Kivipelto M, Jelic V, Fratiglioni L, Wahlund LO, et al. Mild cognitive impairment--beyond controversies, towards a consensus: report of the International Working Group on Mild Cognitive Impairment. *J Intern Med.* 2004;256(3):240-6.
23. Morris JC, Heyman A, Mohs RC, Hughes JP, van Belle G, Fillenbaum G, et al. The Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease (CERAD). Part I. Clinical and neuropsychological assessment of Alzheimer's disease. *Neurology.* 1989;39(9):1159-65.
24. Bertolucci PHF, Okamoto IH, Toniolo Neto J, Ramos LR, Brucki SMD. Desempenho da populacao brasileira na bateria neuropsicologica do Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease (CERAD) São Paulo: *Revista de Psiquiatria Clínica*; 1998. p. 80-3.
25. Chandler MJ, Lacritz LH, Hynan LS, Barnard HD, Allen G, Deschner M, et al. A total score for the CERAD neuropsychological battery. *Neurology.* 2005;65(1):102-6.

26. Shulman KI, Gold DP, Cohen CA, Zuccherro CA. Clock-drawing and dementia in the community

A longitudinal study, *International Journal of Geriatric Psychiatry* Volume 8, Issue 6. *International Journal of Geriatric Psychiatry* [Internet]. 1993 01; 8(6):[487-96 pp.]. Available from: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/gps.930080606/abstract>.

27. Yesavage JA, Brink TL, Rose TL, Lum O, Huang V, Adey M, et al. Development and validation of a geriatric depression screening scale: a preliminary report. *J Psychiatr Res*. 1982;17(1):37-49.

28. Almeida O, Almeida S. Confiabilidade da versão brasileira da Escala de Depressão em Geriatria (GDS) versão reduzida. *Arq Neuro-Psiquiatr*. 1999;57:421-6.

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

30. Majumdar A, Cruz D, Asamoah N, Buxbaum A, Sohar I, Lobel P, et al. Activation of microglia acidifies lysosomes and leads to degradation of Alzheimer amyloid fibrils. *Mol Biol Cell*. 2007;18(4):1490-6.

31. Akiyama H, Barger S, Barnum S, Bradt B, Bauer J, Cole GM, et al. Inflammation and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 2000;21(3):383-421.

32. Butterfield DA, Griffin S, Munch G, Pasinetti GM. Amyloid beta-peptide and amyloid pathology are central to the oxidative stress and inflammatory cascades under which Alzheimer's disease brain exists. *J Alzheimers Dis*. 2002;4(3):193-201.

33. McGeer EG, McGeer PL. Inflammatory processes in Alzheimer's disease. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2003;27(5):741-9.

34. Perry VH, Newman TA, Cunningham C. The impact of systemic infection on the progression of neurodegenerative disease. *Nat Rev Neurosci*. 2003;4(2):103-12.

35. Pimplikar SW. Neuroinflammation in Alzheimer's disease: from pathogenesis to a therapeutic target. *J Clin Immunol.* 2014;34 Suppl 1:S64-9.
36. Maccioni RB, Rojo LE, Fernández JA, Kuljis RO. The role of neuroimmunomodulation in Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci.* 2009;1153:240-6.
37. Combs CK, Karlo JC, Kao SC, Landreth GE. beta-Amyloid stimulation of microglia and monocytes results in TNFalpha-dependent expression of inducible nitric oxide synthase and neuronal apoptosis. *J Neurosci.* 2001;21(4):1179-88.
38. Rao JS, Kellom M, Kim HW, Rapoport SI, Reese EA. Neuroinflammation and synaptic loss. *Neurochem Res.* 2012;37(5):903-10.
39. Yaffe K, Lindquist K, Penninx BW, Simonsick EM, Pahor M, Kritchevsky S, et al. Inflammatory markers and cognition in well-functioning African-American and white elders. *Neurology.* 2003;61(1):76-80.
40. Blum-Degen D, Müller T, Kuhn W, Gerlach M, Przuntek H, Riederer P. Interleukin-1 beta and interleukin-6 are elevated in the cerebrospinal fluid of Alzheimer's and de novo Parkinson's disease patients. *Neurosci Lett.* 1995;202(1-2):17-20.
41. Tobinick E. Tumour necrosis factor modulation for treatment of Alzheimer's disease: rationale and current evidence. *CNS Drugs.* 2009;23(9):713-25.
42. Yamamoto M, Kiyota T, Horiba M, Buescher JL, Walsh SM, Gendelman HE, et al. Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha regulate amyloid-beta plaque deposition and beta-secretase expression in Swedish mutant APP transgenic mice. *Am J Pathol.* 2007;170(2):680-92.
43. Vallières L, Campbell IL, Gage FH, Sawchenko PE. Reduced hippocampal neurogenesis in adult transgenic mice with chronic astrocytic production of interleukin-6. *J Neurosci.* 2002;22(2):486-92.

