



CENTRO UNIVERSITÁRIO DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA EDUCAÇÃO E SAÚDE  
GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

REGINALDO RAMOS DE LIMA

**O USO DE BIOMARCADORES SANGUÍNEOS E DO LÍQUIDO  
CEFALORRAQUIDIANO NOS ESTÁGIOS PRÉ-CLÍNICO E PRODRÔMICO DA  
DOENÇA DE ALZHEIMER**

Trabalho de conclusão de curso, apresentado no formato de artigo científico ao UniCEUB como requisito para a conclusão do Curso de Bacharelado em Biomedicina.

Orientador: Prof. MSc Milton Rego de Paula Júnior

BRASÍLIA

2015

Àqueles que sofreram, sofrem e sofrerão da  
doença de Alzheimer, o nosso carinhoso  
respeito.

# O USO DE BIOMARCADORES SANGUÍNEOS E DO LÍQUIDO CEFALORRAQUIDIANO NOS ESTÁGIOS PRÉ-CLÍNICO E PRODRÔMICO DA DOENÇA DE ALZHEIMER

REGINALDO RAMOS DE LIMA\*

MILTON REGO DE PAULA JÚNIOR\*\*

## Resumo

A doença de Alzheimer é o transtorno neurocognitivo mais frequente no mundo, com alto custo econômico. Ela possui uma fisiopatologia complexa, com causas desconhecidas, marcada por alterações cognitivas e comportamentais, com curso insidioso. Seus estágios pré-clínico e prodrômico são longos, antes do aparecimento dos primeiros sintomas. O objetivo desse trabalho foi discutir e comparar a utilização dos biomarcadores sanguíneos plasmáticos (painéis proteicos e lipídicos) e do líquido cefalorraquidiano (peptídeos  $\beta$ -amiloides e proteínas tau) nesses ambos os estágios. A revisão dos periódicos do Pubmed publicados em inglês, entre 31 de março de 2013 a 31 de março de 2015, foi sistemática, com adoção de critérios de inclusão e exclusão. Um total de 31 artigos foi analisado. Os painéis proteicos e lipídicos possuem uma enorme aplicação, comparável aos biomarcadores do líquido cefalorraquidiano, mas há necessidade de pesquisas com novos desenhos e parâmetros de validação, antes que possam ser utilizados na prática clínica.

Palavras-chave: Biomarcadores Sanguíneos. Líquido Cefalorraquidiano. Doença de Alzheimer pré-clínico. Doença de Alzheimer prodrômico. Proteoma. Lipídios.

\* Cientista Social (habilitação em Antropologia) pela UnB (1995); MSc. em Biologia Animal pela UnB (2002); Psicólogo Clínico pelo UniCEUB (2009). Graduando do curso de Biomedicina do UniCEUB. E-mail: reginaldo.ramosdelima@hotmail.com

\*\* Biomédico pela Universidade Católica de Goiás (1997); MSc. em Patologia Molecular (2003), UnB; Doutorando em Ciências Médicas, UnB; professor dos cursos de Biomedicina e Medicina do UniCEUB. E-mail: milton.junior@uniceub.br

# **BLOOD AND CEREBROSPINAL FLUID BIOMARKERS FOR USE IN PRECLINICAL AND PRODROMAL STAGES OF ALZHEIMER'S DISEASE**

## **Abstract**

Alzheimer's disease is the most common neurocognitive disorder in the world, with a high economic cost. It has a complex pathophysiology, with unknown causes, marked by cognitive and behavioral changes, with insidious course. Its preclinical and prodromal stages are long, before the onset of symptoms. The aim of this study was to discuss and compare the use of blood plasma biomarkers (proteins and lipid panels) and cerebrospinal fluid ( $\beta$ -amyloid peptide and tau protein) both these stages. The review of the PubMed journals published in English, from 31 March 2013 to 31 March 2015, was systematic, with the adoption of inclusion and exclusion criteria. A total of 31 articles were analyzed. The protein and lipid panels have a huge application, comparable to the cerebrospinal fluid biomarker, but there is need for research into new designs and validation parameters, before they can be used in clinical practice.

**Keywords:** Blood Biomarkers. Cerebrospinal Fluid Biomarkers. Preclinical Alzheimer's disease. Prodromal Alzheimer's disease. Proteome. Lipids.

## 1 Introdução

Em todo o mundo, o número estimado de pessoas acometidas com transtornos neurocognitivos ou demenciais superava os 35 milhões em 2010 (CHIU et al., 2013; RASMUSSEN et al., 2015). A doença de Alzheimer representa mais da metade desses casos clínicos (CHIU et al., 2013). No Brasil, por exemplo, a ABRAz: Associação Brasileira de Alzheimer (2015), estima haver 1,2 milhão de portadores, a maioria não devidamente diagnosticada. Sua incidência e prevalência aumentam entre os idosos e entre as mulheres, mas não se sabe se esse aumento da doença de Alzheimer entre as mulheres é devido à maior expectativa de vida ou à existência de um fator de risco predisponente (HOLLAND et al., 2013). Com o envelhecimento da população, projeta-se uma quadruplicação desses números em 2050 (HERRUP et al., 2013), principalmente nos subdesenvolvidos (WIMO et al., 2014).

No tocante à fisiopatologia do Alzheimer, a doença é marcada pela deposição de peptídeos  $\beta$ -amiloide em placas senis extracelulares e pela presença de emaranhados tau neurofibrilares intracelulares, estes resultantes da hiperfosforilação da proteína associada ao microtúbulo tau, no cérebro que levam à neurodegeneração, produzindo morte neuronal (HERRUP et al., 2013; MEREDITH Jr. et al., 2013; WIRTH et al., 2013; BRIER et al., 2014; FAGAN et al., 2014; LANDAU; FROSCH, 2014; OSORIO et al., 2014; TOLEDO et al., 2014), com destaque a atrofia hipocampal (CHIU et al., 2013). Outros mecanismos estão também envolvidos como a ativação da micróglia, neuroinflamação, estresse oxidativo, disfunção mitocondrial, anormalidades do ciclo celular (HERRUP et al., 2013; OSORIO et al., 2014). Um modelo hipotético defende que a deposição  $\beta$ -amiloide antecede os emaranhados tau neurofibrilares, hipometabolismo, atrofia cerebral e declínio cognitivo progressivo, ainda na fase pré-clínica (WIRTH et al., 2013). Contudo, a associação entre a deposição  $\beta$ -amiloide e a neurodegeneração nem sempre ocorre (WIRTH et al., 2013).

No que tange aos critérios de classificação diagnóstica, a doença de Alzheimer faz parte dos transtornos neurocognitivos, contendo alterações cognitivas e comportamentais. Tais transtornos são classificados em maior e leve, com base no tipo de diminuição grave ou leve (necessidade de um esforço maior, mas sem prejuízo das atividades da vida diária) no desempenho de um ou mais domínios cognitivos (atenção, função executiva, aprendizagem, memória, linguagem, perceptomotora, cognição social), com interferência grave ou apenas exigindo esforço compensatório na execução das atividades da vida diária. Tais prejuízos não podem ser explicados por *delirium* ou por uma condição de transtorno mental. Ela pode ser

diagnosticada como provável ou possível. No transtorno neurocognitivo maior devido ao Alzheimer, haverá um provável Alzheimer se uma das seguintes condições estiver presente: a) evidência de uma mutação genética; b) presença de três condições simultâneas, como declínio na memória e aprendizagem e em outro domínio cognitivo; gradual declínio ao longo do tempo; não pode ser explicado por outras patologias. Caso nenhuma das duas condições seja atendida, tem-se um possível Alzheimer. No caso de transtorno neurocognitivo leve devido ao Alzheimer, a provável doença de Alzheimer terá como critério a presença de mutação genética; por sua vez, a possível doença de Alzheimer, o critério anterior não é satisfeito e todas as três seguintes condições estão presentes: declínio evidente na memória e aprendizagem; gradual declínio na cognição; não há evidências de outras condições patológicas que possam explicar esse declínio (MANUAL DIAGNÓSTICO E ESTATÍSTICO DE TRANSTORNOS MENTAIS DSM-5<sup>®</sup>, 2014).

Trata-se de uma complexa doença poligênica, com múltiplos fatores envolvidos, cuja causa ainda é desconhecida (HERRUP et al., 2013; TALWAR et al., 2014). Geralmente os sintomas aparecem na oitava ou na nona década de vida (MANUAL DIAGNÓSTICO E ESTATÍSTICO DE TRANSTORNOS MENTAIS DSM-5<sup>®</sup>, 2014), na forma conhecida como Alzheimer esporádico (HOLLAND et al., 2013). Nesta, o polimorfismo da apolipoproteína E apresenta-se como um forte fator de risco, quando os alelos E4 estão em homozigose, inclusive reduz a idade de início (HERRUP et al., 2013; HOLLAND et al., 2013). Existe também uma forma rara e familiar, com transmissão herança autossômica dominante e penetrância quase completa (HERRUP et al., 2013), o surgimento se dá na quinta e na sexta décadas de vida, com algumas mutações conhecidas em um dos seguintes genes: proteína precursora do amiloide (APP), presenilina 1 (PSEN1) ou presenilina 2 (PSEN2) (MANUAL DIAGNÓSTICO E ESTATÍSTICO DE TRANSTORNOS MENTAIS DSM-5<sup>®</sup>, 2014). Além desses genes citados no Alzheimer típico de início precoce e tardio, outros estão associados e atualmente investigados (TALWAR et al., 2014).

