ARTUR MARTINS NOVAES COUTINHO

Análise de alterações volumétricas e metabólicas cerebrais nos diferentes subtipos de comprometimento cognitivo leve

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Programa de Radiologia

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto Buchpiguel

SÃO PAULO
2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Coutinho, Artur Martins Novaes
Análise de alterações volumétricas e metabólicas cerebrais nos diferentes subtipos de comprometimento cognitivo leve / Artur Martins Novaes Coutinho. -- São Paulo, 2015.
Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Programa de Radiologia.
Orientador: Carlos Alberto Buchpiguel.

Descritores: 1.Comprometimento cognitivo leve 2.Doenças neurodegenerativas 3.Tomografia por emissão de pósitrons 4.Imagem por ressonância magnética 5.Neuroimagem 6.Líquido cefalorraquidiano

USP/FM/DBD-373/15

“Eu não quero acreditar, eu quero conhecer”.

Carl Sagan

"Toda a nossa ciência comparada com a realidade é primitiva e infantil - e, no entanto, é a coisa mais preciosa que temos".

Albert Einstein

À minha esposa Tamya que, com seu companheirismo e dedicação incondicionais, foi a única pessoa a testemunhar em sua totalidade as tormentas e felicidades pelas quais passei ao longo do doutorado.

À minha mãe Rosa, pelo seu otimismo constante e por ensinar com exemplos que a vida pode não ser fácil, mas que com trabalho e fé podemos ir bem mais longe do que acreditamos.

Ao meu pai Odemar e todos os familiares e amigos da vida extraprofissional, que se alegram com minhas conquistas e me apoiam nas dificuldades.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Carlos Alberto Buchpiguel, Professor Titular da Disciplina de Medicina Nuclear do Departamento de Radiologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pela confiança em mim depositada e por estar sempre disposto a ajudar.

Ao amigo Dr. Fábio Henrique de Gobbi Porto, pelo árduo trabalho nos últimos quatro anos e apoio fundamental na parte clínica, estatística e escrita desta tese.

Aos colegas, Dra. Carla Rachel Ono, Fabio Luis de Souza Duran e Silvana Prando, pela ajuda e paciência nesse momento de iniciação no mundo da quantificação em neuroimagem e à biomédica Camila de Godoi, com a correção para efeito de volume parcial.

Ao Prof. Dr. Marcelo Tatit Sapienza e ao Prof. Dr. Fausto Hironaka, por todo o apoio à minha carreira na Medicina Nuclear do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

A todos os demais colegas médicos, biomédicos, enfermeiros, técnicos e residentes da Medicina Nuclear do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, seja pela ajuda direta ou indireta com a coleta dos dados ou pela cobertura assistencial quando precisei.

Em especial aos profissionais da secretaria e equipe de agendamento dos serviços do Centro de Medicina Nuclear e Serviço de Ressonância Magnética do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pela providencial ajuda ao facilitar a coleta de dados do presente trabalho.

Aos professores, médicos, funcionários e demais colegas do Centro de Referência em Distúrbios Cognitivos (CEREDIC) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, por fornecer o apoio logístico e clínico necessários à realização dessa pesquisa, especialmente ao Prof. Dr. Ricardo Nitrini, Profa. Dra. Sônia Maria Dozzi Brucki e psicóloga Maira Okada de Oliveira e secretária Simône Rebouças.

Aos funcionários do serviço de Ressonância Magnética do Instituto de Radiologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pela ajuda na coleta de dados.

Aos meus colegas contemporâneos de residência médica, mais velhos ou mais novos, por me incentivar com palavras ou atos, em especial aos amigos: Dr. Rodrigo Kubo, por permitir que eu fizesse parte da pesquisa que originou este trabalho; Dr. Felipe Arriva Pitella, por ajudar a tornar os anos de residência mais tranquilos; e mais recentemente Dr. Rafael Fernandes Nunes, pela ajuda com a coleta de dados

Aos colegas dos serviços de medicina nuclear e PET/CT dos hospitais Sírio Libanês e Santa Paula, pela compreensão e pelas eventuais ausências nos últimos anos.

A todos os professores que durante minha vida dedicaram seu tempo, boa vontade e amor à minha formação, em especial aos professores da Universidade do Estado do Pará: Prof. Dr. Jofre Freitas, pela crença na ciência e companheirismo, Prof. Jaime Seráfico pelo seu amor à neurologia e Prof. Dr. Marcus Brito pela paciência de ensinar metodologia científica a graduandos em medicina.

À Sra. Maria Helena Vargas, pela minuciosa revisão final do presente trabalho.

A todos aqueles que me acolheram na cidade de São Paulo, que agora posso chamar de casa.

Aos nossos queridos idosos voluntários e pacientes, que colaboraram com este estudo, via de regra, comparecendo com muita alegria e pela manhã, despojados de qualquer outro interesse, senão o de contribuir com os avanços científicos.

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias.*
Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3ª ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentações; 2011.

Abreviatura dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas e siglas
Lista de figuras
Lista de tabelas
Lista de gráficos
Resumo
Abstract

1 INTRODUÇÃO 1
1.1 Aspectos Gerais e Epidemiológicos das Demências e da Doença de Alzheimer 2
1.2 Comprometimento Cognitivo Leve - Caracterização, Diferentes Subtipos e suas Diferentes Evoluções 6
1.3 Patologia do CCL e o Uso de Biomarcadores - Conceito e Possíveis Utilidades Prognósticas na Caracterização do CCL.....8
1.3.1 Ressonância magnética e análise de volume cortical como biomarcador de neurodegeneração 12
1.3.2 Tomografia por emissão de pósitrons com 18f-fluordesoxiglicose como biomarcador de neurodegeneração 13
1.3.3 Biomarcadores no LCR 16
1.4 Biomarcadores nos Diferentes Subtipos de CCL 18
1.5 Racional e Justificativas do Estudo 21

2 OBJETIVOS 23
2.1 Objetivo Geral.....24
2.1 Objetivos Específicos 24

3 MÉTODOS 26
3.1 Casuística e Recrutamento 27
3.1.1 Diagnóstico clínico e critérios de inclusão.....30
3.1.2 Critérios de exclusão.....32
3.2 Avaliação Clínica e Testes Neuropsicológicos 33
3.2.1 Avaliação clínica 33
3.2.2 Testes neuropsicológicos.....35
3.3 Aquisição dos Exames de Imagem 38
3.3.1 Ressonância magnética.....38
3.3.2 Tomografia por emissão de pósitrons acoplada à tomografia computadorizada com 18F-fluordesoxiglicose (PET-18FDG) 40
3.4 Processamento e Quantificação das Imagens 41
3.4.1 Processamento das imagens de RM.....42
3.4.2 Processamento das imagens de PET-18FDG 43
3.5 Análise dos biomarcadores no liquido cefalorraquidiano.....45
3.6 Análise Estatística 46
3.6.1 Dados clínicos.....46
3.6.2 Métodos de Imagem (SPM8) 47

4 RESULTADOS 53
4.1 Comparação das Características Clínicas e de Biomarcadores Liquóricos Entre os Grupos 54
4.1.1 Dados gerais 54
4.1.2 Perfil neuropsicológico dos grupos CCL 56
4.1.3 Análise das hiperintensidades na substância branca por escala semiquantitativa 58
4.1.4 Perfil dos biomarcadores no LCR 60
4.2 Análise dos Métodos de Imagem 68
4.2.1 Análise das diferenças volumétricas por RM (VBM) 68
4.2.2 Análise das diferenças no metabolismo regional de glicose com PET-^{18}FDG 73
4.2.3 Análise das diferenças no MRG com PET-18FDG nos diferentes subtipos de CCL quando distribuídos por domínios cognitivos 82
4.2.4 Análise de possíveis correlações entre as alterações metabólicas, volumétricas, de biomarcadores no LCR e testes clínicos 90

5 DISCUSSÃO 92
5.1 Aspectos Gerais 93
5.2 Biomarcadores no líquido cefalorraquidiano e suas relações com as outras variáveis 96
5.3 Achados Comparativos dos Biomarcadores de Imagem e sua Relação com os Outros Achados 100
5.3.1 Principais achados da ressonância magnética 100
5.3.2 Principais achados metabólicos à tomografia por emissão de pósitrons 104
5.3.2.1 Achados no grupo comprometimento cognitivo leve amnéstico 104
5.3.2.2 Achados metabólicos no grupo CCL não amnéstico 108
5.4 Avaliação Final dos Resultados 112
5.5 Limitações do Estudo e Considerações Finais 117

6 CONCLUSÕES 119

7 ANEXOS 122

8 REFERÊNCIAS 129

APÊNDICE 153

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

[^{11}C]PIB	-	Composto B de Pittsburgh marcado com carbono-11
^{18}FDG	-	^{18}F-fluorodesoxiglicose
3D-SSP	-	Three-dimensional stereotactic surface projection
APOE-ε4	-	alelo ε4 da apolipoproteína E
Aβ	-	β-amiloide
BCB	-	Bateria breve de avaliação cognitiva
CAPPesq	-	Comitê de Ética em Pesquisa
CCL	-	Comprometimento cognitivo leve
CCLa	-	Comprometimento cognitivo leve amnéstico
CCLna	-	Comprometimento cognitivo leve não amnéstico
CEREDIC	-	Centro de Referência em Distúrbios Cognitivos
CMN	-	Centro de Medicina Nuclear
DA	-	Doença de Alzheimer
DARTEL	-	*Diffeomorphic Anatomical Registration using Exponentiated Lie algebra*
DICOM	-	*Digital Imaging and Communications in Medicine*
FAS	-	Fluência verbal fonêmica
FDR	-	*False discovery rate*
FLAIR	-	*Fluid attenuation inversion recovery*
FSE	-	*Fast spin echo*
FWE	-	*Familywise error*
GC	-	Grupo controle
gCCLa	-	Grupo CCLa
gCCLna	-	Grupo CCLna
GDS	-	*Geriatric Depression Scale*
HC-FMUSP	-	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HSB	-	Hiperintensidades de substância branca
InRad	-	Instituto de Radiologia

LCR	-	Líquido cefalorraquidiano
MBq	-	Mega-Becquerel
mCi	-	Mili-Curie
MD	-	Múltiplos domínios
MNI	-	*Montreal Neurologic Institute*
MRG	-	Metabolismo regional de glicose
OSEM	-	*Ordered subset expectation maximization*
PET	-	Tomografia por Emissão de Pósitrons
PET-^{18}FDG	-	PET com ^{18}F-fluordesoxiglicose
p-tau	-	Proteína tau-fosforilada
PVE	-	*Partial Volume Effect*
QAF	-	Questionário de Atividades Funcionais
RAVLT	-	Teste de aprendizagem verbal auditiva de Rey
RM	-	Ressonância magnética
ROI	-	*Region of interest*
SB	-	Substância branca
SC	-	Substância cinzenta
SPECT	-	Tomografia por emissão de fóton único
SPIR	-	*SPECTRAL presaturation with inversion recovery*
SPM	-	*Statistical Parametric Mapping*
SVC	-	*Small volume correction*
Tau	-	Proteína tau
UD	-	Único domínio
VBM	-	*Voxel-based morphometry* - Morfometria baseada no voxel
WAIS	-	*Wechsler Adult Intelligence Scale*
WMS-R	-	*Wechsler Memory Scale - revised*
DM	-	Diabetes mellitus
HAS	-	Hipertensão arterial
RAVLT	-	Teste de aprendizagem verbal auditiva de Rey total
pFWE	-	*Familywise error*
DMN	-	*Default mode network*
ADNI	-	*Alzheimer's disease neuroimaging intiative*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fluxograma dos procedimentos envolvidos no estudo 29

Figura 2 - Quadro demonstrando o fluxo diagnóstico dos diferentes tipos de CCL 31

Figura 3 - Exemplo de um mapa estatístico paramétrico de comparação voxel a voxel gerado pelo SPM8 para análise de metabolismo glicolítico regional por PET.....48

Figura 4 - Exemplo da interface do aplicativo BioImage Suite, para conversão de coordenadas do espaço SPM8 50

Figura 5 - Representação detalhada da tabela com os resultados estatísticos do SPM8 51

Figura 6 - Imagens ilustrativas das áreas de redução de volume da substância cinzenta visto pela VBM por RM no grupo CCL amnéstico em relação ao GC 71

Figura 7 - Imagens ilustrativas das áreas de redução de volume da substância cinzenta visto pela VBM por RM no grupo CCL amnéstico em relação ao gCCLna.....72

Figura 8 - Imagens ilustrativas das áreas de redução de volume da substância cinzenta visto pela VBM por RM no grupo CCL não amnéstico em relação ao GC (A1 e A2) e em relação ao gCCLa (B) 72

Figura 9 - Imagens ilustrando as áreas gerais com redução de volume em relação ao GC nos dois grupos 73

Figura 10 - Imagens ilustrando a localização dos *voxels* com redução estatisticamente significativa do MRG (pontos vermelhos) visto pela PET-^{18}FDG no grupo CCL amnéstico em relação ao GC (A1 e A2) e em relação ao gCCLna (B1 e B2).....76

Figura 11 - Imagens ilustrando a localização dos *voxels* com redução estatisticamente significativa do MRG (pontos vermelhos) visto pela PET-^{18}FDG no grupo CCL não amnéstico em relação ao GC (A1 e A2) e em relação ao gCCLa (B1 e B2).....77

Figura 12 - Imagens ilustrando as áreas gerais com redução do metabolismo em relação ao GC nos dois grupos 81

Figura 13 - Imagens ilustrando a localização dos *voxels* com redução estatisticamente significativa do MRG (pontos vermelhos) visto pela PET-^{18}FDG no grupo CCL amnéstico e em suas subdivisões em relação ao GC 85

Figura 14 - Imagens ilustrando a localização dos *voxels* com redução estatisticamente significativa do MRG (pontos vermelhos) visto pela PET-^{18}FDG no gCCL não amnéstico em comparação com o GC (1 - sem alterações significativas), e em relação ao gCCLa (2 e 3), demonstrando redução metabólica nos giros frontais médio bilaterais e medial à direita.....86

Figura 15 - Imagens ilustrando a localização dos *voxels* com redução estatisticamente significativa do MRG (pontos vermelhos) visto pela PET-^{18}FDG nos subgrupos do gCCL não amnéstico em comparação com o GC.....86

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Dados gerais dos participantes incluídos no estudo 54

Tabela 2 - Resultados dos diferentes testes neuropsicológicos nos grupos CCLa e CCLna.....57

Tabela 3 - Distribuição dos pacientes dos três grupos em relação aos diferentes graus na escala semiquantitativa de HSB à RM (Fazekas *et al*., 1987).....58

Tabela 4 - Resultados da análise dos biomarcadores no LCR, realizada em uma subamostra dos grupos gCCLa e gCCLna.....61

Tabela 5 - Resultados da análise dos valores de Aβ no LCR, realizada em uma subamostra dos grupos gCCLa e gCCLna, após exclusão de *outliers* do grupo CCLa 64

Tabela 6 - Regiões de redução de volume da substância cinzenta medido pelo método VBM utilizando RM entre os grupos #.....70

Tabela 7 - Regiões de redução do MRG em repouso medido por PET-^{18}FDG entre os grupos.# 75

Tabela 8 - Redução do MRG em repouso medido por PET-^{18}FDG após análise direcionada das regiões de hipótese *a priori* (córtex parietal posterior e temporoparietal de associação) nos grupos CCLa e CCLna em relação ao GC.# 78

Tabela 9 - Regiões de redução do metabolismo glicolítico em repouso medido por PET-^{18}FDG entre os grupos, após correção para PVE e controle para idade e escolaridade # 79

Tabela 10 - Redução do metabolismo glicolítico em repouso medido por PET-^{18}FDG após análise direcionada das regiões de hipótese *a priori* (córtex parietal posterior e temporoparietal de associação) nos grupos CCLa e CCLna em relação ao GC, após correção para PVE e controle para idade e escolaridade.# 80

Tabela 11 - Regiões de redução do MRG em repouso medido por PET-^{18}FDG levando-se em consideração a subdivisão em único ou múltiplos domínios cognitivos comprometidos, após correção para PVE e controle para idade e escolaridade.[#] 84

Tabela 12 - Correlações encontradas entre diferentes variáveis obtidas no estudo - Metabolismo por PET-^{18}FDG, VBM por RM, variáveis clínicas e neuropsicológicas e biomarcadores no LCR 91

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Proporção dos diferentes graus da escala visual para graduação de HSB (Fazekas *et al*., 1987) nos diferentes grupos (em %).....59

Gráfico 2 - Distribuição dos pacientes dos grupos gCCLa e gCCLna em relação aos diferentes graus da escala semi-quantitativa de HSB à RM (Fazekas *et al*., 1987) (em número de pacientes).....60

Gráfico 3 - Gráfico *box plot* demonstrando a dispersão de peptídeo Aβ e proteína tau no LCR de sujeitos dos grupos gCCLa e gCCLna em (unidade). • e *: sujeitos acima de 1,5 vezes a distância interquartis (*outliers*). Valores em mg/mL.....62

Gráfico 4 - Gráfico *box plot* demonstrando a dispersão apenas de peptídeo Aβ no LCR de sujeitos dos grupos gCCLa e gCCLna em (unidade). A linha vermelha pontilhada ilustra os valores normais fornecidos pelo fabricante. • e *: sujeitos com valores acima de 1,5 vezes a da distância interquartis (outliers). Valores em mg/mL.....63

Gráfico 5 - Gráfico *box plot* demonstrando a dispersão de proteína tau fosforilada no LCR de sujeitos dos grupos gCCLa e gCCLna em (unidade). • : sujeitos com valores acima de 1,5 vezes a distância interquartis (*outliers*). Valores em mg/mL.....64

Gráfico 6 - Gráfico *box plot* demonstrando a dispersão de peptídeo Aβ e tau no LCR de sujeitos dos grupos gCCLa e gCCLna em (unidade), após exclusão dos *outliers* vistos nos gráficos 3 e 4. • : sujeitos acima de 1,5 vezes a distância interquartis (*outliers*). Valores em mg/mL.....66

Gráfico 7 - Gráfico *box plot* demonstrando a dispersão apenas de peptídeo Aβ no LCR de sujeitos dos grupos gCCLa e gCCLna, após exclusão dos *outliers* vistos nos gráficos 3 e 4. A linha vermelha pontilhada ilustra os valores normais fornecidos pelo fabricante. • : sujeitos acima de 1,5 vezes a distância interquartis (*outliers*). Valores em mg/mL; # Valores de referência fornecido pelo fabricante.....67

Gráfico 8 - Gráfico *box plot* demonstrando a dispersão dos valores das contagens radioativas relativas ao metabolismo regional de glicose no giro do cíngulo posterior direito (área de maior diferença estatística entre o gCCLa e o GC) nos diferentes grupos, obtidos pelo aplicativo MarsBar para SPM 88

Gráfico 9 - Gráfico *box plot* demonstrando a dispersão dos valores das contagens radioativas relativas ao metabolismo regional de glicose no pré-cúneo direito (área de diferença estatística entre o gCCLa e o GC) nos diferentes grupos, obtidos pelo aplicativo MarsBar para SPM 88

Gráfico 10 - Gráfico *box plot* demonstrando a dispersão dos valores das contagens radioativas relativas ao metabolismo regional de glicose no giro temporal médio esquerdo (área de diferença estatística entre o gCCLa e o GC) nos diferentes grupos, obtidos pelo aplicativo MarsBar para SPM 89

RESUMO

COUTINHO AMN. *Análise de alterações volumétricas e metabólicas cerebrais nos diferentes subtipos de comprometimento cognitivo leve* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2015.

Introducão: o comprometimento cognitivo leve (CCL) é reconhecido como um estágio transicional sintomático entre o envelhecimento normal e a demência, particularmente a doença de Alzheimer (DA). Apresenta como subtipos principais o amnéstico (CCLa), com comprometimento de memória, e o não amnéstico (CCLna), que apresenta perda de outras funções, principalmente executivas, de atenção, de linguagem e visuoespaciais. Aparentemente o CCLna tem menor taxa de conversão para demências ao longo do tempo que o subtipo amnéstico, particularmente para a DA. Dessa forma, o CCLna poderia apresentar um perfil de biomarcadores diferente do CCLa no momento do diagnóstico. Estudos na literatura investigando o padrão de biomarcadores no CCLna como grupo independente são raros, alguns destes indicando perfil menos relacionado à DA no CCLna que o visto no CCLa. Segundo nosso conhecimento, não há estudos investigando concomitantemente volume e metabolismo cerebrais, além de biomarcadores no LCR de uma mesma amostra de CCLna, em comparação com CCLa e um grupo de idosos cognitivamente normais. **Objetivo:** investigar as alterações de volume e metabolismo cerebral em grupos de indivíduos com os subtipos amnéstico e não amnésico de CCL, comparativamente a voluntários idosos sem comprometimento cognitivo, com o intuito de avaliar se há concordância entre estas alterações. Avaliou-se ainda possíveis associações entre os perfis dos estudos de imagem com padrões classicamente descritos na para CCL em risco de evolução para DA, investigando ainda a existência de correlações entre destes achados com o dos diferentes biomarcadores no LCR e com dados clínicos. **Métodos:** cento e quatorze voluntários foram incluídos em três diferentes grupos: gCCLna (N = 38), gCCLa (N = 46) e GC (N = 30). Após entrevista clínica, exame neurológico e classificação por uma bateria de testes neuropsicológicos, estes foram submetidos a exames de RM cerebral (para excluir outras causas de comprometimento cognitivo e para análise de morfometria baseada em *voxels* – VBM) e de PET-^{18}FDG cerebral. Analisou-se ainda os valores de biomarcadores no LCR (Aβ, tau e p-tau) de uma

subamostra de pacientes (CCLna = 33, CCLa = 38). **Resultados:** os três grupos não apresentaram diferenças em relação às variáveis idade, escolaridade, sexo, fatores de risco cardiovascular (exceto por maior prevalência de dislipidemia no gCCLa) e hiperintensidades de substância branca na RM. Menores valores de mini-exame do estado mental foram observado nos grupos CCLa e CCLna em relação ao GC. O subgrupo amnéstico apresentou redução de volume em porções mediais e polares de ambos os lobos temporais em comparação com GC e gCCLna, além de áreas de redução do metabolismo no giro do cíngulo posterior e pré-cúneo direitos e giro temporal médio esquerdo em relação ao GC. Esse padrão de redução volumétrica e metabólica não foi visto no gCCLna, que demonstrou discreta redução volumétrica nos giros temporal inferior esquerdo e frontal médio direito em comparação com o GC. Nenhuma alteração metabólica persistiu no subgrupo não amnéstico após correção para efeito de volume parcial em comparação com o GC, havendo redução metabólica bilateral no giro frontal médio em comparação com o gCCLa. Não houve diferenças significativas nos biomarcadores de LCR entre os grupos CCLa e CCLna. Houve, porém, tendência de menores valores de peptídeo Aβ no gCCLa. Observou-se correlação positiva entre metabolismo no giro temporal médio esquerdo e rendimento em testes de memória; correlação negativa também foi observada entre os valores de Aβ e os de tau e p-tau no LCR. **Conclusão:** os grupos CCLa e CCLna apresentaram alterações de volume e metabolismo diferentes em comparação com o grupo controle, e estas alterações não apresentaram concordância entre si. Também não foram encontradas correlações entre os diferentes biomarcadores de imagem e no LCR, notando-se apenas correlação positiva entre metabolismo temporal e desempenho em testes de memória. O gCCLa apresentou padrões de metabolismo e volume cerebrais classicamente relacionados a risco de evolução para DA. Por outro lado, o grupo CCLna apresentou um padrão diferente de alterações metabólicas e volumétricas, com áreas menores de redução de volume e padrão mais heterogêneo de alterações metabólicas em relação ao grupo controle. O conjunto de achados de biomarcadores no gCCLna não é indicativo de nenhum perfil específico de evolução para demências.

Descritores: Comprometimento cognitivo leve. Doenças neurodegenerativas. Tomografia por emissão de pósitrons. Imagem por ressonância magnética. Neuroimagem. Líquido cefalorraquidiano.

ABSTRACT

COUTINHO AMN. *Volumetric, metabolic and CSF biomarkers profile in different subtypes of MCI* [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2015.

Introduction: Mild cognitive impairment (MCI) is presumably a transitional stage between normal aging and dementia, particularly Alzheimer’s disease (AD). Non-amnestic subtypes (naMCI) present with executive, attention, visuospatial and language dysfunctions. They have a lower conversion rate to dementia compared to amnestic subtypes (aMCI). Investigations regarding biomarker profiles of naMCI as an independent group are scarce. To our knowledge there is no study investigating the brain volumetric and metabolic features, as well as the profile of cerebrospinal fluid (CSF) biomarkers of naMCI patients as a single group in comparison to aMCI and cognitively normal elderly patients (control group – CG). **Objective**: to investigate the brain volumetric and metabolic changes in individuals presenting amnestic and non-amnestic MCI subtypes in comparison to elderly volunteers without cognitive impairment, aiming to verify if there are agreements between these changes. Possible associations between the imaging profile of these groups and classical patterns of high risk for developing AD were also evaluated, as well as possible correlations between imaging biomarkers, CSF biomarkers and clinical data. **Methods:** a hundred and fourteen (114) patients were included in three different groups: naMCIg (N = 38), aMCIg (N = 46) and CG (N = 30). Patients underwent brain MRI (in order to exclude other causes of the cognitive impairment but also for VBM analysis) and [^{18}F]FDG-PET. A subsample (naMCIg = 33, aMCIg = 38) also underwent a lumbar puncture in order to assess the profile of amyloid-ß peptide, tau and phosphorylated tau protein levels in the CSF. **Results:** There was no difference in CSF biomarkers, education years, age, gender and cardiovascular risk factors between the naMCI and aMCI groups, except for a higher prevalence of dyslipidemia in aMCI. The amnestic MCI group had lower rBGM in relation to control group in the precuneus, posterior cingulate and left medium temporal gyrus. Compared to aMCIg, naMCIg presented with bilateral prefrontal cortex hypometabolism, but without metabolic changes in relation to CG after correction for partial volume effect. Amnestic MCI group had bilateral temporal lobe volume reduction in comparison to naMCI and CG, particularly

in the polar and mesial parts of the temporal lobe. Non-amnestic MCI presented with discrete volumetric reductions in comparison to CG, **Conclusion:** Volumetric and metabolic alterations were different and essentially discordant between aMCI and naMCI groups in comparison to CG. Amnestic MCI showed metabolic and volumetric profiles classically related to MCI due to AD, while naMCI group presented with less-significant areas of volumetric and metabolic reductions in relation to control group. Our non-amnestic MCI group probably represents a heterogeneous group with a different pattern of neurodegeneration than the classical MCI due to AD.

Descriptors: Mild cognitive impairment. Neurodegenerative diseases. Positron-emission tomography. Magnetic resonance imaging. Neuroimaging. Cerebrospinal fluid.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos Gerais e Epidemiológicos das Demências e da Doença de Alzheimer

Os números relacionados ao envelhecimento populacional mundial são expressivos: estima-se que em 2040 a população com mais de 60 anos ultrapasse a de menores de 15 anos na América Latina e Ásia, e em 2050 cerca de 10% das pessoas que vivem em países desenvolvidos terão mais de 80 anos (Harper, 2014). Demência é uma condição de alta prevalência em pessoas idosas, com incidência que aumenta com o evoluir da idade e representa a maior causa de dependência e invalidez nessa faixa etária. Com o aumento da expectativa de vida da população, estima-se que a prevalência de demência atinja níveis epidêmicos, acometendo 35,6 milhões de pessoas em 2011 e possivelmente 115 milhões em 2050. Estas pessoas serão, em sua maioria, habitantes dos países em desenvolvimento e consumirão gastos da ordem de 1% do produto interno bruto mundial em tratamento e cuidados (WHO, 2012; Harper, 2014).

A chamada “epidemia silenciosa” mundial de demências, portanto, será inevitável nas próximas décadas. Por outro lado, recentes estudos indicam uma tendência de redução de sua prevalência em certos grupos específicos, especificamente em países desenvolvidos. Essa tendência parece estar relacionada a uma elevação no seu nível educacional e uma redução de fatores de risco cardiovasculares, ambos derivados de mudanças socioeconômicas da

segunda metade do Século XX (Larson et *al.*, 2013). Esses dados lançam luz sobre o poder da prevenção e a importância no diagnóstico precoce de grupos com maior risco de evolução para demências.

Segundo Frota *et al.* (2011), o consenso da Academia Brasileira de Neurologia define demência como uma “síndrome de declínio cognitivo persistente que interfere com as atividades diárias cotidianas sociais e/ou profissionais do indivíduo”, não permitindo mais a sua independência funcional. Esse declínio deve ser persistente, pressupõe funções cognitivas previamente em um estágio mais elevado e presença de dano neuronal (degeneração neural ou neurodegeneração). Pode incluir déficit em diversos domínios cognitivos, incluindo perda de memória (amnésia anterógrada) além de declínio em outro domínio cognitivo (por exemplo, atenção e funções executivas) e usualmente preserva o nível de vigília (Knopman *et al.*, 2003; Frota *et al.*, 2011).

A Doença de Alzheimer (DA), considerada a forma mais comum de demência, que também tem a idade como o seu maior fator de risco, ocorre em geral após os 65 anos e envolve distúrbios de memória, desorientação temporal e espacial, linguagem e atenção.

Em geral a DA é diagnosticada tardiamente na fase de demência, e não há até o momento opções terapêuticas modificadoras da sua história natural (Petersen *et al*., 1999; Knopman *et al.*, 2003; Frota *et al*., 2011; Jack, 2012). Assim, identificar o processo neurodegenerativo da DA em fases pré-demenciais seria o ideal para a busca de novas intervenções e terapias.

Entre todos os eventos patológicos, a deposição de peptídeo β-amiloide (Aβ) é a característica fundamental da DA. Sua deposição tem

início décadas antes das primeiras manifestações clínicas (Hardy e Selkoe, 2002). O peptídeo Aβ é produto do processamento proteolítico da proteína precursora do amiloide pelas enzimas β e γ-secretases (Evin e Weidemann, 2002). As placas senis encontradas no cérebro de pacientes com DA são compostas de depósitos insolúveis de β-amiloide processado erroneamente (Iwatsubo *et al.*, 1994).

Até recentemente, a pesquisa da deposição de amiloide em humanos era limitada, pois dependia de biópsia cerebral ou análise *post mortem*. Nos últimos anos, foram desenvolvidas basicamente duas formas de identificar a deposição cerebral de Aβ: mensuração no líquido cefalorraquidiano (LCR) (fragmento Aβ42) ou avaliação diretamente do cérebro por imagem molecular com tomografia por emissão de pósitrons (PET) por meio de marcadores de amiloide (Pike *et al.*, 2007; Rabinovici e Jagust, 2009).

Com a progressão inicial da doença, outros marcadores liquóricos sofrem alterações, como aumento dos níveis de proteína tau (total e fosforilada), indicando dano neuronal. Além disso, alterações funcionais e estruturais indicando neurodegeneração se tornam identificáveis também antes da instalação do quadro demencial. No estágio em que são preenchidos os critérios diagnósticos clínicos para demência inicial, já houve uma deposição cortical significativa de Aβ e esta se encontra relativamente estável. Por outro lado, com o agravamento do declínio cognitivo, há progressiva degeneração estrutural e funcional cerebral (Aisen *et al.*, 2011; Jack, 2012; Jack *et al.*, 2013).

Por conseguinte, seria importante para o estudo da DA que o diagnóstico fosse realizado em uma fase de transição clínica entre as

alterações cognitivas normais relacionadas ao envelhecimento e a demência, antes que haja uma degeneração cerebral difusa, buscando uma detecção precoce do processo patológico. Essa fase foi clinicamente reconhecida e denominada inicialmente como comprometimento cognitivo leve (CCL). Na fase de CCL, os indivíduos apresentam queixa subjetiva de declínio cognitivo com alterações objetivas em testes cognitivos e neuropsicológicos, porém sem o preenchimento de critérios para demência, ou seja, vivem de forma independente, com pouca ou nenhuma alteração funcional nas atividades cotidianas (Petersen *et al*., 1999).

Deve-se ressaltar, contudo, que o estado de CCL compreende indivíduos com diferentes características clínicas e que nem todos pacientes evoluem para demência (os chamados “conversores”). Existem também os indivíduos que permanecem estáveis e aqueles que voltam (ou “revertem”) a um estágio de cognição normal, de acordo com seus diferentes perfis clínicos, epidemiológicos e biológicos, como será detalhado abaixo (Mitchell e Shiri-Feshki, 2009; Schroeter *et al*., 2009; Galuzzi *et al*., 2013).

Ainda assim, o estágio de CCL adquire importância mesmo entre os indivíduos “reversores”, pois aparentemente mesmo esses indivíduos têm mais chance de evoluir para demência em idades mais avançadas do que idosos que nunca foram classificados como CCL, garantindo importância prognóstica para o diagnóstico de CCL em qualquer momento da vida de um indivíduo (Roberts *et al.*, 2014).

1.2 Comprometimento Cognitivo Leve - Caracterização, Diferentes Subtipos e suas Diferentes Evoluções

O comprometimento de memória foi inicialmente considerado como fator essencial para o diagnóstico de CCL (Petersen *et al*., 1999; Knopman *et al.*, 2003). Entretanto, CCL é hoje considerado uma síndrome clínica heterogênea que pode ser classificada com base nos diferentes domínios cognitivos que podem estar comprometidos. São reconhecidos o comprometimento cognitivo leve amnéstico (CCLa), que envolve predominantemente e obrigatoriamente a memória, e o comprometimento cognitivo leve não amnéstico (CCLna), que engloba outros domínios cognitivos, excluindo-se a memória, que são basicamente: funções executivas (que incluem memória de trabalho, inibição, fluência e mudança de cenário), atenção, velocidade de processamento de informações, linguagem e função visual espacial. Ambos podem ainda ser classificados como único ou múltiplos domínios, de acordo com o número de funções acometidas (reiterando que comprometimento de memória sempre define CCLa, seja de único ou múltiplos domínios) (Winblad *et al.*, 2004; Petersen, 2011).

Indivíduos com CCL apresentam taxa variável de conversão para demência ao longo dos anos, em proporções que variam em torno de 5% a 15% ao ano, em contraste com a população geral, que apresenta evolução para o estágio demencial com taxa de 1% a 2% ao ano (Mitchell e Shiri-Feshki, 2009). Essa taxa é maior em pacientes idosos mais velhos (Peltz et *al*., 2011). Adicionalmente, há aparente maior risco de conversão entre pacientes acompanhados em hospitais terciários do que nos provenientes da comunidade, na presença de polimorfismos com um ou dois alelos do tipo ε4

da apolipoproteína E (APOE-ε4), ou entre pacientes com acometimento de múltiplos domínios cognitivos (Manly *et al*., 2008; Mitchell e Shiri-Feshki, 2009; Ganguli *et al*., 2011; Tatsuoka *et al*., 2013).

Enquanto o CCLa é tradicionalmente considerado uma fase sintomática pré-demencial com alto risco de evolução para DA, o CCLna aparentemente teria um risco menor de evoluir para demências em geral e menos ainda para a DA, estando mais relacionado a doença cerebrovascular e outras doenças neurodegenerativas na maioria dos estudos epidemiológicos (Winblad *et al*., 2004; Mitchell e Shiri-Feshki, 2009; Petersen, 2011; Espinosa *et al*., 2013; Tatsuoka *et al.*, 2013), com raras exceções (Han *et al*., 2012).

Há, ainda, evidências consistentes de maior progressão para demências em geral em pacientes com acometimento de múltiplos domínios cognitivos em relação àqueles com único domínio (Manly *et al*., 2008; Aretouli *et al.*, 2013) reforçando a noção de que a evolução desfavorável esteja mais relacionada a uma deterioração cerebral global do que de uma área específica como a memória. Por outro lado, as evidências de que há maior conversão na condição de CCLa que na de CCLna, embora menos consistentes, também se demonstram reprodutíveis (Winblad *et al.*, 2004; Bäckman *et al*., 2004; Mitchell e Shiri-Feshki, 2009; Ganguli et *al*., 2011; Aretouli *et al.*, 2013; Espinosa et *al*., 2013; Tatsuoka *et al.*, 2013).