44. Brosseron F, Krauthausen M, Kummer M, Heneka MT. Body fluid cytokine levels in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease: a comparative overview. *Mol Neurobiol.* 2014;50(2):534-44.
45. Tarkowski E, Blennow K, Wallin A, Tarkowski A. Intracerebral production of tumor necrosis factor-alpha, a local neuroprotective agent, in Alzheimer disease and vascular dementia. *J Clin Immunol.* 1999;19(4):223-30.
46. Tarkowski E, Andreasen N, Tarkowski A, Blennow K. Intrathecal inflammation precedes development of Alzheimer's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2003;74(9):1200-5.
47. Garlind A, Brauner A, Höjeberg B, Basun H, Schultzberg M. Soluble interleukin-1 receptor type II levels are elevated in cerebrospinal fluid in Alzheimer's disease patients. *Brain Res.* 1999;826(1):112-6.
48. Richartz E, Stransky E, Batra A, Simon P, Lewczuk P, Buchkremer G, et al. Decline of immune responsiveness: a pathogenetic factor in Alzheimer's disease? *J Psychiatr Res.* 2005;39(5):535-43.
49. Lanzrein AS, Johnston CM, Perry VH, Jobst KA, King EM, Smith AD. Longitudinal study of inflammatory factors in serum, cerebrospinal fluid, and brain tissue in Alzheimer disease: interleukin-1beta, interleukin-6, interleukin-1 receptor antagonist, tumor necrosis factor-alpha, the soluble tumor necrosis factor receptors I and II, and alpha1-antichymotrypsin. *Alzheimer Dis Assoc Disord.* 1998;12(3):215-27.
50. Swardfager W, Lanctôt K, Rothenburg L, Wong A, Cappell J, Herrmann N. A meta-analysis of cytokines in Alzheimer's disease. *Biol Psychiatry.* 2010;68(10):930-41.
51. Gómez-Tortosa E, Gonzalo I, Fanjul S, Sainz MJ, Cantarero S, Cemillán C, et al. Cerebrospinal fluid markers in dementia with lewy bodies compared with Alzheimer disease. *Arch Neurol.* 2003;60(9):1218-22.

52. Pirttila T, Mehta PD, Frey H, Wisniewski HM. Alpha 1-antichymotrypsin and IL-1 beta are not increased in CSF or serum in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 1994;15(3):313-7.
53. Martínez M, Fernández-Vivancos E, Frank A, De la Fuente M, Hernanz A. Increased cerebrospinal fluid fas (Apo-1) levels in Alzheimer's disease. Relationship with IL-6 concentrations. *Brain Res*. 2000;869(1-2):216-9.
54. Yamada K, Kono K, Umegaki H, Iguchi A, Fukatsu T, Nakashima N, et al. Decreased interleukin-6 level in the cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer-type dementia. *Neurosci Lett*. 1995;186(2-3):219-21.
55. Schuitemaker A, Dik MG, Veerhuis R, Scheltens P, Schoonenboom NS, Hack CE, et al. Inflammatory markers in AD and MCI patients with different biomarker profiles. *Neurobiol Aging*. 2009;30(11):1885-9.
56. Galimberti D, Venturelli E, Fenoglio C, Guidi I, Villa C, Bergamaschini L, et al. Intrathecal levels of IL-6, IL-11 and LIF in Alzheimer's disease and frontotemporal lobar degeneration. *J Neurol*. 2008;255(4):539-44.
57. Hampel H, Schoen D, Schwarz MJ, Kötter HU, Schneider C, Sunderland T, et al. Interleukin-6 is not altered in cerebrospinal fluid of first-degree relatives and patients with Alzheimer's disease. *Neurosci Lett*. 1997;228(3):143-6.
58. Cheng X, Yang L, He P, Li R, Shen Y. Differential activation of tumor necrosis factor receptors distinguishes between brains from Alzheimer's disease and non-demented patients. *J Alzheimers Dis*. 2010;19(2):621-30.
59. Buchhave P, Zetterberg H, Blennow K, Minthon L, Janciauskiene S, Hansson O. Soluble TNF receptors are associated with A β metabolism and conversion to dementia in subjects with mild cognitive impairment. *Neurobiol Aging*. 2010;31(11):1877-84.
60. Jiang H, Hampel H, Prvulovic D, Wallin A, Blennow K, Li R, et al. Elevated CSF levels of TACE activity and soluble TNF receptors in subjects with mild cognitive impairment and patients with Alzheimer's disease. *Mol Neurodegener*. 2011;6:69.