A doença de Alzheimer ainda pode ser classificada em atípica, marcada por uma relativa preservação da memória, e mista, na qual há presença de comorbidades (DUBOIS et al., 2014; MORRIS et al., 2014). A forma atípica pode ser subdividida em variante posterior, variante logopênica e variante frontal. A primeira é marcada por uma atrofia cortical, que pode ter dois subtipos: uma variante occipitotemporal (prejuízos na identificação de objetos, símbolos, palavras ou faces) e uma variante biparietal (com maiores prejuízos no desempenho visuo-espacial, acompanhada de dificuldades no aprendizado motor; a segunda, com prejuízos

na linguagem; e a terceira, pode haver uma apatia progressiva ou comportamentos desinibidos ou estereotipados, com declínio na função executiva (DUBOIS et al., 2014).

Sabe-se que as alterações fisiopatológicas do Alzheimer levam décadas antes do aparecimento dos primeiros sintomas clínicos dessa doença (BERENGUER et al., 2014; PATERSON et al., 2014). Nesse período, além da fase pré-clínica ou assintomática, pode haver uma fase prodromal sintomática ou com transtorno (comprometimento) cognitivo leve devido ao Alzheimer, na qual há um leve declínio da memória episódica, mas sem prejuízos nas atividades da vida diária (MORRIS et al., 2013). É bom destacar que nem todos nesta fase desenvolverão o quadro demencial (CHIU et al., 2013). Portanto, torna-se importante a investigação de biomarcadores de degeneração cortical, moleculares e genéticos (presença de mutações) que possam elucidar o diagnóstico ainda nesse período assintomático ou com comprometimento cognitivo leve (MORRIS et al., 2014), a fim de melhor monitoramento da progressão da doença e da eficácia da terapia (CHIU et al., 2013).

Comumente, faz-se esse acompanhamento por imageamento cerebral e por diagnóstico molecular dos níveis do peptídeo  $\beta$ -amiloide e da proteína tau e seus derivados nas amostras coletadas do líquido cefalorraquidiano (CHIU et al., 2013; MOGHEKAR et al., 2013; MORRIS et al., 2014; FLEISHER et al., 2015). Porém, a ressonância magnética do cérebro e a tomografia de emissão de pósitrons para  $\beta$ -amiloide e proteína tau representam um alto custo; por sua vez, a obtenção da amostra do líquido cefalorraquidiano por punção lombar é um método invasivo, que possui um relativo risco e o desconforto da necessidade de amostras repetitivas para a avaliação da neurodegeneração ou do efeito da terapia (CHIU et al., 2013). Na tentativa de superar esses inconvenientes, pesquisa-se painéis de biomarcadores proteicos (GUO et al., 2013; MARKSTEINER et al., 2014; YANG et al., 2014), metabólicos (WANG et al., 2014) e lipídicos (MAPSTONE et al., 2014) no exame de amostras sanguíneas, que satisfaçam as condições de baixo custo e elevada acurácia, validade, reprodutibilidade, sensibilidade e especificidade (MORRIS et al., 2014), assim como possuam um valor preditivo (BURNS; ORSINI; L'ITALIEN, 2013), proporcionem um momento mais adequado de intervenções terapêuticas antes do início das sequelas irreversíveis da patologia (PATERSON et al., 2014) e respeitem as implicações éticas (ARIAS; KARLAWISH, 2014).

Esse trabalho se propõe a discutir as recentes pesquisas com biomarcadores sanguíneos que possam ser utilizados na investigação dos estágios pré-clínico e prodromático da doença de Alzheimer, especificamente os painéis proteicos e lipídicos do plasma,

comparando-os com os biomarcadores comumente obtidos a partir da amostra do líquido cefalorraquidiano: peptídeos  $\beta$ -amiloides e proteínas tau.

## **2 Metodologia**

### **2.1 Fonte de pesquisa**

Os periódicos pesquisados estavam disponibilizados no PubMed. Consultou-se também o Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais DSM-5<sup>®</sup> (2014), versão traduzida do manual da *American Psychiatric Association*, e as informações disponibilizadas pela ABRAZ: Associação Brasileira de Alzheimer (2015). As ilustrações, com exceção do gráfico, foram adaptadas do vídeo produzido por Jannis, Dempsey e Fredenburg (2010).

### **2.2 Tipo de revisão dos periódicos**

A revisão dos periódicos foi sistemática, conforme os critérios de inclusão e exclusão especificados abaixo. Em algumas situações, somente o *Abstract* serviu como fonte para a presente análise.

### **2.3 Critérios de inclusão**

Examinaram-se apenas os periódicos disponibilizados entre 31 de março de 2013 a 31 de março de 2015, que realizaram pesquisas em humanos. Os descritores utilizados, combinando-os entre si, foram: “*Alzheimer*”, “*prodromal*”, “*preclinical*”, “*plasma*”, “*biomarker*”, “*phospholipids*”, “*proteome*”, “*proteins*”, “*Mild cognitive impairment*”. A ênfase nesse trabalho era encontrar artigos que avaliassem biomarcadores sanguíneos preditivos, ou seja, que pudessem prever a mudança de um estágio pré-clínico assintomático para um estágio prodromático sintomático, com evidência do Comprometimento Cognitivo Leve, ou deste para uma provável doença de Alzheimer.

### **2.4 Critérios de exclusão**

Permitiu-se encontrar 187 periódicos, porém não se consideraram as 47 revisões, apenas os artigos originais. Dos 140 restantes, excluíram-se os artigos repetidos, os não publicados em inglês, os relatos de aplicação de drogas, tratamentos, imageamento cerebral, imunoglobulina, interação mitocondrial, marcadores inflamatórios e neuroinflamatórios,

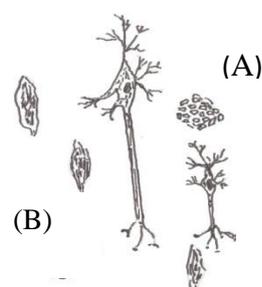
citocinas, doenças, mutações genéticas, microRNA de interferência, assuntos outros não relevantes ao tema discutido nesse trabalho.

Excetuando-se um ou outro eventual artigo utilizado para a fundamentação teórica deste trabalho, não se avaliaram as pesquisas com biomarcadores de neurodegeneração cerebral, nem aquelas que utilizassem apenas um ou mais biomarcadores no plasma, como apolipoproteína E, proteína tau ou peptídeos  $\beta$ -amiloide. Também não se discutiu as pesquisas que apenas discriminassem, com biomarcadores sanguíneos, os indivíduos normais dos acometidos com Alzheimer e Comprometimento Cognitivo Leve, nem aquelas que avaliassem a concentração de apolipoproteína E no líquido cefalorraquidiano e o declínio cognitivo. Com esses critérios de exclusão, pôde-se separar para a análise um total de 31 artigos originais.

### 3 Modelo fisiopatológico do Alzheimer

Um dos modelos que tentam explicar a fisiopatologia do Alzheimer é a hipótese da cascata amiloide (LANDAU; FROSCHE, 2014; OSORIO et al., 2014). Na figura 1 podem-se visualizar as características desse modelo, que está baseado na presença dos depósitos de peptídeos  $\beta$ -amiloide, que constituem as placas senis, e pelos emaranhados tau neurofibrilares, ambas as condições resultariam na neurodegeneração, com morte neuronal no cérebro (HERRUP et al., 2013; MEREDITH Jr. et al., 2013; WIRTH et al., 2013; FAGAN et al., 2014; LANDAU; FROSCHE, 2014; OSORIO et al., 2014; TOLEDO et al., 2014).