O conjunto de estudos epidemiológicos permite postular que o subtipo amnéstico de CCL esteja mais relacionado a uma fase sintomática pré-demencial da DA, em termos fisiopatológicos, que o CCLna. Além disso, a evolução para demência seria acelerada quando a apresentação amnésica for acompanhada de comprometimento em outros domínios cognitivos. O

grupo CCLna persiste, então, como um grupo heterogêneo sem etiologia bem definida, provavelmente compreendendo indivíduos com diferentes doenças no momento do seu diagnóstico. Uma das possibilidades para superar o desafio da correta caracterização desse grupo seria a realização de estudos sistemáticos com marcadores biológicos em grupos específicos desses indivíduos.

1.3 Patologia do CCL e o Uso de Biomarcadores - Conceito e Possíveis Utilidades Prognósticas na Caracterização do CCL

Devido à heterogeneidade das manifestações clínicas e à baixa especificidade dos testes cognitivos, o diagnóstico de CCL devido à DA (ou por outras etiologias, principalmente no caso do CCLna), pode se tornar desafiador. Apesar do potencial clínico do uso de biomarcadores (Galuzzi *et al.*, 2013), nenhuma medida biológica isolada resulta em um diagnóstico específico o suficiente, nem tampouco há um padrão de avaliação único que possa ser empregado para a identificação de indivíduos de alto risco. O diagnóstico definitivo de DA ainda é somente possível por exame histopatológico, para confirmar a presença das alterações neuropatológicas específicas da doença, como as placas neuríticas extracelulares formadas por aglomerados de peptídeo β-amiloide e os emaranhados neurofibrilares intracelulares formados por aglomeração de proteína tau, acompanhados de perda neuronal (McKhann *et al*, 1984).

Alterações patológicas corroboram o CCL como um estado de transição para DA. A apresentação neuropatológica nos diferentes

indivíduos, contudo, é mais heterogênea do que o observado na DA clássica. As principais alterações encontradas em grande parte dos pacientes com CCL e que sugerem se tratar de uma transição para DA são a presença difusa de peptídeo β-amiloide (fragmentos da proteína precursora de amiloide) em placas neuríticas no neocórtex e frequentes emaranhados neurofibrilares que predominam em estruturas do lobo temporal medial, estes relacionadas ao acúmulo de proteína tau (Petersen *et al*., 2006; Jack, 2012). A maioria dos artigos relacionados à patologia do CCL, porém, estuda apenas a forma amnésica e reforça sua relação prodrômica com a DA, de certa forma negligenciando os subtipos não amnésticos (Petersen *et al.*, 2006; Schroeter *et al.*, 2009; Jack, 2012).

Os achados de necropsia cerebral que investigaram a patologia do CCL foram posteriormente corroborados por técnicas de imagem in vivo, como a PET com marcadores de deposição de peptídeo β-amiloide (Aβ), principalmente com o composto B de Pittsburgh marcado com carbono-11 ([^{11}C]PIB). Estudos de PET com [^{11}C]PIB demonstraram também que sujeitos com CCL apresentam taxa de deposição in vivo de Aβ intermediária em relação a voluntários normais e com DA. Contudo, há dúvidas quanto à exata correlação da deposição de amiloide com outros marcadores de degeneração, como metabolismo e volume cerebrais (Alexopoulos *et al.*, 2014; Fjell *et al.*, 2014).

Considerando-se o CCL como uma possível fase sintomática pré-demencial, a correta caracterização desta entidade assume grande importância, possibilitando o diagnóstico precoce e a pesquisa de possíveis intervenções terapêuticas. Critérios de diagnóstico objetivos e que levem em

consideração achados em métodos de imagens relacionados à fisiopatologia da DA poderiam facilitar a detecção dos pacientes com declínio cognitivo verdadeiramente relacionado a esta condição (Albert *et al.*, 2011; Budson *et al.*, 2012; Galuzzi *et al.*, 2013).

Exames de imagens estruturais como a ressonância magnética (RM) são de grande ajuda principalmente para excluir outras causas de alterações cognitivas como tumores ou lesões vasculares. Adicionalmente à RM, exames funcionais como a tomografia por emissão de fóton único (SPECT) e a PET possibilitam a detecção de alterações características da idade (envelhecimento fisiológico) ou relacionadas às demências, em fase precoce (Schroeter *et al.*, 2009; Petersen, 2011; Jack, 2012; Jack *et al.*, 2013; Fjell *et al.*, 2014).

Tais métodos de imagem podem detectar déficits na fase de CCL antes que os critérios clínicos para o diagnóstico de demência sejam cumpridos, além de estratificar indivíduos com alterações mais graves e maior risco de conversão para demência (Schroeter *et al.*, 2009; Petersen, 2011; Jack, 2012;). Levando-se em consideração o uso crescente de exames de neuroimagem e de outros testes diagnósticos, alguns autores propuseram novos critérios para diagnóstico de DA e CCL. Segundo esses critérios, para uso inicial em pesquisa, os pacientes podem ser classificados, por exemplo, como CCL ou demência *por* ou *devido à* DA de acordo com as alterações vistas nos testes (Albert *et al.*, 2011; Budson *et al.*, 2012).

Dessa forma, exames e suas variáveis podem ser caracterizados como biomarcadores, sejam eles exames de imagens (como exemplo: PET – metabolismo ou deposição amiloide cerebral, SPECT – fluxo cerebral ou RM – volume cerebral), ou testes no sangue ou no LCR. Marcadores

biológicos, ou biomarcadores, são conceituados pela Biblioteca Nacional de Medicina dos Estados Unidos[1] como parâmetros biológicos mensuráveis e quantificáveis que sirvam como índices para avaliações fisiológicas e/ou relacionadas à saúde, como risco ou diagnóstico de doenças, distúrbios psiquiátricos, processos metabólicos e celulares, etc. Assim, ao serem mensurados *in vivo*, biomarcadores podem indicar uma característica específica ou o estágio de um processo patológico.

O padrão de alteração destes biomarcadores, como será detalhado a seguir, permitiria estratificar a probabilidade de um paciente com CCL evoluir no curto prazo para a fase demencial, ou ainda afirmar com maior segurança que a fase de CCL esteja relacionada a uma doença neurodegenerativa, definido o estágio como um possível CCL devido à DA (Petersen, 2011; Albert *et al*., 2011; Budson *et al.*, 2012; Jack *et al.*, 2013; Galuzzi *et al.*, 2013; Cerami *et al.*, 2015).

Por fim, os diferentes estudos de neuroimagem são hoje consagrados como marcadores biológicos, ou biomarcadores, para a DA (Jack, 2012). No estudo das fases da DA, podem ser subdivididos como biomarcadores de deposição amiloide (por imagem PET ou dosagem de amiloide no LCR) ou de lesão neuronal (PET investigando metabolismo cerebral, SPECT investiando perfusão cerebral, dosagem de proteínas tau e tau fosforilada no LCR e RM investigando redução de volume) (Wolf *et al*., 2003).

---

[1] *United States National Library of Medicine, Medical Subject Headings* - MeSH®. Disponível em: <http://www.nlm.nih.gov/mesh/>

1.3.1 Ressonância magnética e análise de volume cortical como biomarcador de neurodegeneração

Volumes de regiões do cérebro relacionados ao CCL e à DA podem ser obtidos por processos automatizados ou pelo desenho manual das áreas de interesse (*region of interest* [ROI]) em imagens de RM. Estudos pelo método ROI, contudo, estão sujeitos a diversos vieses, entre eles a definição dos limites anatômicos, a falta de correção de variações individuais de tamanho da cabeça e diferenças entre avaliadores. Um método automatizado de avaliação volumétrica do cérebro pela RM comumente utilizado é a morfometria baseada no voxel [*voxel-based morphometry* (VBM)], em que imagens estruturais são normalizadas com um modelo anatômico, comparando *voxel* por *voxel* todo o cérebro (Ashburner e Friston, 2000).

Estudos com RM pelos diferentes métodos demonstram que pacientes com CCL apresentam menores volumes dos córtices entorrinal e hipocampal do que idosos normais, e que essa diminuição é ainda maior na DA. O volume hipocampal está associado ao desempenho em testes de memória e cognição geral (Bell-McGinty *et al*., 2005; Schuff e Zhu, 2007; Ries *et al*., 2008; Du *et al*., 2001; Hinrichs *et al*., 2011) e está entre os biomarcadores que predizem conversão para DA (Schroeter *et al.*, 2009; Petersen, 2011; Albert *et al*., 2011; Budson *et al.*, 2012; Jack *et al.*, 2013; Galuzzi *et al.*, 2013).

Utilizando a técnica de VBM, alguns estudos demonstraram que a perda de massa cinzenta na DA engloba inicialmente a amígdala, hipocampo anterior e córtex entorrinal, para depois envolver todo o hipocampo e lobo parietal, eventualmente a região temporoparietal e até regiões do lobo frontal na conversão de CCL para DA (Bell-McGinty *et al*., 2005; Schuff e Zhu, 2007).

A progressão para DA estaria relacionada ao grau de diminuição do volume do hipocampo (Ries *et al.*, 2008; Schroeter *et al.*, 2009; Galuzzi *et al.*, 2013) e posterior diminuição maior nas áreas de hipocampo, giro temporal inferior e médio, córtex do cíngulo posterior e pré-cúneo, inclusive com degeneração das fibras de substância branca (Bell-McGinty *et al*., 2005; Schuff e Zhu, 2007; Parente *et al.*, 2008; Ries *et al.*, 2008).

Visto que a análise visual subjetiva na prática clínica muitas vezes não alcança resultados adequados, algumas abordagens por classificação de padrões já foram utilizados em estudos de RM para diferenciar CCL de controles saudáveis, com 90% de acurácia (Davatzikos *et al*., 2008) sujeitos com CCL que converteram para DA de sujeitos com CCL estável com 81% de acurácia (Misra *et al.*, 2009), além de pacientes com DA de indivíduos saudáveis, com 87%-95% de acurácia (Busatto *et al.*, 2003; Klöppel *et al.*, 2008; Vemuri *et al.*, 2008).

1.3.2 Tomografia por emissão de pósitrons com 18f-fluordesoxiglicose como biomarcador de neurodegeneração

O método de imagem PET com ^{18}F-fluordesoxiglicose (PET-^{18}FDG) vem sendo progressivamente recomendado clinicamente para pacientes com diagnóstico recém-estabelecido de demência, para o diagnóstico precoce de DA e diferencial com outras demências, muitas vezes com rendimento clínico superior às outras modalidades (Silverman, 2004; O'Brien *et al.*, 2014).

Para imagens de PET-^{18}FDG os primeiros estudos relataram sensibilidade de 93% e especificidade de 63% no diagnóstico de DA (Schuff e Zhu, 2007). Posteriormente, usando uma forma quantitativa de comparação,

a análise *three-dimensional stereotactic surface projection* (3D-SSP), em que a atividade metabólica do cérebro é projetada em uma superfície cortical padrão, mostrou-se sensibilidade e especificidade de 94% e 99% para a PET-^{18}FDG no diagnóstico de quadros demenciais duvidosos ou de demência leve (Burdette *et al.*, 1996). Em geral entre as áreas hipometabólicas na DA estão o córtex de associação temporoparietal bilateral, o pré-cúneo e o giro do cíngulo posterior, como será detalhado a seguir (Burdette *et al.*, 1996; Silverman, 2004; Matsuda, 2007; Schuff e Zhu, 2007; Jack *et al.*, 2012).

Clinicamente, o uso de PET-^{18}FDG se mostrou superior a outro exame funcional de medicina nuclear, a tomografia por emissão de fóton único para avaliação de perfusão cerebral, tanto no diagnóstico diferencial de demências quanto em detecção precoce de DA. Revisão sistemática aponta valores de sensibilidade de 75% a 99% e especificidade de 71% a 93% para PET-^{18}FDG em comparação com sensibilidade de 65% a 85% e especificidade de 72% a 87% para SPECT (Davison e O'Brien, 2014). Trabalho recente de comparação direta entre os métodos reafirma a superioridade da PET-^{18}FDG sobre o SPECT de perfusão no diagnóstico entre DA e doença por corpúsculos de Lewy (O'Brien *et al.*, 2014).

A revisão sistemática de Davison e O'Brien (2013) refere escassez de estudos comparando PET-^{18}FDG e SPECT de perfusão na análise de CCL. Destaca-se particularmente a dificuldade de se atribuir valores de sensibilidade e especificidade para o diagnóstico, pela heterogeneidade dos pacientes com CCL e a dificuldade de acompanhamento ou avaliação patológica. Um estudo de comparação direta com uma pequena amostra (12

pacientes com CCL), porém, favorece a PET-^{18}FDG sobre SPECT, na detecção tanto de pacientes que evoluirão para a fase de demência quanto em relação aos que permanecerão estáveis (Döbert *et al.*, 2005).

A diminuição do metabolismo de glicose na PET-^{18}FDG na fase transicional de CCL é evidente em estruturas temporoparietais, parietais posteriores (pré-cúneos) e do sistema límbico e paralímbico, como o córtex retroesplênico e cíngulo posterior, sendo parcialmente concordante com alterações de volume encontradas em estudos com ressonância magnética. A redução metabólica é controversa quando se trata de estruturas temporais mediais, como o córtex entorrinal e a formação hipocampal, frequentemente reduzidas em volume na RM (Johnson *et al.*, 2007; Clerici *et al.*, 2009; Hinrichs *et al*., 2011; Fjell *et al.*, 2014). Quando identificado, o hipometabolismo mesial temporal é em geral menos significativo do que em regiões parietais como o cíngulo posterior (Minoshima *et al*., 1997; Drzezga *et al*., 2003).

Uma meta-análise com mais de 1351 pacientes com CCL amnéstico e DA, além de 1097 controles, demonstrou que a transição de CCLa para DA está relacionada a alterações estruturais no córtex entorrinal e hipocampal, porém comprometimento funcional visto à PET e SPECT em áreas distintas, principalmente nos lóbulos parietais inferiores e pré-cúneos (Schroeter *et al.*, 2009). Esse padrão de hipometabolismo foi recentemente utilizado para classificação clínica individual e quantitativa dos diferentes tipos de CCL, predizendo com alta acurácia a conversão para diferentes tipos de demência, principalmente a DA (Cerami *et al.*, 2015).

Assim, como revisto por Fjell *et al*. (2014), ainda persiste a discussão se a redução de metabolismo em fases precoces da DA se dá antes, ao

mesmo tempo ou em consequência de atrofia mesial temporal. De qualquer forma, ao passo que os primeiros sinais de declínio cognitivo da DA se correlacionam com a atrofia do lobo temporal medial (córtex entorrinal e hipocampos), a redução de metabolismo abrange desde o início áreas mais extensas da chamada rede temporoparietal (giro do cíngulo posterior, pré-cúneos e transição temporoparietal posterior), intensamente conectada com as estruturas límbicas que sofrem atrofia e muito importante para formação da memória episódica (Minoshima *et al*., 1999; Matsuda, 2007; Schuff e Zhu, 2007; Jack, 2012; Jack *et al.*, 2013; Fjell *et al*., 2014).

1.3.3 Biomarcadores no LCR

Dentre os biomarcadores não relacionados à imagem, destacam-se a dosagem no LCR do fragmento da proteína ou peptídeo Aβ, um marcador de deposição amiloide nas placas neuríticas (teoricamente o primeiro evento relacionado à DA), e da proteína tau e de sua forma fosforilada (p-tau), possíveis indicadores de lesão neuronal relacionada à formação de emaranhados neurofibrilares intracelulares.

Análises prospectivas demonstraram que quanto menores os níveis de Aβ no LCR (indicando maior deposição cortical de amiloide) e maiores os níveis de tau e p-tau (indicando lesão neuronal com liberação de proteína tau para o meio extracelular) no início do acompanhamento, maior o risco de conversão para demência em sujeitos com CCL (Hansson *et al*., 2006; Mattsson *et al*., 2009; Forlenza *et al*., 2010).

Menores níveis de Aβ no LCR também foram descritos em pacientes com CCL e hipometabolismo temporoparietal ao PET-^{18}FDG (perfil com alto

risco de conversão para DA), em comparação com aqueles com CCL e PET-^{18}FDG normal ou com áreas de hipometabolismo menos relacionadas à conversão para DA (Alexopoulos *et al.*, 2013). O grau de deposição de Aβ se correlaciona também com a perda de memória em pacientes com CCLa, porém não em CCLna, além de atingir um platô e não parecer se relacionar mais com testes de memória na fase demencial (Haldenwanger *et al.*, 2010).

Outros autores reportaram maior deposição de Aβ mesmo em pacientes com CCL e queixa subjetiva de declínio cognitivo não comprovado objetivamente por testes neuropsicológicos e cognitivos, indicando provavelmente um processo fisiopatológico da DA em estágios bastante precoces da doença (Wolfsgruber *et al.*, 2015).

No caso da proteína tau (marcador de neurodegeneração), as correlações com testes de memória e exames de imagem são menos claros. Alexopoulos *et al.* (2013) não encontraram menores níveis de proteína tau no LCR de pacientes com perfil metabólico cerebral à PET-^{18}FDG em risco de desenvolver DA. Haldenwanger *et al.* (2010) também não encontraram correlações entre os níveis de proteína tau e p-tau no LCR com testes neuropsicológicos em sujeitos com CCL e DA. Tais achados demonstram a necessidade de se explorar melhor esses marcadores em sujeitos com os diferentes tipos de CCL e correlacionar com achados de biomarcadores de imagem em uma mesma casuística.

1.4 Biomarcadores nos Diferentes Subtipos de CCL

A maioria dos estudos com biomarcadores acima descritos investigando CCL compreende pacientes com CCL de padrão amnéstico (CCLa), que em tese teriam maior risco de evolução para DA. Poucos trabalhos analisam subgrupos não amnésticos de forma sistemática e com número adequado de pacientes, como será demonstrado a seguir.

Clerici *et al.* (2009) realizaram estudo pioneiro comparando imagens de PET-^{18}FDG de um grupo de pacientes com CCLa (N = 16) e CCLna (N = 14), com um número pequeno de controles enviados por razões oncológicas (N = 7). Os achados indicaram redução metabólica predominantemente bilateral em ambos os grupos em relação ao grupo controle no giro do cíngulo posterior, giro frontal inferior, pré-cúneo e giro temporal superior em relação aos controles.

Por outro lado, os pacientes amnésticos apresentaram redução metabólica no hipocampo, amígdala e giro fusiforme esquerdos em relação aos não amnésticos, indicando possíveis diferenças entre os grupos. As características metodológicas do estudo, entretanto, não permitem caracterizar tais achados como conclusivos, pelo pequeno número de pacientes incluídos, sujeitos controles portadores de neoplasias e inclusão apenas de pacientes com CCLna com comprometimento de função executiva (CCLna único domínio ou disexecutivo) (Clerici *et al*., 2009).

Outro estudo, desta vez com tecnologia SPECT, referiu diferenças perfusionais entre CCLa (N = 40) e CCLna (N = 17), com redução de fluxo sanguíneo em áreas relacionadas à conversão para DA no CCLa, especialmente o hipocampo esquerdo e regiões temporoparietais (Nobili *et al*., 2008).

Os autores (Nobili *et al.*, 2008) reportam redução de perfusão no córtex pré-frontal direito de alguns sujeitos com CCLna em comparação com outros queixa subjetiva de memória e em ambos os lobos temporais em relação ao grupo controle. As diferenças de fluxo, entretanto, não foram inequívocas, com alta taxa de depressão (29%) no grupo CCLna, além de análise por regiões de interesse com pobre localização espacial (devido ao uso de máquinas de diferentes centros), e não por análises quantitativas bem estabelecidas *voxel* a *voxel* ou por 3D-SSP.

Dois estudos examinaram ainda diferenças no volume cerebral entre CCLa e CCLna. Em ambos os estudos, o CCLa apresentou redução no volume hipocampal em relação aos controles, alteração não observada nos pacientes não amnésticos, seja na sua variante disexecutiva, seja na variante múltiplos domínios (He *et al*., 2009; Pa *et al*., 2009).

No estudo de He *et al*. (2009), incluindo 27 CCLna disexecutivos e 15 CCLna com acometimento de múltiplos domínios, houve maior prevalência de fatores de risco cardiovascular no CCLna do que na variante amnésica, sugerindo relação com perdas cognitivas de origem vascular (He *et al*., 2009).

No estudo de Pa *et. al.* (2009), que incluiu 32 pacientes com CCLna exclusivamente do subtipo disexecutivo, o subgrupo não amnéstico apresentou redução volumétrica no córtex pré-frontal esquerdo em relação aos pacientes normais, indicando via de degeneração diferente no CCLna em comparação com a atrofia hipocampal e entorinal dos pacientes amnésticos.

A caracterização do perfil de biomarcadores amiloides em CCLna também demonstra a mesma carência de estudos de biomarcadores de neurodegeneração. Em estudo com [^{11}C]PIB-PET, uma maior deposição

cortical de Aβ foi observada em CCLa em relação a um subgrupo não amnéstico (Pike *et al.*, 2007). Estudo avaliando a deposição de Aβ medida no LCR também demonstrou correlação entre a sua deposição e testes de memória no CCLa, porém nenhuma correlação com testes clínicos no CCLna (Haldenwanger *et al.*, 2010).

Um recente artigo ilustra a utilidade prognóstica de biomarcadores em CCL de diferentes subtipos. Pacientes com CCL realizaram exame de PET-^{18}FDG no momento do diagnóstico e foram acompanhados em relação ao desfecho clínico. Em uma amostra de 45 pacientes, oito foram identificados como CCLna único domínio. Destes, dois evoluíram para demência frontotemporal e possuíam hipometabolismo frontal ao diagnóstico; dos outros seis, dois permaneceram estáveis e possuíam metabolismo normal ao diagnóstico; os quatro pacientes que apresentaram padrão de hipometabolismo temporoparietal evoluíram para DA (três pacientes) ou CCLa múltiplos domínios. Com relação aos pacientes também houve imporante capacidade de predizer aqueles que evoluiriam para DA ou permaneceriam estáveis (Cerami *et al.*, 2015).

O conjunto de achados de biomarcadores em subgrupos de CCLna é, portanto, ainda inconclusivo por diversas questões metodológicas (p.ex. pelo pequeno número de pacientes analisados), porém aponta na direção de que estes sujeitos apresentam alterações de biomarcadores e se encontram em risco para evolução para demências, ainda que em menor proporção que o CCLa e aparentemente com alterações menos relacionadas classicamente à DA.

1.5 Racional e Justificativas do Estudo

As evidências relacionadas aos biomarcadores e CCL descritas nos itens anteriores indicam uma possível sequência temporal de alterações fisiopatológicas que precedem o diagnóstico clínico de DA e se modificam durante a evolução da doença. Essas alterações, porém, são bem documentadas apenas nos subtipos amnésticos de CCL. Em subtipos não amnésticos a alteração temporal dos biomarcadores é pouco descrita, quando não desconhecida, e há evidências de estudos de outros grupos (Cerami *et al.*, 2014) de que CCLna possa compreender indivíduos com diferentes padrões de marcadores de lesão, inclusive o padrão típico da DA.

Como demonstrado, não há na literatura estudos consistentes investigando em uma amostra considerável e de forma sistemática o perfil dos diferentes tipos de biomarcadores de imagem e liquóricos relacionados à DA em pacientes com CCLna em relação ao CCLa e a sujeitos sem comprometimento cognitivo. Os poucos estudos existentes também não investigam possíveis correlações entre os achados dos diferentes métodos de imagem funcional e anatômica, biomarcadores liquóricos e variáveis clínicas nas diferentes variações do CCL.

Considerando-se o progressivo aumento da prevalência do CCL e de demências em geral, caracterizar corretamente do ponto de vista fisiopatológico os subtipos de CCL seria fundamental para, no futuro, melhor triar pacientes com relação ao seu risco de desenvolver específicas formas de demência ou outras doenças neuropsiquiátricas, ou mesmo de desenvolver tratamentos específicos para cada subtipo.

Tendo-se em vista os dados existentes na literatura, postula-se que a variante amnésica estaria mais relacionada à fisiopatologia da DA. Por outro lado, o mesmo não se poderia afirmar com relação às variantes não-amnésica, que apresentam menor conversão anual para demência e tem aparentemente menos alterações em biomarcadores relacionados à DA.

Por outro lado, deve-se ressaltar que nem todos os pontos relativos ao subtipo amnéstico de CCL estão resolvidos. Há ainda dúvidas quanto à exata correlação da deposição de amiloide com outros marcadores de degeneração, como metabolismo e volume cerebrais (Alexopoulos *et al.*, 2013; Fjell *et al.*, 2014). Alguns autores tem proposto que existam diferentes vias de neurodegeneração: a via amiloidogênica e uma via não dependente de amiloide (Jack *et al.*, 2013; Jack *et al.,* 2014), e é possível que alguns pacientes com CCLna se encaixem em caminhos alternativos de degeneração. Uma correta diferenciação prognóstica das diferentes vias pode se tornar crucial para, no futuro, classificarmos a DA em diversos subtipos, com possíveis diferenças prognósticas e de tratamento.

A correta classificação de pacientes em fases pré-demenciais abre uma perspectiva de se realizar medidas preventivas e terapêuticas mais exatas, almejando como meta reduzir a prevalência das demências. A análise por biomarcadores talvez seja a forma mais objetiva de realizar essa classificação. Essa possibilidade representa um enorme impacto econômico, porém também humanístico, quando se observa o progressivo e acelerado envelhecimento populacional mundial, particularmente em países subdesenvolvidos como o Brasil.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Investigar o volume e o metabolismo cerebral dos grupos de indivíduos com os subtipos amnéstico e não amnésico de comprometimento cognitivo leve, comparativamente a voluntários idosos sem comprometimento cognitivo, com o intuito de avaliar se existe concordância entre as possíveis alterações encontradas.

2.1 Objetivos Específicos

a) Avaliar possíveis associações entre os padrões funcionais metabólicos cerebrais dos diferentes subtipos de comprometimento cognitivo leve com alteração padrão descrita na literatura como fator de risco de evolução para doença de Alzheimer.

b) Avaliar possíveis associações entre os padrões de volumetria dos diferentes subtipos de comprometimento cognitivo leve com alteração padrão descrita na literatura como fator de risco de evolução para doença de Alzheimer.

c) Investigar a existência de correlações entre as alterações cerebrais volumétricas e as metabólicas nos diferentes subtipos de comprometimento cognitivo leve.

d) Investigar a existência de correlações entre as alterações cerebrais volumétricas e metabólicas com os valores de biomarcadores no líquido cefalorraquidiano e com variáveis clínicas nos diferentes subtipos de comprometimento cognitivo leve.

3 MÉTODOS

3.1 Casuística e Recrutamento

Foram incluídos no estudo voluntários com mais de 60 anos, com ou sem queixas cognitivas. O recrutamento foi feito por busca ativa de idosos ou por encaminhamento de bancos de indivíduos controles dos serviços de geriatria, neurologia e psiquiatria do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP). Foram incluídos somente participantes com mais de quatro anos de educação formal (correspondente ao atual ensino básico, ou o antigo ensino primário, no Brasil), no período de janeiro de 2011 a julho de 2014.

A fase de busca ativa foi realizada por um médico neurologista em grupos de encontro de idosos da cidade de São Paulo, SP, Brasil. Inicialmente o neurologista proferiu uma série palestras sobre demências e distúrbios cognitivos e posteriormente oferecia participação no estudo com divulgação de número telefônico para contato, tanto para voluntários com queixas cognitivas ou “de memória” (possíveis indivíduos com CCL), quanto para aqueles sem queixas (possíveis indivíduos do grupo controle). Uma consulta era então agendada após inscrição voluntária dos indivíduos por via telefônica. Estes, após a inscrição e a consulta inicial, foram matriculados para posterior acompanhamento no ambulatório do Centro de Referência em Distúrbios Cognitivos (CEREDIC) do HC-FMUSP.

Após o recrutamento, todos os participantes foram submetidos na consulta inicial a exame clínico e neurológico, avaliação de sintomas de depressão e ansiedade, e posteriormente a uma série padrão de exames neuropsicológicos. O diagnóstico clínico final dos voluntários foi estabelecido por consenso com a participação de uma equipe multiprofissional atuante na área cognitiva pertencente ao CEREDIC, composta de pelo menos dois neurologistas e/ou um neurologista e um psiquiatra, com o auxílio dos testes neuropsicológicos. O diagnóstico de CCL foi baseado nos critérios propostos por Petersen (Petersen *et al.*, 1999; Winblad *et al.*, 2004; Petersen, 2011).

Uma vez finalizada a fase de exames clínicos e neuropsicológicos, após a confirmação diagnóstica clínica, os voluntários foram enviados para a realização dos exames de imagem. O estudo de RM foi sempre o primeiro a ser realizado e teve também o objetivo de excluir possíveis causas de perdas cognitivas não relacionadas a doenças neurodegenerativas (os critérios de exclusão e a metodologia de aquisição estão detalhados abaixo). Aqueles que preenchiam os critérios de inclusão e foram submetidos ao exame de PET-^{18}FDG do encéfalo. Os procedimentos foram realizados dentro de um período de duas semanas entre os mesmos, para evitar que as diferenças temporais não comprometessem a interpretação dos resultados. As fases de recrutamento e inclusão estão ilustradas abaixo (Figura 1).

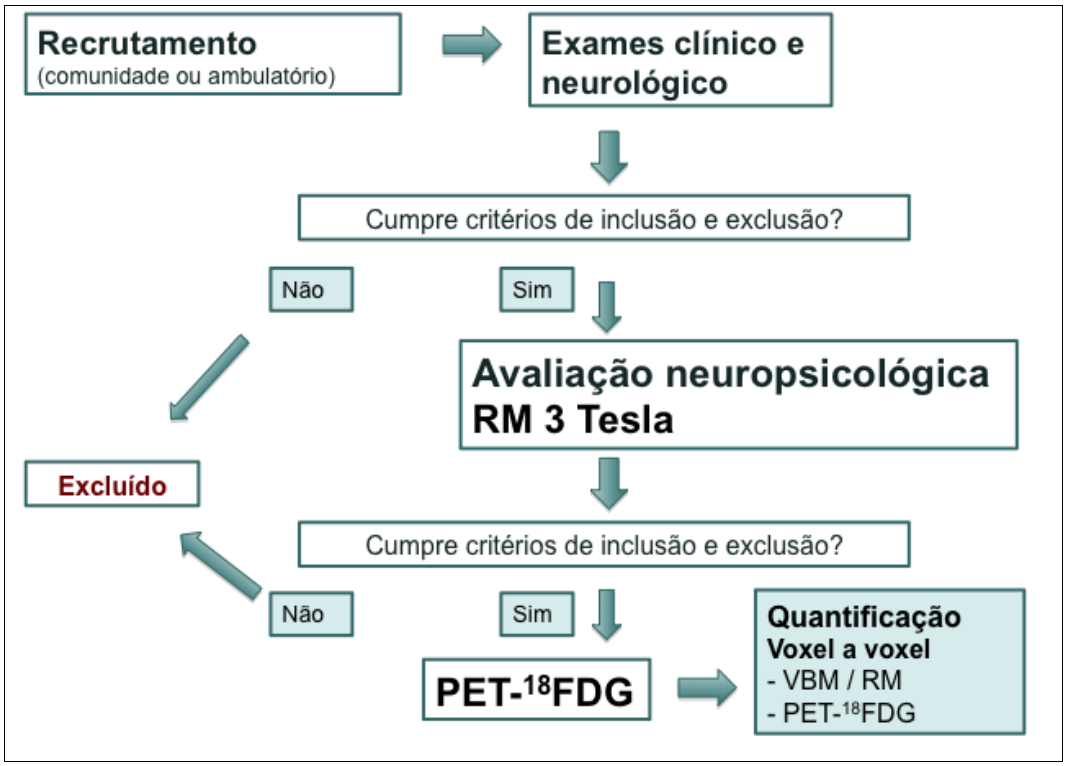


Figura 1 - Fluxograma dos procedimentos envolvidos no estudo

O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo (CAPPesq/HC-FMUSP 0642/09) (Anexo A). Todos os participantes foram esclarecidos a respeito do protocolo de pesquisa, exames a serem realizados, além dos riscos e benefícios dos procedimentos. Após sua concordância, foi realizada a assinatura do termo de consentimento livre e informado relativo ao estudo (Anexo B).

3.1.1 Diagnóstico clínico e critérios de inclusão

Foram incluídos sujeitos com CCL de acordo com os critérios de Petersen (Petersen *et al.,* 1999; Petersen, 2011). Os voluntários com CCL foram então distribuídos em grupo CCLa (gCCLa) ou grupo CCLna (gCCLna), de acordo com a presença ou ausência de comprometimento de memória (definidora de CCLa) ou de outros domínios cognitivos (CCLna) no estudo neuropsicológico (Petersen *et al.,* 1999; Petersen, 2011).

Um domínio ou função cognitiva foi considerado comprometido se um dos testes neuropsicológicos relativos àquela função estivesse com *Z score* menor que -1,5 (valores padronizados para a idade e nível educacional do indivíduo), ou ainda se dois ou mais testes relativos à mesma função estivessem com *Z score* entre -1,0 e -1,5 (Clark *et al*., 2013).

Os pacientes com CCL foram então classificados como único (UD) ou múltiplos domínios (MD) de acordo com os critérios acima, levando-se em conta que o comprometimento de memória sempre definiu o paciente como CCLa, independente do número de domínios acometidos (assim, um CCL com comprometimento de memória associada a déficit em outra função seria sempre um CCLa MD). Este fluxo para o diagnóstico dos diferentes tipos de CCL está ilustrado na Figura 2.

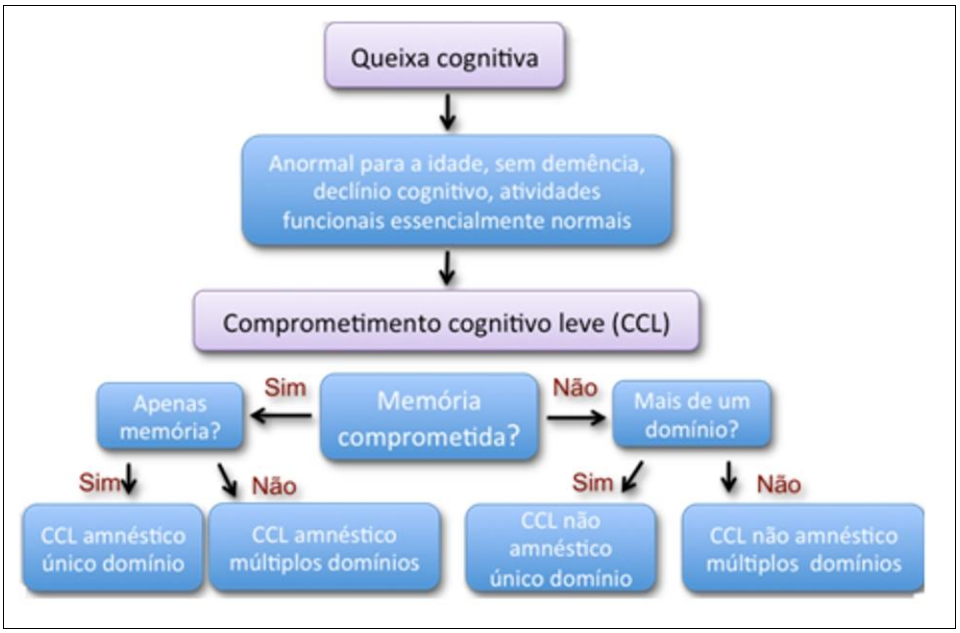


Figura 2 - Quadro demonstrando o fluxo diagnóstico dos diferentes tipos de CCL, adaptado de Winblad *et al*. (2004) e Peterson *et al*. (2011)

A subdivisão de CCLa e CCLna em único ou múltiplos domínios foi realizada com a finalidade de realizar análises secundárias para investigar possíveis relações entre o acometimento de um certo domínio cognitivo (principalmente memória no CCLa ou função executiva no caso de CCLna) e alterações de biomarcadores, particularmente os achados de neuroimagem.

No total foram incluídos 84 sujeitos com CCL, classificados como gCCLa (N = 46) e gCCLna (N = 38), além de 30 voluntários idosos sem comprometimento cognitivo [grupo controle (GC)].