61. Streit WJ. Microglial senescence: does the brain's immune system have an expiration date? *Trends Neurosci.* 2006;29(9):506-10.
62. Huberman M, Shalit F, Roth-Deri I, Gutman B, Brodie C, Kott E, et al. Correlation of cytokine secretion by mononuclear cells of Alzheimer patients and their disease stage. *J Neuroimmunol.* 1994;52(2):147-52.
63. Hebert LE, Weuve J, Scherr PA, Evans DA. Alzheimer disease in the United States (2010-2050) estimated using the 2010 census. *Neurology.* 2013;80(19):1778-83.

Table 1

Subjects socio-demographic characteristics scores in accord with the baseline diagnosis.

	MCI (n = 33)	Controls (n = 12)	p value
Age (years): median (min-max)	68 (61-78)	63,5 (60-76)	.053
Education (years): median (min-max)	11 (1-18)	11 (5-18)	.211
Sex, (male/female): n	10/23	3/9	.120

*MCI: Mild Cognitive Impairment. ¥ Mann-Whitney test was used, except for sex (Chi-Square Test).

Table 2

Cognitive and affective neuropsychological tests in accord with the baseline diagnosis.

	MCI (n = 33)	Controls (n = 12)	p value
GDS: median (min-max)	2 (0-5)	1 (0-5)	.724
CERAD: median (min-max)	27 (18-37)	31 (23-40)	.041
Clock Drawing Test: median (min-max)	4 (1-5)	4 (1-5)	.825

* MCI: Mild Cognitive Impairment; GDS: Geriatric Depression Scale; CERAD: Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's disease. ¥ Mann-Whitney test was used.

Table 3

CSF levels of IL-1 β , IL-6 and TNF- α in MCI patients and healthy controls.

	MCI (n = 33)	Controls (n = 12)	p value
IL-1 β (pg/mL): median	13.735	22.932	.000
IL-6 (pg/mL): median	4.178	5.689	.106
TNF- α (pg/mL): median	1.913	2.627	.002

*CSF: Cerebrospinal fluid; IL-1 β : Interleukin-1 beta; IL-6: Interleukin-6; TNF- α : Tumor necrosis factor alpha; MCI: Mild Cognitive Impairment. ¥ Mann-Whitney test was used.