Figura 1 – Característica fisiopatológica da doença de Alzheimer



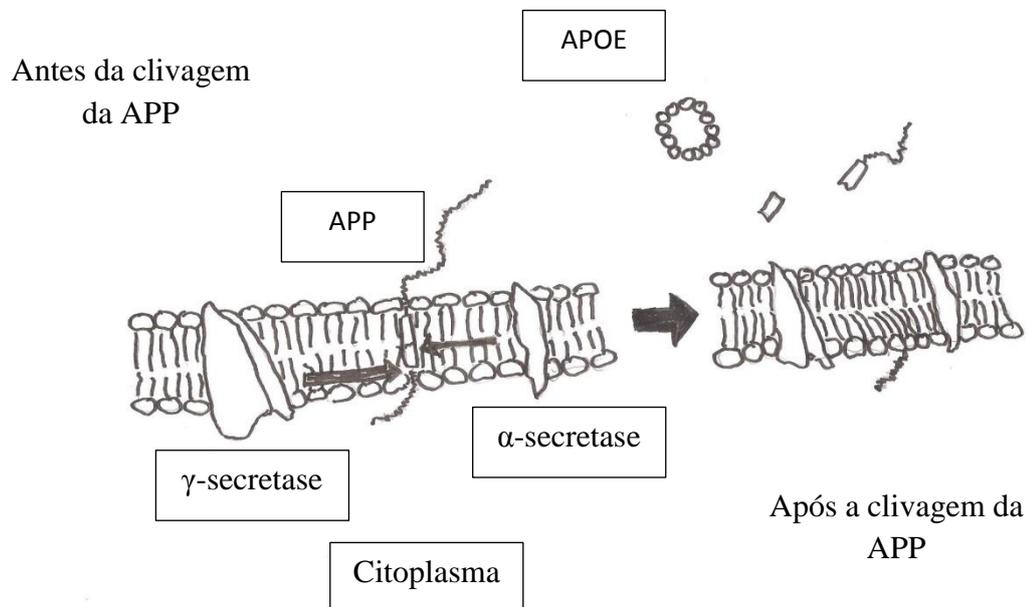
(A) Depósitos  $\beta$ -amiloides nas placas senis fora do neurônio

(B) Emaranhados tau neurofibrilares dentro do neurônio

Fonte: adaptado do vídeo produzido por Jannis, Dempsey e Fredenburg (2010).

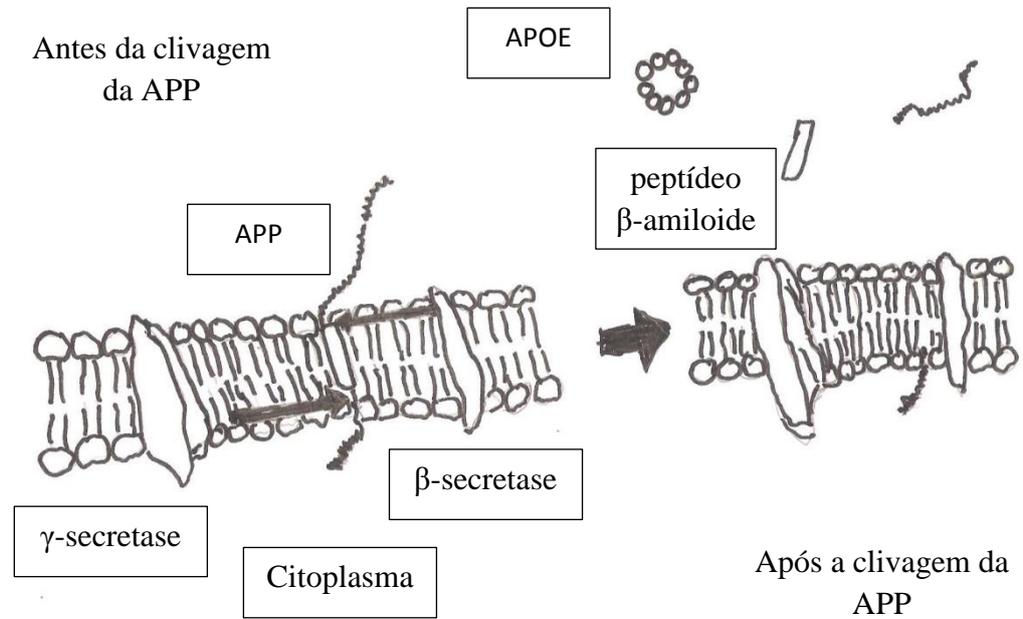
Na Figura 2, pode-se visualizar o mecanismo do processo proteolítico da proteína precursora amiloide normal, com a participação das enzimas  $\gamma$ -secretase e  $\alpha$ -secretase (JANNIS; DEMPSEY; FREDENBURG, 2010). No Alzheimer, demonstrado na Figura 3, o processo proteolítico acontece de maneira diferente, com o envolvimento da enzima  $\beta$ -secretase no lugar da  $\alpha$ -secretase, que produzirá, sobretudo, peptídeos  $\beta$ 42-amiloide, que formarão agregados extracelularmente e os depósitos, vistos na Figura 4, característicos das placas senis (JANNIS; DEMPSEY; FREDENBURG, 2010; MEREDITH Jr et al., 2013; OSORIO et al., 2014). Tais depósitos são resultados de um desequilíbrio entre a produção dos peptídeos  $\beta$ -amiloide e a *clearance* desses peptídeos, no Alzheimer de início tardio (OSORIO et al., 2014). A Apolipoproteína E (APOE), visualizada na Figura 2, no cérebro está implicada nessa depuração (RASMUSSEN et al., 2015). Isso refletirá nos baixos níveis dos peptídeos  $\beta$ -amiloide no líquido cefalorraquidiano nos indivíduos com doença de Alzheimer ou mesmo muitos anos antes do início da demência (MEREDITH et al., 2013).

Figura 2 – Mecanismo normal proteolítico da proteína precursora amiloide (APP) da membrana celular



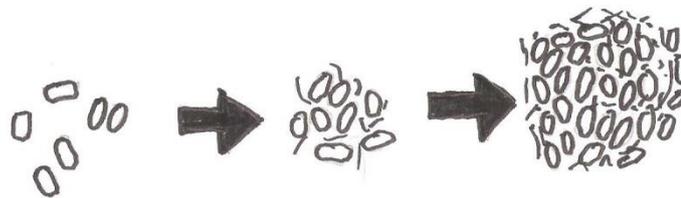
Fonte: adaptado do vídeo produzido por Jannis, Dempsey e Fredenburg (2010).

Figura 3 – Mecanismo proteolítico da proteína precursora amiloide (APP) da membrana celular com formação dos peptídeos  $\beta$ -amiloide no Alzheimer



Fonte: adaptado do vídeo produzido por Jannis, Dempsey e Fredenburg (2010).

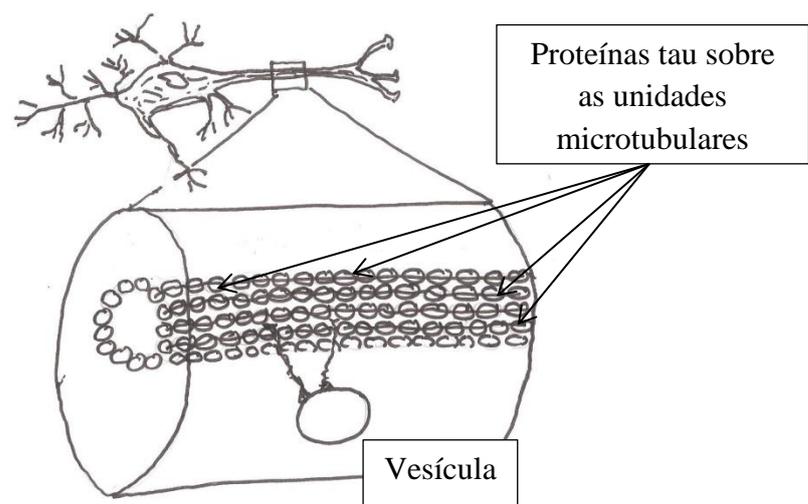
Figura 4 – Agregação dos peptídeos  $\beta$ -amiloide nas placas senis no Alzheimer



Fonte: adaptado do vídeo produzido por Jannis, Dempsey e Fredenburg (2010).