Setenta e um pacientes dos grupos gCCLa (N = 38) e gCCLna (N = 33), concordaram em ser submetidos a uma punção lombar para obtenção de líquido cefalorraquidiano para dosagem de peptídeo ß-amiloide (Aß), proteínas tau e tau-fosforilada. Esses dados foram utilizados no presente estudo de forma retrospectiva após consentimento dos pesquisadores envolvidos no projeto CAPPesq 0061/11 (Anexo C).

3.1.2 Critérios de exclusão

Foram excluídos do estudo voluntários com as seguintes características: presença de doença de Parkinson e/ou qualquer tipo de parkinsonismo detectado ao exame neurológico; presença de outras doenças neurológicas (epilepsia, acidente vascular cerebral, doenças inflamatórias); desordens psiquiátricas compreendidas pelo DSM-IV e não relacionadas à DA (esquizofrenia, transtorno obsessivo-compulsivo, depressão ativa avaliada clinicamente e com valor maior que 5 na Escala de Depressão Geriátrica – *Geriatric Depression Scale* (GDS); Sheikh e Yesavage *et al.* (1986) e outras que possam cursar com alterações regionais de fluxo sanguíneo e metabolismo cerebral; lesões orgânicas cerebrais além das degenerativas, detectadas pela RM, incluindo acidente vascular cerebral e lesões vasculares importantes após a análise subjetiva de um radiologista habilitado e com alterações ao exame neurológico na avaliação clínica; claustrofobia ou qualquer outro motivo de recusa em realizar o exame de RM; uso crônico de álcool ou medicações psicotrópicas, a não ser uso estável de antidepressivos, por ao menos oito semanas; pacientes diabéticos sem controle glicêmico adequado (por risco de interferência na qualidade do exame de PET-^{18}FDG); declínio cognitivo intenso o suficiente para interferir com as atividades da vida diária (consistente com o diagnóstico de demência), de acordo com julgamento clínico e com o *Functional Activities Questionnaire* (uma medida indireta de funcionalidade: pacientes com notas acima de 4 foram excluídos (Pfeffer *et al*., 1982); uso de inibidores da colinesterase ou memantina.

3.2 Avaliação Clínica e Testes Neuropsicológicos

3.2.1 Avaliação clínica

Todos os participantes foram submetidos a uma entrevista clínica, se quando possível inicialmente em conjunto com seus informantes (pessoas próximas que conheçam o paciente de longa data, como familiares, amigos ou outros acompanhantes).

Os seguintes testes cognitivos foram realizados por um neurologista: Mini-Exame do Estado Mental (MEEM) (Folstein *et al.*, 1975) validado para a língua portuguesa em população brasileira (Brucki *et al*., 2003), ADAS-CoG modificado (Rosen *et al*., 1984; Schultz *et al*., 2001), e bateria breve de avaliação cognitiva (BCB) (Nitrini *et al.*, 2004).

A BCB é um teste de aprendizado visual associado a três testes de interferência. Nesta bateria um sujeito tem três oportunidades para aprender 10 figuras simples (sapato, casa, pente, chave, avião, tartaruga, livro, colher, árvore e balde). Inicialmente, as 10 figuras são mostradas e os sujeitos instruídos a nomeá-las. Após essa fase as figuras são retiradas e pede-se que os sujeitos recordem espontaneamente o nome das figuras (sem uma instrução prévia de tentar se lembrar durante a fase de reconhecimento). As figuras relembradas são pontuadas como “memória incidental”. Todas as figuras são então mostradas novamente por 30 segundos e os sujeitos são instruídos a tentar memorizá-las. As figuras são então retiradas e os sujeitos tem um minuto para recordar os seus nomes. Esse procedimento é então repetido uma vez (total de duas tentativas de 30 segundos para aprender as 10 figuras). O número de figuras aprendidas após a segunda tentativa é computado como “memória de aprendizado”.

Após a aplicação dessas duas fases iniciais, os pacientes são submetidos a testes de fluência semântica (fluência de animais), fonêmica categórica (fluência da letra P) e ao teste do desenho do relógio. Estes testes servem como uma atividade de distração dentro da BCB.

No último passo é solicitado que os pacientes relembrem durante um minuto os desenhos da BCB (evocação tardia) e também avaliar o reconhecimento dos desenhos inicialmente apresentados depois de misturados com outros 10 desenhos diferentes na mesma página (em alguns casos de disfunção amnéstica há a chamada “intrusão” – inclusão de memórias não existentes entre as figuras originalmente apresentadas).

Essa série de testes clínicos demonstrou previamente uma boa acurácia para o diagnóstico de estágios iniciais de demência na população brasileira (Nitrini *et al.*, 2004, 2006 e 2007) e foi escolhida por esse motivo para o rastreamento clínico no presente estudo.

Além da entrevista clínica para exclusão de depressão no grupo controle, a intensidade de sintomas depressivos nos subgrupos CCL foi medida pela GDS (Sheikh e Yesavage, 1986; Almeida e Almeida, 1999), a de sintomas ansiosos pela escala de ansiedade de Hamilton (Hamilton, 1959). A escala de Hamilton e a GDS foram incluídas pelo conhecido impacto de prejuízo de atenção causado por estresse, ansiedade ou depressão em testes neuropsicológicos (Arnaíz e Almkvist, 2003), além de ajudarem a detectar síndromes psiquiátricas (critério de inclusão). O índice de funcionalidade foi avaliado por meio do Questionário de Atividades Funcionais (QAF) (Pfeffer *et al.*, 1982), aplicado aos acompanhantes para excluir demência.

3.2.2 Testes neuropsicológicos

Após a entrevista clínica e inclusão dos participantes, foi realizada uma bateria de testes neuropsicológicos. A partir desta, os pacientes previamente classificados como CCL foram classificados entre os seus diferentes subtipos, como abordado previamente (amnéstico ou não amnéstico, único ou múltiplos domínios). Os pacientes do grupo controle (que já haviam apresentado rendimento normal na bateria de testes clínicos) também deveriam apresentar pontuação dentro dos limites normais para idade e escolaridade nos testes neuropsicológicos. Abaixo segue a lista de testes neuropsicológicos realizados, de acordo com a função cognitiva avaliada. A aplicação, a pontuação e a interpretação dos resultados obtidos nos testes foram realizadas de acordo com o guia de referência de cada um destes, e os resultados foram ajustados de acordo com a idade e níveis educacionais.

Testes de memória

- Subtestes de reprodução visual (avaliação de memória episódica visual) e memória lógica (avaliação de memória episódica verbal) da Escala de Memória de Wechsler [*Wechsler Memory Scale – revised* (WMS-R)] (Wechsler, 1987).
- Reconhecimento tardio (evocação tardia) da figura complexa de Rey-Osterriech, que avalia a memória episódica visual (Spreen *et al.*, 2006).

- Teste de aprendizagem verbal auditiva de Rey (RAVLT), que inclui aprendizagem de uma lista de palavras (aprendizagem verbal) e avalia também a memória episódica visual (Spreen *et al.*, 2006; Malloy-Diniz *et al.*, 2007).

Testes de habilidades construtivas e função visuoespacial

- Desenho do Relógio, uma tarefa visuoespacial e construtiva para a investigação clínica, este aplicado pelo neurologista como parte da BCB (Battersby *et al.*, 1956).
- Cópia da Figura complexa de Rey-Osterriech (Spreen *et al.*, 2006).
- Subteste do desenho de blocos do *Wechsler Adult Intelligence Scale* (WAIS) (Wechsler, 1987, 1986 e 1999; Nascimento, 2004).
- Percepção visual por meio do teste de Raciocínio Matricial do WAIS (Wechsler, 1987, 1996 e 1999; Nascimento 2004).

Testes de atenção e funções executivas

Os dois domínios foram agrupados pela superposição dessas funções nos testes, sendo difícil separá-los com base nos resultados numéricos.

- Teste das trilhas (*Trail Making Test*), partes A e B (Weintraub e Mesulam, 1985). O teste mede velocidade de varredura visual, funcionamento motor, sequenciação e flexibilidade mental. Na parte A o sujeito deve conectar círculos numerados de acordo com sua ordem consecutiva, sendo avaliada a atenção, velocidade de processamento e exploração visual (funções executivas), Na parte B

deve-se relacionar em sequência números e letras, alternando as sequências (por exemplo: 1 – A, 2 – B, etc.); essa fase avalia atenção e controle inibitório de respostas (função executiva).

- Teste de Stroop (Weintraub e Mesulam, 1985), que avalia atenção e controle inibitório de respostas (função executiva).
- Dígitos direto e indireto do WMS-R (Wechsler, 1987; Spreen *et al.*, 2006), que medem predominantemente atenção. O subteste do dígito direto mede o máximo da amplitude da atenção aumentando o volume de informações que precisam ser armazenadas por um espaço de tempo curto durante uma única tarefa. O dígito indireto mede o controle mental por meio da capacidade de operacionalizar dados no plano mental, devendo o sujeito armazenar e processar informações simultaneamente.

Testes de linguagem

Além da avaliação durante o exame clínico e neurológico, a linguagem foi avaliada por meio dos testes de fluência verbal fonêmica (FAS) e fluência de letra P (Spreen *et al.*, 2006).

3.3 Aquisição dos Exames de Imagem

Todos os voluntários controles foram submetidos a exames de imagem no Instituto de Radiologia (InRad) do HC-FMUSP. Inicialmente foram realizadas as sequências de ressonância magnética no Serviço de Ressonância Magnética e posteriormente os estudos de PET-CT com ^{18}FDG no Centro de Medicina Nuclear (CMN), em dias diferentes. A realização dos exames de imagem e testes neuropsicológicos foi realizada dentro de um período de duas semanas.

3.3.1 Ressonância magnética

As aquisições de imagens por ressonância magnética tiveram o duplo objetivo de coletar imagens para quantificação de morfometria baseada em *voxel* (VBM), na sequência volumétrica sagital 3D T1, e de excluir possíveis alterações estruturais clinicamente relevantes (tumores, malformações, doença vascular, etc.).

Todas as imagens foram adquiridas no mesmo equipamento (Philips ACHIEVA 3.0 Tesla), durante cerca de 30 minutos, nas seguintes sequências:

- Sagital 3D T1, sequência volumétrica usada para a realização do VBM, consistindo de 180 imagens com espessura de corte de 1 mm e tamanho do pixel de 1 m^2 (TR = 7 ms, TE = 3,2 ms; FOV 24 cm^2; matriz 240 x 240).
- Axial T2 *fast spin echo* (FSE), com 28 imagens com espessura de corte 4,5 mm (TR = 833,75 ms, TE = 11,1136 ms; FOV 23 cm^2; matriz 256 x 256).

- Axial *fluid attenuation inversion recovery* (FLAIR), com 28 imagens com espessura de corte de 4,5 mm (TR = 11000 ms, TE =130 ms; FOV 23 cm^2; matriz 352 x 264).
- Coronal T2 *spectral presaturation with inversion recovery* (SPIR), com 32 imagens com espessura de corte de 4,5 mm (TR = 2830,83 ms, TE = 120 ms; FOV 23 cm^2; matriz 460 x 445).
- Coronal T2 alinhado com hipocampo, com 24 imagens com espessura de corte de 3,0 mm (TR = 2630,92 ms, TE = 80 ms; FOV 23 cm^2; matriz 400 x 316).
- Difusão SENSE, com 28 imagens com espessura de corte de 4,0 mm (TR = 3257,11 ms, TE = 67,4547 ms; FOV 23 cm^2; matriz 192 x 153).
- Difusão, com 56 imagens com espessura de corte de 4,0 mm (TR = 3257,11 ms, TE = 67,4547 ms; FOV 23 cm^2; matriz 192 x 153).

Com o intuito de avaliar uma possível influência de doença microvascular para a perda cognitiva de alguns voluntários, foi também realizada uma análise visual semiquantitativa das hiperintensidades de substância branca (HSB) no cérebro de todos os voluntários. Presença de HSB na RM não foi um critério de exclusão, ao contrário de lesões vasculares significativas ou com sintomas clínicos. O método escolhido foi a escala visual proposta Fazekas *et al*. (1987), aplicada na sequência axial FLAIR por um neuroradiologista habilitado e sem conhecimento dos dados clínicos e epidemiológicos dos pacientes. Resumidamente, tal escala é graduada em quatro pontos (de 0 a 3) de acordo com a quantidade de HSB vista à RM, como detalhado abaixo:

- Fazekas 0: ausência de HSB significantes.
- Fazekas 1: focos esparsos de HSB subcortical e periventricular.
- Fazekas 2: focos de HSB subcortical e periventricular, com início de confluência entre eles.
- Fazekas 3: grandes áreas de confluência de HSB subcortical ou periventricular.

3.3.2 Tomografia por emissão de pósitrons acoplada à tomografia computadorizada com 18F-fluordesoxiglicose (PET-18FDG)

Todos os estudos de PET/CT foram adquiridos em equipamento Biograph (CTI/ Siemens, Knoxville, TN, E.U.A.), composto por conjuntos de detectores BGO acoplados a uma tomografia computadorizada helicoidal. A aquisição foi feita 60 minutos após a injeção intravenosa de aproximadamente 370 MBq (10 mCi) de ^{18}FDG, tempo durante o qual os sujeitos foram mantidos em condições padronizadas de repouso (ausência de estímulos audiovisuais). Todos os participantes foram submetidos a jejum de pelo menos seis horas. Antes da administração da ^{18}FDG, glicemia de jejum foi dosada sistemicamente conforme protocolo padronizado na Instituição.

Inicialmente foram adquiridas as imagens de tomografia computadorizada empregadas para corregistro anatômico e neste projeto para correção de atenuação das imagens tomográficas de emissão de pósitrons. As imagens tomográficas foram também empregadas com finalidades diagnósticas, com o objetivo de eventualmente avaliar presença de calcificações parenquimatosas ou outras anormalidades eventualmente não detectadas nos exames de ressonância magnética.

Os cortes tomográficos foram adquiridos durante 15 minutos com matriz 256 x 256, zoom 2,5, resultando em pixels de tamanho 1,04 mm (voxel de 1,04 mm^3). As imagens foram reconstruídas pelo método iterativo *ordered subset expectation maximization* (OSEM), com seis iterações e 16 subsets e suavizadas com filtro Gaussiano de 5 mm. Os dados foram corrigidos para espalhamento, atenuação e decaimento e não foi aplicada a correção para volume parcial neste momento.

3.4 Processamento e Quantificação das Imagens

Todos os procedimentos relacionados ao processamento e quantificação das imagens de PET e RM foram realizados utilizando o *software Statistical Parametric Mapping* (SPM8) (*Wellcome Department of Cognitive Neurology, Functional Imaging Laboratory,* Londres, Reino Unido - http://www.fil.ion.ucl.ac.uk/spm/), implementado na plataforma MATLAB R2009a (*The Mathworks Inc.*, Sherborn, MA, E.U.A). Os detalhes específicos de cada método seguem abaixo.

Após a coleta e pré-processamento das imagens (descrito acima), todas foram transformadas em imagens de padrão *Digital Imaging and Communications in Medicine* (DICOM) (extensão .dcm) e posteriormente para o formato nifti (extensão .nii), o arquivo padrão para processamento no SPM8. Neste momento as imagens são então convertidas da chamada “orientação radiológica” (lado esquerdo da imagem é o lado direito do paciente), para a chamada “orientação neurológica”, na qual o lado esquerdo da imagem é o lado esquerdo do paciente. Após esse momento as imagens

passaram por processos de normalização espacial e suavização e seguiram por processos diferentes de processamento, que serão detalhados abaixo.

3.4.1 Processamento das imagens de RM

A etapa de processamento e análise da morfometria cerebral de substância cinzenta foi realizada usando o método de morfometria baseada no *voxel* [*voxel based morphometry* (VBM)], usando o programa SPM8. O SPM8 usa um algoritmo de registro difeomórfico robusto [*Diffeomorphic Anatomical Registration using Exponentiated Lie algebra* (DARTEL)]. Este registro de imagens difeomórfico prevê uma melhor precisão anatômica comparada aos métodos anteriores para VBM. O algoritmo do DARTEL está implementado no SPM8 por meio de uma caixa de ferramentas (DARTEL *Toolbox*). Esta caixa de ferramenta também cria uma *template* (molde espacial) específico para o estudo. No nosso estudo, tal molde foi criado com base nas imagens dos voluntários do grupo controle.

Em resumo, as imagens de RM são segmentadas em três compartimentos – substância cinzenta (SC), substância branca (SB) e LCR, usando o modelo de segmentação unificada. A partir destas imagens segmentadas, o molde customizado é obtido utilizando a caixa de ferramenta DARTEL. As imagens são então moduladas pelo determinante Jacobiano e adequadas ao padrão de coordenadas (x, y, z) do *Montreal Neurologic Institute* (MNI), que é o padrão de coordenadas usado pelo SPM8. Por fim, as imagens segmentadas, normalizadas e moduladas são suavizadas com filtro Gaussiano de oito milímetros e seguem para comparação entre grupos.

3.4.2 Processamento das imagens de PET-18FDG

As imagens PET de cada paciente foram inicialmente corregistradas com as suas próprias imagens de RM (sequência T1). Após o coregistro, as imagens foram normalizadas espacialmente no SPM8 em um espaço estereotático baseado no MNI.

Cada uma das imagens foi individualmente suavizada com um filtro gaussiano de 8 mm para reduzir o impacto de possível erro de corregistro no espaço e para melhorar o sinal em relação ao ruído. Para garantir que a análise conteve apenas *voxels* mapeando o tecido cerebral, um valor de corte (*threshold*) de 0,8 da captação média do radiofármaco em tecido cerebral foi selecionado. As diferenças de captação global entre as imagens foram ajustadas utilizando a opção *proportional scaling* do SPM08, utilizando uma normalização pela média das contagens cerebrais de cada grupo (normalização por *global means*). Os cortes tomográficos resultantes foram reamostrados utilizando interpolação trilinear gerando *voxels* de 2 x 2 x 2 mm.

O processo acima descrito e a análise estatística (detalhada abaixo) são tidos como o padrão de análise para imagens metabólicas funcionais e foram validados previamente (Signorini *et al.,*1999) e usados em diversos estudos clínicos prévios envolvendo PET e CCL (Drzezga *et al.*, 2003; Jagust *et al.*, 2006; Perneczky *et al*., 2007; Salmon *et al*., 2008; Clerici *et al*., 2009; Pa *et al*., 2009).

Correção do efeito de volume parcial nas imagens PET

Após o processamento padrão, as imagens de PET-^{18}FDG foram corrigidas para o efeito de volume parcial [*Partial Volume Effect* (PVE)] utilizando a técnica para correção Meltzer (Quarantelli *et al.*, 2004), implementada no programa PVE-lab (http://nru.dk/downloads/software). Para realizar esta correção, o PVE-lab realiza um pré-processamento (corregistro e segmentação) usando as rotinas do SPM. Primeiramente, as imagens originais de PET-^{18}FDG são coregistradas para a sua imagem correspondente de RM sem o compartimento extracerebral. Em seguida, as imagens de RM são segmentadas em SC, SB e LCR. Após estas etapas, o programa realiza convoluções das imagens de RM segmentadas com a imagem de PET-^{18}FDG.

O PVE é uma aparente redução do metabolismo em áreas de redução volumétrica da SC e preservação metabólica artificial em regiões com redução menos pronunciadas de volume da SC (Yanase *et al.*, 2005). Isso ocorre graças ao chamado “efeito de espalhamento” dos fótons emitidos pelo radionuclídeo (^{18}FDG) entre as estruturas adjacentes (Quarantelli *et al.*, 2004). Assim, a correção do PVE é de fundamental relevância para diferenciar alterações cerebrais metabólicas relacionadas à redução volumétrica ou não.

Análise complementar de áreas de interesse (correção por pequenos volumes - small volume correction)

Com o intuito de se analisar diretamente áreas de hipometabolismo classicamente relacionadas à evolução de CCL para DA, foram realizadas análises complementares de ROI pelo método de *small volume correction* (SVC). Essa análise permite que, analisando áreas específicas pré-definidas e não o cérebro globalmente, os resultados falso-positivos e falso-negativos sejam reduzidos. Contudo, realizando o método SVC, as áreas pré-definidas sofrem menos correções estatísticas, e deve-se usar testes estatísticos mais rigorosos, como detalhado abaixo. As áreas foram definidas de acordo com duas amplas revisões prévias (Jagust *et al*., 2009; Landau *et al*., 2011) e incluíram o giro do cíngulo posterior, pré-cúneos, giros angulares, giro temporal médio bilateral e giro temporal inferior, todos bilaterais. Estas áreas fazem parte do córtex parietal posterior e temporoparietal de associação.

3.5 Análise dos biomarcadores no liquido cefalorraquidiano

Como explicitado anteriormente, alguns sujeitos dos grupos CCLa (N = 38) e CCLna (N = 33) consentiram com a coleta de LCR para dosagem de peptídeo ß-amiloide 1-42, e proteínas tau e tau fosforilada [Thr 181 (p-tau)]. Os resultados desses testes foram utilizados de forma retrospectiva nos pacientes incluídos em nosso estudo. Voluntários do grupo controle não foram submetidos a tais exames.

As análises laboratoriais foram realizadas pelo Laboratório de LCR do Serviço de Neurologia do Instituto Central do HC-FMUSP. Os pacientes

foram submetidos, após oito horas de jejum, a punção do LCR ao nível das vértebras L4-L5, realizada por médico neurologista. Aproximadamente 10 ml de LCR foram obtidos, coletados em tubo de polipropileno, rapidamente centrifugados e após isso, congelados à temperatura de -80 °C para posterior análise.

As concentrações dos marcadores biológicos foram determinadas pela tecnologia LuminexTM x-MAP (MAP = perfil de múltiplos analitos, x = variável), usando os kits comerciais Inno-BIA ALZBIO3 para a análise de Aβ, proteína tau total e phospho Thr181 (p-tau) (Innotest hTAUAg, Innogenetics, Ghent, Bélgica).

3.6 Análise Estatística

3.6.1 Dados clínicos

Os dados clínicos, demográficos e valores dos biomarcadores no LCR foram analisados pelo programa SPSS versão 17.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, EUA), com diferentes testes estatísticos de acordo com a variável empregada. Para variáveis contínuas foram utilizados o teste t de Student não pareado quando comparados dois grupos ou o teste ANOVA com testes t *post-hoc* quando os três grupos foram comparados. Para variáveis categóricas foi utilizado o teste do Chi-quadrado.

Para as variáveis clínicas foi adotado o ponto de corte de 0,05 (α = 5%) como o valor de rejeição da hipótese de nulidade, sendo considerados valores de p iguais ou menores que 0,05 como estatisticamente significantes.

3.6.2 Métodos de Imagem (SPM8)

Para análise da diferença entre grupos nos métodos de imagem (PET-^{18}FDG e RM), foram realizadas comparações *voxel* a *voxel* no programa SPM8 com o intuito de identificar diferenças na captação regional de radiofármaco da PET-^{18}FDG [metabolismo regional de glicose (MRG)] e de volume cerebral na volumetria por RM (VBM).

O programa SPM8 realiza comparações de variáveis entre grupos, criando uma estatística t para cada *voxel* cerebral, após os processos de normalização espacial e suavização explicados em sessão anterior. Nessas comparações, a cada *voxel* é atribuído um valor numérico (relativo ao metabolismo na PET ou volume na RM), e as médias de cada *voxel* em cada um dos grupos são comparadas individualmente.

Assim, ao final da análise, o SPM atribui um valor de p para cada *voxel* cerebral, e os *voxels* são relatados em uma tabela de acordo com um limiar pré-definido pelo pesquisador. Esses valores resultam em uma análise inicial que gera mapas de estatística t para cada *voxel* cerebral, que assim constituem os mapas estatísticos paramétricos. O programa realiza ainda correções estatísticas que levam em consideração o problema das múltiplas correções.

Como demonstrado na Figura 3, no SPM8 os *voxels* estatisticamente relevantes são identificados em termos de coordenadas numéricas (x, y, z) de acordo com as coordenadas do MNI. Após identificação das coordenadas MNI, estas são convertidas para coordenadas de acordo com o atlas de Talairach e Tournoux em software específico (http://bioimagesuite.yale.edu/ - noodle.med.yale.edu) (Lacadie *et al.*, 2008) e posteriormente confirmadas com ajuda do programa *Talairach Client* (Lancaster *et al.,* 1997 e 2000).

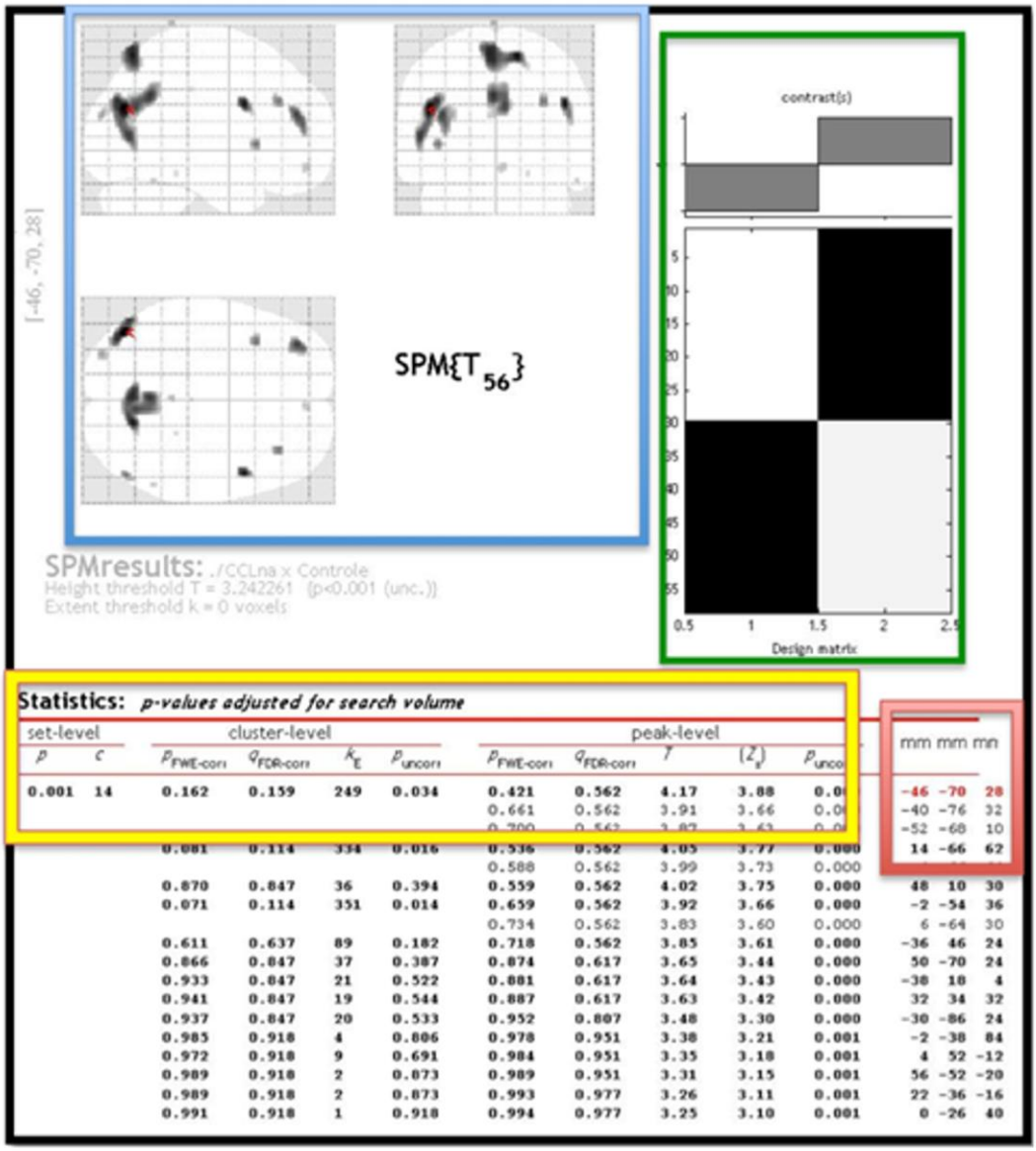


Figura 3 - **Exemplo de um mapa estatístico paramétrico de comparação voxel a voxel gerado pelo SPM8 para análise de metabolismo glicolítico regional por PET. O retângulo azul demonstra a representação gráfica, em três projeções-padrão (o chamado template do SPM), das alterações encontradas na comparação entre os cérebros de dois grupos, após os processos de normalização e suavização no espaço padrão do SPM. O retângulo verde demonstra o desenho estatístico e o contraste escolhido, neste caso um teste t não pareado de contraste -1; 1 [busca analisar o que o primeiro grupo de cérebros tem "a menos" (-1) em termos metabólicos do que o segundo (1)]. O retângulo amarelo demonstra a tabela com os resultados da análise estatística, detalhado em figura a seguir. O retângulo vermelho demonstra as coordenadas (x, y, z), em milímetros, de cada região cerebral em que foi encontrada alguma diferença estatística, no espaço do SPM (MNI), que serão posteriormente convertidas para coordenadas de Talairach**

Para a análise estatística no programa SPM08 foi realizado um teste ANOVA entre os três principais grupos (gCCLna, gCCLa e gC) e posteriormente os grupos foram comparados entre si em análise *post-hoc* com um teste t não pareado.

Além das comparações simples entre os pacientes dos três grupos, foram realizadas comparações adicionais por testes t não pareados entre subgrupos, de acordo com as funções cognitivas afetadas, a saber:

- gCCLa múltiplos domínios versus GC.
- gCCLa único domínio (memória) versus GC.
- gCCLna múltiplos domínios versus GC.
- gCCLna único domínio (função executiva / atenção) versus GC.

Para as análises no SPM8, foi adotado o ponto de corte de $p = 0,001$ (0,1%) como o valor de rejeição da hipótese de nulidade, o que corresponde a um valor de 3,09 na curva de estatística Z. Assim, considerados com valores de $p < 0,001$ como estatisticamente significantes ao nível de voxel, com no mínimo 10 *voxels* agrupados em cada área de significância (denominada de "*cluster*"). Esse é um ponto de corte clássico utilizado em estudos funcionais que julgamos adequado para sujeitos sem demência (Signorini *et al.,* 1999), que já foi usado previamente em estudos com CCL e neuroimagem, incluindo alguns com desenho semelhante à presente tese (Drzezga *et al*., 2003; Clerici *et al*., 2009; Pa *et al*., 2009).

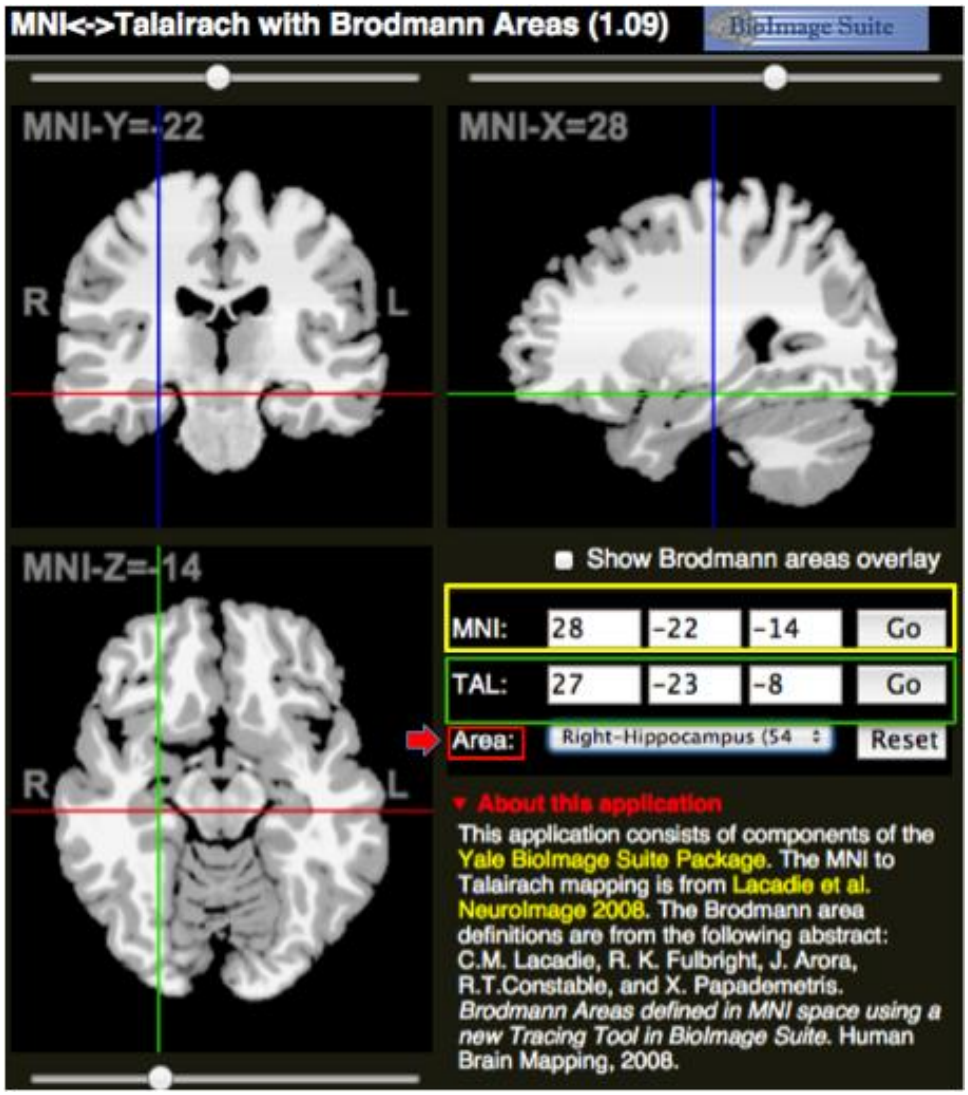


Figura 4 - Exemplo da interface do aplicativo BioImage Suite, para conversão de coordenadas do espaço SPM8 (MNI - retângulo amarelo) para o espaço Talairach (TAL - retângulo verde). Após a conversão e localização anatômica, que já é fornecida previamente pelo programa (seta e retângulo vermelhos), os dados são ainda confirmados do programa Talairach client [Fonte: http://bioimagesuite.yale.edu/]

O mapa estatístico do SPM8 aplica ainda automaticamente métodos estatísticos de correção para múltiplas comparações, como o *familywise error* (FWE) e *false discovery rate* (FDR). Nos casos em que os voxels permaneceram estatisticamente significantes após a correção para esses métodos, eles foram também identificados. Devido à rigidez estatística destes métodos, nesta análise foram considerados valores de 0,05 (α = 5%)

como o valor de rejeição da hipótese de nulidade, sendo considerados valores de p < 0,05 como estatisticamente significantes, identificados de acordo com o método de correção para múltiplas comparações (pFWE e/ou pFDR). Para a análise SVC, por esta ser direcionada a menores áreas cerebrais e, portanto, sujeita a menos correções para múltiplas comparações, foi adotado o valor de 0,05 (α = 5%) para rejeição da hipótese de nulidade, porém sempre após correções para múltiplas comparações pelos métodos acima expostos.