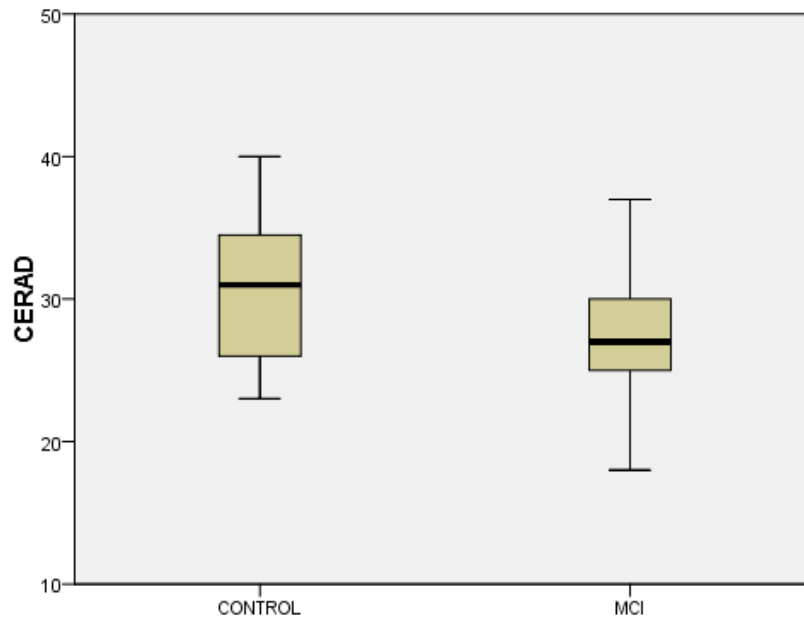


Figure 1. Boxplot of CERAD distribution in controls and MCI subjects. Controls= median:31; lower quartile:26; upper quartile: 34.75; lower bound: 23; upper bound: 40. MCI= median: 27; lower quartile:24.5; upper quartile: 30.50; lower bound: 18; upper bound: 37; p: 0.041. * CERAD: Consortium to Establish a Registry for Alzheimer’s disease; MCI: Mild Cognitive Impairment. ¥ Mann-Whitney test was used.

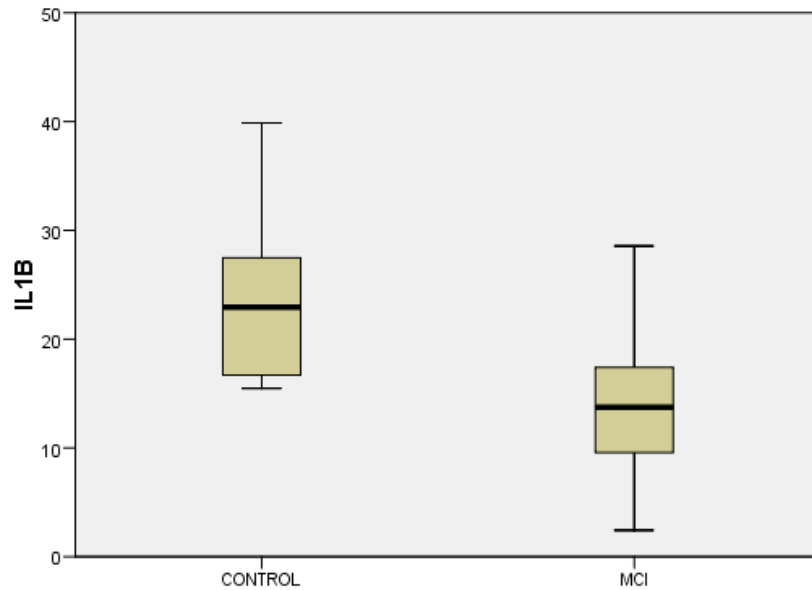


Figure 2. Boxplot of IL-1 β distribution in controls and MCI subjects. Controls= median: 22.93; lower quartile: 16.44; upper quartile: 28.55; lower bound: 15.48; upper bound: 39.88. MCI= median: 13.73; lower quartile: 9.42; upper quartile: 17.46; lower bound: 2.42; upper bound: 28.55; $p < 0.001$. * MCI: Mild Cognitive Impairment; IL-1 β : Interleukin-1 beta. ¥ Mann-Whitney test was used.