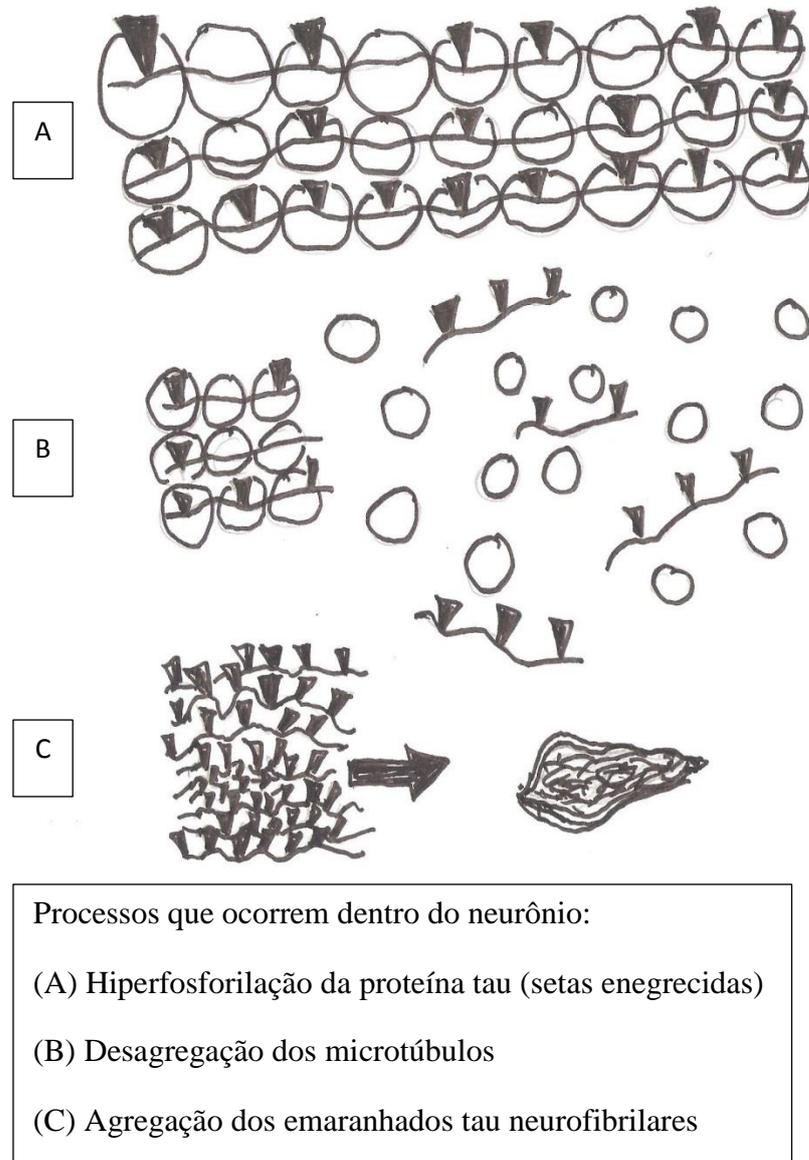
A Figura 5 mostra o interior do axônio do neurônio, no qual se pode ver um dos microtúbulos, formado por várias estruturas unidas entre si, tendo em sua superfície a proteína tau, disposta longitudinalmente; Observa-se nesta mesma figura o transporte das vesículas dentro dos axônios, por esses microtúbulos (JANNIS; DEMPSEY; FREDENBURG, 2010). Na Figura 6, pode-se notar o processo de hiperfosforilação da proteína tau, associada aos microtúbulos, com a conseqüente desagregação dos mesmos, e a produção dos emaranhados tau neurofibrilares, que promoverão a morte neuronal (JANNIS; DEMPSEY; FREDENBURG, 2010; MEREDITH Jr et al., 2013). No líquido cefalorraquidiano, esse fato explica parcialmente o aumento em torno de duas a três vezes do nível das proteínas tau e p181-tau (fosfo-epítipo 181), entre vários outros fosfo-epítipos, nos indivíduos com leve e moderada doenças de Alzheimer, pois se tem conhecimento que os próprios neurônios secretam essas proteínas (MEREDITH Jr et al., 2013). Assim como a diminuição do nível dos peptídeos  $\beta$ -amiloide no líquido cefalorraquidiano, o aumento das proteínas tau e p-tau possui um valor preditivo na conversão à doença de Alzheimer leve (MEREDITH Jr et al., 2013).

Figura 5 – Desenho esquemático de um dos microtúbulos dentro do axônio do neurônio, com destaque para o transporte de uma vesícula e a proteína tau, disposta longitudinalmente (seta) sobre a superfície das unidades microtubulares



Fonte: adaptado do vídeo produzido por Jannis, Dempsey e Fredenburg (2010).

Figura 6 – A formação dos emaranhados tau neurofibrilares e desagregação dos microtúbulos dentro do neurônio no Alzheimer



Fonte: adaptado do vídeo produzido por Jannis, Dempsey e Fredenburg (2010).

Baseado em evidências de neuroimagem e de investigações de amostras do líquido cefalorraquidiano, os depósitos de peptídeos  $\beta$ -amilóide precedem cinco a dez anos antes da

neurodegeneração, com a presença de atrofia do córtex médio temporal, hipometabolismo temporo-parietal, acúmulo de proteína tau no líquido cefalorraquidiano (LANDAU; FROSCHE, 2014). Em relação às mudanças cognitivas, essas alterações ocorrem uma ou mais décadas antes (SOLDAN et al., 2013; LANDAU; FROSCHE, 2014; TOLEDO et al., 2014), inclusive o acúmulo de emaranhado tau neurofibrilares (SOLDAN et al., 2013), marcando um longo estágio pré-clínica antes do aparecimento dos primeiros sintomas demenciais (SOLDAN et al., 2013; TOLEDO et al., 2014; FORTEA et al., 2014) ou do estágio prodrômico, no qual o comprometimento cognitivo leve é presente (TOLEDO et al., 2014).

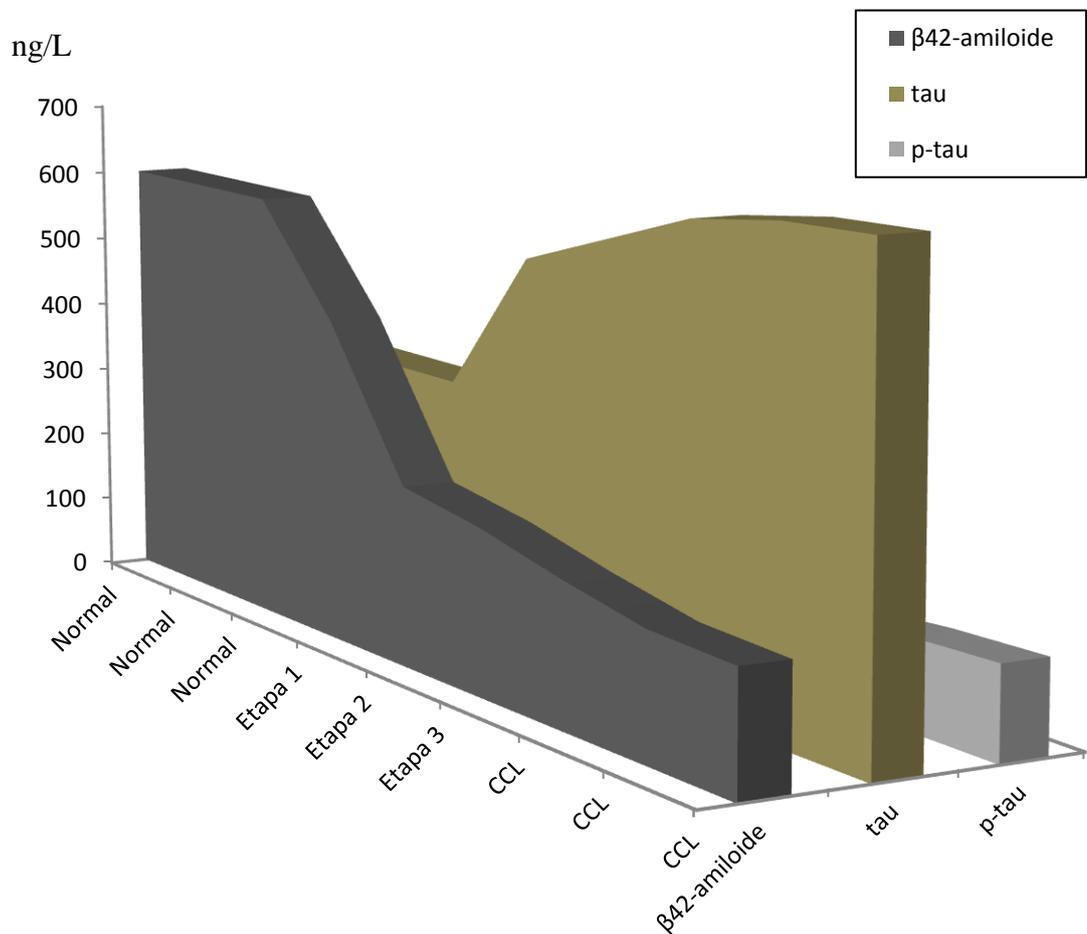
Hipoteticamente, a deposição  $\beta$ -amiloide é o evento primário, e influenciará a formação dos emaranhados tau neurofibrilares; porém, contraditoriamente, há evidências em estudos de necropsia que os achados tau neurofibrilares precedem essa deposição (OSORIO et al., 2014). Propõe-se um modelo que o acúmulo dos depósitos de peptídeos  $\beta$ -amiloide ocorre de maneira contínua no cérebro, com reflexo na concentração de biomarcadores no líquido cefalorraquidiano (peptídeos  $\beta$ -amiloide, tau e p-tau) marcado por três subdivisões ou etapas, que antecederiam o estágio prodrômico, com comprometimento cognitivo leve, e os sintomas propriamente ditos do Alzheimer: na etapa 1, com assintomática deposição  $\beta$ -amiloide; na etapa 2, há continuidade dessa deposição, com evidência do início da neurodegeneração no cérebro; na etapa 3, já se nota um sutil declínio cognitivo (KNOPMAN et al., 2013; VAN HARTEN et al., 2013; FORTEA et al., 2014; TOLEDO et al., 2014).