Statistics: *p-values adjusted for search volume*

set-level		cluster-level				peak-level					mm mm mm		
p	c	$p_{FWE-corr}$	$q_{FDR-corr}$	k_E	p_{uncorr}	$p_{FWE-corr}$	$q_{FDR-corr}$	T	$(Z_=)$	p_{uncorr}			
0.001	14	0.162	0.159	249	0.034	0.421	0.562	4.17	3.88	0.000	-46	-70	28
						0.661	0.562	3.91	3.66	0.000	-40	-76	32
						0.700	0.562	3.87	3.63	0.000	-52	-68	10
		0.001	0.114	334	0.016	0.536	0.562	4.05	3.77	0.000	14	-66	62
						0.588	0.562	3.99	3.73	0.000	-4	-66	64
		0.870	0.847	36	0.394	0.559	0.562	4.02	3.75	0.000	48	10	30
		0.071	0.114	351	0.014	0.659	0.562	3.92	3.66	0.000	-2	-54	36
						0.734	0.562	3.83	3.60	0.000	6	-64	30
		0.611	0.637	89	0.182	0.718	0.562	3.85	3.61	0.000	-36	46	24
		0.866	0.847	37	0.387	0.874	0.617	3.65	3.44	0.000	50	-70	24
		0.933	0.847	21	0.522	0.881	0.617	3.64	3.43	0.000	-38	18	4
		0.941	0.847	19	0.544	0.887	0.617	3.63	3.42	0.000	32	34	32
		0.937	0.847	20	0.533	0.952	0.807	3.48	3.30	0.000	-30	-86	24
		0.985	0.918	4	0.806	0.978	0.951	3.38	3.21	0.001	-2	-38	84
		0.972	0.918	9	0.691	0.984	0.951	3.35	3.18	0.001	4	52	-12
		0.989	0.918	2	0.873	0.989	0.951	3.31	3.15	0.001	56	-52	-20
		0.989	0.918	2	0.873	0.993	0.977	3.26	3.11	0.001	22	-36	-16
		0.991	0.918	1	0.918	0.994	0.977	3.25	3.10	0.001	0	-26	40

Figura 5 - Representação detalhada da tabela com os resultados estatísticos do SPM8. O retângulo azul indica o limiar estatístico escolhido pelo pesquisador para a visibilização dos resultados (ponto de corte para valorização estatística). Neste caso, só serão demonstrados resultados com valores de p < 0,001. O retângulo amarelo identifica os resultados a partir do ponto de vista de uma área de voxels contíguos, área esta denominada de cluster. Deve-se notar a coluna verde, que demonstra o número de voxels em cada área. O retângulo vermelho demonstra os resultados para os voxels de maior expressão em cada cluster. Percebe-se que são oferecidos valores de p com correções para múltiplas comparações pelos métodos familywise error (pFWEcorr), false discovery rate (pFDRcorr) e não corrigido (puncorr). São ainda demonstrados os valores em estatística T e o Z score (Z) para cada voxel. No presente estudo foram valorizados apenas resultados com puncorr < 0,001 para o voxel de maior significância, com no mínimo 10 voxels agrupados na região (cluster de maior significância); valores de p corrigidos para múltiplas comparações pelos dois métodos expostos foram demonstrados apenas quando atingiram valores < 0,05, o que denota maior segurança estatística do que um valor de puncorr < 0,001

Levando-se em consideração que as variáveis idade e educação podem influenciar o padrão metabólico cerebral, inclusive em fases progrômicas da DA, todas as análises foram refeitas após controle estatístico para educação e idade de cada paciente (Garibotto *et al*., 2008; Morbelli *et al*., 2013).

Extração de valores numéricos para análises de correlação

Com o intuito de correlacionar os dados de PET-^{18}FDG e VBM com as variáveis clínicas e laboratoriais, foram extraídos os valores numéricos de áreas pré-definidas e estatisticamente significantes. Esses valores foram registrados no programa SPSS.

Valores numéricos da média de contagens radioativas dos *voxels* com maior diferença estatística entre os grupos foram obtidos por meio da caixa de ferramentas MarsBar para SPM (http://marsbar.sourceforge.net/), na opção "*explore design/files and factors*". Tais valores são obtidos após todo o processamento das imagens. Os valores de volume dos hipocampos e giros parahipocampais bilaterais das imagens de RM foram obtidos por *script* específico do SPM8 na plataforma MATLAB R2009a.

Foram realizadas correlações de Pearson (quando os valores apresentaram distribuição normal) ou de Spearman (em casos de distribuição não normal) entre as variáveis de imagem acima descritas (metabolismo ou volume cerebral) e entre esses valores e os valores numéricos de peptídeo Aβ, proteínas tau e p-tau, e valores do MEEM e de testes cognitivos.

4 RESULTADOS

4.1 Comparação das Características Clínicas e de Biomarcadores Liquóricos Entre os Grupos

4.1.1 Dados gerais

Os principais dados demográficos do estudo foram resumidos na Tabela 1.

Tabela 1 - Dados gerais dos participantes incluídos no estudo

	GC N = 30	gCCLa N = 46	gCCLna N = 38	p
Idade (anos)*	69,5 (6,4)	71,3 (6,2)	69,6 (5,6)	0,310
Gênero (F/M)¶	24 / 6	35 / 11	28 / 10	0,477
Escolaridade (anos)*	12,9 (4,9)	10,8 (4,2)	11,8 (4,3)	0,133
GDS†	-	1,3 (1,3)	1,0 (1,44)	0,276
MEEM*	**29,0 (1,0)**	**27,8 (1,4)**	**27,9 (1,7)**	**0.000 GCxCCLa - 0,002 GCxCCLna-0,005**
HAS (S/N)¶	18 / 12	22 / 24	18 / 20	0,507
DM (S/N)¶	1 / 29	7 / 39	3 / 35	0,208
DLP (S/N)¶	12 / 18	**27 / 19**	10 / 28	**0,011** gCCLa > GC e gCCLna

Variáveis contínuas expressas em média (desvio padrão)
*ANOVA (Post hoc: teste t, corrigido pelo método de Bonferroni); ¶ Teste do Qui-quadrado; † Teste t; CCL: comprometimento cognitivo leve; CCLa: CCL amnéstico; CCLna: CCL não amnéstico; DM: *diabetes mellitus*; DLP: dislipidemia; F: feminino; GDS: *geriatric depression scale*; HAS: hipertensão; M: masculino; MEEM: mini exame do estado mental.

Foram incluídos no gCCLa um total de 46 voluntários, 11 do gênero masculino e 35 do feminino, com média de idade de 71,3 anos e desvio-padrão (DP) de ± 6,2 anos, variando entre 62 e 80 anos. O gCCLna compreendeu 38 voluntários, 10 do gênero masculino, 28 do feminino, média de idade de 69,6 e DP de ± 5,6 anos, variando entre 60 e 83 anos. Não houve diferença estatística nas variáveis idade e gênero entre os grupos CCLa e CCLna e em relação ao GC, que incluiu 30 voluntários, seis do gênero masculino e 24 do feminino, média da idade de 69,5 anos e desvio padrão de ± 6,4 anos, variando entre 58 e 87 anos. Em todos os grupos houve uma maior prevalência de pacientes do gênero feminino (teste qui quadrado; gCCLa - p = 0,018, gCCLna - p = 0,004, GC = 0,001).

Também não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos em relação aos anos de escolaridade, prevalência de diabetes mellitus (DM) e de hipertensão arterial (HAS). Os grupos CCLa e CCLna também não apresentaram diferenças em relação a sintomas depressivos pela escala GDR. Houve maior prevalência de dislipidemia (DLP) no gCCLa (p = 0,011).

Houve diferença significativa nos valores do mini-exame do estado mental (MEEM) entre os grupos (ANOVA, p = 0,001). Tanto gCCLa (p = 0,002) quanto gCCLna (p = 0,005) apresentaram valores menores em relação ao GC na comparação post-hoc (teste t, corrigido pelo método de Bonferroni).

4.1.2 Perfil neuropsicológico dos grupos CCL

Entre os sujeitos do gCCLa, 11 se apresentaram apenas com comprometimento exclusivo de memória (CCLa único domínio) e os demais (N = 35) com comprometimento de memória acrescido de déficit em outros domínios (CCLa múltiplos domínios).

Todos os pacientes do grupo CCLna apresentaram comprometimento de função executiva/atenção (N = 38). Destes, 23 foram considerados CCLna UD e 15 como CCLna MD. As outras funções cognitivas acometidas no subgrupo CCLna MD foram linguagem (N = 7), função visuoespacial (N = 6) e velocidade de processamento (N = 2).

As comparações diretas das pontuações dos diferentes testes neuropsicológicos entre os grupos gCCLa e gCCLna está demonstrada abaixo na Tabela 2. Observam-se menores escores nos testes de memória no gCCLa em comparação com o gCCLna (memórias de reconhecimento visual imediata e tardia; lembrança da figura complexa de Rey; teste de aprendizagem verbal auditiva de Rey total; evocação pós-interferência e evocação tardia do RAVLT).

Não houve diferença entre os dois grupos no que se refere aos outros domínios cognitivos não relacionados à memória, inclusive função executiva/atenção, demonstrando que a disfunção executiva no gCCLa é semelhante à observada no gCCLna. Isso se deu provavelmente pela disfunção executiva associada à memória nos pacientes com CCLa MD. Assim, os pacientes do gCCLa se apresentam com menores *scores* de memória em comparação com o gCCLna, porém os grupos se equivalem em todos os outros testes empregados, como pode ser visto abaixo.

Tabela 2 - Resultados dos diferentes testes neuropsicológicos nos grupos CCLa e CCLna

Testes	gCCLa N = 46	gCCLna N = 38	p*
TMA	48,5 (20,9)	50,6 (24,5)	0,676
TMB	151,2 (77,6)	154,7 (81,5)	0,845
STROOP1	16,9 (4,0)	16,8 (3,2)	0,886
STROOP2	22,1 (6,2)	22,2 (4,5)	0,966
STROOP3	33,9 (14,1)	37,1 (10,0)	0,477
RACMATRICIAL	11,8 (2,9)	11,7 (3,1)	0,923
FIGREY	29,6 (5,3)	31,5 (5,1)	0,106
MEMLOG_IM	19,6 (6,4)	20,8 (6,0)	0,395
MEMLOG_TARD	14,3 (6,8)	15,8 (6,8)	0,342
REPVISUAL_IM	27,9 (7,0)	31,5 (6,2)	**0,020**
REPVISUAL_TARD	8,5 (6,9)	17,9 (8,3)	**0,0000003**
FIGREY_TARD	8,7 (5,9)	13,3 (6,1)	**0,001**
RAVLT_TOTAL	35,9 (7,9)	42,7 (7,0)	**0,0001**
RAVLT_ET1	6,1 (2,4)	8,5 (2,5)	**0,0001**
RAVLT_ET2	5,6 (2,4)	8,7 (1,5)	**0,000000002**

Variáveis contínuas expressas em média (desvio padrão)
*Teste t; *TMA: trail making test parte A; TMB: trail making test parte B; Stroop1, 2 e 3: diferentes etapas do teste de cores de Stroop; RACMATRICIAL: raciocínio matricial; FIGREY: teste da figura complexa de Rey; MEMLOG_IM: memória lógica imediata; REPVISUAL_IM: memória de reconhecimento visual imediata; MEMLOG_TARD: memória lógica tardia; REPVISUAL_TARD: memória de reconhecimento visual tardio; FIGREY_TARD: lembrança da figura complexa de Rey; RAVLT_TOTAL: teste de aprendizagem verbal auditiva de Rey; RAVLT_ET1: evocação pós-interferência do RAVLT; RAVLT_ET2: evocação tardia do RAVLT*

4.1.3 Análise das hiperintensidades na substância branca por escala semiquantitativa

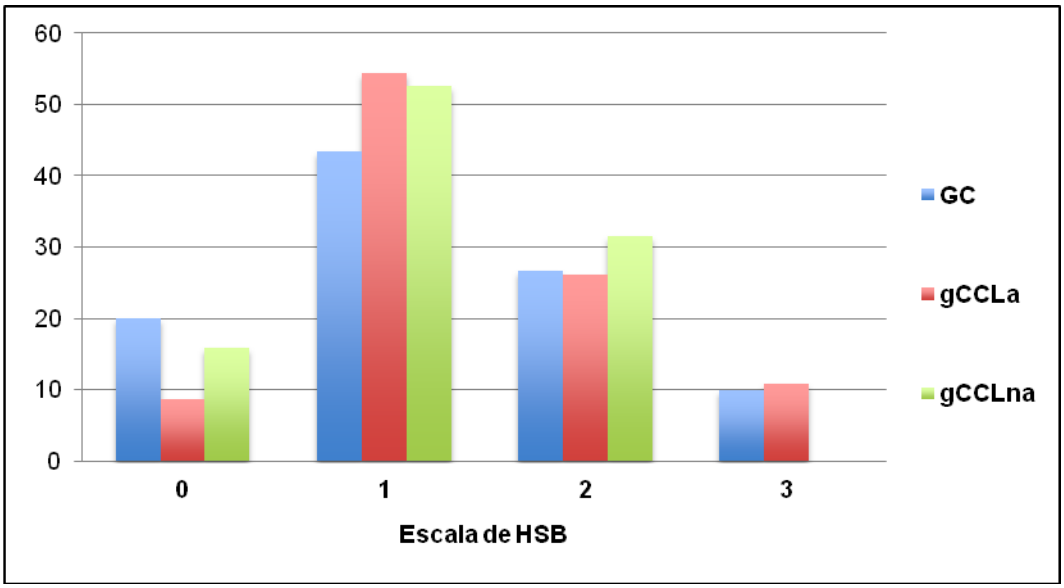
A presença de focos de hiperintensidade de sinal na substância branca nas sequências específicas de imagem por ressonância magnética pode estar associada a maior ou menor probabilidade de doença vascular (Reed *et al*., 2004; Murray *et al*., 2010). A quantidade de hiperintensidades na substância branca, após análise por escala visual semiquantitativa na RM (Fazekas *et al*., 1987) está demonstrada na Tabela 3 e nos Gráficos 1 e 2.

Tabela 3 - Distribuição dos pacientes dos três grupos em relação aos diferentes graus na escala semiquantitativa de HSB à RM (Fazekas *et al*., 1987)

	GC	gCCLa	gCCLna	p
	N = 30	N = 46	N = 38	
Grau na escala visual de HSB	0: 06 (20%)	0: 04 (09%)	0: 06 (16%)	0.155
	1: 13 (43%)	1: 25 (54%)	1: 20 (52%)	
	2: 08 (27%)	2: 12 (26%)	2: 12 (32%)	
	3: 03 (10%)	3: 05 (11%)	3: 0 (0%)	

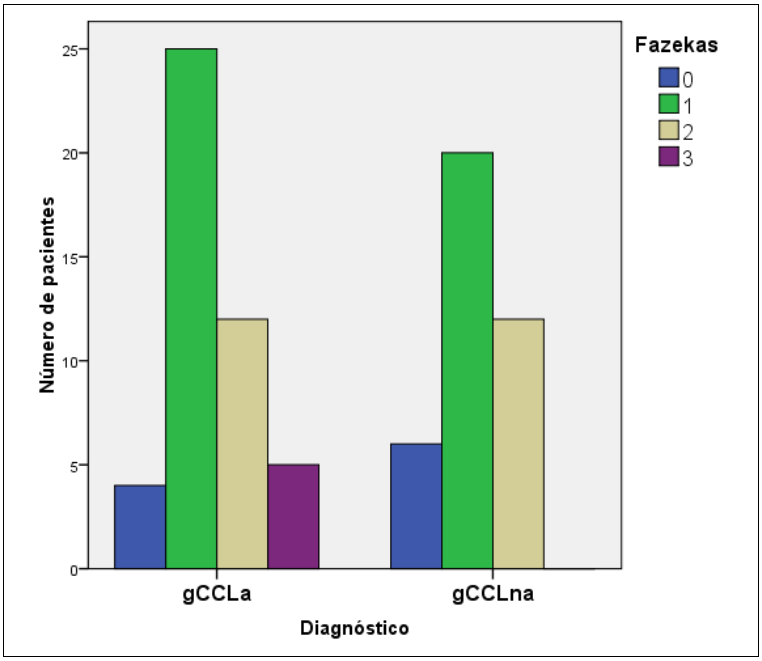
Teste do Qui-quadrado; CCL: comprometimento cognitivo leve; CCLa: CCL amnéstico; CCLna: CCL não amnéstico; HSB: hiperintensidades na substância branca

Gráfico 1 - Proporção dos diferentes graus da escala visual para graduação de HSB (Fazekas *et al*., 1987) nos diferentes grupos (em %)



Nota-se que não houve diferença estatisticamente significante entre os três grupos na análise de HSB. Houve maior número de voluntários com os graus 0 e 1 desta escala em todos os grupos (63% no GC e gCCLa e 69% no gCCLna), porém apenas o GC (N = 03) e o gCCLa (N = 05) apresentaram pacientes no grau 3 da escala, ainda que isso não tenha influenciado no resultado final da comparação estatística.

Gráfico 2 - Distribuição dos pacientes dos grupos gCCLa e gCCLna em relação aos diferentes graus da escala semi-quantitativa de HSB à RM (Fazekas *et al*., 1987) (em número de pacientes)



Na comparação direta entre gCCLa e gCCLna, observa-se distribuição semelhante dos pacientes nos diferentes graus da escala, ressaltando-se novamente que apenas o gCCLa apresentou pacientes na escala 3 (N = 05), além da maior prevalência de DLP demonstrada acima.

4.1.4 Perfil dos biomarcadores no LCR

A análise dos biomarcadores no LCR em um subgrupo de pacientes com CCL não demonstrou diferença entre os grupos gCCLa e gCCLna com relação à presença de tau, p-tau e Aβ no LCR (Tabela 4).

Tabela 4 - Resultados da análise dos biomarcadores no LCR, realizada em uma subamostra dos grupos gCCLa e gCCLna

	gCCLa	gCCLna	p	Ref #
	N = 38	N = 33		
LCR Aβ [a]	813 (363)	956 (433)	0,135	> 540
LCR tau [a]	231 (128)	236 (114)	0,869	< 450
LCR p-tau [a]	44 (150)	44 (145)	0,999	< 65

Variáveis contínuas expressas em média (desvio padrão); valores em ng/L
[a] teste de Mann-Whitney (sem distribuição normal); CCL: comprometimento cognitivo leve; gCCLa: grupo CCL amnéstico; gCCLna: grupo CCL não amnéstico; LCR Aβ: peptídeo β-amilóide; LCR p-tau: tau-fosforilada; # valores de referência fornecidos pelo fabricante, ainda não validados em população brasileira

A tabela demonstra que ambos os grupos de CCL apresentaram valores semelhantes dos marcadores liquóricos sugestivos de injúria neuronal (tau e p-tau) e também de marcador amiloide, embora o gCCL tenha apresentado menores valores de Aβ no LCR, o que poderia indicar maior deposição cortical desse peptídeo. A Tabela 4 demonstra, porém, altos valores no desvio padrão em ambos os grupos em todos os marcadores, demonstrando alta variabilidade desses biomarcadores em nosso estudo.

Para mais bem ilustrar esses dados, inclusive a alta variação dos valores, a dispersão dos biomarcadores liquóricos entre os grupos está demonstrada em estilo *box plot* nos Gráficos 3 (valores de Aβ e tau juntos), 4 (valores isolados de Aβ) e 5 (valores de p-tau isolados, pelos valores em geral menores desse biomarcador).

Gráfico 3 - Gráfico *box plot* demonstrando a dispersão de peptídeo Aβ e proteína tau no LCR de sujeitos dos grupos gCCLa e gCCLna em (unidade). • e *: sujeitos acima de 1,5 vezes a distância interquartis (*outliers*). Valores em mg/mL

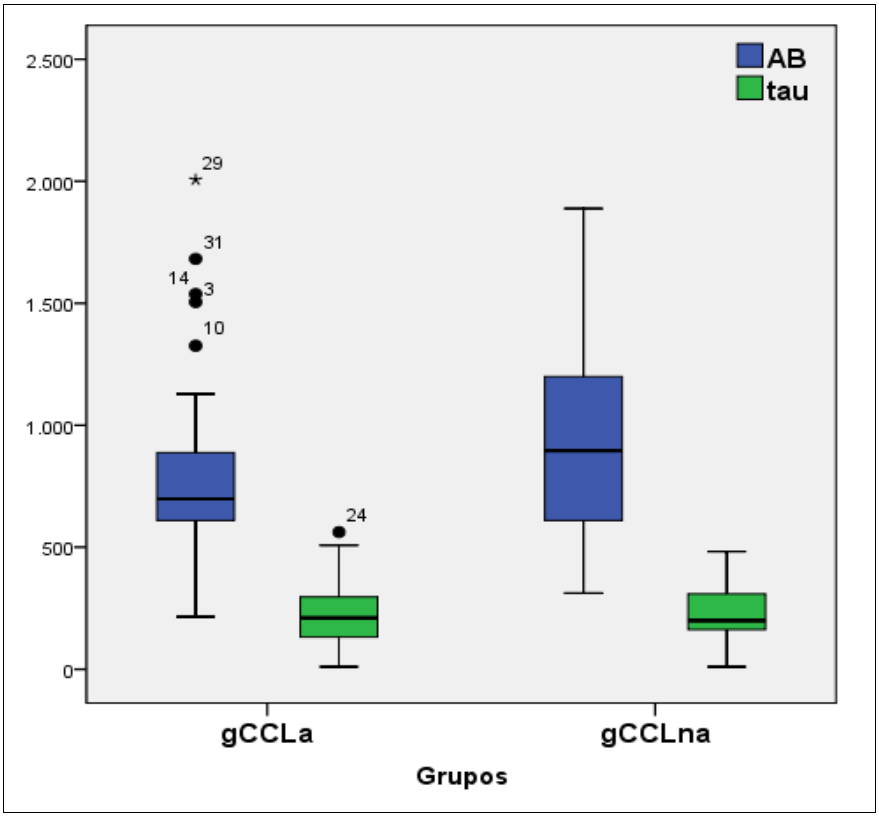
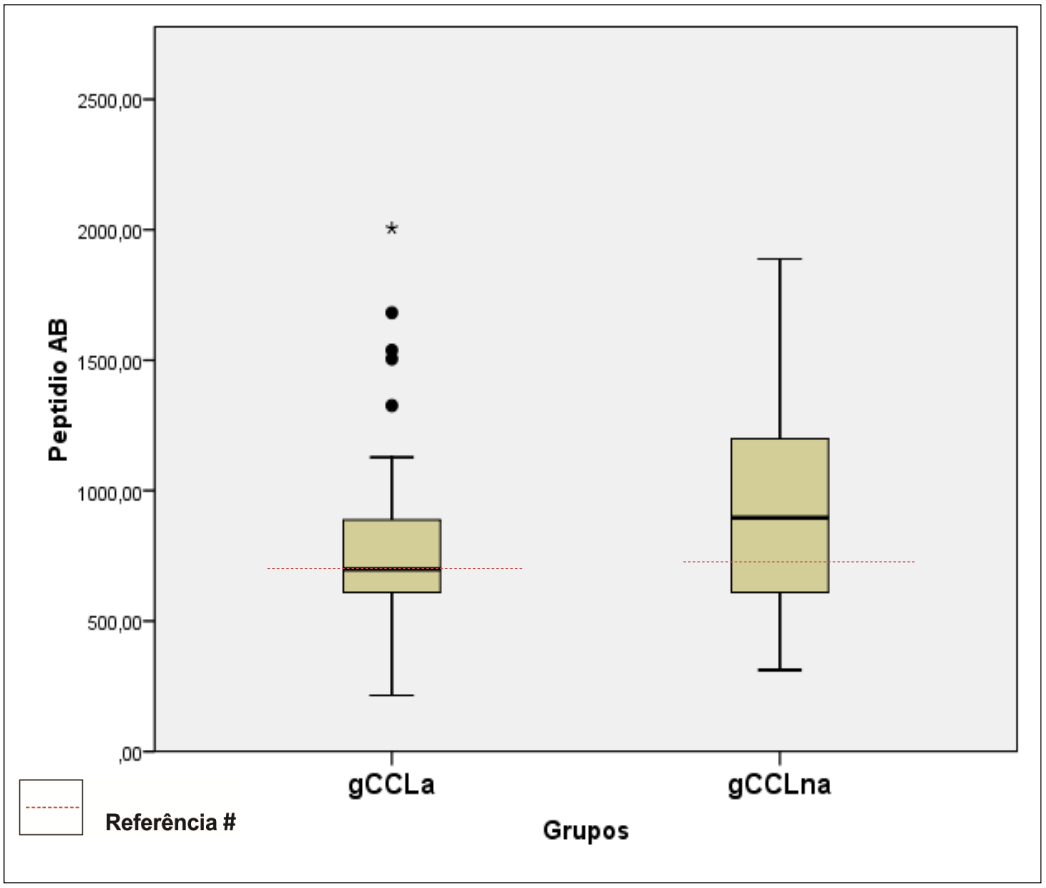
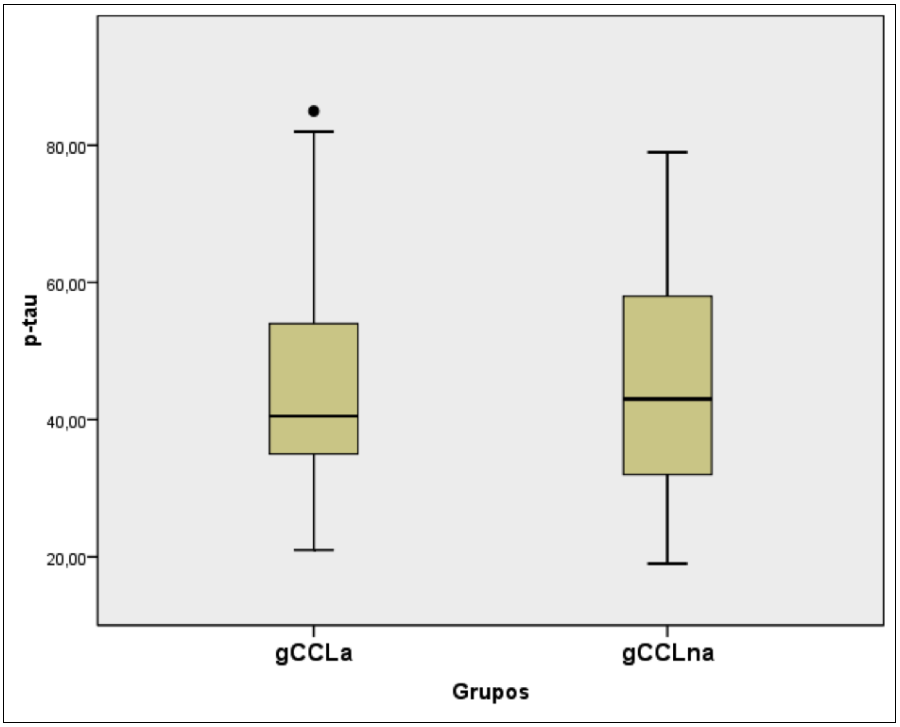


Gráfico 4 - Gráfico *box plot* demonstrando a dispersão apenas de peptídeo Aβ no LCR de sujeitos dos grupos gCCLa e gCCLna em (unidade). A linha vermelha pontilhada ilustra os valores normais fornecidos pelo fabricante. • e *: sujeitos com valores acima de 1,5 vezes a da distância interquartis (outliers). Valores em mg/mL



valores de referência fornecidos pelo fabricante, ainda não validados em população brasileira

Gráfico 5 - Gráfico *box plot* demonstrando a dispersão de proteína tau fosforilada no LCR de sujeitos dos grupos gCCLa e gCCLna em (unidade). • : sujeitos com valores acima de 1,5 vezes a distância interquartis (*outliers*). Valores em mg/mL



Os Gráficos 3, 4 e 5 ilustram a grande variação nos valores de todos os marcadores liquóricos entre os grupos. Nota-se particularmente nos Gráficos 3 e 4 que cinco pacientes do gCCLa apresentavam valores de peptídio Aβ 1,5 vezes acima da distância da caixa (equivalente à distância entre os percentis 25 e 75, ou distância interquartis). Esses sujeitos são estatisticamente identificados como *outliers*, ou seja, casos com valores atípicos em relação a um grupo, com possibilidade de alterar resultados de um teste estatístico. Uma nova comparação entre os valores de Aβ dos grupos gCCLa e gCCLna foi então realizada, excluindo-se os *outliers* do gCCLa (Tabela 5 e Gráficos 6 e 7).

Tabela 5 - Resultados da análise dos valores de Aβ no LCR, realizada

em uma subamostra dos grupos gCCLa e gCCLna, após exclusão de *outliers* do grupo CCLa

	gCCLa	gCCLna	p	Ref #
	N = 38	N = 33		
LCR Aβ [a]	692 (173)	956 (434)	**0,013**	> 540

Variáveis contínuas expressas em média (desvio padrão); valores em ng/l
[a] teste de Mann-Whitney (sem distribuição normal); CCL: comprometimento cognitivo leve; gCCLa: grupo CCL amnéstico; gCCLna: grupo CCL não amnéstico; LCR Aβ: peptídeo β-amilóide; LCR p-tau: tau-fosforilada; # valores de referência fornecidos pelo fabricante, ainda não validados em população brasileira

Após a exclusão dos *outliers* do gCCLa, os grupos passam a apresentar diferença estatisticamente significativa (p = 0,013) nos valores de peptidio Aβ, com menores valores no gCCLa, indicando indiretamente maior deposição cortical de proteína β-amiloide no subgrupo amnéstico. A variação nos valores no gCCLa também reduz de forma importante após a exclusão desses sujeitos, como observado nos Gráficos 6 e 7.

Gráfico 6 - Gráfico *box plot* demonstrando a dispersão de peptídeo Aβ e tau no LCR de sujeitos dos grupos gCCLa e gCCLna em (unidade), após exclusão dos *outliers* vistos nos gráficos 3 e 4. • : sujeitos acima de 1,5 vezes a distância interquartis (*outliers*). Valores em mg/mL

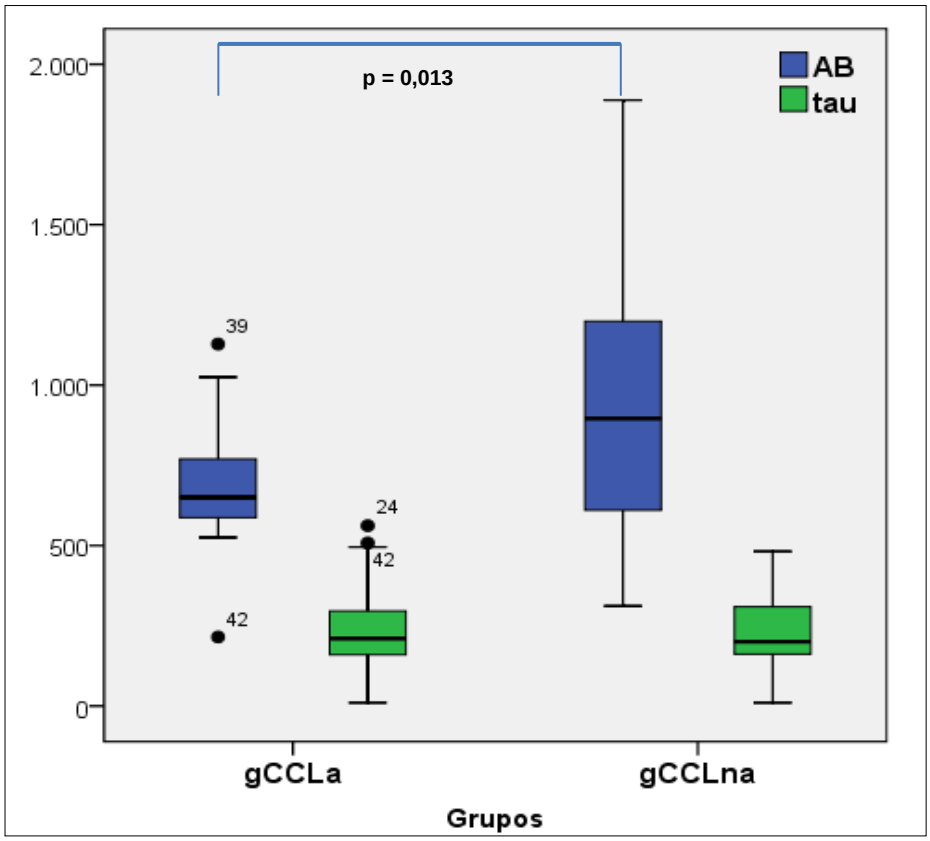
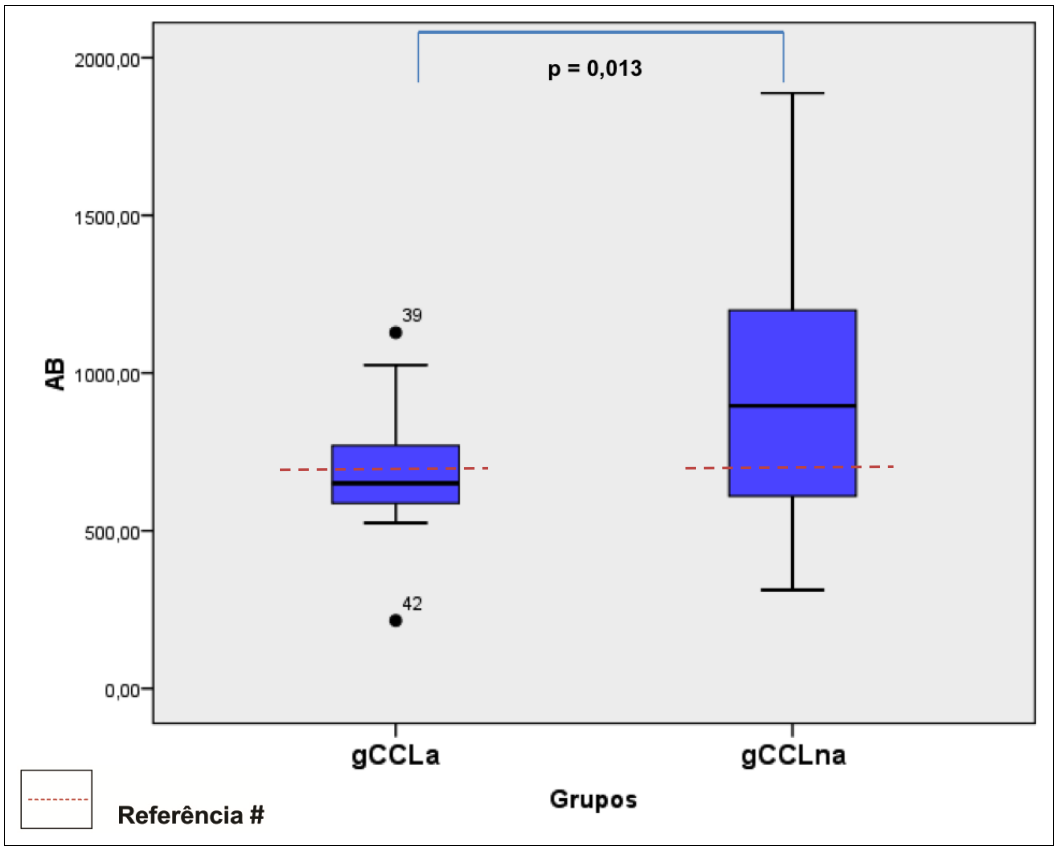


Gráfico 7 - Gráfico *box plot* demonstrando a dispersão apenas de peptídeo Aβ no LCR de sujeitos dos grupos gCCLa e gCCLna, após exclusão dos *outliers* vistos nos gráficos 3 e 4. A linha vermelha pontilhada ilustra os valores normais fornecidos pelo fabricante. • : sujeitos acima de 1,5 vezes a distância interquartis (*outliers*). Valores em mg/mL; # Valores de referência fornecido pelo fabricante



valores de referência fornecidos pelo fabricante, ainda não validados em população brasileira

Assim, a análise dos biomarcadores no LCR demonstra que o gCCLa apresenta tendência de maior deposição cortical de peptidio Aβ, que se torna estatisticamente significativa após exclusão de *outliers*. Deve-se ter em mente, contudo, o possível viés de seleção pós-teste introduzido após esta análise com a exclusão desses sujeitos.

Por outro lado, os grupos apresentam níveis semelhantes níveis dos biomarcadores de lesão neuronal (tau e p-tau), além de uma grande variação nos resultados de todos os biomarcadores, demonstrando heterogeneidade nos sujeitos com CCL incluídos em ambos os grupos.

4.2 Análise dos Métodos de Imagem

4.2.1 Análise das diferenças volumétricas por RM (VBM)

As diferenças volumétricas medidas por RM pelo método VBM entre os grupos estão apresentadas na Tabela 6.

A análise por VBM evidencia redução volumétrica bilateral nos lobos temporais vista no gCCLa, em regiões mediais (uncus do giro parahipocampal direito e esquerdo) e polares anteriores, porém também no pré-cúneo e giro temporal médio direitos, embora em menor extensão.

Em relação ao grupo controle observa-se uma redução bilateral centrada no uncus e região polar temporal (extremidade anterior do giro temporal superior) e nessas mesmas áreas no lobo contralateral. Houve também redução nessas mesmas áreas no gCCLa em relação ao gCCLna. A redução volumétrica nessas áreas atingiu nível de significância estatística após correção para múltiplas comparações pelos métodos FDR e FWE, mesmo na análise global, o que demonstra uma alteração de volume estatisticamente robusta.