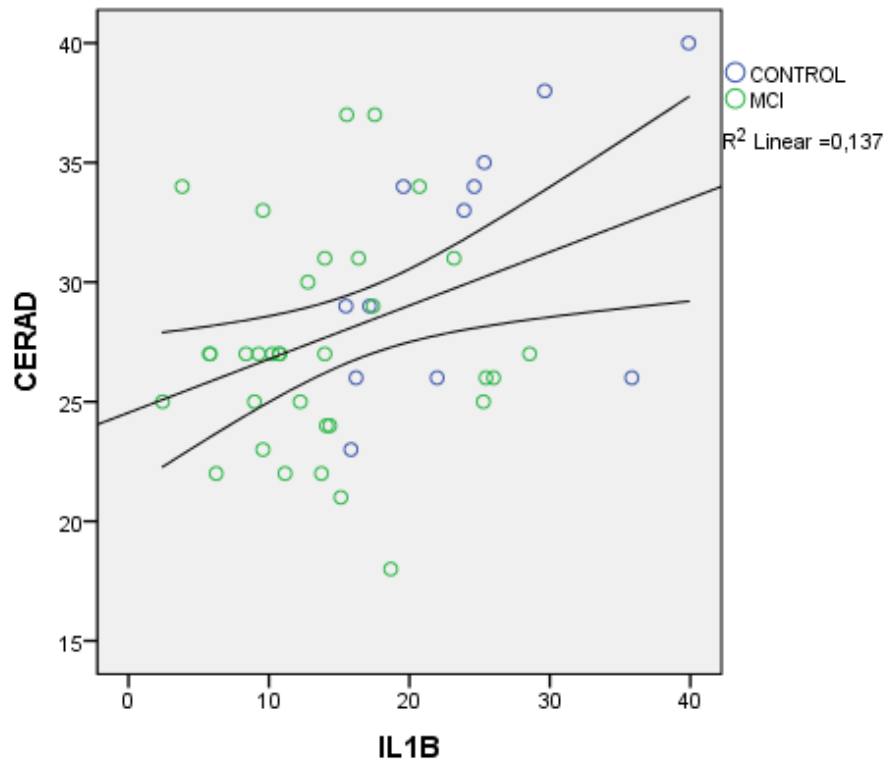


Figure 3. Linear regression analysis between Δ CERAD and IL-1 β (pg/mL) (β : 24.545; p :0.012), showing direct linear dependence. Distribution in controls and MCI subjects. *CERAD: Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's disease; MCI: Mild Cognitive Impairment; IL-1 β : Interleukin-1 beta.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho agrega conhecimento aos escassos e contraditórios estudos referentes aos mecanismos inflamatórios no estágio de CCL-a no líquido cefalorraquidiano e auxilia na caracterização de citocinas inflamatórias em relação ao declínio cognitivo. Os resultados obtidos indicam que IL-1 β e TNF- α estão diminuídas no CCL-a. O que poderia ser explicado pelos efeitos da chamada imunossenescência ou então pelo fato de os receptores desses mediadores inflamatórios estarem suprarregulados, portanto sequestrando inicialmente citocinas do líquido cefalorraquidiano para fagocitar os depósitos de β -amilóide inicialmente formados. Nessa fase de CCL, possivelmente a microglia ainda não tenha recebido estímulos suficientes para aumentar a produção e liberação de citocinas, como foi verificado em alguns estudos com indivíduos com DA. Ou os tenha recebido, mas a imunossenescência estaria comprometendo a imediata liberação dessas citocinas.

Um progresso substancial foi feito ao longo das últimas décadas na compreensão DA. No entanto, há poucos estudos sobre os níveis de citocinas em casos CCL, o que pode explicar, em parte, os contraditórios resultados na literatura. Este estudo encoraja novas pesquisas sobre a relação entre marcadores inflamatórios no líquido cefalorraquidiano de CCL-a e sua possível evolução para DA. Estudos de coorte com dosagem inicial ou seriada de marcadores inflamatórios, β -amilóide e proteína *Tau*, juntamente com avaliações clínicas e neuropsicológicas intermitentes serviriam para melhor elucidar os mecanismos inflamatórios relacionados com a etiopatogenia da doença.

As perspectivas em relação a este estudo consistem no seguimento desses indivíduos visando reavaliação quanto à conversão à DA ou mesmo eventual regressão à normalidade. Aguarda-se as dosagens das proteínas β -amilóide e *Tau* no líquido cefalorraquidiano de casos e controles, o que possibilitará a caracterização de um subgrupo de casos de CCL-a, os portadores de Alzheimer prodrômico. Estas dosagens possibilitarão também a análise da possível relação entre estes já clássicos biomarcadores da doença e os marcadores inflamatórios aqui estudados.