Na prática clínica, conforme visualizado na Figura 7, os indivíduos normais que estariam na etapa 0 (Normal) teriam a concentração de peptídeo  $\beta$ 42-amiloide superior a 550 ng/L, tau deveria estar inferior a 375 ng/L e p-tau, menor do que 52 ng/L no líquido cefalorraquidiano. Na etapa 1, já se evidenciaria alterações no nível do peptídeo  $\beta$ 42-amiloide, mas tau e p-tau estariam normais. Na etapa 2, a concentração do peptídeo  $\beta$ 42-amiloide estaria alterada, e tau e p-tau poderiam ambas estarem aumentadas, ou apenas uma delas. Na etapa 3, as concentrações do peptídeo  $\beta$ 42-amiloide, tau e p-tau estariam alterados (VAN HARTEN et al., 2013). Estes valores seguem alterados no estágio prodrômico (MOGHEKAR et al., 2013).

Uma observação interessante que neste trabalho de Van Harten et al. (2013), os sujeitos que se tinham queixas do desempenho da própria memória, poderiam já ser classificados nas etapas 1 e 2, anteriores à etapa 3, definida como aquela em que o sutil declínio cognitivo comparece. Tal dado questiona esse modelo supracitado, em etapas ou

subdivisões do estágio pré-clínico, quanto aos aspectos cognitivos (VAN HARTEN et al., 2013).

Figura 7 – Mudanças dos biomarcadores do líquido cefalorraquidiano nos estágios pré-clínico e prodrômico (Comprometimento Cognitivo Leve – CCL) da doença de Alzheimer (valores normais são:  $\beta$ 42-amiloide > 550 ng/L; tau < 375 ng/L; p-tau < 52 ng/L)



Fonte: O gráfico obtido a partir dos valores estimados pelos autores, baseado nos parâmetros normais encontrados em VAN HARTEN et al. (2013) e das informações sobre o CCL em MOGEKHAR et al. (2013).

#### **4 O uso de biomarcadores sanguíneos para os estágios do Alzheimer pré-clínico e prodrômico**

Em uma recente análise quantitativa de lipídios, aminoácidos e amins biogênicas, por meio de método lipidômico e metabolômico, provenientes de 124 amostras do plasma sanguíneo com pessoas de 70 ou anos mais, Mapstone et al. (2014) conseguiram identificar dez metabólitos que se apresentam bastante diminuídos – fosfatidilcolinas e acilcarnitinas –, nos idosos normais, que passariam a ser classificados como indivíduos com Comprometimento Cognitivo Leve amnésico ou com Alzheimer leve, com 2 a 3 anos de antecedência, com uma acurácia superior a 90%. Porém, esse painel lipídico ainda necessita de validação externa, com semelhante classificação clínica, além da utilização de amostras do plasma de sujeitos com uma maior diversidade em suas características demográficas (MAPSTONE et al., 2014).

É importante ressaltar que os idosos eram considerados saudáveis no início do estudo e foram acompanhados observacionalmente durante cinco anos. Ao longo desse tempo, contudo, alguns deles foram reclassificados em três grupos, a partir de critérios de avaliação neuropsicológica, relacionados com a medição do desempenho de memória e com o exame da cognição global: Comprometimento Cognitivo Leve amnésico/Alzheimer leve, Conversores (com desempenho de memória piorado, podendo agora ser incluídos em Comprometimento Cognitivo Leve amnésico ou com Alzheimer leve) e Normais (grupo controle) (MAPSTONE et al., 2014).

Na Tabela 1 visualiza-se os dez diferentes tipos de fosfolipídios encontrados na pesquisa de Mapstone et al. (2014). Essa depleção de fosfatidilcolinas e acilcarnitinas no plasma sanguíneo assinala indiretamente a existência de um processo de desregulação da integridade da membrana dos neurônios colinérgicos no cérebro já no estágio pré-clínico, com a consequente morte neuronal (MAPSTONE et al., 2014). De fato, as fosfatidilcolinas e as acilcarnitinas são fundamentais na integridade e funcionamento das membranas celulares (JONES; McDONALD; BORUM, 2010 apud MAPSTONE et al., 2014). No cérebro, as acilcarnitinas também estão envolvidas no metabolismo lipídico que acontece dentro das mitocôndrias e são implicadas com a regulação, a produção e a manutenção dos neurônios, por meio do aumento da produção do fator de crescimento neural. Este é um potente fator trófico e de sobrevivência para os neurônios colinérgicos, que estão afetados na doença de Alzheimer (JONES; McDONALD; BORUM, 2010 apud MAPSTONE et al., 2014).

Tabela 1 – Fosfolipídios identificados no plasma que discriminam idosos normais que converterão em Comprometimento Cognitivo Leve amnésico ou Alzheimer leve

Fosfolipídio	Tipo
Diacil C36:6	Fosfatidilcolina
Diacil C38:0	Fosfatidilcolina
Diacil C38:6	Fosfatidilcolina
Diacil C40:1	Fosfatidilcolina
Diacil C40:2	Fosfatidilcolina
Diacil C40:6	Fosfatidilcolina
Acil-Aquil C40:6	Fosfatidilcolina
Lisoacil C18:2	Fosfatidilcolina
Propionil (C3)	Acilcarnitina
C16:1-OH	Acilcarnitina

Fonte: adaptado de Mapstone et al. (2014)

Numa pesquisa que tinha como objetivo investigar metabólitos associados com a doença de Alzheimer, Wang et al. (2014) constataram uma diminuição significativa no plasma sanguíneo em indivíduos com a doença de Alzheimer e Comprometimento Cognitivo Leve amnésico dos ácidos graxos monoinsaturados e poli-insaturados (n-3, n-6 e n-9), assim como os ácidos graxos saturados (ácido palmítico, ácido tetradecanóico, ácido pentadecanóico e ácido octadecanóico), o que reforça as evidências nas alterações do metabolismo lipídico.

Dentre os artigos consultados sobre o painel de biomarcadores proteicos no plasma sanguíneo, duas pesquisas demonstraram diferenças entre indivíduos normais daqueles acometidos com Alzheimer (GUO et al., 2013; MARKSTEINER et al., 2014) e, inclusive com Comprometimento Cognitivo Leve (MARKSTEINER et al., 2014), mas sem realizar comentários sobre o valor preditivo desses resultados. Burnham et al. (2014) investigaram um painel de 176 marcadores biológicos a partir das amostras do plasma sanguíneo de 273 indivíduos participantes do estudo Imagem Australiana, Biomarcadores e Estilo de Vida, que foram previamente avaliados com alta e baixa marcação de deposição  $\beta$ -amiloide no

neocórtex pela tomografia de emissão de pósitrons. Eles conseguiram estabelecer um modelo preditivo, no qual nove proteínas do plasma sanguíneo (CXCL-13, PPY, IL-17, IgM, Proteína C reativa, VCAM-1, IGFBP2, ANGPF2 e CD40) foram capazes de identificar, com sensibilidade de 80% e especificidade de 82%, esses dois grupos revelados por esse método de neuroimagem. Este trabalho teve validação externa com amostras provenientes da Iniciativa de Neuroimagem da Doença de Alzheimer (BURNHAM et al., 2014).

Diferentemente dessas publicações, o trabalho de Yang et al. (2014) conseguiu identificar proteínas e peptídeos capazes de predizer, com acurácia de aproximadamente 79%, a progressão rápida para a doença de Alzheimer em indivíduos com Comprometimento Cognitivo Leve em comparação àqueles que permaneceram estáveis. Essa acurácia é semelhante ao trabalho publicado em 2007 por Ray et al., citado por Yang et al. (2014), no qual o painel de 18 proteínas poderia discriminar indivíduos com Comprometimento Leve que rapidamente evoluíam para o Alzheimer, com uma sensibilidade e especificidade ao redor de 80%.

No estudo de Yang et al. (2014) foram utilizadas 119 amostras de plasma sanguíneo de idosos de ambos os sexos com Comprometimento Cognitivo Leve (estável e de rápida progressão para a doença de Alzheimer), com idade variando entre 65 e 77 anos. Das 125 proteínas analisadas, encontraram 60 que podiam discriminar entre os idosos com Comprometimento Cognitivo Leve estável e de rápida progressão para a doença de Alzheimer. Destas identificaram 13 proteínas tiveram comportamentos de regulação em direção opostas dependendo do sexo: fator B do Complemento, fator I do Complemento,  $\alpha$ -1-ácido glicoproteína 1, Ig  $\gamma$ -3 (região da cadeia 3), ceruplasmina, fator H do Complemento, inibidor da protease plasmática C1, fibronectina, cadeias  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$  do fibrinogênio, gelsolina e  $\alpha$ -2-macroglobina. Destas as mais informativas, nesse modelo que leva em conta o sexo, foram a  $\alpha$ -2-macroglobina e a fibronectina. Cabe ainda destacar que muitas dessas proteínas sugerem o envolvimento do sistema imune, especialmente em processos neuroinflamatórios, na patologia da doença de Alzheimer (YANG et al., 2014).