O gCCLa apresentou ainda áreas menores e menos significantes de redução de volume em relação ao GC no pré-cúneo e no giro temporal médio (BA 21) à direita. Em comparação com o gCCLna foi também evidenciada redução volumétrica no giro frontal inferior à direita.

O gCCLna apresentou alterações volumétricas consideravelmente menores do que o grupo amnéstico em relação ao GC, restringindo-se a uma área na porção posterior do giro temporal inferior esquerdo (BA 20). Em relação ao gCCLa apresentou área de redução volumétrica no giro frontal médio esquerdo (BA 8). Essa pequena redução de volume no córtex frontal é concordante com as áreas de redução de metabolismo antes da correção para PVE vista em algumas análises demonstradas acima.

Tabela 6 - Regiões de redução de volume da substância cinzenta medido pelo método VBM utilizando RM entre os grupos #

Comparações	N° de voxels na área	pFWE	pFDR	p(unc)	Z score	Ponto de maior significância (Talairach)		
gCCLa x GC (redução)								
Área centrada no polo temporal direito, incluindo as três áreas abaixo:	2225							
Polo temporal direito, BA 38		0,00003	0,00006	< 0,00001	6,12	19	16	-34
Uncus do giro parahipocampal direito, BA 20		0,00005	0,00006	< 0,00001	6,01	24	-11	-41
Polo temporal direto, BA 38		0,0003	0,0002	< 0,00001	5,66	27	15	-42
Área centrada no uncus do giro parahipocampal esquerdo, incluindo as três áreas abaixo:	1005							
Uncus do giro parhipocampal esquerdo, BA 36		0,003	0,001	< 0,00001	5,22	-16	-12	-32
Polo temporal esquerdo, BA 38		-	0,025	< 0,00001	4,55	-21	12	-30
Polo temporal esquerdo, BA 38		-	-	0,0002	3,48	-28	6	-43
Pré-cúneo direito, BA 7	80	-	-	0,0002	3,48	27	-50	48
Giro temporal médio direito, BA21	48	-	-	0,0003	3,42	45	-17	-12
gCCLa x CCLna (redução)								
Área centrada no polo temporal direito, incluindo as três áreas abaixo:	2630							
Polo temporal direto, BA 38		0,00006	0,00004	< 0,00001	7,13	18	9	-30
Uncus do giro parahipocampal direito, BA 36		< 0,00001	< 0,00001	< 0,00001	6,35	17	-7	-36
Uncus do giro parahipocampal direto, BA 36		-	-	< 0,00001	5,98	15	1	-34
Área centrada no polo temporal esquerdo, incluindo as três áreas abaixo:	1028							
Polo temporal esquerdo, BA 38		0,0001	0,00001	< 0,00001	5,9	-19	11	-25
Uncus do giro parahipocampal esquerdo, BA 36		0,014	0,004	< 0,00001	4,91	-16	-12	-30
Uncus do giro parahipocampal esquerdo, BA 38		0,03	0,009	< 0,00001	4,7	-27	-9	-42
Giro frontal inferior direito, BA45	65	-	-	0,0001	3,6	50	22	10
gCCLna x GC (redução)								
Giro temporal inferior esquerdo, porção posterior, BA 20	143	-	-	0,00003	4	-60	-42	-16
CCLna x CCLa (redução)								
Giro frontal médio esquerdo, BA8	28	-	-	0,0001	3,62	-32	22	37

Resultados demonstrados para o *voxel* mais significativo de cada região com diferença estatística (*peak voxel level*). Análise global ANOVA, seguida de teste t não pareado post-hoc; *p(unc) = p* não corrigido para múltiplas comparações; pFWE = p corrigido para múltiplas comparações pelo método *familywise error*; pFDR = p corrigido para múltiplas comparações pelo método *false discovery rate*

BA - área de Brodmann; CCL - comprometimento cognitivo leve; CCLa - CCL amnéstico; CCLna - CCL não amnéstico; GC - grupo controle

Os resultados acima descritos da análise VBM estão ilustrados nas figuras a seguir. Observa-se, sobretudo, a consistente redução de volume medial e polar temporal bilateral no gCCLa em relação ao GC e ao gCCLna. As áreas de redução de volume no gCCLna são menos extensas e menos significativas à análise estatística.

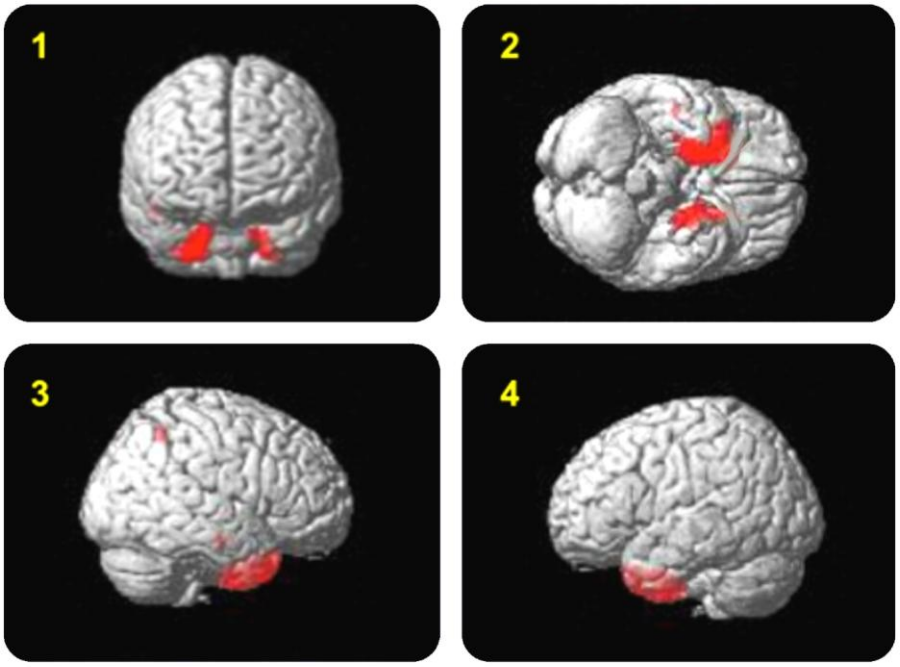


Figura 6 - Imagens ilustrativas das áreas de redução de volume da substância cinzenta visto pela VBM por RM no grupo CCL amnéstico em relação ao GC. Nota-se importante redução volumétrica nas porções mediais (centrada no uncus dos giros parahipocampais) e polares dos lobos temporais (1 a 4), porém também em menor extensão no pré-cúneo e giro temporal médio direitos (3). As áreas de redução volumétrica são demonstradas sobre um molde padrão de RM fornecido pelo SPM8; ponto de corte de visualização: p< 0,001, mínimo de 10 *voxels*

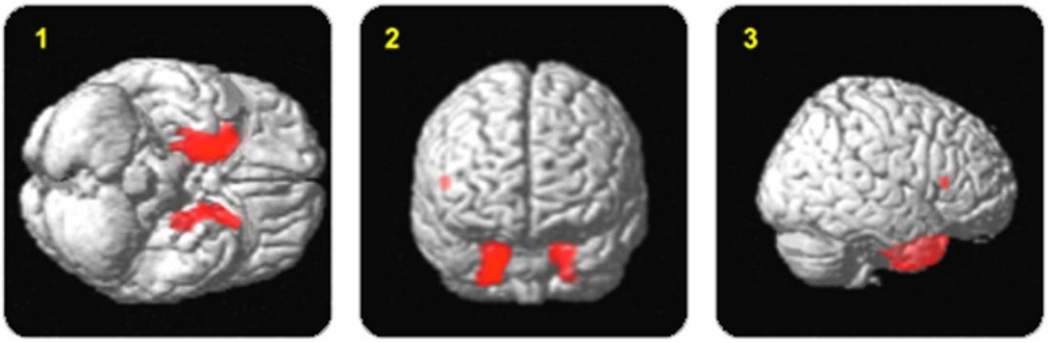


Figura 7 - **Imagens ilustrativas das áreas de redução de volume da substância cinzenta visto pela VBM por RM no grupo CCL amnéstico em relação ao gCCLna. Nota-se importante redução volumétrica nas porções mediais (centrada no uncus dos giros parahipocampais) e polares dos lobos temporais e em pequena área no giro frontal inferior direito. As áreas de redução volumétrica são demonstradas sobre um molde padrão de RM fornecido pelo aplicativo SPM8; ponto de corte de visualização: p< 0,001, mínimo de 10 *voxels***

Figura 8 - **Imagens ilustrativas das áreas de redução de volume da substância cinzenta visto pela VBM por RM no grupo CCL não amnéstico em relação ao GC (A1 e A2) e em relação ao gCCLa (B). Nota-se pequena área de redução volumétrica no giro temporal inferior esquerdo em relação ao GC (A1 e A2) e no giro frontal médio esquerdo em relação ao gCCLa (B). As áreas de redução volumétrica são demonstradas sobre um molde padrão de RM fornecido pelo SPM8; ponto de corte de visualização: p< 0,001, mínimo de 10 *voxels***

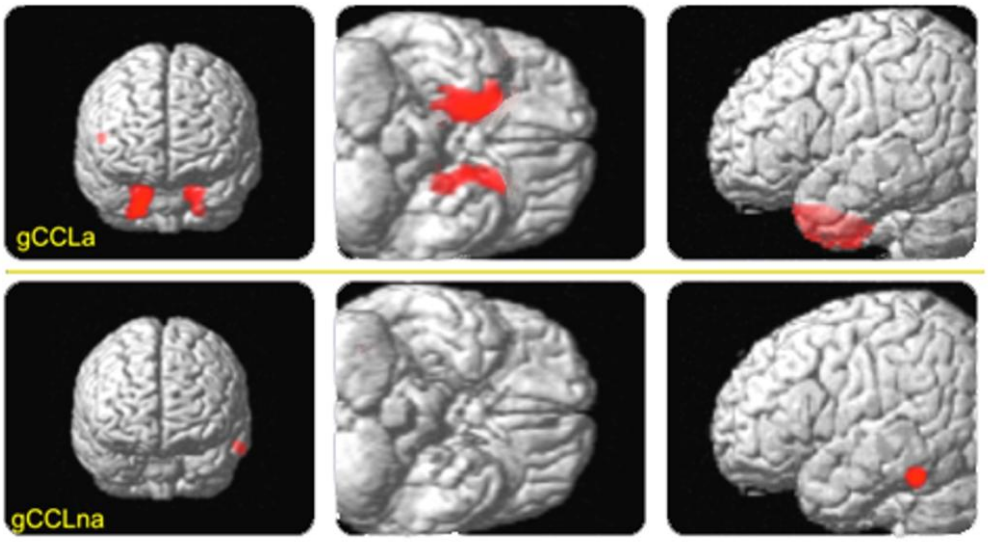


Figura 9 - Imagens ilustrando as áreas gerais com redução de volume em relação ao GC nos dois grupos. No gCCLa (linha superior) predominam reduções temporais mediais e polares, principalmente em regiões hipocampais; as áreas de redução volumétrica no gCCLna são menos extensas e menos evidentes e restritas ao giro temporal inferior e frontal médio esquerdos. As áreas de redução volumétrica são demonstradas sobre um molde padrão de RM do SPM8; ponto de corte de visualização: p< 0,001, mínimo de 10 *voxels*

4.2.2 Análise das diferenças no metabolismo regional de glicose com PET-^{18}FDG

Os resultados das diferenças de metabolismo regional de glicose entre os grupos serão apresentados com e sem a aplicação de correção para efeitos de volume parcial, e controlados para eventuais diferenças de idade e escolaridade.

Os resultados sem correção para PVE das diferenças do MRG entre os grupos estão demonstrados na Tabela 7. A quantificação demonstra que ambos os grupos CCLa e CCLna apresentaram redução do metabolismo em comparação com o GC no pré-cúneo direito, na área de Brodmann (BA) 7. O grupo amnéstico apresenta ainda redução em algumas áreas do córtex occipital bilateral e giro frontal médio direito em comparação com o GC.

O grupo amnéstico apresentou áreas adicionais de redução metabólica em relação ao grupo não amnéstico no giro parahipocampal esquerdo (BA 19) e direito (BA 36).

Chama atenção no gCCLna as áreas de redução metabólica em comparação com o GC no córtex pré-frontal direito (giros frontal superior, médio e inferior – BA 9 e 10), além de redução metabólica adicional no giro temporal inferior esquerdo (BA 20, parte do córtex de associação). Houve ainda redução adicional do MRG no CCLna em relação ao amnéstico no giro frontal médio deste mesmo lado.

Tabela 7 - Regiões de redução do MRG em repouso medido por PET-^{18}FDG entre os grupos.#

Comparações	N° de *voxels* na área	Z score	p	Ponto de maior significância (Talairach)		
gCCLa x GC (redução)						
Cúneo direito, BA 18	29	3,62	0,0002	1	-93	22
Giro frontal médio direito, BA 10	41	3,38	0,0004	1	46	-7
Pré-cúneo direito, BA 7	11	3,31	0,0005	0	-63	57
Giro lingual esquerdo, BA 17	13	3,23	0,0006	-5	-93	-2
gCCLa x gCCLna (redução)						
Giro Parahipocampal esquerdo, BA 19	97	3,64	0,0001	-39	-42	0
Giro Parahipocampal Direito, BA 36	49	3,48	0,0002	38	-32	-22
gCCLna x GC (redução)						
Área centrada no pré-cúneo direito, incluindo as três áreas abaixo:	170					
Pré-cúneo direito, BA 7		3,63	0,0001	0	-64	55
Pré-cúneo direito, BA 7		3,23	0,0006	-1	-50	65
Pré-cúneo direito, BA 7		3,13	0,0008	12	-62	55
Giro frontal superior direito, BA 9	39	3,58	0,0002	31	35	32
Giro frontal médio direito, BA 10	29	3,32	0,0004	35	45	19
Giro frontal médio direito, BA 10	29	3,16	0,0008	27	51	20
Giro frontal inferior direito, BA 9	13	3,49	0,0002	45	10	32
Giro temporal inferior esquerdo, BA 20	11	3,29	0,0005	-56	-37	-11
gCCLna x gCCLa (redução)						
Giro frontal médio direito, BA 6	21	3,4	0,0003	30	11	48

Resultados demonstrados para o *voxel* mais significativo de cada região com diferença estatística (*peak voxel level*). Análise global ANOVA, seguida de teste t não pareado *post-hoc;* valor de *p* não corrigido para múltiplas comparações.

BA - área de Broadmann; CCL - comprometimento cognitivo leve; CCLa - CCL amnéstico; CCLna - CCL não amnéstico; GC - grupo controle.

Esses achados refletem uma predominância de redução no MRG em regiões “posteriores” (parietais e occipitais) no gCCLa, além de regiões parahipocampais bilaterais em comparação com o gCCLna. Por outro lado, o gCCLna apresenta reduções metabólicas mais difusas, com presença de áreas frontais de hipometabolismo, em adição a áreas parietais semelhantes às do grupo amnéstico. Nesta análise sem correção para PVE, as áreas de hipometabolismo no pré-cúneo direito são ainda mais extensas no grupo não amnéstico do que no gCCLa.

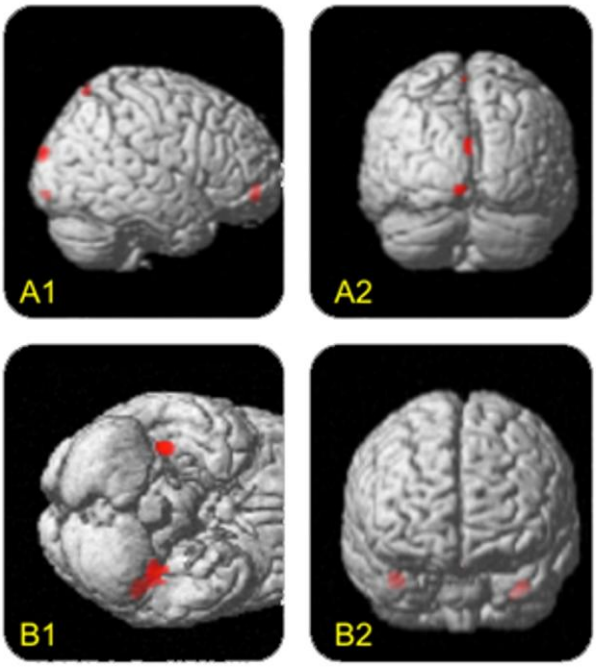


Figura 10 - Imagens ilustrando a localização dos *voxels* com redução estatisticamente significativa do MRG (pontos vermelhos) visto pela PET-^{18}FDG no grupo CCL amnéstico em relação ao GC (A1 e A2) e em relação ao gCCLna (B1 e B2). A1, A2: redução metabólica do gCCla em relação ao GC no pré-cúneo, cúneo, giro lingual esquerdo e giro frontal médio direito; B1 e B2: áreas de redução metabólica em comparação com o gCCLna demonstrando redução do metabolismo nos giros parahipocampais. As áreas de redução do MRG são demonstradas sobre um molde padrão de RM do SPM8; ponto de corte de visualização: p< 0,001, mínimo de 10 *voxels*

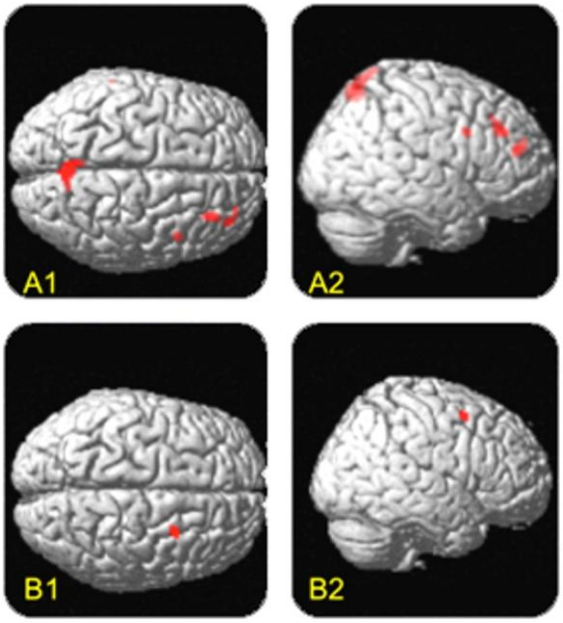


Figura 11 - Imagens ilustrando a localização dos *voxels* com redução estatisticamente significativa do MRG (pontos vermelhos) visto pela PET-^{18}FDG no grupo CCL não amnéstico em relação ao GC (A1 e A2) e em relação ao gCCLa (B1 e B2). A1 e A2: redução metabólica no pré-cúneo e córtex pré-frontal direitos; B1 e B2: redução em relação ao grupo gCCLa no giro frontal médio direito. As áreas de redução do MRG são demonstradas sobre um molde padrão de RM do SPM8; ponto de corte de visualização: p< 0,001, mínimo de 10 *voxels*

Análise adicional em ambos os grupos (CCLa e CCLna) direcionada para as áreas com hipótese *a priori* de redução do MRG foi realizada pelo método *small volume correction*, como detalhado na sessão de métodos (áreas tradicionalmente envolvidas na conversão para DA em sujeitos com CCL). Os resultados estão descritos na Tabela 8 ($p < 0,05$ corrigido para múltiplas comparações pelo método *familywise error* (p_{FWE}).

A análise SVC evidencia hipometabolismo nessas áreas tanto no gCCLa (giro do cíngulo posterior e pré-cúneo, ambas à esquerda), quanto no gCCLna (pré-cúneo direito), que persistem após aplicação de correção para múltiplas comparações. Esses achados demonstram que ambos os grupos apresentam redução de metabolismo no córtex parietal em comparação com o GC, antes da correção para PVE.

Tabela 8 - Redução do MRG em repouso medido por PET-^{18}FDG após análise direcionada das regiões de hipótese *a priori* (córtex parietal posterior e temporoparietal de associação) nos grupos CCLa e CCLna em relação ao GC.#

Comparações	N° de voxels na área	Z score	p_{FWE}	p	Ponto de maior significância (Talairach)		
gCCLa x GC (redução)							
Área centrada no pré-cúneo esquerdo, incluindo as duas áreas abaixo:	*53*						
Pré-cúneo esquerdo, BA 31		3,07	0,032	0,001	-1	-51	31
Giro do cíngulo posterior, BA 31		2,93	0,047	0,002	0	-42	41
gCCLna x GC (redução)							
Pré-cúneo direito, BA 7	52	3,57	0,034	0,0002	-2	- 64	-55

Resultados demonstrados para o voxel mais significativo de cada região com diferença estatística (*peak voxel level*). Análise ANOVA seguida de teste t não pareado post-hoc, direcionada para a região de hipótese a priori - small volume correction. Valores de *p* corrigido para múltiplas comparações pelo método familywise error ($p_{FWE} < 0,05$) . p: valores de p sem correção para múltiplas comparações

BA - área de Broadmann; CCL - comprometimento cognitivo leve; CCLa - CCL amnéstico; CCLna - CCL não amnéstico; GC - grupo controle.

Após esta análise inicial, os resultados das diferenças do MRG foram submetidas a correção para PVE e controle para idade e escolaridade. Os resultados estão demonstrados na Tabela 9.

Nota-se que após a aplicação dessas correções, persistem áreas de redução metabólica em relação ao GC somente no gCCLa (pré-cuneo e cíngulo posterior à direita – BA 7 e 31, além do giro temporal médio esquerdo – BA 21). Não são mais vistas áreas de redução metabólica na análise global no gCCLna em comparação com o GC após as correções.

As áreas de redução metabólica no gCCLa em relação ao não amnéstico nos giros parahipocampais direito e esquerdo também não persistem após correção para PVE, inferindo-se que essas áreas de redução

metabólica estejam relacionadas à redução de volume, como será detalhado abaixo na análise por VBM.

Após a correção para PVE, as únicas reduções de MRG que persistem no gCCLna são em comparação com o gCCLa (giros frontais médios direito e esquerdo, BA 8 à direita e 6 bilateral).

Tabela 9 - Regiões de redução do metabolismo glicolítico em repouso medido por PET-^{18}FDG entre os grupos, após correção para PVE e controle para idade e escolaridade #

Comparações	N° de *voxels* na área	Z score	p	Ponto de maior significância (Talairach)		
gCCLa x GC (redução)						
Giro temporal médio esquerdo, BA 21	16	4,01	0,00003	-61	-50	10
Giro do cíngulo posterior direito, BA 31	20	3,63	0,0001	4	-33	41
Pré-cúneo direito, BA 7	11	3,62	0,0001	2	-66	37
gCCLa x gCCLna (redução)						
Sem áreas com diferença estatisticamente significativas						
gCCLna x GC (redução)						
Sem áreas com diferença estatisticamente significativas						
gCCLna x gCCLa (redução)						
Giro frontal médio direito, BA 8	35	4,18	0,00001	24	36	42
Giro frontal médio esquerdo, BA 6	17	3,65	0,0001	24	36	42
Giro frontal medial direito, BA 6	15	3,63	0,0001	16	0	61

Resultados demonstrados para o *voxel* mais significativo de cada região com diferença estatística (*peak voxel level*). Análise global ANOVA, seguida de teste t não pareado *post-hoc;* valor de *p* não corrigido para múltiplas comparações.
BA - área de Broadmann; CCL - comprometimento cognitivo leve; CCLa - CCL amnéstico; CCLna - CCL não amnéstico; GC - grupo controle.

Nova análise adicional direcionada para as áreas de hipótese *a priori* pelo método SVC foi realizada entre os grupos, também após correção para PVE e controle para idade e escolaridade. Os resultados estão descritos na Tabela 10.

À análise SVC direcionada após as correções, persistem áreas de redução metabólica no giro do cíngulo posterior direito e temporal médio à esquerda no gCCLa. Diferentemente do hipometabolismo no pré-cúneo observado antes das correções, após a correção para PVE nenhuma redução no MRG foi vista no gCCLna. Tais achados demonstram que as áreas de hipometabolismo no córtex parietal e giro do cíngulo posterior foram mais consistentes no gCCLa do que no gCCLna.

Tabela 10 - Redução do metabolismo glicolítico em repouso medido por PET-^{18}FDG após análise direcionada das regiões de hipótese *a priori* (córtex parietal posterior e temporoparietal de associação) nos grupos CCLa e CCLna em relação ao GC, após correção para PVE e controle para idade e escolaridade.#

Comparações	N° de voxels na área	Z score	p_{FWE}	p	Ponto de maior significância (Talairach)		
gCCLa x GC (redução)							
Giro temporal médio esquerdo, BA 21	16	4,01	0,027	0,00003	-61	-50	10
Giro do cíngulo posterior direito, BA 31	20	3,63	0,046	0,0001	4	-33	41
gCCLna x GC (redução)							
Sem áreas com pFWE < 0,05							

Resultados demonstrados para o voxel mais significativo de cada região com diferença estatística (peak voxel level). Análise ANOVA seguida de teste t não pareado post-hoc, direcionada para regiões de hipótese a priori - small volume correction, valores de *p* corrigidos para múltiplas comparações pelo método familywise error (pFWE < 0,05) ; p: valores de p sem correção para múltiplas comparações
BA - área de Broadmann; CCL - comprometimento cognitivo leve; CCLa - CCL amnéstico; CCLna - CCL não amnéstico; GC - grupo controle.

A Figura 12 demonstra de forma ilustrativa os achados metabólicos gerais nos dois grupos com CCL: predominância de hipometabolismo "posterior" (parietal) no gCCLa, ao passo que o gCCLna as áreas de hipometabolismo são mais difusas, sobretudo frontais associadas a reduções menos consistentes paretais posteriores, que não persistem após correção para PVE. Os achados são demonstrados com ponto de corte de visualização menos rígido para efeitos ilustrativos (p < 0,01).

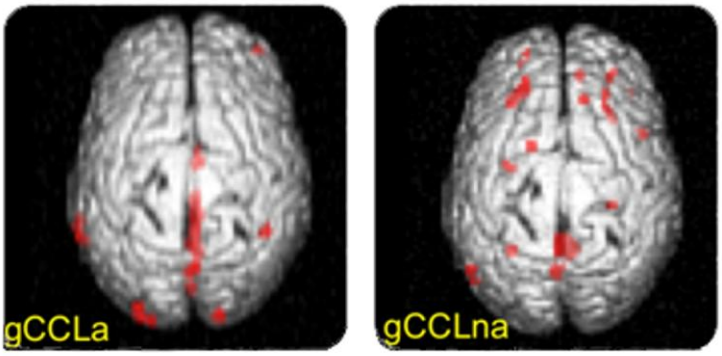


Figura 12 - Imagens ilustrando as áreas gerais com redução do metabolismo em relação ao GC nos dois grupos. No gCCLa (à esquerda) predominam alterações parietais (pré-cúneo e giro do cíngulo posterior), porém também no córtex temporal posterior esquerdo; no gCCLna as alterações frontais são mais evidentes, mas alguma redução metabólica nos pré-cúneos e giro do cíngulo posterior também são vistas, embora menos consistentes do que no gCCLa. A maior parte das áreas demonstradas no gCCLna não apresentou diferenças estatisticamente significantes pelos critérios do estudo (p <0,001) após correção para PVE. As áreas de redução do MRG são demonstradas sobre um molde padrão de RM do SPM8; ponto de corte de visualização: p< 0,01, mínimo de 10 *voxels*

4.2.3 Análise das diferenças no MRG com PET-18FDG nos diferentes subtipos de CCL quando distribuídos por domínios cognitivos

Para explorar mais a fundo possíveis alterações funcionais nos subgrupos de CCL incluídos, análise complementar do MRG cerebral dos grupos CCLa e CCLna foi realizada levando-se em consideração a sua subdivisão em único domínio cognitivo comprometido - UD (memória no gCCLa UD e atenção/função executiva no gCCLna UD) ou múltiplos domínios acometidos. Os resultados estão demonstrados na Tabela 11, foram corrigidos para PVE e controlados para idade e escolaridade dos pacientes.

As regiões de hipometabolismo variam bastante em comparação com as análises feitas antes dessa subdivisão, principalmente no gCCLna. Deve-se levar em consideração principalmente a redução no número de sujeitos em cada subgrupo nessa subanálise no momento de interpretar esses dados.

Destacam-se alterações no giro do cíngulo posterior direito e giro frontal superior esquerdo no gCCLa UD, além de reduções no MRG no lobo temporal esquerdo no gCCLa MD (giros temporal superior e médio). Deve-se destacar que as alterações no lobo temporal e no cíngulo posterior já eram observadas no gCCLa como um todo (não surgiram áreas hipometabolismo novas nessa subanálise). Nestes subgrupos com disfunção amnéstica continuam predominando alterações parietais e no córtex temporal de associação.

Nos subgrupos gCCLna UD (apenas disfunção executiva / atencional) destacam-se as reduções no MRG nos giros frontal superior e médio

esquerdos. No subgrupo CCLna MD são vistas reduções em áreas diferentes, a notar: ínsula esquerda, cúneo direito e giro temporal médio esquerdo. Destaca-se que o grupo com disfunção executiva/funcional exclusiva voltou a apresentar redução do metabolismo em áreas do córtex frontal, em padrão semelhante ao visto antes da correção para PVE, padrão que se altera quando os sujeitos passam a ter comprometimento cognitivo em outras funções.

As diferenças nos padrões no gCCLna UD e MD entre si, além do surgimento de áreas de hipometabolismo não observadas no grupo incluindo todos os sujeitos, demonstram possivelmente maior heterogeneidade dos sujeitos incluídos nesse grupo em comparação com o gCCLa.

Tabela 11 - Regiões de redução do MRG em repouso medido por PET-^{18}FDG levando-se em consideração a subdivisão em único ou múltiplos domínios cognitivos comprometidos, após correção para PVE e controle para idade e escolaridade.#

Comparações	N° de *voxels* na área	Z score	p	Ponto de maior significância (Talairach)		
gCCLa UD (N = 11) x GC (redução)						
Giro frontal superior esquerdo, BA 8	12	3.98	0,00003	-5	27	50
Giro do cíngulo posterior direito, BA 24	10	3.38	0,0003	4	-8	41
gCCLa MD (N = 35) x GC (redução)						
Área centrada no giro temporal superior esquerdo, incluindo as duas áreas abaixo:	33					
Giro temporal superior esquerdo, BA 21/22		4.18	0,00001	-59	-50	10
Giro temporal médio esquerdo, BA 21/22		3.31	0,0004	-58	-42	4
gCCLna MD (N = 15)x GC (redução)						
Cúneo direito (córtex visual primário), BA 17	10	3.72	0,0001	10	-93	6
Ínsula esquerda, BA 13	18	3.63	0,0001	-37	16	3
Giro temporal médio esquerdo, BA 39	15	3.48	0,0002	-51	-62	22
gCCLna UD (N = 23) x GC (redução)						
Área centrada no giro frontal médio esquerdo, incluindo as duas áreas abaixo:	39					
Giro frontal médio esquerdo, BA 9		3,66	0,00006	-27	18	48
Giro frontal superior esquerdo, BA 9		3,63	0,00009	16	0	61

Resultados demonstrados para o *voxel* mais significativo de cada região com diferença estatística (*peak voxel level*). Análise global ANOVA, seguida de teste t não pareado *post-hoc;* valor de *p* não corrigido para múltiplas comparações.
BA - área de Broadmann; CCL - comprometimento cognitivo leve; gCCLa - grupo CCL amnéstico; gCCLna - grupo CCL não amnéstico; GC - grupo controle; MD - múltiplos domínios; UD - único domínio.

O resumo dos resultados da análise do MRG medido pela PET-^{18}FDG estão ilustrados abaixo nas Figuras 13, 14 e 15.

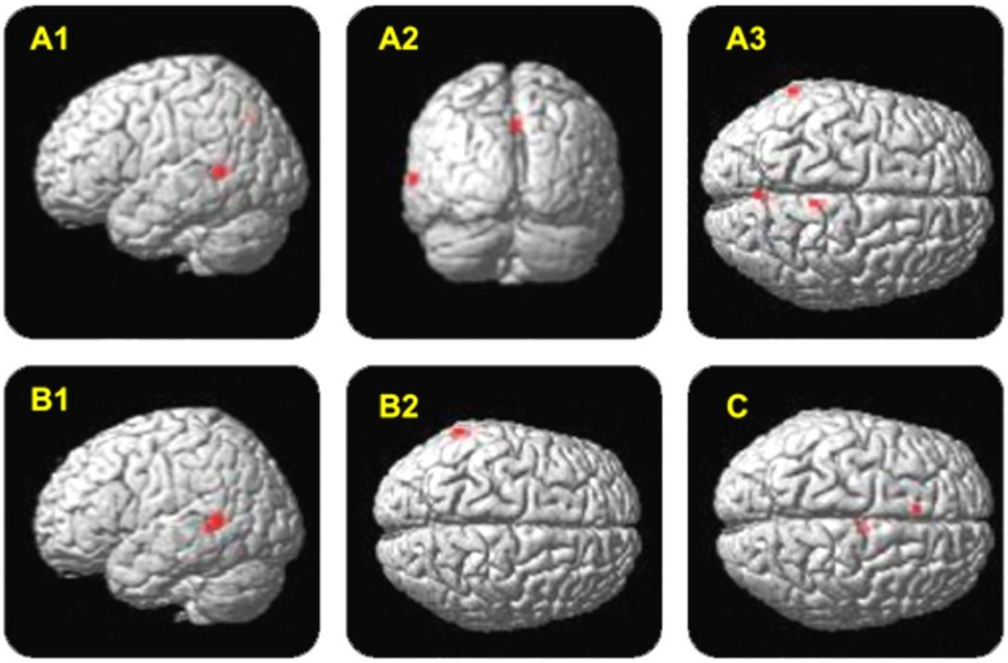


Figura 13 - Imagens ilustrando a localização dos *voxels* com redução estatisticamente significativa do MRG (pontos vermelhos) visto pela PET-^{18}FDG no grupo CCL amnéstico e em suas subdivisões em relação ao GC. A1,A2 e A3: redução metabólica do gCCLa em relação ao GC no pré-cúneo e cíngulo posterior direitos, além do giro temporal médio esquerdo; B1 e B2: áreas de redução metabólica em comparação com o GC no subgrupo CCLa MD no giro temporal superior esquerdo; C: redução do MRG em relação ao GC no subgrupo gCCLa UD no giro do cíngulo médio/posterior direito e giro frontal superior esquerdo. As áreas de redução do MRG são demonstradas sobre um molde padrão de RM fornecido pelo aplicativo SPM8; ponto de corte de visualização: p< 0,001, mínimo de 10 *voxels*

A Figura 13 demonstra predominância de alterações metabólicas parietais posteriores, no cíngulo posterior e temporal posterior esquerda (giro temporal médio) em todas as subanálises do grupo amnéstico, com exceção apenas do subgrupo gCCLa MD, que apresenta discreta área de redução metabólica no giro frontal superior esquerdo em relação ao GC.

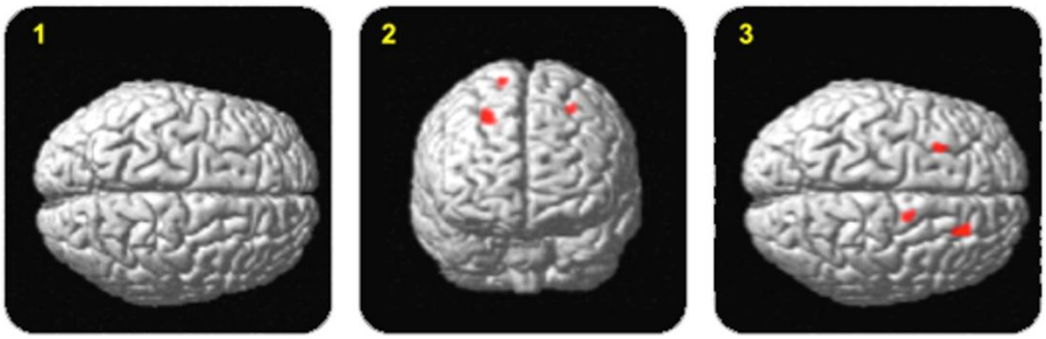


Figura 14 - Imagens ilustrando a localização dos *voxels* com redução estatisticamente significativa do MRG (pontos vermelhos) visto pela PET-^{18}FDG no gCCL não amnéstico em comparação com o GC (1 - sem alterações significativas), e em relação ao gCCLa (2 e 3), demonstrando redução metabólica nos giros frontais médio bilaterais e medial à direita. As áreas de redução do MRG são demonstradas sobre um molde padrão de RM fornecido pelo aplicativo SPM8. Ponto de corte de visualização: p< 0,001, mínimo de 10 *voxels*

Figura 15 - Imagens ilustrando a localização dos *voxels* com redução estatisticamente significativa do MRG (pontos vermelhos) visto pela PET-^{18}FDG nos subgrupos do gCCL não amnéstico em comparação com o GC. A1 e A2: redução metabólica no gCCLna UD em relação ao GC nos giros frontais médio e superior esquerdos; B: áreas de redução metabólica em comparação com o GC no subgrupo CCLna MD no córtex visual primário direito, ínsula esquerda (vista por transparência) e giro temporal médio esquerdo. As áreas de redução do MRG são demonstradas sobre um molde padrão de RM fornecido pelo aplicativo SPM8; ponto de corte de visualização: p< 0,001, mínimo de 10 *voxels*

As Figuras 14 e 15 resumem os achados metabólicos do subgrupo gCCLna. Elas demonstram alterações menos consistentes, porém predominantemente no córtex pré-frontal na comparação com o gCCLa e do subgrupo gCCLna UD em relação ao GC. O subgrupo gCCLna MD apresenta alterações mais difusas, incluindo ínsula, córtex temporal de associação e visual primário.