7. ANEXOS

7.1 PROTOCOLO DE INVESTIGAÇÃO

Nome: _____; Idade: _____;
 Escolaridade: _____, Profissão: _____, Aposentadoria: _____.
 Mora com: _____, Hx familiar: _____.

Escala de Depressão Geriátrica (GDS-15) de Yesavage

O(A) senhor(a) ...

1. Está satisfeito com a sua vida? () Sim () Não
2. Deixou muitos de seus interesses e atividades? () Sim () Não
3. Sente que a sua vida está vazia? () Sim () Não
4. Se aborrece com freqüência? () Sim () Não
5. Se sente de bom humor a maior parte do tempo? () Sim () Não
6. Tem medo que algo de ruim lhe aconteça? () Sim () Não
7. Se sente feliz a maior parte do tempo? () Sim () Não
8. Sente que sua situação não tem saída? () Sim () Não
9. Prefere ficar em casa em vez de sair e fazer coisas novas? () Sim () Não
10. Se sente com mais problemas de memória do que a maioria? () Sim () Não
11. Acha maravilhoso estar vivo? () Sim () Não
12. Se sente um inútil nas atuais circunstâncias? () Sim () Não
13. Se sente cheio de energia? () Sim () Não
14. Acha que sua situação é sem esperança? () Sim () Não
15. Acha que a maioria das pessoas está melhor do que o/a senhor/a? () Sim () Não

TOTAL: _____ Pontos

CLINICAL DEMENTIA RATING (CDR)

	Saudável CDR 0	Demência questionável CDR 0,5	Demência leve CDR 1	Demência moderada CDR 2	Demência grave CDR 3
MEMÓRIA	Sem perda de memória, ou apenas esquecimento discreto e inconsistente	Esquecimento leve e consistente; lembrança parcial de eventos; "esquecimento benigno"	Perda de memória moderada, mais acentuada para fatos recentes; o déficit interfere com atividades do dia-a-dia	Perda de memória grave; apenas material <i> muito </i> aprendido é retido; materiais novos são rapidamente perdidos	Perda de memória grave; apenas fragmentos permanecem
ORIENTAÇÃO	Plenamente orientado	Plenamente orientado	Dificuldade moderada com as relações de tempo; orientado no espaço no exame, mas pode ter desorientação geográfica em outros locais	Geralmente desorientado	Orientação pessoal apenas
JULGAMENTO E SOLUÇÃO DE PROBLEMAS	Resolve bem problemas do dia-a-dia, juízo crítico é bom em relação ao desempenho passado	Leve comprometimento na solução de problemas, semelhanças e diferenças	Dificuldade moderada na solução de problemas, semelhanças e diferenças; julgamento social geralmente mantido	Gravemente comprometido para solução de problemas, semelhanças e diferenças. Juízo social geralmente comprometido	Incapaz de resolver problemas ou de ter qualquer juízo crítico
ASSUNTOS NA COMUNIDADE	Função independente na função habitual de trabalho, compras, negócios, finanças, e grupos sociais	Leve dificuldade nestas atividades	Incapaz de funcionar independentemente nestas atividades embora ainda possa desempenhar algumas; pode parecer normal à avaliação superficial	Sem possibilidade de desempenho fora de casa. Parece suficientemente bem para ser levado a atividades fora de casa	Sem possibilidade de desempenho fora de casa. Parece muito doente para ser levado a atividades fora de casa
LAR E PASSATEMPOS	Vida em casa, passatempos, e interesses intelectuais mantidos	Vida em casa, passatempos, e interesses intelectuais levemente afetados	Comprometimento leve mas evidente em casa; abandono das tarefas mais difíceis; passatempos e interesses mais complicados são também abandonados	Só realiza as tarefas mais simples. Interesses muito limitados e pouco mantidos	Sem qualquer atividade significativa em casa
CUIDADOS PESSOAIS	Plenamente capaz	Plenamente capaz	Necessita assistência ocasional	Requer assistência no vestir e na higiene	Requer muito auxílio nos cuidados pessoais. Geralmente incontinente