Uma das proteínas acima, a  $\alpha$ -2-macroglobina apresentou-se aumentada, ainda que sem diferença significativa, nas mulheres idosas com Comprometimento Cognitivo Leve de rápida progressão para a doença de Alzheimer comparada aos homens idosos nesta mesma condição. Quando esse primeiro grupo era comparado àqueles com Comprometimento Cognitivo Leve estável, o nível de  $\alpha$ -2-macroglobina era 13% superior. Porém, se a

comparação era feita entre homens idosos com Comprometimento Cognitivo Leve de rápida progressão e àqueles com Comprometimento Cognitivo Leve estável, o nível de  $\alpha$ -2-macroglobina era 12% inferior nos idosos com Comprometimento Cognitivo Leve de rápida progressão (YANG et al., 2014).

## **5 A comparação com os biomarcadores comumente utilizados no líquido cefalorraquidiano nos estágios do Alzheimer pré-clínico e prodromico**

Ao contrário das pesquisas sobre os painéis proteicos e lipídicos, a utilização dos biomarcadores no líquido cefalorraquidiano (peptídeos  $\beta$ -amiloide, proteínas tau e p181-tau) tem a sua importância reconhecida como método diagnóstico de diferenciação entre indivíduos normais daqueles com a doença de Alzheimer, inclusive por proporcionar uma avaliação preditiva para a progressão do declínio cognitivo (MEREDITH Jr et al., 2013; MOGHEKAR et al., 2013; SOLDAN et al., 2013; VAN HARTEN et al., 2013; BERENGUER et al., 2014; FAGAN et al., 2014; FORTEA et al., 2014; OSORIO et al., 2014; YANG et al., 2014; FLEISHER et al., 2015). Contudo, não é um método sem riscos e inconvenientes, como o desconforto da punção, àqueles que se submetem a esse exame (CHIU et al., 2013; GUO et al., 2013; MAPSTONE et al., 2014; MARKSTEINER et al., 2014).

Na presente revisão, constataram-se, contudo, duas controvérsias a respeito da utilização desses biomarcadores do líquido cefalorraquidiano. A primeira é o caráter preditivo. Blennow et al., 2010, apud Mapstone et al. (2014), afirmam que o valor preditivo para a doença de Alzheimer dos três tipos de biomarcadores do líquido cefalorraquidiano no estágio pré-clínico não é tão forte, e sua utilização é apenas útil para a confirmação diagnóstica. A segunda é a capacidade desses biomarcadores do líquido cefalorraquidiano em distinguir a doença de Alzheimer das outras demências, como a demência vascular ou a demência frontotemporal. Para Marksteiner et al. (2014) essa diferenciação não é possível. Contrapondo a essa posição, Meredith Jr et al. (2013) afirmam que o aumento da proteína tau não é detectada nas demências de Parkinson e frontotemporal.

No parâmetro predição, entre os estudos longitudinais com os três tipos de biomarcadores do líquido cefalorraquidiano mencionados, a publicação de Moghekar et al. (2013) demonstrou a capacidade de predição de mais de cinco anos antes do aparecimento dos

primeiros sintomas de Comprometimento Cognitivo Leve ou mesmo doença de Alzheimer. Coletou-se, inicialmente, a amostra do líquido cefalorraquidiano em 265 indivíduos saudáveis, com média de idade de 57,2 anos e 61% pertencentes ao sexo feminino, avaliados por testes neuropsicológicos, e sem problemas neurológicos e psiquiátricos. Esses sujeitos foram acompanhados, e 53 destes receberam posteriormente o diagnóstico de Comprometimento Cognitivo Leve ou doença de Alzheimer (não há uma subdivisão nesses dois grupos). Ao se comparar a linha de base constituída pela análise dos biomarcadores coletados, notou-se uma diferença naqueles que permaneceram normais ( $n = 212$ ), com média de idade de 56 anos e constituídos por 61% de mulheres, em relação ao grupo restante que progrediu para o Comprometimento Cognitivo Leve ou doença de Alzheimer ( $n = 53$ ), com média de idade de 62 anos e formado por 58% de mulheres. Neste, os valores dos peptídeos  $\beta$ -amiloide eram menores; t-tau (tau total) e p-tau (tau fosfo-epítipo) eram maiores, assim como as razões t-tau/ $\beta$ -amiloide e p-tau/ $\beta$ -amiloide. É interessante assinalar que a elevação da taxa dessas duas razões torna-se um poderoso valor preditivo para quem sofrerá precocemente declínio cognitivo (MOGHEKAR et al., 2013).

O trabalho de Moghekar et al. (2013) foi corroborado pela pesquisa de Berenguer et al. (2014), quanto aos resultados da linha de base dos três biomarcadores (peptídeos  $\beta$ -amiloide, t-tau e p-tau) e das duas razões (t-tau/ $\beta$ -amiloide e p-tau/ $\beta$ -amiloide), num grupo assintomático no início ( $n = 39$ ), saudável, com idade variando entre 59 e 83 anos, avaliado por diferentes testes neuropsicológicos que mediram a cognição global, a memória, a atenção, a fluência verbal, a atividade da vida diária e o comportamento). Os indivíduos que desenvolveram declínio cognitivo ( $n = 10$ ) nesses domínios, após dois anos desde a coleta das amostras do líquido cefalorraquidiano, tiveram reduzidos níveis de peptídeo  $\beta$ -amiloide; as razões t-tau/ $\beta$ -amiloide e p-tau/ $\beta$ -amiloide estavam aumentadas; as concentrações de t-tau e p-tau eram maiores, mas não diferiram significativamente do grupo controle ( $n = 29$ ).

Alguns trabalhos mostraram uma análise mais detalhada entre a utilização do teste neuropsicológico e os biomarcadores mencionados do líquido cefalorraquidiano para a doença de Alzheimer. Um dos resultados encontrados por Berenguer et al. (2014) foi a correlação do pior desempenho no teste de Recordação Seletiva Livre e com Pistas, que avalia a memória, e os reduzidos níveis dos peptídeos  $\beta$ -amiloide. Todavia, nenhuma correlação foi encontrada entre os níveis de t-tau e p-tau e as medidas cognitivas. A cognição global não pôde ser correlacionada com o nível de peptídeo  $\beta$ -amiloide.

Na publicação de Van Harten et al. (2013), 132 sujeitos, com idade variando entre 53 a 69 anos e 42% pertencentes ao sexo feminino, que se queixavam subjetivamente no desempenho da própria memória, classificados inicialmente conforme as concentrações de peptídeo  $\beta$ 42-amiloide, tau e p-tau coletadas do líquido cefalorraquidiano (Tabela 2), foram acompanhados durante  $2 \pm 1$  anos e avaliados no desempenho de quatro domínios cognitivos (memória, atenção, função executiva e linguagem). Destes, somente 10% ( $n = 13$ ) progrediram clinicamente para o quadro de Comprometimento Cognitivo Leve ou demência devido à doença de Alzheimer. A análise dos três biomarcadores pôde constatar que tanto a concentração do peptídeo  $\beta$ 42-amiloide como a razão  $\beta$ 42-amiloide/tau sozinhos puderam prever o declínio no desempenho da memória, função executiva e cognição global. As concentrações de tau e p-tau, independentemente, não predisseram o declínio cognitivo (VAN HARTEN et al., 2013).

Tabela 2 – Distribuição dos 132 sujeitos, conforme a avaliação dos biomarcadores do líquido cefalorraquidiano (peptídeo  $\beta$ 42-amiloide, tau e p-tau) em diferentes etapas ou subdivisões do estágio pré-clínico para o Alzheimer e no grupo suspeito de não desenvolver Alzheimer (GSNDA)

Etapas	N (%)	Biomarcadores do líquido cefalorraquidiano (ng/L)		
		$\beta$ 42-amiloide	tau	p-tau
Etapas 0	80 (61)	> 550	< 375	< 52
Etapas 1	11 (8)	< 550	< 375	< 52
Etapas 2	10 (8)	< 550	Um ou ambos alterados	
GSNDA	31 (23)	> 550	Um ou ambos alterados	

Fonte: adaptado de Van Harten et al. (2013)

No quesito acurácia, Mapstone et al. (2014) demonstraram, que a utilização dos dez fosfolipídios (fosfaditilcolinas e acilcarnitinas) plasmáticos possuem uma acurácia acima de 90% na predição, com dois a três anos de antecedência, daqueles indivíduos idosos normais

que se converteriam em Comprometimento Cognitivo Leve amnésico ou na patologia da doença de Alzheimer, semelhante ou superior aos estudos que utilizam os três tipos de biomarcadores do líquido cefalorraquidiano. Essa comparação, porém, não foi realizada com as publicações revisadas nesse trabalho sobre os painéis proteicos com valor preditivo (BURNHAM et al., 2014; YANG et al., 2014).