Algumas áreas de hipometabolismo encontradas acima, particularmente aquelas vistas no gCCLa (pré-cúneo, giro do cíngulo posterior e giro temporal médio), persistem em todas as análises, antes e após correção para PVE e controle para idade e escolaridade. Estas são classicamente relacionadas a maior risco para evolução para DA. Para mais bem ilustrá-las, abaixo são demonstrados gráficos *box plot* demonstrando a dispersão dos valores de contagens radioativas médias relacionadas ao MRG medida pela PET-^{18}FDG observadas nos três grupos (Gráficos 8, 9 e 10).

Os gráficos demonstram que, apesar das reduções do MRG no cíngulo posterior, pré-cúneo e giro temporal médio esquerdo atingirem diferenças estatisticamente significantes apenas no gCCLa, os valores do metabolismo no gCCLna são em geral intermediários entre o gCCLa e o grupo controle. Esses valores demonstram, porém, maior variação de metabolismo no gCCLna. Nota-se ainda que a região cerebral de maior diferença entre os grupos, inclusive entre o gCCLa e o gCCLna, é o giro temporal médio esquerdo, em sua porção posterior.

Gráfico 8 - Gráfico *box plot* demonstrando a dispersão dos valores das contagens radioativas relativas ao metabolismo regional de glicose no giro do cíngulo posterior direito (área de maior diferença estatística entre o gCCLa e o GC) nos diferentes grupos, obtidos pelo aplicativo MarsBar para SPM

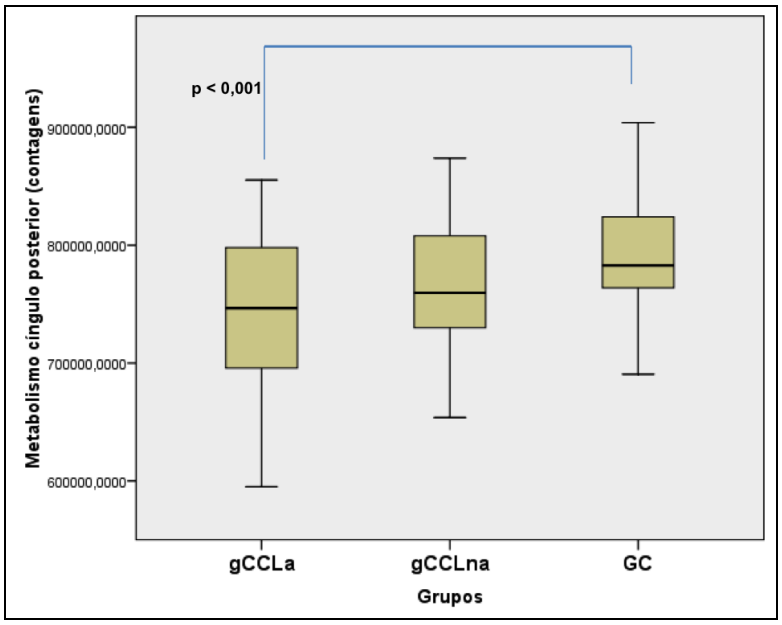


Gráfico 9 - Gráfico *box plot* demonstrando a dispersão dos valores das contagens radioativas relativas ao metabolismo regional de glicose no pré-cúneo direito (área de diferença estatística entre o gCCLa e o GC) nos diferentes grupos, obtidos pelo aplicativo MarsBar para SPM

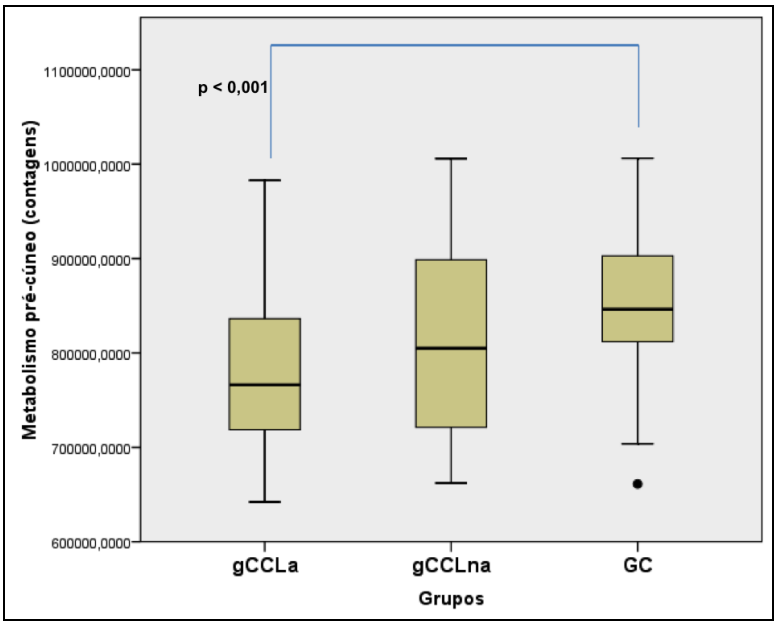
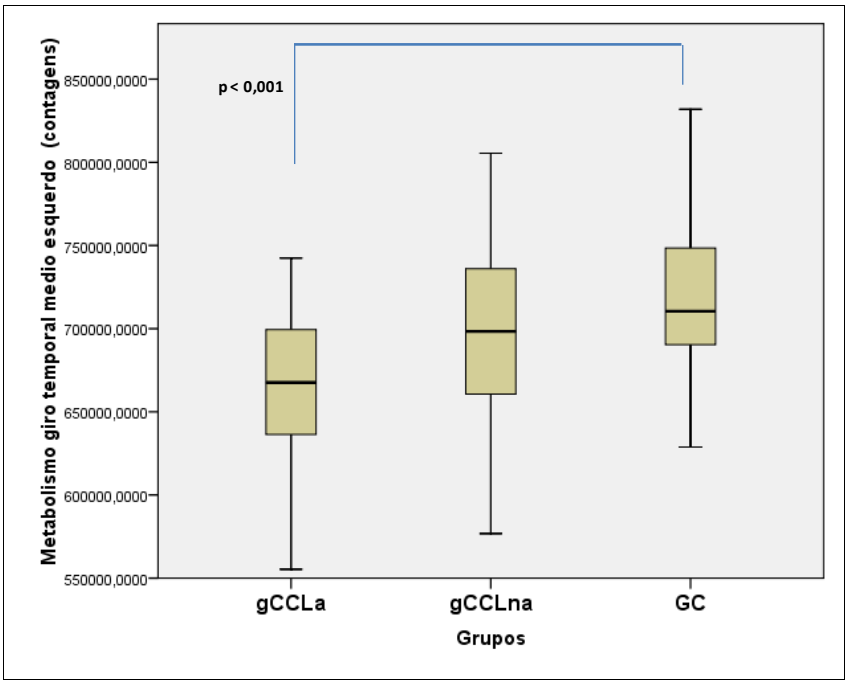


Gráfico 10 -Gráfico *box plot* demonstrando a dispersão dos valores das contagens radioativas relativas ao metabolismo regional de glicose no giro temporal médio esquerdo (área de diferença estatística entre o gCCLa e o GC) nos diferentes grupos, obtidos pelo aplicativo MarsBar para SPM



4.2.4 Análise de possíveis correlações entre as alterações metabólicas, volumétricas, de biomarcadores no LCR e testes clínicos

Após as análises realizadas acima, investigou-se possíveis correlações entre as variáveis obtidas dos exames de imagem (contagens radioativas médias das áreas de redução metabólica à PET-^{18}FDG observadas nos grupos CCLa e CCLna em relação ao grupo controle; volume dos hipocampos e regiões parahipocampais bilaterais à RM dos três grupos, após normalização para o volume cerebral total) entre si e em relação aos valores de biomarcadores no LCR, testes clínicos e neuropsicológicos.

Foram encontradas correlações positivas entre o metabolismo de glicose em área do giro temporal médio esquerdo e quatro testes de memória: evocação após interferência e tardia do RAVLT, testes de memória lógica imediata e tardia. Essa área apresentou redução do MRG significativa no gCCLa em relação ao GC, inclusive na análise direcionada. Foi também esta área a que apresenta maior diferença entre os grupos gCCLa e gCCLna nos gráficos de dispersão (Gráfico 10).

Além das correlações encontradas acima, os valores de peptídeo Aβ se correlacionaram negativamente com os valores de proteínas tau e p-tau no LCR. Isso sugere que haja maior deposição de β-amiloide cortical nos sujeitos com maiores níveis de lesão neuronal medidos por tau e p-tau. As correlações encontradas estão demonstradas na Tabela 12. Não foram demonstradas as correlações sem significância estatística.

Tabela 12 - Correlações encontradas entre diferentes variáveis obtidas no estudo - Metabolismo por PET-^{18}FDG, VBM por RM, variáveis clínicas e neuropsicológicas e biomarcadores no LCR

Variáveis	Coeficiente de correlação	p
MRG GTM E x RAVLT ET1 #	0,384	< 0,000
MRG GTM E x RAVLT ET2 #	0,367	0,001
MRG GTM E x memória logica imediata #	0,299	0,006
MRG GTM E x memória logica tardia #	0,385	< 0,000
Aβ x tau*	-0,45	< 0,000
Aβ x p-tau*	-0,285	0,016

Testes de correlação: # Pearson (R) e * Spearman (rho); MRG: metabolismo regional de glicose; GTM E: giro temporal médio esquerdo; RAVLT: teste de aprendizagem verbal auditiva de Rey; ET1: evocação pós-interferência do RAVLT; ET2: evocação tardia do RAVLT

5 DISCUSSÃO

5.1 Aspectos Gerais

Já é bem reconhecido na literatura o valor dos métodos de imagem estruturais e funcionais na avaliação de diversos processos neurodegenerativos. Contudo, variáveis demográficas como idade e escolaridade podem influenciar os resultados de testes neuropsicológicos e de exames de imagem (Garibotto *et al.,* 2008; Tucker e Stern, 2011; Morbelli *et al.,* 2013). Na presente amostra, os grupos gCCLa, gCCLna e GC não apresentaram diferença estatisticamente significativa nas variáveis idade, gênero, escolaridade, HAS e DM. Os grupos gCCLa e gCCLna também apresentaram valores semelhantes na escala GDS de intensidade de sintomas depressivos e depressão ativa foi um critério de exclusão, fator que sabidamente poderia afetar os achados de neuroimagem funcional no presente trabalho.

Estudos prévios demonstraram que lesões de substância branca podem apresentar correlação negativa com função executiva e atividade do córtex pré-frontal, além de estarem relacionadas a lesões microvasculares (Reed *et al*., 2004; Murray *et al*., 2010). Ainda que a RM por vezes falhe em detectar lesões microvasculares identificadas *post mortem* (Gouw *et al.*, 2011), a prevalência semelhante de HSB reduz a possibilidade de um viés de inclusão de sujeitos com mais lesões vasculares em um dos grupos. No presente estudo, lesões vasculares significativas (identificadas à análise

qualitativa visual da RM e/ou que apresentavam repercussão ao exame neurológico) foram critérios de exclusão. Além disso, não houve diferenças entre os grupos quanto aos fatores na análise visual semiquantitativa de HSB (Tabela 1, Gráficos 1 e 2).

Por consequência, pode-se afirmar que a quantidade de HSB provavelmente não influenciou os resultados dos nossos exames de imagem. Não obstante, outros autores já relataram prevalência semelhante de HSB nos diferentes tipos de CCL (Bombois *et al*., 2007).

Uma exceção às semelhanças entre os grupos foi a maior frequência de dislipidemia (DLP) no gCCLa (Tabela 1). DLP é um fator de risco cardiovascular e aparentemente para o desenvolvimento de DA. Este estaria associado à sua fisiopatogenia, influenciando no metabolismo de lipoproteínas cerebrais e possivelmente aumentando a produção de Aβ (Polidori *et al*, 2012; Ricciarelli *et al.*, 2012; Reitz, 2012). Pacientes diabéticos e dislipidêmicos podem apresentar maior reatividade cerebrovascular em áreas relacionadas à chamada “rede de modo padrão”, consagrada na língua inglesa como *default mode network* (DMN), uma rede de conectividade neural fisiológica em repouso, com algumas implicações na fisiopatologia da DA (Haight *et al*., 2015). Na nossa amostra não foram incluídos pacientes com diagnóstico de diabetes mellitus.

Redução de fatores de risco cardiovasculares, associada a menor grau de sedentarismo e elevação dos níveis educacionais da população, podem estar entre os responsáveis pela tendência de redução na incidência de novos casos de demências em idosos jovens detectada recentemente em alguns países de alta renda *per capita* (Larson *et al.* 2013; Langa, 2015). Na nossa

amostra de pacientes, soma-se à maior prevalência de DLP no gCCLa o fato deste grupo ter apresentado cinco pacientes com a escala 3 de Fazekas na análise de HSB, dentre os quais quatro apresentaram DLP. O gCCLna, por outro lado, não apresentou nenhum paciente com essa graduação.

Ainda que de forma especulativa, pois não houve diferença estatística nessa comparação, pode-se sugerir que gCCLa tenha discreta maior prevalência de fatores de risco cardiovascular que o gCCLna. Esses fatores de risco estão associados à maior prevalência de DA (Polidori *et al*, 2012; Ricciarelli *et al.*, 2012; Larson *et al.* 2013; Reitz, 2012; Langa, 2015).

Por outro lado, no estudo de He *et al*. (2009) houve maior prevalência de fatores de risco cardiovascular em um subgrupo de CCLna em relação ao subtipo amnéstico, resultado esse distinto ao observado no presente estudo. Neste estudo houve ainda quase o dobro da prevalência de APOE-ε4 em CCLa do que em sujeitos com CCLna. Esse trabalho e outros podem sugerir a ideia de CCLna como entidade menos ligada à DA clássica e talvez relacionada a fatores microvasculares (Mariani *et al*., 2007; Bombois *et al*., 2007; He *et al*., 2009). Nossos dados epidemiológicos e a análise de HSB, contudo, não dão suporte à visão do CCLna como entidade ligada a fatores vasculares.

Por fim, o conjunto dos dados favorece a interpretação de que fatores demográficos e epidemiológicos tiveram pouca influência nos achados de biomarcadores de imagem e no LCR no presente estudo. Considera-se que os três grupos foram relativamente homogêneos do ponto de vista clínico-epidemiológico, exceto pela maior prevalência estatística de DLP, um conhecido fator de risco para DA, no gCCLa.

5.2 Biomarcadores no líquido cefalorraquidiano e suas relações com as outras variáveis

A análise dos biomarcadores no LCR não demonstrou diferenças nos níveis de tau e p-tau (considerados marcadores de lesão neuronal) entre os indivíduos dos grupos CCLa e CCLna (Tabela 3, Gráficos 3 e 5). Esta semelhança é contraditória se levado em consideração as diferenças estruturais de volume (VBM) e de metabolismo (PET-^{18}FDG), marcadores estes também de degeneração neuronal, observadas entre os mesmos grupos no presente estudo. Os achados liquóricos de tau e p-tau também não se correlacionaram com as alterações metabólicas e volumétricas encontradas. Correlação entre essas variáveis é considerada como típica do processo fisiopatológico da DA por muitos autores (Jack, 2012; Jack *et al.,* 2013).

Correlação negativa entre volume das formações hipocampais e de regiões parietais com maiores níveis de tau e p-tau no LCR em sujeitos com CCLa do *Alzheimer's disease neuroimaging intiative* (ADNI) foi demonstrada por Carmichael *et al.* (2013). Petrie *et al.* (2009) demonstraram correlações negativas entre o metabolismo medido por PET-^{18}FDG e as medidas de tau e p-tau em sujeitos de diferentes faixas etárias anos sem comprometimento cognitivo. Os autores sugerem correlação negativa entre os valores de tau e p-tau no LCR com MRG no cíngulo posterior, pré-cúneos e regiões parahipocampais, justamente as áreas que cursaram com maior redução metabólica (cíngulo posterior e pré-cúneo) e de volume (regiões parahipocampais) no nosso estudo, em especial no grupo CCL amnéstico. Neste estudo (Petrie *et al.*, 2009), a correlação do MRG foi maior com os

marcadores de lesão neuronal (tau) do que com deposição de amiloide (correlação inversa apenas com metabolismo nos giros parahipocampais).

Nossa amostra de biomarcadores no LCR apenas de sujeitos idosos com CCL provavelmente não teve a mesma abrangência de valores encontrados nos sujeitos de diferentes idades e sem comprometimento cognitivo do estudo de Petrie *et al.* (2009). Isso pode em parte ter contribuído para a falta de correlação entre os diferentes biomarcadores na presente amostra.

Por outro lado, discordância e fracas taxas de correlação entre diferentes tipos de biomarcadores de lesão neuronal (metabolismo, volume e proteína tau) já foi relatada previamente em sujeitos com CCL, quando divididos categoricamente entre “normais” e “alterados” (Alexopoulos *et al*., 2014), concordando com nossos achados. O mesmo grupo (Alexopoulos *et al.*, 2013) também já havia relatado semelhantes níveis de proteína tau no LCR de sujeitos com CCL agrupados por diferentes graus de hipometabolismo à PET-^{18}FDG, demonstrando fraca relação entre alteração de metabolismo e elevação de tau no LCR.

Devido à concordância abaixo do ideal entre os diferentes biomarcadores de lesão neuronal, ambos os artigos, somados aos dados encontrados no nosso estudo, lançam luz sobre a complexidade da categorização de marcadores de diferentes naturezas (metabolismo, volume e liberação de tau no LCR) como traçadores de um mesmo evento, nesse caso lesão neuronal (Alexopoulos *et al*, 2013 e 2014). Deve-se considerar que curvas de alterações sequenciais dos biomarcadores ao longo do tempo, propostas para melhor entendimento da fisiopatologia da DA (Jack

2012*;* Jack *et al.,* 2013) devem ser entendidas como modelos teóricos, e não como dados matemáticos definitivos, levando-se ainda em consideração a possibilidade de neurodegeneração por vias não amiloidogênicas (Jack *et al.*, 2014).

Quanto aos níveis liquóricos de Aβ, nota-se nos Gráficos 3 e 4 uma grande variabilidade dos valores em ambos os grupos da nossa amostra. Apesar da maior variabilidade geral no gCCLna (sugerindo uma heterogeneidade fisiopatológica entre os sujeitos desse grupo), há maior presença de sujeitos com valores muito acima do desvio padrão da amostra no grupo CCLa, os chamados *outliers*. No gCCLa há também maior quantidade de sujeitos com níveis de Aβ abaixo dos valores normais fornecidos pelo fabricante. Quando os sujeitos considerados *outliers* são excluídos, o grupo CCLa passa a apresentar menores valores de Aβ no LCR com significância estatística, indicando maior deposição cortical amiloide (Tabela 5, Gráficos 6 e 7). O desvio-padrão dos valores de Aβ dos sujeitos do gCCLa também reduz bastante após essa exclusão.

Assim, nota-se que apesar da grande heterogeneidade dos valores de marcador amiloide no LCR dos sujeitos de ambos os grupos com CCL, os voluntários com CCLa tenderam a apresentar menores valores de amiloide no LCR do que o gCCLna. Isso infere maior deposição cortical desse peptídeo, uma característica clássica da DA com início décadas antes das primeiras manifestações da doença (Iwatsubo *et al.*, 1994; Hardy e Selkoe, 2002). Contudo, é importante referir que a análise sem *outliers* traz um viés de análise pós-teste que pode comprometer a interpretação dos resultados. Não é possível excluir que essa heterogeneidade esteja relacionada a

sujeitos com CCL por motivos distintos em ambos os grupos, alguns que irão certamente converter para DA e outros que potencialmente não apresentarão esta conversão. Apenas o seguimento longitudinal e evolutivo destes pacientes poderá confirmar tal inferência.

Maior deposição cortical de Aβ, seja medida indiretamente no LCR ou por PET, esteve relacionada com maior declínio cognitivo ao longo de dois anos em sujeitos com CCL (Ewers *et al.*, 2012). Neste estudo, tanto sujeitos com CCL quanto aqueles sem comprometimento cognitivo apresentaram maior progressão na perda de volume nos lobos temporais mesiais e maior redução no metabolismo parietal de glicose quando foram classificados como positivos para deposição amiloide. Investigando 31 sujeitos com CCL, Okello *et al.* (2011) demonstraram conversão para DA em 82% daqueles com deposição de amiloide cortical medida por PET com [^{11}C]PIB ao longo de três anos, contra apenas 7% de conversão em sujeitos sem concentração cortical de [^{11}C]PIB.

Meta-análise investigando o perfil de biomarcadores em idosos cognitivamente normais sugere relação mais próxima entre deposição de Aβ e memória episódica do que com relação a outras funções cognitivas (Hedden *et al.*, 2013). Correlação similar entre memória e deposição amiloide medida no LCR foi demonstrada em CCLa (N = 25) porém não em CCLna (Haldenwanger *et al.*, 2010). Estudo da deposição cortical de [^{11}C]PIB demonstrou ausência de deposição amiloide em grupo com CCLna contra concentração em 75% de sujeitos com CCLa (Pike *et al*., 2007).

Esses estudos reforçam, portanto, nossos achados de menores valores de Aβ no LCR do gCCLa e possível maior relação dessa deposição

com comprometimento de memória do que com redução de outras funções. Deve-se destacar o pequeno número de pacientes com CCLna incluídos nos estudos de Haldenwanger *et al.* (2010), com 12 indivíduos, e de Pike *et al*. (2007), com seis sujeitos, em contraponto aos nossos achados em uma subamostra de 38 sujeitos com CCLa e 33 com CCLna.

Quando considerada toda a amostra de sujeitos com biomarcadores no LCR, nota-se que os valores de peptídeo Aβ se correlacionaram negativamente com os de proteína tau e p-tau. Esse dado é concordante com as teorias prevalentes do desenvolvimento da DA e da hipótese amiloide, em que haveria maior lesão neuronal (medida por tau e p-tau) em pacientes com maior deposição cortical de amiloide, particularmente em estágios iniciais da doença (Hardy e Selkoe, 2002; Jack, 2012; Jack *et al.*, 2013).

5.3 Achados Comparativos dos Biomarcadores de Imagem e sua Relação com os Outros Achados

5.3.1 Principais achados da ressonância magnética

A VBM por RM demonstrou achados significativos e estatisticamente consistentes na comparação entre os grupos gCCLa e gCCLna, tanto entre si quanto em relação ao GC, dados que já haviam sido demonstrados em parte na literatura. Redução de volume em áreas contíguas do córtex temporal medial foi vista no grupo CCLa, tanto em comparação com o GC quanto com o gCCLna. Como se pode ver nas Figuras 11 e 12, as áreas de redução volumétrica compreendem o córtex entorrinal anterior e parahipocampal (grande parte das formações hipocampais) bilaterais, além da porção mesial dos polos temporais (porção anterior dos giros temporais

superiores). Essas regiões são citoarquitetonicamente ligadas e estão envolvidas com formação de novas memórias (Noback *et al.*, 1999; Ding *et al.*, 2009; Carmichael *et al.*, 2013), além de se apresentarem classicamente reduzidas em pacientes com CCL e relacionadas à maior evolução para DA em uma série de estudos (Du *et al.*, 2001; Bell-McGinty *et al.*, 2005; Schuff e Zhu, 2007).

Adicionalmente, foi vista pequena redução volumétrica no pré-cúneo direito e giro temporal médio no grupo amnéstico em relação ao GC. Essas áreas são parte do córtex associativo relacionado à cognição e sua redução também está envolvida no espectro de alterações volumétricas relacionadas à evolução da DA, assim como as alterações no córtex entorrinal relatadas previamente (Bell-McGinty *et al.*, 2005; Ries *et al.*, 2008; Ding *et al.*, 2009; Carmichael *et al.*, 2013).

Se por um lado a redução volumétrica observada em estruturas temporais mesiais foi documentada de forma robusta na literatura para CCLa, quando investigados grupos específicos com CCLna essa redução volumétrica ou não foi observada (He *et al.*, 2009) ou se apresentou menos evidente e com diferente padrão de redução do que o visto em subgrupos exclusivamente amnésticos (Bell-McGinty *et al.*, 2005).

Bell-McGinty *et al.* (2005) encontraram discreta atrofia hipocampal em um grupo com CCL MD sem comprometimento amnéstico, porém acrescida de reduções volumétricas mais difusas, incluindo os lobos frontais e outras porções dos lobos temporais. Em nosso gCCLna apenas pequena área no giro temporal inferior esquerdo esteve reduzida em relação ao GC, além de área no giro frontal médio esquerdo na comparação com o gCCLa (Tabela

11 e Figura 13). De certa forma, porém, nossos achados são concordantes com os de Bell-McGinty *et al.* (2005), exceto pelo menor número de áreas de redução volumétrica em nosso gCCLna.

Estudando as alterações volumétricas de uma amostra de 317 sujeitos com CCLa do ADNI, Carmichael *et al.* (2013) identificaram quatro grandes grupos de redução volumétrica no cérebro desses sujeitos ao longo de dois anos. Foram identificadas quatro grandes áreas cerebrais, ou fatores, de redução volumétrica ao longo do tempo. Duas delas foram relacionadas à evolução para DA: a) uma classicamente reconhecida, englobando o córtex temporal medial e os hipocampos; b) uma segunda, envolvendo áreas parietais posteriores, córtex temporal de associação lateral e giro do cíngulo posterior, que se associavam também aos hipocampos. Essa segunda área foi em grande parte congruente espacialmente com a *default mode network*, implicada por vários autores na patologia da DA (Fjell *et al.*, 2014). Os outros dois grandes fatores foram atrofia das regiões pré-frontais e atrofia global, ambas não relacionadas à evolução para DA (Carmichael *et al.*, 2013). As áreas de redução volumétrica em nosso grupo amnéstico estão contidas particularmente na rede de atrofia relacionada ao lobo temporal medial e hipocampos, relatada por Carmichael *et al.* (2013).

As área de redução volumétrica no gCCLna também estão contidas nas áreas com tendência de atrofia em pacientes evoluem para DA no estudo de Carmichael *et al.* (2013), estando porém mais relacionada à rede de atrofia em regiões temporais posteriores. Isso poderia indicar, a princípio, que o gCCLna tenha um padrão de perda volumétrica mais sutil ou

simplesmente diferente em comparação com o CCLa. A área de redução volumétrica frontal evidenciada na comparação com o gCCLa não é um fator de risco típico de evolução para DA.

Achados semelhantes aos nossos foram parcialmente reportados por He *et al*. (2009), apesar de algumas diferenças metodológicas. Os autores demonstraram redução do volume hipocampal em CCLa único e múltiplos domínios porém não em subgrupos com CCLna, após análise volumétrica manual dos hipocampos, em contraponto à presente análise global por VBM.

Outros autores (Pa *et al*., 2009) também não demonstraram reduções volumétricas mesiais temporais em CCL UD do tipo disexecutivo com VBM, porém sugerem menores volumes de regiões pré-frontais nesta entidade, de forma semelhante ao nosso achado isolado de redução volumétrica no giro frontal médio esquerdo em comparação com o gCCLa. Este mesmo grupo também observou redução volumétrica hipocampal bilateral, no giro do cíngulo posterior e no córtex parietal direito em grupo com CCLa, semelhante aos nossos achados.

Depósito de proteína tau-fosforilada nas formações hipocampais é encontrado desde as fases iniciais da DA, o que caracteriza a doença como uma taupatia; esse acúmulo é progressivo e distinguível de outras taupatias (Milenkovic *et al*., 2014). Portanto, os achados de proeminente redução volumétrica nessa região no gCCLa, associado ainda a menores níveis de Aβ no LCR do gCCLa, sugere que o grupo amnéstico esteja em um processo de degeneração em fase mais avançada no momento do diagnóstico do que os sujeitos do gCCLna.

5.3.2 Principais achados metabólicos à tomografia por emissão de pósitrons

5.3.2.1 Achados no grupo comprometimento cognitivo leve amnéstico

Após correção para PVE e controle para efeitos de idade e escolaridade, os pacientes do gCCLa apresentaram redução do MRG no pré-cúneo direito, giro do cíngulo posterior direito e no giro temporal médio esquerdo próximo à transição com o lobo parietal (córtex temporal de associação). A região no giro temporal médio foi a que apresentou maior diferença no gCCLa em relação aos outros grupos e ainda a área com maior correlação positiva com rendimento nos testes de memória (menor metabolismo, pior performance nos testes). Esses foram os achados mais consistentes à PET-^{18}FDG no estudo.

O córtex medial parietal (no qual estão contidas as áreas do pré-cúneo e a área contígua do cíngulo posterior) parece particularmente vulnerável à deposição de ß-amiloide e disfunção metabólica (Buckner *et al*. 2005; Fjell *et al*., 2014). Perda da integridade das fibras de substância branca em redes das regiões temporais e parietais também já foi descrita (Parente *et al.*, 2008).

Questionam-se quais regiões seriam as primeiras a ter seu metabolismo reduzido no CCL devido à DA, principalmente com relação à cronologia de alterações no cíngulo posterior *versus* córtex temporoparietal de associação (Fjell *et al.*, 2014). Há consenso, contudo, de que menor atividade sináptica em ambas as áreas diferencia sujeitos com CCL e DA precoce de controles, além de estar relacionada a maior risco de evolução e progressão mais rápida para DA, tanto em estudos com SPECT de perfusão cerebral (Johnson *et al.*, 2007) quanto de PET-^{18}FDG, seja em análises de

grupos ou de padrões individuais, empregando diferentes metodologias (Minoshima *et al.*,1997; Dzrezga *et al.*,2003, Yakushev *et al.*, 2009; Hinrichs *et al.*,2011; Landau *et al.*, 2011; Cerami *et al.*,2015).

O hipometabolismo observado nos exames funcionais poderia ser devido parcialmente à redução de volume, o chamado efeito de volume parcial, visto que menor volume determinaria menos contagens radioativas no exame PET, diluídas em um maior espaço padrão. Estariam mais sujeitas a esse efeito áreas próximas de espaços liquóricos, nas margens cerebrais e em estruturas circunvolvas, como o hipocampo (Ibáñez *et al*., 1998; Rousset, 2007; Karow *et al*., 2010).

Alguns autores relatam o “desaparecimento” de áreas de redução metabólica estatisticamente significantes nos mapas do SPM após a correção para PVE. Notadamente no trabalho de Karow *et al*. (2010), relata-se desaparecimento do hipometabolismo hipocampal em sujeitos com CCL quando comparados a sujeitos de um grupo controle após correção para PVE.

Hipometabolismo hipocampal em CCL amnéstico foi visto, por exemplo, por Clerici *et al.* (2009) em sujeitos com CCL amnéstico, a exemplo de outros relatos prévios de redução metabólica nos hipocampos concomitantemente à redução no giro do cíngulo posterior em DA precoce (Minoshima *et al*., 1997) e CCLa (Drzezga *et al.,* 2003). Alguns destes autores relatam, contudo, maior papel do MRG no giro do cíngulo posterior do que nos hipocampos na diferenciação entre sujeitos com e sem conversão para DA (Drzezga *et al*., 2003) e alterações metabólicas mas extensas no cíngulo posterior do que nos hipocampos (Minoshima *et al.*, 1997). Nenhum desses estudos incluiu correção de volume parcial em sua análise.

A exemplo desses autores (Minoshima *et al.*, 1997; Drzezga *et al.,* 2003; Clerici *et al.*, 2009), no presente estudo houve redução do MRG nos giros parahipocampais bilaterais no gCCLa em comparação com o gCCLna, concordante com as áreas de redução de volume na VBM. Esta alteração, porém, não sobreviveu com diferença estatisticamente significativa entre os grupos após aplicação da correção para PVE. Essa redução de MRG pode, assim, ser atribuída a efeito de volume parcial em nosso trabalho. Outras áreas que também não demonstraram mais significância após a correção para PVE no gCCLa foram o cúneo direito, giro frontal médio direito e giro lingual esquerdo, quando comparado gCCLa com GC, além do cerebelo esquerdo e lobo frontal esquerdo na comparação entre gCCLa e gCCLna. Efeitos de PVE foram também observados no gCCLna.

Contudo, o PVE por si só não explica a redução metabólica vista no grupo CCLa, pois persistiram as áreas de redução de atividade sináptica temporal esquerda, no cíngulo posterior e pré-cúneo, a exemplo do que foi relatado por outros autores ao estudar alterações na DA com e sem correção para PVE (Ibáñez *et al*., 1998). A opinião de que reduções metabólicas vão além dos achados clássicos de redução volumétrica na DA é sustentada por muitos especialistas (Minoshima *et al.*, 1999).

No que se refere aos hipocampos, ainda não está claro o motivo pelo qual as áreas de redução volumétrica não sejam acompanhadas de redução adicional da atividade metabólica (La Joie *et al.*, 2012; Fjell *et al.*, 2014), visto que esta área é onde aparentemente acontecem as primeiras alterações fisiopatológicas da DA (Milenkovic *et al*., 2014). Nosso estudo corrobora com aqueles que também não encontraram déficit significativo de

metabolismo nos hipocampos, apesar da nítida redução volumétrica observada nessa região pelos métodos quantitativos empregados em exames de RM (Karow *et al*., 2010). Isso talvez permita inferir que esteja ocorrendo uma maior atividade metabólica dos neurônios residuais que ainda não foram destruídos pelo processo fisiopatológico da doença, em compensação à perda volumétrica. Contudo, não existem estudos ou evidências publicadas na literatura para sustentar essa hipótese.

As áreas no pré-cúneo e cíngulo posterior em que houve redução metabólica no presente estudo são tidas como um componente da DMN, uma rede neural mais ativa em repouso ou introspecção e que tem a atividade reduzida durante tarefas mentais (Buckner, 2012). O metabolismo do cíngulo posterior demonstrou ser a área com maior correlação com soma das caixas da escala *Clinical Dementia Rating* (uma medida de severidade de demência), em sujeitos com CCL amnéstico (Perneczky *et al.*, 2007). Dessa forma, observa-se que o MRG no cíngulo posterior não só demonstra maior risco de progressão para DA, como poderia também indicar o seu estágio de evolução (Perneczky *et al.*, 2007).

A DMN se encontra afetada no envelhecimento normal, porém também de forma proeminente em fases precoces da DA (Buckner *et al*., 2005; Fjell *et al.,* 2014), inclusive com perda de volume (Carmichael *et al*., 2013). Esta inclui também o córtex retroesplênico, pré-frontal medial, dorsal medial pré-frontal, lóbulo parietal inferior e possivelmente partes do córtex medial temporal (Buckner *et al*., 2008; Buckner, 2012; Leech *et al.*, 2014).

As formações hipocampais não fazem parte integralmente da DMN, mas ambas possuem conexões anatômicas entre si, que poderiam explicar em parte

a redução de metabolismo na DMN simultânea à redução volumétrica hipocampal vista no presente estudo e por outros autores (Fjell *et al.,* 2014). Ainda que a redução de volume ao longo do tempo na DA precoce aconteça tanto na DMN quanto nos hipocampos, nossos dados reforçam a hipótese de que na DMN haja uma redução metabólica mais precoce e independente da perda volumétrica, ao contrário dos hipocampos, onde parece haver uma perde volumétrica previamente ao comprometimento metabólico.