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

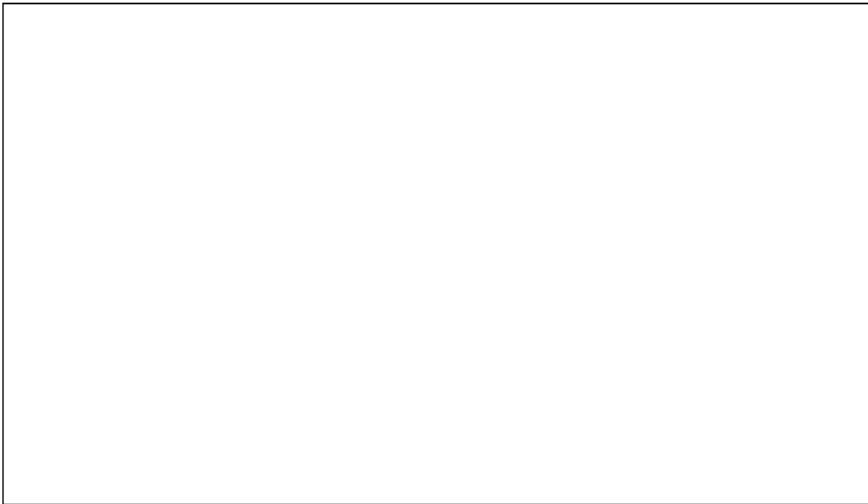
Lista de Palavras para Fixação e Recordação					
1ª tentativa	Ordem	2ª tentativa	Ordem	3ª tentativa	Ordem
Manteiga		Praia		Cabana	
Braço		Braço		Bilhete	
Praia		Cabana		Poste	
Carta		Manteiga		Rainha	
Rainha		Poste		Motor	
Cabana		Motor		Carta	
Poste		Erva		Erva	
Bilhete		Rainha		Braço	
Erva		Bilhete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

Reconhecimento da lista de palavras

No.	Palavra	Rec	Ponto	No.	Palavra	Rec	Ponto
1	Igreja	Sim / Não		11	Rainha	Sim / Não	
2	Café	Sim / Não		12	Cabana	Sim / Não	
3	Manteiga	Sim / Não		13	Chinelo	Sim / Não	
4	Dólar	Sim / Não		14	Poste	Sim / Não	
5	Braço	Sim / Não		15	Aldeia	Sim / Não	
6	Praia	Sim / Não		16	Corda	Sim / Não	
7	Cinco	Sim / Não		17	Bilhete	Sim / Não	
8	Carta	Sim / Não		18	Tropa	Sim / Não	
9	Hotel	Sim / Não		19	Erva	Sim / Não	
10	Montanha	Sim / Não		20	Motor	Sim / Não	

TESTE DO RELÓGIO**DESENHO LIVRE:**

“Desenhe um relógio redondo com todos os números dentro e coloque os ponteiros marcando “quinze para as duas”.”

ESCORE:**CERAD**

Evocação de 5 minutos	
	Ordem
Manteiga	
Braço	
Praia	
Carta	
Rainha	
Cabana	
Poste	
Bilhete	
Erva	
Motor	
SCORE	

7.2 TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Estamos convidando pacientes do Ambulatório de Neurogeriatria do HCPA/UFRGS para participar de um projeto de pesquisa que tem por objetivo a identificação precoce do comprometimento da memória, ou de outras funções cerebrais relacionadas com aprendizado e inteligência, que chamamos de “funções cognitivas”. A detecção precoce é fundamental para prevenção e tratamento de possíveis quadros de demência (doença caracterizada por perda da memória, da orientação, da capacidade de cálculo, entre outras funções cognitivas).

Nesta pesquisa, a idade inicial para se tentar identificar esse comprometimento cognitivo será de 60 anos ou mais, para analisarmos se é possível um diagnóstico precoce e quais os fatores que influenciam nesse comprometimento da memória e de outras funções cognitivas. Portanto, para a realização desta pesquisa será analisada a ficha clínica geriátrica padrão de pacientes diagnosticados com comprometimento cognitivo leve amnésico, com mais de 60 anos de idade, do Ambulatório de Neurogeriatria do HCPA/UFRGS.