Essas pesquisas com painéis proteicos e lipídicos plasmáticos ainda precisam ser realizadas em muitas outras situações, no que diz respeito à reserva cognitiva (SOLDAN et al., 2013) e às mutações dos genes proteína precursora do amiloide (APP), presenilina 1 (PSEN1) ou presenilina 2 (PSEN2) nas formas de Alzheimer familiar (FAGAN et al, 2014; FLEISHER et al., 2015).

A reserva cognitiva é um constructo que pode ser definido como o nível do repertório educacional e o envolvimento ocupacional em atividades complexas e socialmente e cognitivamente estimulantes (SOLDAN et al., 2013). Em um estudo utilizando-se de biomarcadores no líquido cefalorraquidiano (peptídeos  $\beta$ -amiloide, t-tau, p-tau, t-tau/ $\beta$ -amiloide e p-tau/ $\beta$ -amiloide) de indivíduos ainda no estágio pré-clínico, constatou-se que aqueles possuidores de alta reserva cognitiva: a) tem um reduzido risco de progressão para o declínio cognitivo; b) são capazes de tolerar até mesmo baixos níveis de peptídeos  $\beta$ -amiloide; c) a progressão para o declínio cognitivo é independente do nível de peptídeos  $\beta$ -amiloide, mas depende dos níveis de t-tau e p-tau, o que significa uma diminuição do efeito da reserva cognitiva sobre a progressão do declínio cognitivo (SOLDAN et al., 2013).

Fagan et al. (2014), num estudo relacionado com a forma familiar da doença de Alzheimer, com metodologias transversal e longitudinal, tiveram como objetivo avaliar a hipótese do nível do aumento das alterações dos biomarcadores no líquido cefalorraquidiano e no plasma ao longo da progressão dessa patologia em portadores e não portadores de mutações nos genes APP, PSEN1 e PSEN2. Os 242 sujeitos da metodologia transversal, examinados neuropsicologicamente, foram agrupados em três diferentes grupos, conforme ser não portador (n = 96; média de idade: 40,3) ou portador de mutação (n = 146), e estes, subdivididos com sintomas de prejuízos cognitivos (n = 62; média de idade: 45,2) e assintomáticos (n = 84; média de idade: 34,6). O estudo longitudinal compreendeu a avaliação de 37 sujeitos, nos seguintes grupos: não portador (n = 11; média de idade: 40,0), portador de mutação com sintomas de declínio cognitivo (n = 17; média de idade: 44,4) e portador de mutação, assintomáticos (n = 9; média de idade: 37,7). Os participantes foram submetidos à

coleta de biomarcadores do líquido cefalorraquidiano (peptídeos  $\beta$ -amiloide, tau, p181-tau e proteína semelhante à visinina – VILIP-1, que é marcadora de injúria e degeneração cerebral) e plasmáticos (peptídeos  $\beta$ -amiloide e visinina – VILIP-1), além da marcação para peptídeos  $\beta$ -amiloide por meio da tomografia por emissão de pósitrons. Eles eram provenientes de famílias com mutação no gene PSEN1 (70%), ambos os sexos (60% do sexo feminino), genotipados para o polimorfismo APOE (ao menos 25% dos indivíduos possuíam um alelo E4, e destes cinco eram homozigotos E4) (FAGAN et al., 2014).

No que se reporta a análise dos biomarcadores do líquido cefalorraquidiano (peptídeos  $\beta$ -amiloide, tau e p181-tau), assunto desta revisão, esse trabalho mostrou, no estudo transversal, que a redução da concentração de peptídeos  $\beta$ -amiloide e a elevação da concentração de tau e p181-tau em portadores de mutação (assintomáticos) podem predizer uma estimativa de dez a vinte anos antes do início dos primeiros sintomas e antes da detecção dos déficits cognitivos. Quanto aos resultados do estudo longitudinal, concluiu-se que a concentração dos biomarcadores do líquido cefalorraquidiano de injúria neuronal (tau, p181tau e VILIP-1) ocorre uma diminuição da concentração desses biomarcadores após o início dos primeiros sintomas, revelando uma lentificação do processo de neurodegeneração com o progresso da patologia nos indivíduos portadores de mutação (FAGAN et al., 2014).

Fleisher et al. (2015) analisaram, num modelo de estudo transversal, as mudanças associadas à idade verificadas no imageamento do cérebro e nos biomarcadores do plasma sanguíneo e do líquido cefalorraquidiano para o Alzheimer em 54 parentes de ambos os sexos, portadores e não portadores da mutação E280A no gene da presenilina 1 (PSEN1), com média de idade variando de 20 a 59 anos, com diferente nível educacional e genotipagem para o polimorfismo APOE. Também foram submetidos a diferentes avaliações neuropsicológicas (cognição global, atenção, função executiva e memória), os quais foram classificados em não portadores normais (n = 22), portadores sem déficit cognitivo (n = 20) e portadores com déficit cognitivo (n = 12).

Algumas das principais conclusões, referente à análise dos biomarcadores (peptídeos  $\beta$ -amiloide, tau total e p-tau), nessa pesquisa foram: a) os portadores da mutação E280A no gene da presenilina 1 (PSEN1), sem déficit cognitivo avaliado, tiveram a concentração reduzida de peptídeos  $\beta$ -amiloide e elevação da tau total, quando comparados com os não portadores, os quais não apresentavam nenhum prejuízo nos domínios cognitivos avaliados; b) pôde-se inferir, por meio de modelos de regressão, uma estimativa de divergência

aproximada da redução dos peptídeos  $\beta$ -amiloide, entre portadores e não portadores da referida mutação, na idade de 24 anos (95% Intervalo de Confiança, 20 a 30 anos), cerca de 20 anos em relação ao início do Comprometimento Cognitivo Leve (95% Intervalo de Confiança, 14 a 24 anos) e 25 anos antes do início dos sintomas de demência de Alzheimer; c) no caso do aumento do tau total, essa estimativa era 29 anos (95% Intervalo de Confiança, 24 a 37 anos), cerca de 15 anos em relação ao início do Comprometimento Cognitivo Leve (95% Intervalo de Confiança, 7 a 20 anos) e 20 anos antes do início dos sintomas de demência de Alzheimer; d) no caso do aumento do p181-tau, essa estimativa era 31 anos (95% Intervalo de Confiança, 25 a 36 anos), cerca de 13 anos em relação ao início do Comprometimento Cognitivo Leve (95% Intervalo de Confiança, 8 a 19 anos) e 18 anos antes do início dos sintomas de demência de Alzheimer (FLEISHER et al., 2015).

## **6 Considerações Finais**

A presente revisão teve um recorte pequeno, apenas se utilizou periódicos publicados no PubMed nos últimos dois anos, com critérios de inclusão e exclusão que limitaram muito o alcance desse trabalho. Por exemplo, preferiu-se não incluir marcadores inflamatórios e neuroinflamatórios, assunto de grande importância na atualidade, refletido no número de publicações associadas ao Alzheimer, nem tampouco abordar as investigações a respeito da utilização de neutrófilos e plaquetas como biomarcadores para essa patologia nos estágios pré-clínico e prodrômico. Contudo, os principais artigos sobre painéis proteicos e lipídicos do plasma sanguíneo foram abordados, comparando-os com os biomarcadores do líquido cefalorraquidiano. Não há dúvida de que a aplicabilidade clínica desses biomarcadores sanguíneos exigirá novos desenhos metodológicos.

A realização de estudos longitudinais e observacionais mais longos, contendo amostras maiores e mais estratificadas de indivíduos (sexo, etnia, nível educacional), numa faixa etária mais jovem do que os estudos revisados nessa monografia, ainda num estágio pré-clínico assintomático. Torna-se importante correlacionar nessa metodologia os diferentes domínios cognitivos (atenção, funções executivas, linguagem, memória, percepção visuo-espacial, cognição global) com os biomarcadores proteicos e lipídicos.

Necessita-se obter amostras provenientes de famílias com casos de doença de Alzheimer, contendo portadores e não portadores de alelos dos genes associados (APOE, APP, PSEN-1, PSEN-2 ou outros). Desta forma, poder-se-ia avaliar melhor a dinâmica desses biomarcadores plasmáticos proteicos e lipídicos nesses indivíduos aparentados, mas com genotipagem diferenciada, nas famílias com diferentes formas de Alzheimer, típicas e atípicas, familiar e esporádica.