5.3.2.2 Achados metabólicos no grupo CCL não amnéstico

A exemplo dos achados de VBM, as áreas de redução metabólica foram mais difusas e inconsistentes no gCCLna do que no observado no subgrupo amnéstico. Não persistiram reduções de MRG após correção para PVE no gCCLna em comparação com o GC. A Figura 7 e os Gráficos 7, 8 e 9, contudo, demonstram que o MRG do gCCLna em algumas áreas no pré-cúneo, cíngulo posterior e giro temporal médio esquerdo apresenta níveis intermediários entre o gCCLa e o GC. Esses valores intermediários entre o grupo normal e o amnéstico, além da sua maior variação, podem indicar que no gCCLna existam sujeitos em diferentes estágios e com degeneração em padrão menos homogêneo que no gCCLa.

Em estudo de PET-^{18}FDG com diferentes tipos de CCL, Clerici *et al.* (2009) relataram a redução metabólica nos pré-cúneos em relação a idosos com cognição normal tanto em CCLa quanto em CCLna. Resultados semelhantes foram vistos em nosso estudo antes da correção para PVE. Contudo, hipometabolismo nessas áreas não persistiu após correção para

PVE no gCCLna em relação ao grupo controle, ao mesmo tempo discordando e complementando os dados destes autores.

Os sujeitos do gCCLna apresentam redução metabólica no córtex pré-frontal direito quando comparados com o grupo controle antes da correção para PVE. Contudo, após correção para PVE persiste hipometabolismo somente no córtex pré-frontal esquerdo no subgrupo com disfunção cognitiva/atencional exclusiva (CCLna UD) quando comparado ao grupo GC, além do córtex pré-frontal direito quando todo o grupo CCLna é comparado ao gCCLa. Achados similares não haviam sido descritos na literatura em estudos específicos de imagem funcional e CCLna (Nobili *et al*., 2008; Clerici *et al.*, 2009).

À primeira vista, poderia ser sugerido que as áreas de hipometabolismo frontal observadas no gCCLna estivessem relacionadas ao comprometimento de funções executivas e de atenção apresentados pelos pacientes deste grupo. O córtex pré-frontal dorsolateral e dorsomedial são classicamente associados a funções executivo-atencionais (Szczepanski e Knight 2014; Rabinovici *et al.*, 2015). O giro frontal superior (especialmente sua porção dorsolateral) tem conexões anatômicas consistentes com redes neurais executivas e de atenção, porém também com a DMN (Li *et al*., 2013).

Déficit na ativação da região pré-frontal é identificado em pacientes com baixo rendimento em testes que avaliam funções executivas, como o teste de trilhas (Zakzanis *et al*. 2005) e esta área pode atuar como parte de uma rede que inclui o giro do cíngulo anterior, envolvida no controle de motivação e planejamento de ações (Szczepanski e Knight 2014; Rabinovici *et al.*, 2015).

O padrão de metabolismo glicolítico em repouso em CCLna aqui demonstrado é parcialmente concordante com outros estudos. Nobili *et al*.

(2008) reportaram redução de fluxo sanguíneo cerebral no córtex frontal direito medido por SPECT em CCLna quando comparado com sujeitos com queixa subjetiva de memória. Esse estudo, contudo, contabilizou no CCLna altas taxas de depressão (29,4%) e grande quantidade de HSB (que foram relacionadas a lesões microvasculares), além de análise por regiões de interesse (ROI) pré-selecionadas e ausência de correção para PVE, o que dificulta sua comparação com os achados do presente trabalho.

Como discutido em parte acima, redução de volume no córtex pré-frontal dorsolateral esquerdo foi relatado em CCLna UD (disexecutivo) por Pa *et al*. (2009). O grupo CCLna desses autores apresentou, contudo, características diferentes do presente estudo, como valores mais elevados de escala de parkinsonismo (critério de exclusão no presente estudo). É reconhecido que determinadas síndromes Parkinsonianas podem estar associados a déficits funcionais e metabólicos nos lobos frontais (Eckert *et al*., 2008; Teune *et al*., 2010).

Carmichael et al. (2013) identificaram redução volumétrica frontal em sujeitos com CCLa ao longo do tempo, porém que não apresentou relações com risco de evolução para DA. O desaparecimento do hipometabolismo frontal visto no gCCLna após correção para PVE pode estar relacionada a este tipo de perda inespecífica de volume frontal em idosos, como visto também por outros autores (Fjell *et al*., 2014). A persistência de reduções do MRG pré-frontais apenas no CCLna UD após a correção para PVE indica, contudo, que no subgrupo com disfunção executiva exclusiva o hipometabolismo independe de perdas volumétricas.

A relação do hipometabolismo frontal com disfunção executiva/atencional é, contudo, especulativa. O gCCLna não apresentou diferenças estatisticamente significantes em relação ao gCCLa na comparação direta dos testes de função executiva (Tabela 2). Os grupos diferiram exclusivamente nos testes de memória. Dessa forma, o desenho do presente trabalho não permite explicar a natureza exata desses achados.

Somam-se ao padrão heterogêneo do MRG no gCCLna a maior variação nos resultados dos biomarcadores no LCR e as alterações volumétricas menos evidentes. O conjunto de achados então sugere uma apresentação fisiopatológica mais heterogênea em comparação com as alterações parietais mais consistentes do gCCLa (como ilustrado na figura 7). Esse perfil de biomarcadores poderia em parte justificar a evolução diferente deste grupo em relação ao CCL amnéstico vista na maioria dos estudos epidemiológicos (Winblad *et al*., 2004; Mitchell e Shiri-Feshki, 2009; Petersen, 2011; Espinosa *et al*., 2013; Tatsuoka *et al.*, 2013).

Embora com um pequeno número de pacientes, Cerami *et al*. (2015) ilustraram essa heterogeneidade em sujeitos com CCLna, apesar do pequeno número de CCLna em sua amostra (oito pacientes). Neste estudo sujeitos com CCLna demonstram evolução para diferentes estados (degeneração lobar frontotemporal, doença com corpúsculos de Lewy, reversão para um estágio sem CCL ou mesmo evolução para CCLa). enquanto os sujeitos com CCLa apresentaram uma evolução mais homogênea para DA.

5.4 Avaliação Final dos Resultados

A análise com diferentes biomarcadores no presente estudo demonstrou alterações mais consistentes no gCCLa e mais discretas no gCCLna. O gCCLa apresentou valores discretamente menores de peptídeo Aβ no LCR do que o gCCLna (inferindo maior deposição cerebral de β-amiloide), redução volumétrica bilateral no córtex temporal medial e polar anterior, além de menor metabolismo em regiões parietais e temporal posteriores. Levando a análise conjunta dos biomarcadores em consideração, fica evidente que esses achados no gCCLa são indicativos de um perfil de CCL relacionado à DA (Petersen, 2011; Albert *et al*., 2011; Budson *et al.*, 2012; Jack *et al.*, 2013; Galuzzi *et al.*, 2013; Cerami *et al.*, 2015).

Hinrichs *et al*. (2011) concluiram, após análise multi-modal por *Machine Learning,* que uma análise multimodal de biomarcadores seria o ideal para avaliação prognóstica do CCL, ainda que eles nem sempre se correlacionem perfeitamente. O racional seria que uma análise multimodal poderia mostrar sinais de patologia em uma modalidade mesmo quando outra modalidade ainda não se alterou. Nossa amostra demonstra resultados concordantes com Hinrichs *et al.* (2011), ao demonstrar diferentes grau de alterações entre os biomarcadores, ainda que com outros métodos de análise. Deve-se ainda reforçar, de acordo com o proposto por esses autores, que pouca correlação estatística entre os biomarcadores não quer dizer necessariamente discordância entre eles.

Hinrichs *et al.* (2011) também sugerem que a combinação de biomarcadores de imagem seja superior como preditor prognóstico em comparação com biomarcadores liquóricos e testes neuropsicológicos. Van

Rossum *et al*. (2013) também relacionaram maior predição na progressão de CCL para DA por marcadores de lesão (particularmente RM) do que por marcadores amiloides. Em nossa amostra, as alterações de volume e MRG no gCCLa, mais evidentes do que as análises no LCR, parecem concordar com os achados desses autores.

Tendo em vista o conjunto de achados no grupo CCLna, foram observadas: área menor de redução volumétrica em relação ao controle do que no gCCLa, perfil heterogêneo e inconsistente de alterações metabólicas e maiores valores de Aβ no LCR. Houve ainda mudança no perfil metabólico vista à PET quando o grupo foi subdividido em gCCLna UD e MD. Embora esses dados sugiram um perfil menos relacionado à DA do que o gCCLa, é importante notar que esse subgrupo também apresenta sinais de um processo de neurodegeneração, talvez incipiente, nos biomarcadores de imagem. Algumas hipóteses merecem ser discutidas em relação a esse subgrupo.

Primeiramente, ainda que todos os sujeitos com CCLna tenham sido classificados de acordo com testes ajustados para idade e escolaridade, não se pode excluir que alguns voluntários com disfunção executiva relacionada à idade tenham sido incluídos neste grupo. É conhecida a perda de inteligência fluida relacionada à idade, mediada principalmente por funções executivas e velocidade de processamento, além da perda de volume nos lobos frontais no envelhecimento normal (Carmichael *et al*., 2013; Fjell *et al*., 2014). Ainda que isso possa ter acontecido, estes idosos “normais” do grupo CCLna devem ter composto apenas pequena parte da amostra, visto que as áreas de redução metabólica e volumétrica vistas no gCCLna, mesmo que discretas, não são consideradas normais para a idade.

Para que a hipótese acima seja inteiramente válida, os voluntários do grupo controle deveriam compreender um grupo de idosos com funções executivas acima do esperado para a idade, ou maior reserva cognitiva (Tucker e Stern, 2011), o que denotaria certo viés de seleção. Os dados epidemiológicos, incluindo idade e escolaridade semelhantes entre os grupos, desencorajam essa interpretação.

Uma segunda alternativa seria a de que o grupo CCLna represente uma fase prodrômica de outras formas de demência, sejam do tipo não-Alzheimer, apresentações atípicas da DA ou mesmo uma fase pré-CCL amnéstico. A Demência com corpúsculos de Lewy pode apresentar uma fase de CCLna com comprometimento executivo e visuoespacial, independente da presença de parkinsonismo, contudo com maior prevalência de hipometabolismo occipital (Boeve, 2012). No presente estudo, entretanto, foram observadas apenas mínimas anormalidades no córtex occipital no subgrupo gCCLna MD e anormalidades motoras foram excluídas na exame neurológico, ao contrário de artigo citado previamente, que demonstrou valores elevados de parkinsonismo no CCLna (Pa *et al*., 2009).

Apresentações atípicas da DA, principalmente a sua controversa variante frontal, com disfunção executiva e comportamental proeminentes, podem também apresentar uma fase pré-demência. Contudo, alterações comportamentais não foram percebidas nas avaliações clínicas e neuropsicológicas em nenhum dos pacientes do gCCLna. Como há dúvidas sobre qual disfunção (comportamental ou executiva) que melhor define a variante frontal da DA, essa possibilidade deve ser levada em conta

(Woodward *et al.*, 2010). Porém, tendo em vista a raridade dessa entidade, é extremamente improvável que uma grande parte dos pacientes da nossa amostra com CCLna sejam portadores dessa variação da DA em fase pré-clínica.

Nossos dados clínico-epidemiológicos e a análise de HSB também não dão suporte à sugestão de que CCLna seja uma entidade relacionada a depressão (Nobili *et al.*, 2008) ou fatores microvasculares (Bombois *et al*., 2007; Mariani *et al*., 2007; He *et al*., 2009).

Adicionalmente, parte dos resultados poderia ser explicada se o grupo CCLna representasse uma variante de fase prodrômica da DA em uma fase ainda mais precoce do que o CCLa, dessa forma compondo um grupo “pré-amnéstico” com disfunção executiva.

A favor dessa hipótese estão os níveis semelhantes das proteínas tau e p-tau e os níveis apenas discretamente diferentes de Aβ no LCR. Antes da correção para PVE, CCLa e CCLna apresentam alterações metabólicas relativamente semelhantes na pré-cúneo, área com especial papel na patogênese da DA (Drzezga *et al.*, 2003; Hinrichs *et al.*, 2011; Cerami *et al.*, 2015). Após essa correção, o metabolismo no pré-cúneo, cíngulo posterior e giro temporal médio no gCCLna permanece menor que no GC, porém sem significância estatística e em situação intermediária em relação ao gCCLa. Além disso, as alterações volumétricas em CCLna foram tênues em comparação à redução volumétrica temporal bilateral no CCLa, porém não foram inexistentes. Vias não amiloidogênicas de degeneração também já foram descritas (Jack *et al.*, 2014), o que poderia explicar os maiores valores de Aβ no LCR.

Assim, a ideia de que o gCCLna esteja em uma fase mais precoce em relação ao gCCLa deve ser considerada entre as diferentes hipóteses, pelo fato de que os pacientes incluídos não apresentam sinais de outras desordens neuropsiquiátricas, além da valores semelhantes nos fatores demográficos e de risco cardiovascular. Assim, uma forma pré-amnésica disexecutiva de CCL pode ser possível e não se pode excluir que alguns desses pacientes evoluam nos próximos anos para um CCL amnéstico com acometimento de múltiplos domínios. Mais uma vez, essa hipótese só poderá ser testada com o acompanhamento prospectivo dos sujeitos.

Por fim, nota-se heterogeneidade nos critérios diagnósticos de CCLna entre os diferentes autores (Bell-McGynti *et al*., 2005; Nobili *et al*., 2008; He *et al*., 2009; Pa *et al*., 2009; Clerici *et al.*, 2009; Cerami *et al.*, 2015). Isso pode levar a amostras representando análises de populações diferentes entre os estudos, o que dificulta a comparação de estudos com biomarcadores. O mais provável é que o nosso gCCLna compreenda indivíduos com diferentes patologias de base ou mesmo combinações delas no momento do seu diagnóstico. Essas especulações só podem ser testadas com acompanhamento prospectivo deste grupo específico de CCLna, após o qual padrões específicos de neuroimagem podem ser investigados, para no futuro ajudar a subclassificar pacientes nesta condição.

5.5 Limitações do Estudo e Considerações Finais

Devem-se ressaltar algumas limitações do presente estudo. Inicialmente, por representar um grupo heterogêneo de pacientes, uma amostra ainda maior de participantes com CCLna seria desejável. Por conseguinte, investigações diagnósticas adicionais também agregariam informações fisiopatológicas, entre elas análise do perfil genético dos pacientes, medidas de reserva cognitiva, estilo de vida, análise do sono REM, uso de diferentes sequências de RM e mesmo diferentes radiofármacos (como traçadores dopaminérgicos e de deposição amiloide).

O presente trabalho teve caráter exclusivamente transversal, o que pode ser também considerado uma limitação. Consideramos a investigação prospectiva como o principal ponto de investigação futuro nessa amostra de indivíduos. Após análise prospectiva desta amostra, pode-se inclusive identificar padrões individuais de biomarcadores com caráter prognóstico, a exemplo do estudo de Cerami *et al*. (2015), porém com uma amostra consideravelmente maior.

Após seguimento de quatro anos de um banco de sujeitos normais, Mosconi *et al.* (2007) sugerem que também o grupo ideal de controles seja selecionado prospectivamente, devendo persistir como “controles” apenas os sujeitos que permanecem com cognição preservada ao longo do tempo. Pelo caráter transversal de nosso estudo, não foi possível realizar essa seleção.

Ainda, as imagens PET-^{18}FDG são adquiridas em condições de repouso mental. Por essa razão, a discussões relacionando funções neuropsicológicas e MRG (por exemplo, hipometabolismo frontal e função executiva) devem ser tratados como especulativos.

Segundo nosso conhecimento, o presente trabalho é o primeiro a analisar de forma sistemática por diferentes categorias de biomarcadores um único grupo com CCLna em comparação com sujeitos normais e com CCL amnéstico. As análises permitem afirmar que CCLna apresentou algumas similaridades no perfil de biomarcadores com relação ao CCLa. Todavia, as diferenças observadas favorecem a hipótese de que o grupo CCLa esteja mais relacionado a uma fase prodrômica clássica da DA, no momento do diagnóstico, do que o gCCLna.

Após cuidadosa exclusão de fatores de confusão no diagnóstico de CCL (depressão, lesões vasculares, parkinsonismo), o perfil de biomarcadores no grupo CCLna leva a crer que este permaneça como um grupo heterogêneo composto de múltiplas etiologias, que podem incluir tanto uma fase precoce de doenças degenerativas que não a DA, DA atípica, ou ainda mesmo uma fase pré-amnésica bastante precoce da DA.

Por fim, o presente estudo é, segundo nosso conhecimento, o que possui a maior amostra de sujeitos com CCLna em uma análise com biomarcadores de diferentes fatores (volume, metabolismo, deposição amiloide, liberação de proteína tau e análise de hiperintensidades na substância branca). Essa investigação dá suporte à necessidade de subdivisão clínica de CCL em grupos com e sem comprometimento de memoria. Os dados fornecem evidências de diferenças biológicas com potencial prognóstico entre esses subgrupos de CCL. Reforça-se ainda a necessidade de investigações prospectivas para aumentar o entendimento acerca do subtipo não amnéstico de comprometimento cognitivo leve, uma entidade ainda indefinida do ponto de vista fisiopatológico.

6 CONCLUSÕES

Os grupos comprometimento cognitivo leve amnéstico e comprometimento cognitivo leve não amnéstico apresentaram padrões diferentes de alterações de volume e metabolismo comparativamente a voluntários sem comprometimento cognitivo, e as regiões em que ocorreram estas alterações foram essencialmente discordantes entre os dois grupos.

Quanto às associações e correlações pode-concluir que:

a) As alterações metabólicas no gCCLa apresentaram um padrão bem definido de maior risco para evolução para doença de Alzheimer (hipometabolismo temporal e parietal posteriores), enquanto o gCCLna apresentou um padrão de alterações metabólicas diferente do gCCLa, com um conjunto de achados que não é indicativo de nenhum perfil específico de evolução para demências.

b) As alterações volumétricas no gCCLa (redução de volume mesial temporal e polar temporal anterior bilateral) foram concordantes com o descrito na literatura como fator de risco para evolução para DA, enquanto no gCCLna as alteração de volume descritas foram menos extensas e em área não classicamente relacionadas a evolução para DA.

c) Não foram observadas correlações estatisticamente significativas entra as alterações cerebrais volumétricas e metabólicas vistas nos diferentes subtipos de comprometimento cognitivo leve.

d) Foi observada correlação positiva entre metabolismo no giro temporal médio esquerdo e rendimento em testes de memória quando considerada toda a amostra; não foram observadas correlações estatisticamente significativas entre as alterações volumétricas e metabólicas com os valores dos biomarcadores no líquido cefalorraquidiano.

7 ANEXOS

Anexo A - Aprovação do Comitê de Ética

HC HOSPITAL DAS CLÍNICAS

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 19/08/2009, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **0642/09**, intitulado: "**ANÁLISE DE CORRELAÇÃO DE ALTERAÇÕES VOLUMÉTRICAS, METABÓLICAS E PERFUSIONAIS NA DOENÇA DE ALZHEIMER, NO COMPROMETIMENTO COGNITIVO LEVE, E NO ENVELHECIMENTO NORMAL.**" apresentado pelo Departamento de **RADIOLOGIA E RADIOTERAPIA**, inclusive o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10/10/1996, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: **Prof. Dr. Carlos Alberto Buchpiguel**
Pesquisador (a) Executante: **Rodrigo Kubo**

CAPPesq, 19 de Agosto de 2009

Prof. Dr. Eduardo Massad
Presidente da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP e da FMUSP Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo Rua Ovídio Pires de Campos, 225, 5º andar - CEP 05403 010 - São Paulo – SP Fone: 011 3069 6442 Fax: 011 3069 6492 e-mail: cappesq@hcnet.usp.br / secretariacappesq2@hcnet.usp.br
hf

Aprovação do Comitê de Ética relativa à inclusão de Pesquisador Executante e de adendo com extensão da amostra e uso de dados do projeto CAPPesq 0064/11

Hospital das Clínicas da FMUSP
Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
CAPPesq

Nº Protocolo: 0642/09

Título: ANÁLISE DE CORRELAÇÃO DE ALTERAÇÕES VOLUMÉTRICAS, METABÓLICAS E PERFUSIONAIS NA DOENÇA DE ALZHEIMER, NO COMPROMETIMENTO COGNITIVO LEVE, E NO ENVELHECIMENTO NORMAL.

Pesquisador Responsável: Carlos Alberto Buchpiguel

Pesquisador Executante: Rodrigo Kubo

Departamento: RADIOLOGIA E RADIOTERAPIA

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa – CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, **APROVOU / TOMOU CIÊNCIA** na sessão datada de 22/05/2013, do(s) documento(s) abaixo mencionado(s):

•Carta datada de 10/04/2013 - Relatório final do estudo - Carta de autorização da pesquisadora responsável pelo projeto 0064/11 - Inclusão do Dr. Artur Martins Novaes Coutinho como pesquisador responsável - Adendo ao protocolo de pesquisa

CAPPesq, 23 de Maio de 2013

PROF. DR. LUIZ EUGÊNIO GARCEZ LEME
Coordenador
Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq

Rua Dr. Ovídio Pires de Campos, 225 - Prédio da Administração - 5º andar - CEP 05403-010 - São Paulo - SP.
55 11 2661-7585 - 55 11 2661-6442 ramais: 16, 17, 18 | marcia.carvalho@hc.fm.usp.br

Anexo B - Termo de Consentimento Livre e Informado

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

I - DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME: .:..... ....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : ..... SEXO : .M ☐ F ☐
DATA NASCIMENTO: ...../...../.....
ENDEREÇO ..... Nº ..... APTO: .....
BAIRRO: ..... CIDADE .....
CEP:..... TELEFONE: DDD (.....) .....

2.RESPONSÁVEL LEGAL .....
NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.) .....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE :.....SEXO: M ☐ F ☐
DATA NASCIMENTO.: ...../...../.....
ENDEREÇO: ..... Nº ..... APTO: .....
BAIRRO: ..... CIDADE: .....
CEP: ..... TELEFONE: DDD (.....).....

II - DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: "Análise de correlação de alterações volumétricas, metabólicas e perfusionais na Doença de Alzheimer, no comprometimento cognitivo leve, e no envelhecimento normal."

PESQUISADOR : Carlos Alberto Buchpiguel
CARGO/FUNÇÃO: Diretor. INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº .....
UNIDADE DO HCFMUSP: Cento de Medicina Nuclear.

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

SEM RISCO ☐ RISCO MÍNIMO **X** RISCO MÉDIO ☐

RISCO BAIXO ☐ RISCO MAIOR ☐

4.DURAÇÃO DA PESQUISA : 2 anos

III - EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE OU SEU REPRESENTANTE LEGAL SOBRE A PESQUISA, CONSIGNANDO:

1. desenho do estudo e objetivos; 2. descrição dos procedimentos que serão realizados, com seus propósitos e identificação dos que forem experimentais e não rotineiros; 3. riscos e desconfortos esperados; 4. benefícios que poderão ser obtidos; 5. procedimentos alternativos que possam ser vantajosos para o indivíduo.

Nessa pesquisa queremos estudar as alterações que ocorrem no cérebro de pessoas que sofrem de diminuição de algumas de suas capacidades como a memória, a atenção ou o raciocínio, entre outras. Para isso, faremos a comparação de testes e exames clínicos com alguns exames de imagem, que incluem: a ressonância magnética, que é um exame em que se utiliza um campo magnético para fazer com cada tipo de substância do corpo emita um tipo de onda de rádio diferente, que é captado para formar a imagem; a tomografia por emissão de pósitrons (PET), que é um exame tomográfico (em que se formam imagens em fatias) que utiliza a glicose marcada com flúor-18, um material radioativo, para a formação de imagens em um detector; e a tomografia por emissão de fóton único (SPECT), que é outro tipo de exame tomográfico que utiliza uma substância que se distribui no cérebro também marcada com material radioativo, o tecnécio-99m, para formar a imagem no detector. Todos esses exames já são utilizados na prática há algum tempo, não causam nenhum tipo de reação nas pessoas e a exposição à radiação é baixa, sendo considerados seguros. Além destes exames, será preciso coletar um pouco de sangue para análise do gene ApoE, que é um gene que está envolvido na produção de proteínas responsáveis pelo metabolismo do colesterol, e há evidências que indicam maior risco de desenvolver Doença de Alzheimer (um tipo de doença em que há perda de capacidades mentais) em pessoas que têm um tipo específico deste gene.

Os incômodos que você terá participando desse trabalho são: os exames são um pouco demorados e você terá que ficar deitado sem se mexer (por 30 a 45 minutos) durante o exame; você não pode ter problemas em ficar em espaços fechados; é preciso receber uma picada na veia para coleta de sangue para análise e para a injeção do material no PET e no SPECT; e, terá que ficar em jejum antes da realização do PET.

Além dos exames que foram descritos, serão realizados exames clínicos, testes psicológicos e entrevistas com familiares ou acompanhantes, que são muito usados na avaliação das doenças que estamos estudando.

Desta forma, queremos avaliar o quanto cada um desses exames ajuda o médico no diagnóstico e no acompanhamento de doenças podem causar essa diminuição nas funções que foram descritas. O benefício que você pode vir a ter ao optar por participar dessa pesquisa ocorrerá na medida em que nossos testes e exames ajudarem o seu médico a avaliar e tratar o seu problema. Não há procedimentos alternativos que possam trazer vantagens para você.

IV - GARANTIA DE ACESSO

Em qualquer etapa do estudo, você terá:

1. acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas.

2. liberdade para retirar seu consentimento e deixar de participar do estudo, sem que isto cause prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição.

3. direito de confidencialidade – as informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgado a identificação de nenhum paciente.

4. direito a tratamento médico na Instituição, bem como às indenizações legalmente estabelecidas, em caso de dano pessoal diretamente causado pelos procedimentos propostos neste estudo (nexo causal comprovado).

V – NOME ENDEREÇO E TELEFONE DO RESPONSÁVEL PELO ACOMPANHAMENTO DA PESQUISA

Pesquisador Responsável: **Dr. Carlos Alberto Buchpiguel**
Email: buch@usp.br
Telefone: (11) 3069 8058
Endereço: Centro de Medicina Nuclear. Av. Dr. Ovídio Pires de Campos, s/nº.

Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: 3069-6442 ramais 16, 17, 18 ou 20, FAX: 3069-6442 ramal 26 – E-mail: cappesq@hcnet.usp.br

---

VI – CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

Declaro ter sido suficientemente informado e ter entendido os propósitos do estudo, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes, e consinto em participar de forma voluntária do presente Protocolo de Pesquisa.

São Paulo, de de 2009.

Assinatura do sujeito da pesquisa/representante legal	Assinatura da testemunha (para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.)

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Data: / /2009

Assinatura do responsável pelo projeto

Anexo C - Autorização do uso dos dados de imagem e clínico-laboratoriais pela pesquisadora responsável pelo projeto CAPPesq 0064/11

São Paulo, 06 de março de 2013

À Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (CAPPesq-HCFMUSP)

Venho autorizar, por meio desta carta, a utilização dos estudos de imagem e de dados clínico-laboratoriais dos pacientes do projeto: "Fatores preditores da resposta cognitiva em indivíduos com comprometimento cognitivo leve submetidos a atividade física aeróbia" (Protocolo de Pesquisa CAPPesq/HC-FMUSP 0064/11), na extensão do projeto intitulado "Análise de correlação de alterações volumétricas, metabólicas e perfusionais na Doença de Alzheimer, no comprometimento cognitivo leve e no envelhecimento normal" (Protocolo de Pesquisa CAPPesq/HC-FMUSP 0642/09), sob responsabilidade do Prof. Dr. Carlos Alberto Buchpiguel.

Atenciosamente,

Profª. Drª Sônia Maria Dozzi Brucki
Pesquisadora Responsável
06/03/2013

Recebido por Juliana
08/03/2013
HCFMUSP

8 REFERÊNCIAS

Aisen PS, Andrieu S, Sampaio C, Carrillo M, Khachaturian ZS, Dubois B, Feldman HH, Petersen RC, Siemers E, Doody RS, Hendrix SB, Grundman M, Schneider LS, Schindler RJ, Salmon E, Potter WZ, Thomas RG, Salmon D, Donohue M, Bednar MM, Touchon J, Vellas B. Report of the task force on designing clinical trials in early (predementia) AD. *Neurology* 2011; 76(3):280-6.

Albert M, DeKosky S, Dickson D, Dubois B, Feldman H, Fox N, Gamst A, Holtzman DM, Jagust WJ, Petersen RC, Snyder PJ, Carrillo MC, Thies B, Phelps CH. 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. Alzheimer's Dement. 2011; 7(3):270-9.

Alexopoulos P, Guo LH, Jiang M, Bujo H, Grimmer T, Förster S, Drzezga A, Kurz A, Perneczky R. Amyloid cascade and tau pathology cerebrospinal fluid markers in mild cognitive impairment with regards to Alzheimer's disease cerebral metabolic signature. *J Alzheimers Dis.* 2013; 36(2):401-8.

Alexopoulos, P. Kriettc L, Hallerd B, Kluppc E, Graye K, Grimmera T, Laskarisf N, Förster S, Robert Perneczkya, Alexander Kurza, Drzezga A, Andreas Fellgiebelj, Yakushev I, for the Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative. Limited agreement between biomarkers of neuronal injury at different stages of Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement*. 2014; 10(6):684-9.

Almeida OP, Almeida SA. Short versions of the geriatric depression scale: a study of their validity for the diagnosis of a major depressive episode according to ICD-10 and DSM-IV. *Int J Geriatr Psychiatry*. 1999; 14(10):858-65.

Aretouli E, Tsilidis K, Brandt J. Four-year outcome of mild cognitive impairment: the contribution of executive dysfunction. *Neuropsychology*. 2013; 27(1):95-106.

Arnáiz E, Almkvist O. Neuropsychological features of mild cognitive impairment and preclinical Alzheimer's disease. *Acta Neurol Scand Suppl.* 2003; 179:34-41.

Ashburner J, Friston K. Voxel-Based Morphometry - The methods. *Neuroimage*. 2000; 11(6 Pt 1):8058-21.

Bäckman L, Jones S, Berger A, Laukka E, Small B. Multiple cognitive deficits during the transition to Alzheimer's disease. *J Intern Med*. 2004; 256(3): 195-204.

Battersby WS, Bender MB, Pollack M, Kahn RL. Unilateral spatial agnosia (inattention) in patients with cortical lesions. *Brain.* 1956; 79(1):68-93.

Bell-McGinty S, Lopez O, Meltzer C, Scanlon J, Whyte E, Dekosky S, Becker JT. Differential cortical atrophy in subgroups of mild cognitive impairment. *Arc Neurol*. 2005; 62(9):1393-7.

Boeve B. Mild cognitive impairment associated with underlying Alzheimer's disease versus Lewy body disease. *Parkinsonism Relat Disord*. 2012. 18(Suppl 1):S4144-.

Bombois, S. Debette S, Delbeuck X, Bruandet A, Lepoittevin S, Delmaire C, Leys D, Pasquier F. Prevalence of subcortical vascular lesions and association with executive function in mild cognitive impairment subtypes. *Stroke*. 2007; 38(9):2595-7-.

Brucki SMD, Nitrini R, Caramelli P, Bertolucci PHF, Okamoto IH. Suggestions for utilization of the mini-mental state examination in Brazil. Arq *Neuropsiquiatr.* 2003; 61:(3B):777-81.

Buckner R, Andrews-Hanna J, Schacter D. The brain's default network: anatomy, function, and relevance to disease. *Ann N Y Acad Sci*. 2008; 1124, 1-38.

Buckner R, Snyder AZ, Shannon BJ, LaRossa G, Sachs R, Fotenos AF, Sheline YI, Klunk WE, Mathis CA, Morris JC, Mintun MA. Molecular, structural, and functional characterization of Alzheimer's disease: evidence for a relationship between default activity, amyloid, and memory. *J Neurosci*. 2005; 25(34):7709--17.

Buckner, R. The serendipitous discovery of the brain's default network. *Neuroimage.* 2012; 62(2):1137-45.

Budson A, Solomon P. New diagnostic criteria for Alzheimer's disease and mild cognitive impairment for the practical neurologist. *Pract Neurol*. 2012; 12(2):88-96.

Burdette JH, Minoshima S, Borght VT, Tran DD, Kuhl DE. Alzheimer disease: improved visual interpretation of PET images by using three-dimensional stereotaxic surface projections. *Radiology.* 1996; 198(3):837-43.

Busatto GF, Garrido GE, Almeida OP, Castro CC, Camargo CH, Cid CG, Buchpiguel CA, Furuie S, Bottino CM. A voxel-based morphometry study of temporal lobe gray matter reductions in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 2003; 24(2):221-31.

Carmichael O, McLaren DG, Tommet D, Mungas D, Jones RN. Alzheimer's disease neuroimaging initiative. Coevolution of brain structures in amnestic mild cognitive impairment. *Neuroimage*. 2013; 66:449-56.

Cerami C, Della Rosa PA, Magnani G, Santangelo R, Marcone A, Cappa SF, Perani D. Brain metabolic maps in Mild Cognitive Impairment predict heterogeneity of progression to dementia. *Neuroimage Clin*. 2015; 7:187-94.

Clark L, Delano-Wood L, Libon D, McDonald C, Nation D, Bangen KJ, Jak AJ, Au R, Salmon DP, Bondi MW. Are empirically-derived subtypes of mild cognitive impairment consistent with conventional subtypes? *J Int Neuropsychol Soc*. 2013; 19(6):635-45.

Clerici F, Sole DA, Chiti A, Maggiore L, Lecchi M, Pomati S, Mosconi L, Lucignani G, Mariani C. Differences in hippocampal metabolism between amnestic and non-amnestic MCI subjects: automated FDG-PET image analysis. *Q J Nucl Med Mol Imaging.* 2009; 53(6):646-57.

Davatzikos C, Fan Y, Wu X, Shen D, Resnick SM. Detection of prodromal Alzheimer's disease via pattern classification of magnetic resonance imaging. *Neurobiol Aging*. 2008; 29(4):514-23.

Davison C, O'Brien J. A comparison of FDG-PET and blood flow SPECT in the diagnosis of neurodegenerative dementias: a systematic review. *Int J Geriatr Psychiatry*. 2014; 29(6):551-61.

Ding S, Hoesen G, Cassell M; Poremba A. Parcellation of human temporal polar cortex: a combined analysis of multiple cytoarchitectonic, chemoarchitectonic, and pathological markers. *J Comp Neurol*. 2009; 514(6): 595-623.

Döbert N1, Pantel J, Frölich L, Hamscho N, Menzel C, Grünwald F Dement Diagnostic value of FDG-PET and HMPAO-SPET in patients with mild dementia and mild cognitive impairment: metabolic index and perfusion index *Geriatr Cogn Disord*. 2005; 20(2-3):63-70.

Drzezga A, Lautenschlager N, Siebner H, Riemenschneider M, Willoch F, Minoshima S, Schwaiger M, Kurz A. Cerebral metabolic changes accompanying conversion of mild cognitive impairment into Alzheimer's disease: a PET follow-up study. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2003; 30(8):1104-13.

Du A, Schuff N, Amend D, Laakso M, Hsu Y, Jagust W, Yaffe K, Kramer JH, Reed B, Norman D, Chui HC, Weiner MW. Magnetic resonance imaging of the entorhinal cortex and hippocampus in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2001; 71(4):441-7.

Eckert T, Tang C, Ma Y, Brown N, Lin T, Frucht S, Feigin A, Eidelberg D. Abnormal metabolic networks in atypical parkinsonism. *Mov Disord*. 2008; 23(5):727-33.

Espinosa A, Alegret M, Valero S, Vinyes-Junqué G, Hernández I, Mauleón A, Rosende-Roca M, Ruiz A, López O, Tárraga L, Boada M. A longitudinal follow-up of 550 mild cognitive impairment patients: evidence for large conversion to dementia rates and detection of major risk factors involved. *J Alzheimers Dis*. 2013; 34(3):769-80.