Para os pacientes que forem selecionados e concordarem em participar do estudo serão realizados os seguintes testes de rastreamento do comprometimento cognitivo: exames clínicos para a exclusão de pacientes com potenciais doenças neurodegenerativas; escala CDR (Clinical Dementia Rating Scale) e a escala GDS (Geriatric Depression Scale). Estes testes fazem parte da rotina de atendimento dos pacientes no Ambulatório de Neurogeriatria e possuem perguntas relacionadas ao seu modo de vida. Não são conhecidos riscos aos pacientes pela aplicação destas escalas.

Além dos testes de rastreamento cognitivo, será feita uma coleta de líquido para avaliar as concentrações líquóricas de marcadores inflamatórios (Interleucina-1beta, Interleucina-6 e Fator de Necrose tumoral alfa). A agulha utilizada para a punção lombar é de fino calibre (22G preferencialmente ou 21G) e descartável, provocando uma dor semelhante àquela para puncionar sangue venoso. A utilização da via lombar apresenta as seguintes vantagens: não há risco grave de lesão de veias ou artérias; a capacidade discriminativa no diagnóstico de processos inflamatórios e/ou infecciosos crônicos é substancialmente maior; testes imunológicos, especialmente aqueles que utilizam técnicas mais refinadas e atuais, têm sido especialmente padronizados para amostras obtidas da região lombar. Portanto, os riscos da punção lombar são mínimos. Cerca de 10 a 30% dos pacientes podem sentir dores de cabeça e/ou nas costas. Dormências transitórias e dor local também podem ocorrer. A dor de cabeça que às vezes ocorre é mais frequente em mulheres magras e jovens, entre 15 e 40 anos de idade, sobretudo quando apresentam cefaleia crônica. Sua frequência e gravidade diminuem significativamente quando o paciente é prévia e pessoalmente informado pelo médico, quando se utilizam agulhas de calibre fino, de preferência 22G, quando se executa a punção sem intercorrências e quando o paciente permanece em repouso, ainda que relativo, durante algumas horas após a punção. Os benefícios que se pode obter com esta pesquisa estão relacionados com a prevenção primária e diagnóstico clínico do comprometimento cognitivo e suas comorbidades.

O paciente tem liberdade de abandonar a pesquisa a qualquer momento sem prejuízo para o atendimento que recebe na instituição. Os dados da pesquisa serão analisados e a publicação

dos resultados será feita em conjunto, sendo que em nenhum momento será divulgado o nome de qualquer paciente. Não haverá nenhum ônus financeiro para os pacientes, sendo estes, absorvidos pelo orçamento da pesquisa. O material colhido ficará armazenado no Serviço de Neurologia do HCPA por um período máximo de 5 anos. Caso sejam realizadas outras análises, será solicitada autorização ao Comitê de Ética em Pesquisa do HCPA, e o paciente será contatado novamente para consentir com o novo estudo.

Eu, _____ (nome do paciente ou responsável), fui informado dos objetivos da pesquisa de forma clara e detalhada. Recebi informações a respeito dos procedimentos a serem realizados e esclareci minhas dúvidas. Minha participação no estudo é totalmente voluntária e sei que a qualquer momento poderei solicitar novas informações e modificar minha decisão em participar do estudo. Os pesquisadores certificam que a identidade dos pacientes será mantida confidencial e que os resultados serão utilizados para fins científicos. Fui informado (a) que caso seja necessário tratamento ou acompanhamento neurológico o paciente poderá ser encaminhado ao especialista disponível. Caso tenha novas perguntas sobre esta pesquisa, posso contatar o médico Matheus Roriz da Silva Cruz CRM: 24333 (pesquisador responsável) nos telefones; (51) 3359-8520 / (51) 93111076 ou no endereço: Rua Ramiro Barcelos, 2350/2040, Porto Alegre, RS.

Concordo em participar do estudo e declaro que recebi cópia deste Termo de Consentimento.

autorizo armazenamento de material biológico para este projeto;

autorizo armazenamento de material biológico para estudos posteriores;

Assinatura do Paciente ou Responsável

Data

Assinatura do Pesquisador Responsável

Data

Este projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HCPA/UFRGS sob o número 13-0009. Contato: (51) 3359-7640.