Almeja-se uma classificação correta dos indivíduos que estejam no estágio pré-clínico ou prodromico, por meio de instrumentos de avaliação neuropsicológicos padronizados, por definições operacionais utilizadas por todos os pesquisadores. Devem-se utilizar métodos laboratoriais e estatísticos de fácil reprodução e execução. Dessa forma, poder-se-á conseguir biomarcadores preditivos, com validação externa, semelhantes àqueles utilizados com amostras do líquido cefalorraquidiano.

### Referências

ABRAZ: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE ALZHEIMER. O que é Alzheimer. **Sobre Alzheimer**. Disponível em: <<http://www.abraz.org.br/sobre-alzheimer/o-que-alzheimer>>. Acesso em 16/05/2015.

ARIAS, J. J.; KARLAWISH, J. Confidentiality in preclinical Alzheimer disease studies: when research and medical records meet. **Neurology**. Minneapolis, v. 82, n. 8, p. 725-729, feb. 2014.

BERENGUER, R. G. et al. Alzheimer disease cerebrospinal fluid biomarkers predict cognitive decline in healthy elderly over 2 years. **Alzheimer disease and associated disorders**. Hagerstown, v. 28, n. 3, p. 234-238, jul-sep 2014.

BRIER, M. R. et al. Functional connectivity and graph theory in preclinical Alzheimer's disease. **Neurobiology of Aging**. New York, v. 35, n. 4, p. 757-768, apr. 2014.

BURNHAM, S. C. et al. A blood-based predictor for neocortical A $\beta$  burden in Alzheimer's disease: results from the AIBL study. **Molecular Psychiatry**. Basingstoke, UK, v. 19, n. 4, p. 519-526, apr. 2014.

BURNS, L. C.; ORSINI, L.; L'ITALIEN, G. Value-based assessment of pharmacodiagnostic testing from early stage development to real-world use. **Value in health: the Journal of the International Society for Pharmacoeconomics and Outcomes Research**. Malden, USA, v. 16, n. 6 Suppl., p. S16-19, sep-oct. 2013.

CHIU, M.-J. et al. Combined plasma biomarkers for diagnosing mild cognition impairment and Alzheimer's disease. **ACS Chemical Neuroscience**. Washington, v. 4, n. 12, p. 1530-1536, dec. 2013.

DUBOIS, B. et al. Advancing research diagnostic criteria for Alzheimer's disease: the IWG-2 criteria. **The Lancet Neurology**. London, v. 6, n. 3, p. 614-629, jun. 2014.

FAGAN, A. M. et al. Longitudinal change in CSF biomarkers in autosomal-dominant Alzheimer's disease. **Science Translational Medicine**. Washington, v. 6, n. 226, p. 226r-230, mar. 2014.

FLEISHER, A. S. et al. Associations between biomarkers and age in the presenilin 1 E280A autosomal dominant Alzheimer disease kindred: a cross-sectional study. **JAMA Neurology**. Chicago, v. 72, n. 3, p. 316-324, mar. 2015.

FORTEA, J. et al. Cerebrospinal fluid  $\beta$ -amyloid and phospho-tau biomarker interactions affecting brain structure in preclinical Alzheimer disease. **Annals of Neurology**. New York, v. 76, n. 2, p. 223-230, aug. 2014.

GUO, L.-H. et al. Plasma proteomics for the identification of Alzheimer's disease. **Alzheimer disease and associated disorders**. Hagerstown, v. 27, n.4, p. 337-342, oct.-dec. 2013.

HERRUP, K. et al. Beyond amyloid: getting real about nonamyloid targets in Alzheimer's disease. **Alzheimer's & Dementia: the journal of the Alzheimer's Association**. Orlando, USA, v. 9, n. 4, p. 452-458, jul. 2013.

HOLLAND, D. et al. Higher rates of decline for women and apolipoprotein E epsilon4 carriers. **AJNR. American Journal of Neuroradiology**. Baltimore, v. 34, n. 12, p. 2287-2293, dec. 2013.

JANNIS, S.; DEMPSEY, W.; FREDENBURG, R. Inside the brain: unravelling the mystery of Alzheimer's disease. Vídeo. **Jannis Productions**. Silver Spring, MD, USA, mar. 2010. Disponível em: <<http://www.cnet.com/pictures/contest-uses-art-to-bring-scientific-concepts-to-life-photos/12/>>. Acesso em: 18/05/2015.

KNOPMAN, D. S. et al. Brain injury biomarkers are not dependent on  $\beta$ -amyloid in normal elderly. **Annals of Neurology**. New York, v. 73, n. 4, p. 472-480, apr. 2013.

LANDAU, S. M.; FROSCH, M. P. Tracking the earliest pathologic changes in Alzheimer disease. **Neurology**. Minneapolis, USA, v. 82, n. 18, p. 1576-1577, may 2014.

MANUAL DIAGNÓSTICO E ESTATÍSTICO DE TRANSTORNOS MENTAIS DSM-5<sup>®</sup>. **American Psychiatric Association**. Tradução: Maria Inês Corrêa Nascimento... et al. Revisão técnica: Aristides Volproato Cordioli... [et al.]. 5. ed. Porto Alegre, Artmed, 2014.

MAPSTONE, M. et al. Plasma phospholipids identify antecedent memory impairment in older adults. **Nature Medicine**. London, v. 20, n. 4, p. 415-420, apr. 2014.

MARKSTEINER, J. et al. Analysis of 27 vascular-related proteins reveals that NT-proBNP is a potential biomarker for Alzheimer's disease and Mild Cognitive Impairment: a pilot-study. **Experimental Gerontology**. Oxford, UK, v. 50, p. 114-121, feb. 2014.

MEREDITH Jr., J. E. et al. Characterization of novel CSF Tau and ptau biomarkers for Alzheimer's disease. **PLoS One**. San Francisco, CA, USA, v. 8, n. 10, 14 páginas, oct 2013. doi: 10.1371

MOGHEKAR, A. et al. CSF biomarker changes precede symptom onset of mild cognitive impairment. **Neurology**. Minneapolis, v. 81, n. 20, p. 1753-1758, nov. 2013.

MORRIS, J. C. et al. Harmonized diagnostic criteria for Alzheimer's disease: recommendations. **Journal of Internal Medicine**. Oxford, v. 275, n. 3, p. 204-213, mar. 2014.

OSORIO, R. S. et al. Imaging and CSF biomarkers in the search for Alzheimer's disease mechanisms. **Neuron-degenerative diseases**. Basel, Switzerland, v. 13, n. 2-3, p. 163-165, jan. 2014.

PATERSON, R. W. et al. Biomarker modelling of early molecular changes in Alzheimer's disease. **Molecular diagnosis & therapy**. Auckland, New Zealand, v. 18, n. 2, p. 213-227, apr. 2014.

RASMUSSEN, K. L. et al. Plasma level of Apolipoprotein E and risk of dementia in the general population. **Annals of Neurology**, New York, v. 77, n. 2, p. 301-311, feb. 2015.

SOLDAN, A. et al. Relationship of cognitive reserve and cerebrospinal fluid biomarkers to the emergence of clinical symptoms in preclinical Alzheimer's disease. **Neurobiology of Aging**. New York, v. 34, n. 12, p. 2827-2834, dec. 2013.

TALWAR, P. et al. Genomic convergence and network analysis approach to identify candidate genes in Alzheimer's disease. **BMC Genomics**. London, v.15, 22 páginas, mar. 2014. doi: 10.1186/1471-2164-15-199

TOLEDO, J. B. et al. Neuronal injury biomarkers and prognosis in ADNI subjects with normal cognition. **Acta Neuropathologica Communications**. London, v. 2, 9 páginas, mar. 2014a. doi: 10.1186/2051-5960-2-26

VAN HARTEN, A. C. et al. Preclinical AD predicts decline in memory and executive functions in subjective complaints. **Neurology**. Minneapolis, v. 81, n. 16, p. 1409-1416, oct. 2013.

WANG, G. et al. Plasma metabolite profiles of Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. **Journal of Proteome Research**. Washington, v. 13, n. 5, p. 2649-2658, may 2014b.

WIMO, A. et al. Health economic evaluation of treatments for Alzheimer disease's: impact of new diagnostic criteria. **Journal of Internal Medicine**. Oxford, v. 275, n. 3, p. 304-316, mar. 2014.

WIRTH, M. et al. Association between Alzheimer disease biomarkers, neurodegeneration, and cognition in cognitively normal older people. **JAMA Neurology**. Chicago, v. 70, n. 12, p. 1512-1519, dec. 2013.

YANG, H. Prognostic polypeptide blood plasma biomarkers of Alzheimer's disease progression. **Journal of Alzheimer's disease**. Amsterdam, Netherlands, v. 40, n. 3, p. 659-