Evin G, Weidemann A. Biogenesis and metabolism of Alzheimer's disease Abeta amyloid peptides. *Peptides*. 2002; 23(7):1285-97.

Ewers M, Insel P, Jagust WJ, Shaw L, Trojanowsky JQ, Aisen P, Petersen R, Schuff N, Weiner MW, for the Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiativa (ADNI). CSF biomarkers and PIB-PET-derived beta-amyloid signature predicts metabolic, gray matter, and cognitive changes in nondemented subjects. *Cereb Cortex*. 2012; 22(9):1993-2004.

Fazekas F, Chawluk JB, Alavi A, Hurtig WI, Zimmerman RA. MR signal abnormalities at 1.5 T in Alzheimer's dementia and normal aging. *AJR Am J Roentgenol*. 1987; 149(2):351-6.

Fjell AM, McEvoy L, Holland D, Dale AM, Walhovd KM, Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative. What is normal in normal aging? Effects of aging, amyloid and Alzheimer's disease on the cerebral cortex and the hippocampus. *Prog Neurobiol*. 2014; 117:20-40.

Folstein MF, Folstein SE, McHugh PR. "Mini-mental state". A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *J Psychiatr Res.* 1975; 12(3):189-98.

Forlenza OV, Diniz BS, Talib LL, Radanovic M, Yassuda MS, Ojopi EB, Gattaz EF. Clinical and biological predictors of Alzheimer's disease in patients with amnestic mild cognitive impairment. *Rev Bras Psiquiatr*. 2010; 32(3):216-22.

Frota N, Nitrini R, Damasceno B, Forlenza O, Dias-Tosta E, Silva AB, Herrera Júnior E, Magaldi RM. Critérios para o diagnóstico de doença de Alzheimer. *Dement Neuropsychol*. 2011; 5(supl 1):5-10.

Galuzzi S, Geroldi C, Amicucci G, Bocchio-Chiavetto L, Bonetti M, Bonvicini C, Cotelli M, Ghidoni R, Paghera B, Zanetti O, Frisoni GB; Translational Outpatient Memory Clinic Working Group. Supporting evidence for using biomarkers in the diagnosis of MCI due to AD. *J Neurol*. 2013; 260(2):640-50.

Ganguli M, Snitz B, Saxton J, Chang C-C, Lee C-W, Bilt J, Hughes TF, Loewenstein DA, Unverzagt FW, Petersen RC. Outcomes of mild cognitive impairment by definition: a population study. *Arch Neurol*. 2011; 68(6):761-7.

Garibotto V, Borroni B, Kalbe E, Herholz K, Salmon E, Holtoff V, Sorbi S, Cappa SF, Padovani A, Fazio F, Perani. Education and occupation as proxies for reserve in aMCI converters and AD FDG-PET evidence. *Neurology*. 2008; 71(17):1342-9.

Gouw AA, Seewann A, van der Flier WM, Barkhof F, Rozemuller AM, Scheltens P, Geurts JJ. Heterogeneity of small vessel disease: a systematic review of MRI and histopathology correlations. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2011; 82(2):126-35.

Haight TJ, Bryan RN, Erus G, Davatzikos C, Jacobs DR, D'Esposito M, Lewis CE, Launer LJ. Vascular risk factors, cerebrovascular reactivity, and the default-mode brain network. *Neuroimage*. 2015; 115:7-16.

Haldenwanger A, Eling P, Kastrup A, Hildebrandt H. Correlation between cognitive impairment and CSF biomarkers in amnesic MCI, non-amnesic MCI, and Alzheimer's disease. *J Alzeimers Dis*. 2010; 22(3): 971-80.

Hamilton M. The assessment of anxiety states by rating. *Br J Med Psychol*. 1959; 32(1):50-5.

Han J, Kim T, Lee S, Park J, Lee J, Huh Y, Park JE, Jhoo JH, Lee DY, Kim KW. Predictive validity and diagnostic stability of mild cognitive impairment subtypes. *Alzheimers Dement*. 2012; 8(6):553-9.

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.

Hardy J, Selkoe DJ. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science*. 2002; 297(5580):353-6.

Harper S. Economic and social implications of aging societies. *Science*. 2014; 346(6209):587-91.

He J, Farias S, Martinez O, Reed B, Mungas D, Decarli C. Differences in brain volume, hippocampal volume, cerebrovascular risk factors, and apolipoprotein E4 among mild cognitive impairment subtypes. *Arc Neurol*. 2009; 66(11):1393-9.

Hedden T, Oh H, Younger A, Patel T. Meta-analysis of amyloid-cognition relations in cognitively normal older adults. *Neurology*. 2013; 80(14):1341-8.

Hinrichs C, Singh V, Xu G, Johnson S, Initiative A. Predictive markers for AD in a multi-modality framework: an analysis of MCI progression in the ADNI population. *NeuroImage*. 2011; 55(2):574-89.

Ibáñez V, Pietrini P, Alexander GE, Furey ML, Teichberg D, Rajapakse JC, Rapoport SI, Schapiro MB, Horwitz B. Regional glucose metabolic abnormalities are not the result of atrophy in Alzheimer’s disease. *Neurology*. 1998; 50(6):1585-93.

Iwatsubo T, Odaka A, Suzuki N, Mizusawa H, Nukina N, Ihara Y. Visualization of A beta 42(43) and A beta 40 in senile plaques with end-specific A beta monoclonals: evidence that an initially deposited species is A beta 42(43). *Neuron*. 1994; 13(1):45-53.

Jack C Jr. Alzheimer disease: new concepts on its neurobiology and the clinical role imaging will play. *Radiology*. 2012; 263(2):344-61.

Jack C, Wiste H, Knopman D, Vemuri P, Mielke M, Weigand S, Senjem ML, Gunter JL, Lowe V, Gregg BE, Pankratz VS, Petersen RC. Rates of β-amyloid accumulation are independent of hippocampal neurodegeneration. *Neurology*. 2014; 82(18):1605-12.

Jack CR Jr., Knopman DS, Jagust WJ, Petersen RC , Weiner MW, Aisen PS, Shaw LM, Vemuri P, Wiste HJ, Weigand SD, Lesnick TG, Pankratz VS, Donohue MC, Trojanowski JQ. Tracking pathophysiological processes in Alzheimer's disease: an updated hypothetical model of dynamic biomarkers. *Lancet Neurol.* 2013; 12(2):207-16.

Jagust W, Gitcho A, Sun F, Kuczynski B, Mungas D, Haan M. Brain imaging evidence of preclinical Alzheimer's disease in normal aging. *Ann Neurol*. 2006; 59(4):673-81.

Jagust WJ, Landau SM, Shaw LM, Trojanowski JQ, Koeppe RA, Reiman EM, Foster NL, Petersen RC, Weiner MW, Price JC, Mathis CA. Relationships between biomarkers in aging and dementia. *Neurology*. 2009; 73(15):1193-9.

Johnson K, Moran EK, Becker JA, Blacker D, Fischman AJ, Albert MS.. et al. Single photon emission computed tomography perfusion differences in mild cognitive impairment. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2007; 78(3):240-.

Karow D, McEvoy LK, Fennema-Notestine C, Hagler DJ Jr, Jennings RG, Brewer JB, Hoh CK, Dale AM; Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative. Relative capability of MR imaging and FDG PET to depict changes associated with prodromal and early Alzheimer disease. *Radiology*. 2010; 256(3):932-42.

Klöppel S, Stonnington CM, Chu C, Draganski B, Scahill RI, Rohrer JD, Fox NC, Jack CR Jr, Ashburner J, Frackowiak RS. Automatic classification of MR scans in Alzheimer's disease. *Brain*. 2008; 131(Pt 3):681-9.

Knopman DS, Boeve BF, Petersen RC. Essentials of the proper diagnoses of mild cognitive impairment, dementia, and major subtypes of dementia. *Mayo Clin Proc*. 2003; 78(10):1290-308.

La Joie R, Perrotin A, Barré L, Hommet C, Mézenge F, Ibazizene M, Camus V, Abbas A, Landeau B, Guilloteau D, de La Sayette V, Eustache F, Desgranges B, Chételat G. et al. Region-specific hierarchy between atrophy, hypometabolism, and β-amyloid (Aβ) load in Alzheimer's disease dementia. *J Neurosci*. 2012; 32:16265-73.

Lacadie CM, Fulbright RK, Constable RT, Papademetris X. More accurate talairach coordinates for neuroimaging using nonlinear registration. *Neuroimage*. 2008; 42(2):717-25.

Lancaster JL, Rainey LH, Summerlin JL, Freitas CS, Fox PT, Evans AC, Toga AW, Mazziotta JC. Automated labeling of the human brain: a preliminary report on the development and evaluation of a forward-transform method. *Hum Brain Mapp*. 1997; 5(4):238-42.

Lancaster JL, Woldorff MG, Parsons LM, Liotti M, Freitas CS, Rainey L, Kochunov PV, Nickerson D, Mikiten SA, Fox PT. Automated talairach atlas labels for functional brain mapping. *Hum Brain Mapp*. 2000; 10(3):120-31.

Landau SM, Harvey D, Madison CM, Koeppe RA, Reiman EM, Foster NL, Weiner MW, Jagust WJ. Associations between cognitive, functional, and FDG-PET measures of decline in AD and MCI. *Neurobiol Aging*. 2001; 32(7):1207-18.

Langa K. Is the risk of Alzheimer's disease and dementia declining? *Alzheimers Res Ther*. 2015; 7(1):34.

Larson EB, Yaffe K, Langa KM. New Insights into the Dementia Epidemic. *N Engl J Med*. 2013; 369(24):2275-7.

Leech R, Sharp D. The role of the posterior cingulate cortex in cognition and disease. *Brain*. 2014; 137(Pt 1):12-32.

Li W, Qin W, Liu H, Fan L, Wang J, Jiang T, Yu C. Subregions of the human superior frontal gyrus and their connections. *NeuroImage*. 2013; 78:46-58.

Malloy-Diniz LF, Lasmar VAP, Gazinelli LSR, Fuentes D, Salgado JV. The Rey Auditory-Verbal Learning Test: applicability for the Brazilian elderly population. *Rev Bras Psiquiatr*. 2007; 29(4):324-9.

Manly JJ, Tang M-XX, Schupf N, Stern Y, Vonsattel J-PGP, Mayeux R. Frequency and course of mild cognitive impairment in a multiethnic community. *Ann Neurol*. 2008; 63(4):494-506.

Mariani E, Monastero R, Ercolani S, Mangialasche F, Caputo M, Feliziani FT, Vitale DF, Senin U, Mecocci P; ReGAl Study Group. Vascular risk factors in mild cognitive impairment subtypes. Findings from the ReGAl project. *Dement Geriatr Cogn Disord*. 2007; 24(6):448-56.

Matsuda H. The role of neuroimaging in mild cognitive impairment. *Neuropathology*. 2007; 27(6):570-7.

Mattsson N, Zetterberg H, Hansson O, Andreasen N, Parnetti L, Jonsson M, Herukka SK, van der Flier WM, Blankenstein MA, Ewers M, Rich K, Kaiser E, Verbeek M, Tsolaki M, Mulugeta E, Rosén E, Aarsland D, Visser PJ, Schröder J, Marcusson J, de Leon M, Hampel H, Scheltens P, Pirttilä T, Wallin A, Jönhagen ME, Minthon L, Winblad B, Blennow K. CSF biomarkers and incipient Alzheimer disease in patients with mild cognitive impairment. *JAMA* . 2009; 302(4):385-93.

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.

Milenkovic I, Petrov T, Kovacs GG. Patterns of hippocampal tau pathology differentiate neurodegenerative dementias. Dement Geriatr Cogn Disord. 2014; 38(5-6):375-88.

Minoshima S, Cross DJ, Foster NL, Henry TR, Kuhl DE. Discordance between traditional pathologic and energy metabolic changes in very early Alzheimer's disease - Pathophysiological implications. *Ann N Y Acad Sci*. 1999; 893:350-2.

Minoshima S, Giordani B, Berent S, Frey K, Foster N, Kuhl D. Metabolic reduction in the posterior cingulate cortex in very early Alzheimer's disease. Ann Neurol. 1997; 42(1):85-94.

Misra C, Fan Y, Davatzikos C. Baseline and longitudinal patterns of brain atrophy in MCI patients, and their use in prediction of short-term conversion to AD: results from ADNI. *Neuroimage*. 2009; 44(4):1415-22.

Mitchell A, Shiri-Feshki M. Rate of progression of mild cognitive impairment to dementia - Meta-analysis of 41 robust inception cohort studies. *Acta Psychiatri Scand*. 2009; 119(4):252-65.

Morbelli S, Perneczky R, Drzezga A, Frisoni G, Caroli A, Berckel B, Ossenkoppele R, Guedj E, Didic M, Brugnolo A, Naseri M, Sambuceti G, Pagani M, Nobili F. Metabolic networks underlying cognitive reserve in prodromal alzheimer disease: a European alzheimer disease consortium project. *J Nucl Med*. 2013; 54(6):894-902.

Mosconi L, Tsui W, Pupi A, Santi S, Drzezga A, Minoshima S, de Leon MJ. (18)F-FDG PET database of longitudinally confirmed healthy elderly individuals improves detection of mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *J Nucl Med*. 2007; 48(7):1129-34.

Murray M, Senjem ML, Petersen RC, Hollman JH, Preboske GM, Weigand SD, Knopman DS, Ferman TJ, Dickson DW, Jack CR Jr. Functional impact of white matter hyperintensities in cognitively normal elderly subjects. *Arch Neurol*. 2010; 67(11):1379-85.

Nitrini R, Caramelli P, Herrera Júnior E, Porto CS, Charchat-Fichman H, Carthery MT, Takada LT, Lima EP. . Performance of illiterate and literate nondemented elderly subjects in two tests of long-term memory. *J Int Neuropsychol Soc*. 2004; 10(4):634-8.

Nitrini R, Caramelli P, Porto CS, Charchat-Fichman H, Formigoni AP, Carthey-Goulart MT, Prandini JC. Uma bateria cognitiva breve com alta acurácia no diagnóstico de doença de Alzheimer em população com grande heterogeneidade educacional. *Arq Neuropsiquiatr.* 2006; 64:200.

Nitrini R, Caramelli P, Porto CS, Charchat-Fichman H, Formigoni AP, Carthery-Goulart MT, Otero C, Prandini JC. Brief cognitive battery in the diagnosis of mild Alzheimer's disease in subjects with medium and high levels of education. *Dement Neuropsychol.* 2007;1(1):32-6.

Noback CR, Strominger NL, Demarest RJ. *The human nervous system - Structure and function.* 5ª ed. Baltimore, MA, USA: Williams & Wilkins. 1999.

Nobili F, Frisoni G, Portet F, Verhey F, Rodriguez G, Caroli A, Guerra UP, Van de Pol LA, Visser PJ. Brain SPECT in subtypes of mild cognitive impairment. Findings from the DESCRIPA multicenter study. *J Neurol*. 2008; 255(9):1344-53.

O'Brien J, Firbank M, Davison C, Barnett N, Bamford C, Donaldson C, Olsen K, Herholz K, Williams D, Lloyd J. 18F-FDG PET and Perfusion SPECT in the Diagnosis of Alzheimer and Lewy body dementias. *J Nucl Med*. 2014; 55(12):1959-65.

Okello A, Koivunen J, Edison P, Archer HA, Turkheimer FE, Någren K, Bullock R, Walker Z, Kennedy A, Fox NC, Rossor MN, Rinne JO, Brooks DJ. Conversion of amyloid positive and negative MCI to AD over 3 years: an 11C-PIB PET study. *Neurology*. 2009; 73(10):754-60.

Pa J, Boxer A, Chao L, Gazzaley A, Freeman K, Kramer J, Miller BL, Weiner MW, Neuhaus J, Johnson JK. Clinical-neuroimaging characteristics of dysexecutive mild cognitive impairment. *Ann Neurol*. 2009; 65(4):414-23.

Parente D, Gasparetto E, Cruz L, Domingues R, Baptista A, Carvalho A, Domingues RC. Potential role of diffusion tensor MRI in the differential diagnosis of mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *AJR Am J Roentgenol*. 2008; 190(5):1369-74.

Peltz CB, Corrada MM, Berlau DJ, Kawas CH. Incidence of dementia in oldest-old with amnestic MCI and other cognitive impairments. Neurology. 2011; 77(21):1906-12.

Perneczky R, Hartmann J, Grimmer T, Drzezga A, Kurz A. Cerebral metabolic correlates of the clinical dementia rating scale in mild cognitive impairment. *J Geriatr Psychiatry Neurol*. 2007; 20(2):84-8.

Petersen R, Parisi J, Dickson D, Johnson K, Knopman D, Boeve B, Jicha GA, Ivnik RJ, Smith GE, Tangalos EG, Braak H, Kokmen E. Neuropathologic features of amnestic mild cognitive impairment. *Arc Neurol*. 2006; 63(5):665-72.

Petersen R, Smith G, Waring S, Ivnik R, Tangalos E, Kokmen E. Mild cognitive impairment: clinical characterization and outcome. *Arch Neurol*. 1999; 56(3):303-8.

Petersen RC. Mild cognitive impairment. *N Engl J Med*. 2011; 364(23):2227-34.

Petrie E, Cross DJ, Galasko D, Schellenberg GD, Raskind MA, Peskind ER, Minoshima S. Preclinical evidence of alzheimer changes: convergent cerebrospinal fluid biomarker and fluorodeoxyglucose positron emission tomography findings. *Arch Neurol*. 2009; 66(5):632-7.

Pfeffer RI, Kurosaki TT, Harrah CH Jr, Chance JM, Filos S. Measurement of functional activities in older adults in the community. *J Gerontol.* 1982; 37(2):323-9.

Pike KE, Savage G, Villemagne VL, Ng S, Moss SA, Maruff P, Mathis CA, Klunk WE, Masters CL, Rowe CC. Beta-amyloid imaging and memory in non-demented individuals: evidence for preclinical Alzheimer’s disease. *Brain*. 2007; 130(Pt 11):2837-44.

Polidori MC, Pientka L, Mecocci P. A review of the major vascular risk factors related to Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*. 2012; 32(3):521-30.

Quarantelli M, Berkouk K, Prinster A, Landeau B, Svarer C, Balkay L, Alfano B, Brunetti A, Baron JC, Salvatore M. Integrated software for the analysis of brain PET/SPECT studies with partial-volume-effect correction. *J Nucl Med*. 2004; 45(2):192-201.

Rabinovici GD, Jagust WJ. Amyloid imaging in aging and dementia: testing the amyloid hypothesis in vivo. *Behav Neurol*. 2009; 21(1):117-28.

Rabinovici GD, Stephens ML, Possin KL. Executive dysfunction. *Continuum (Minneap Minn)*. 2015; 21(3 Behavioral Neurology and Neuropsychiatry):646-59. doi: 10.1212/01.CON.0000466658.05156.54.

Reed B, Eberling JL, Mungas D, Weiner M, Kramer JH, Jagust WJ. Effects of white matter lesions and lacunes on cortical function. *Arch Neurol*. 2004; 61(10):1545050.

Reitz C. Dyslipidemia and dementia: current epidemiology, genetic evidence, and mechanisms behind the associations. *J Alzheimers Dis*. 2012; 30(Suppl 2):S127-45.

Ricciarelli R, Canepa E, Marengo B, Marinari UM, Poli G, Pronzato MA, Domenicotti C. Cholesterol and Alzheimer's disease: a still poorly understood correlation. *IUBMB Life.* 2012, 64(12):931-5.

Ries M, Carlsson C, Rowley H, Sager M, Gleason C, Asthana S, Johnson SC. Magnetic resonance imaging characterization of brain structure and function in mild cognitive impairment: a review. *J Am Geriatr Soc*. 2008; 56(5):920-34.

Roberts RO, Knopman DS, Mielke MM, Cha RH, Pankratz VS, Christianson TJH, Geda YE, Boeve BF, Ivnik RJ, Tangalos EG, Rocca WA, Petersen RC. Higher risk of progression to dementia in mild cognitive impairment cases who revert to normal. *Neurology*. 2014; 82:317-25.

Rosen WG, Mohs RC, Davis KL. A new rating scale for Alzheimer's disease. *Am J Psychiatry*. 1984; 141(11):1356-64.

Rousset O. Partial volume correction strategies in PET. *PET Clinics*, 2007.

Salmon E, Lekeu F, Garraux G, Guillaume B, Magis D, Luxen A, Moonen G, Collette F. Metabolic correlates of clinical heterogeneity in questionable Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 2008; 29(12):1823-9.

Schroeter ML, Stein T, Maslowski N, Neumann J. Neural correlates of Alzheimer's disease and mild cognitive impairment: a systematic and quantitative meta-analysis involving 1351 patients. *Neuroimage.* 2009; 47(4):1196-206.

Schuff N, Zhu X. Imaging of mild cognitive impairment and early dementia.*Br J Radiol*. 2007 Dec; 80 Spec No 2:S109-14.

Schultz RR, Siviero MO, Bertolucci PH. The cognitive subscale of the "Alzheimer's Disease Assessment Scale" in a Brazilian sample. *Braz J Med Biol Res*. 2001; 34(10):1295-302.

Sheikh JI, Yesavage JA. Geriatric Depression Scale (GDS): recent evidence and development of a shorter version. *Clin Gerontol*. 1986; 5:165-73.

Signorini M, Paulesu E, Friston K, Perani D, Colleluori A, Lucignani G, Grassi F, Bettinardi V, Frackowiak RS, Fazio F. Rapid assessment of regional cerebral metabolic abnormalities in single subjects with quantitative and nonquantitative [18F]FDG PET: a clinical validation of statistical parametric mapping. *Neuroimage*. 1999; 9(1):63-80.

Silverman D. Brain 18F-FDG PET in the diagnosis of neurodegenerative dementias: comparison with perfusion SPECT and with clinical evaluations lacking nuclear imaging. *J Nucl Med*. 2004; 45(4):594-607.

Spreen O, Strauss E, Sherman EMS. *A compendium of neuropsychological tests: administration, norms, and commentary*. 3ª Ed. New York: Oxford UnivPress; 2006.

Szczepanski S, Knight R. Insights into human behavior from lesions to the prefrontal cortex. *Neuron*. 2014; 83(5):1002-18.

Tatsuoka C, Tseng H, Jaeger J, Varadi F, Smith M, Yamada T, Smyth KA, Lerner AJ; Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative. Modeling the heterogeneity in risk of progression to Alzheimer’s disease across cognitive profiles in mild cognitive impairment. *Alzheimers Res Ther*. 2013; 5(2):14.

Teune L, Bartels AL, de Jong BM, Willemsen AT, Eshuis SA, de Vries JJ, van Oostrom JC, Leenders KL. Typical cerebral metabolic patterns in neurodegenerative brain diseases. *Mov Disord*. 2010; 25(14):2395-404.

Tucker AM, Stern Y. Cognitive reserve in aging. *Curr Alzheimer Res*. 2011; 8(4):354-60.

Vemuri P, Gunter JL, Senjem ML, Whitwell JL, Kantarci K, Knopman DS, Boeve BF, Petersen RC, Jack CR Jr. Alzheimer's disease diagnosis in individual subjects using structural MR images: validation studies. *Neuroimage*. 2008; 39(3):1186-97.

Wechsler D. *WAIS-III/WMS-III technical manual*. San Antonio: The Pshychological Corporation, 1996.

Wechsler D. *Wechsler Abbreviated Scale of Intelligence (WASI)*. New Yokr: The Psychological Corporation, 1999.

Wechsler D. *WMS-R Manual: Wechsler memory scale revised*. New York: Harcourt Brace Jovanovich, Inc, The Psychological Corporation,, 1987.

Weintraub S, Mesulam MM. Mental state assessment of young and elderly adults in behavioral neurology. In: Mesulam MM (eD.). *Principles of behavioral neurolo*gy. Philadelphia, PA: Davis Company; 1985. p. 71-123.

Winblad B, Palmer K, Kivipelto M, Jelic V, Fratiglioni L, Wahlund LO, Nordberg A, Bäckman L, Albert M, Almkvist O, Arai H, Basun H, Blennow K, de Leon M, DeCarli C, Erkinjuntti T, Giacobini E, Graff C, Hardy J, Jack C, Jorm A, Ritchie K, van Duijn C, Visser P, Petersen RC. 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.

Wolf H, Jelic V, Gertz HJ, Nordberg A, Wahlund LO. A critical discussion of the role of neuroimaging in mild cognitive impairment. *Acta Neurol Scand Suppl*. 2003; 179:52-76.

Wolfsgruber S, Jessen F, Koppara A, Kleinedam L, Schmidkte K, Frölich L, Kurz A, Schulz S, Hampel H, Heuser I, Peters O, Reischies FM, Jahn H, Luckhaus C, Hüll M, Gertz HJ, Schröder J, Pantel J, Rienhoff O, Rüther E, Henn F, Wiltfang J, Maier W, Kornhuber J, Wagner M. Subjective cognitive decline is related to CSF biomarkers of AD in patients with MCI. *Neurology*. 2015; 84(12):1261-8.

Woodward M, Brodaty H, Boundy K, Ames D, Blanch G, Balshaw R; PRIME Study Group. Does executive impairment define a frontal variant of Alzheimer's disease? *Int Psychogeriatr*. 2010; 22(8):1280-90.

World Health Organization and Alzheimer's Disease International. *Dementia: a public health priority*.. 2012; ISBN: 978 92 4 156445 8. Disponível em: <http://www.who.int/mental_health/publications/dementia_report_2012/en/>. Acesso em 3 jul 2015.

Yakushev I, Hammers A, Fellgiebel A, Schmidtmann I, Scheurich A, Buchholz H-G, Peters J, Bartenstein P, Lieb K, Schreckenberger M. SPM-based count normalization provides excellent discrimination of mild Alzheimer's disease and amnestic mild cognitive impairment from healthy aging. *NeuroImage*. 2009; 44(1):43-50.

Yanase D, Matsunari I, Yajima K, Chen W, Fujikawa A, Nishimura S, Matsuda H, Yamada M. Brain FDG PET study of normal aging in Japanese: effect of atrophy correction. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2005; 32(7):794-805.

Zakzanis K, Mraz R, Graham S. An fMRI study of the Trail Making Test. *Neuropsychologia*. 2005; 43(13):1878-86.

APÊNDICE

Apêndice A - Prova de impressão de artigo aceito para publicação, contendo parte dos dados da tese

Coutinho *et al. Alzheimer's Research & Therapy* _####################_
DOI 10.1186/s13195-015-0143-0

alzheimer's research&therapy

RESEARCH Open Access

Brain metabolism and cerebrospinal fluid biomarkers profile of non-amnestic mild cognitive impairment in comparison to amnestic mild cognitive impairment and normal older subjects

Artur M N Coutinho[1,2*], Fábio H G Porto[3], Fabio L S Duran[4], Silvana Prando[1], Carla R Ono[1], Esther A A F Feitosa[1], Lívia Spíndola[3], Maira O. de Oliveira[3], Patrícia H F do Vale[3], Helio R. Gomes[3], Ricardo Nitrini[3], Sonia M D Brucki[3] and Carlos A. Buchpiguel[1]

Abstract

Introduction: Mild cognitive impairment (MCI) is classically considered a transitional stage between normal aging and dementia. Non-amnestic MCI (naMCI) patients, however, typically demonstrate cognitive deficits other than memory decline. Furthermore, as a group, naMCI have a lower rate of an eventual dementia diagnosis as compared to amnestic subtypes of MCI (aMCI). Unfortunately, studies investigating biomarker profiles of naMCI are scarce. The study objective was to investigate the regional brain glucose metabolism (rBGM) with [^{18}F]FDG-PET and cerebrospinal fluid (CSF) biomarkers in subjects with naMCI as compared to a control group (CG) and aMCI subjects.

Methods: Ninety-five patients were included in three different groups: naMCI (N = 32), aMCI (N = 33) and CG (N = 30). Patients underwent brain MRI and [^{18}F]FDG-PET. A subsample (naMCI = 26, aMCI = 28) also had an assessment of amyloid-β, tau, and phosphorylated tau levels in the CSF.

Results: Both MCI groups had lower rBGM in relation to the CG in the precuneus. Subjects with naMCI showed decreased right prefrontal metabolism as well as higher levels of CSF amyloid-β relative to aMCI subjects.

Conclusion: While amnestic MCI subjects showed a biomarker profile classically related to MCI due to Alzheimer's disease, naMCI patients illustrated a decrease in both prefrontal hypometabolism and higher CSF amyloid-β levels relative to the aMCI group. These biomarker findings indicate that naMCI is probably a heterogeneous group with similar precuneus hypometabolism compared to aMCI, but additional frontal hypometabolism and less amyloid-β deposition in the brain. Clinical follow-up and reappraisal of biomarkers of the naMCI group is needed to determine the outcome and probable etiological diagnosis.

Introduction

Mild cognitive impairment (MCI) is assumed to be a transitional stage between normal aging and dementia. Clinically, MCI has several etiologies and includes two main subtypes, amnestic MCI (aMCI) and nonamnestic MCI (naMCI) [1]. aMCI forms are typically considered a symptomatic predementia phase of Alzheimer's disease (AD), while naMCI forms are believed to be more related to other neurodegenerative or nondegenerative conditions, such as vascular or psychiatric disorders [1]. Thus, while the heralding impairment of aMCI is characteristically a memory deficit, the naMCI subtype typically shows a greater preservation of memory function with larger degrees of deficits in the cognitive domains such as attention, language, visuospatial, and executive functions [2, 3]. Previous research has shown that in most cohorts [4, 5], but not all [6], naMCI presented a lower rate of conversion to dementia than the amnestic

* Correspondence: artur.coutinho@hc.fm.usp.br
[1]Department of Radiology/Nuclear Medicine Center/LIM43, Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil
[2]Trav. Ovídio Pires de Campos S/N, prédio do Centro de Medicina Nuclear, 2 andar – LIM43, Cerqueira Cesar, São Paulo CEP 05403-010, Brazil
Full list of author information is available at the end of the article

BioMed Central

© 2015 Coutinho et al. **Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

UNCORRECTED PROOF

subtype. Most studies indicate a preferential conversion of aMCI to AD, but other variables such as the presence of more than one affected domain, type of impairment, intensity of cognitive impairment at baseline, and presence of apolipoprotein E epsilon 4 allele may possibly influence the conversion to dementia [7].

According to the most currently accepted theory of AD physiopathology [8], if naMCI is due to disorders other than AD, then biomarkers should be different in aMCI and naMCI. Some authors have compared magnetic resonance imaging (MRI) and positron emission tomography with ^{18}F-fluordeoxyglucose ([^{18}F]FDG-PET) in both MCI subtypes, concluding that aMCI shows imaging patterns more consistent with a transition to AD, like hypometabolism in the posterior cingulate and temporoparietal regions [8], than naMCI [9–12]. However, most studies have not identified a distinct set of imaging and cerebrospinal fluid (CSF) biomarkers necessary to specifically characterize naMCI, thereby leaving ambiguity in which parameters might best classify nonamnestic forms of MCI.

Given these outstanding issues, the aim of the present study was to compare the profiles of naMCI, aMCI, and control older subjects with [^{18}F]FDG-PET (a surrogate marker of synaptic function) and CSF biomarkers (a measurement of brain amyloid deposition and neuronal injury), in efforts to not only illustrate the relationship between naMCI and aMCI CSF biomarkers, but also demonstrate synaptic functioning differences between the groups.

Materials and methods

Participants

Q9 Community-dwelling older adults (≥60 years old) were recruited through community announcements and invited to participate in meetings hosted in recreation centers throughout the city of São Paulo, Brazil. Subjects reporting any cognitive complaints were evaluated by a neurologist (FHGP). Cognitive complaints needed to be reported by the subjects and were confirmed by a collateral source, usually a relative or spouse. To be included in the study, subjects had to have completed 4 years or more of formal education, or what constitutes "primary education" in Brazil. Older volunteers without cognitive complaints were also recruited as members of the control group (CG). All participants underwent a complete neurological and psychiatric evaluation, a comprehensive neuropsychological test battery, and an assessment for symptoms of depression and anxiety. After each initial assessment, a final diagnosis was established by a consensus of neurologists with expertise in cognitive and behavioral neurology.

The revised Petersen et al. [13] criteria were used to diagnose individuals with MCI. Classification of aMCI or naMCI was determined according to the presence or absence of impairment in memory tasks (which defines aMCI), or other cognitive domains in the neuropsychological assessment [3, 13]. We considered a cognitive function or domain to be impaired if the test *Z* scores on that function were greater than 1.5 below the appropriate mean for age and education on one test, or if the *Z* scores were between 1.0 and 1.5 below the appropriate mean on more than one test of the same cognitive domain [14]. MCI patients were classified into aMCI or naMCI according to the criteria described. The domains impaired in the naMCI group were: executive/attention (n = 25), executive/attention and language (n = 5), and executive/attention and visuospatial function (n = 2).

The cognitive battery used to screen subjects included the Mini-Mental State Examination (MMSE) [15, 16] and the Brief Cognitive Battery [17] followed by the clock drawing test [18]. This battery has been shown to have good accuracy for the diagnoses of early dementia [19]. The following neuropsychological tests were used to define naMCI and aMCI: memory tests (visual reproduction and logical memory subtests of the Wechsler Memory Scale (revised), delayed recall of the Rey–Osterrieth Complex Figure, and the Rey Auditory Verbal Learning Test); constructive abilities (Block Design subtest of the Wechsler Adult Intelligence Scale, and copy of the Rey–Osterrieth Complex Figure); visual perception (matrix reasoning); and attention and executive functions (Trail Making Test (Parts A and B) and the Stroop Test). Application, scoring, and Q11 interpretation of the results obtained for all tests were performed according to each reference guide. Scores were adjusted according to appropriate age and education norms. Additional details of the evaluation protocol used, and neuropsychological tests administered, are reported in de Porto Gobbi et al. [20]. Q12

Exclusion criteria included: volunteers with clinically relevant psychiatric symptoms meeting DSM-IV criteria (the Geriatric Depression Scale (GDS) [21] and the Geriatric Anxiety Inventory [22] were administered to all MCI patients to evaluate the intensity of depressive and anxiety symptoms, respectively; patients with scores >5 on the GDS were excluded); any uncompensated clinical comorbidity, such as cardiac failure or anemia; history or presence of signs of neurologic diseases, such as Parkinson's disease, epilepsy, inflammatory disease or stroke, with the exception of migraine; presence of any drug abuse (especially alcoholism); cognitive decline intense enough to interfere with daily activities according to clinical judgment or a score of ≥5 on the Functional Activities Questionnaire [23]; cognitive decline consistent with a diagnostic of dementia according to clinical judgment; diabetes mellitus without adequate glycemic control in the last 2 weeks (excluded because of possible interference with the [^{18}F]FDG-PET); and presence of neoplastic or significant vascular lesions on the MRI scan, according to the judgment of a neuroradiologist

UNCORRECTED PROOF

Q13 (EAAFF) and one of the authors (AMNC). Individuals were not excluded based on the presence of white matter hyperintensities (WMH) on the MRI scan. The presence of WMH was an exclusionary criterion only if associated with focal neurological signs or gait impairment in the neurologic examination. No patient was using cholinesterase inhibitors or memantine. Antidepressant use was not strictly exclusionary; patients using antidepressants were allowed to participate if they were on a stable dose for at least 3 months and did not have symptoms of an active psychiatric disease at the time of screening.

This research project was approved by the ethics committee of the Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, and was in agreement with the provisions of the Declaration of Helsinki. All participants signed a term of consent.

CSF analysis

Of the 65 MCI patients enrolled, 54 (aMCI, 28 patients; naMCI, 26 patients) agreed to have a lumbar puncture Q14 to assess amyloid beta (Aβ), tau, and phosphorylated tau (p-tau) protein levels in the CSF. Lumbar punctures were performed after an 8-hour fast, always between 8:00 and 10:00 a.m. A 22-gauge spinal needle was inserted between the fourth or fifth lumbar vertebral body by a trained neurologist. Approximately 10 ml CSF were taken. All of the samples were collected in polypropylene tubes, briefly centrifuged, and stored at a temperature of −80 °C. Total tau, p-tau, and Aβ were determined quantitatively using a commercial sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (Innotest hTAUAg Innotest _amyloid 1–42; Innogenetics, Ghent, Belgium).

MRI acquisition

After the initial work-up, all patients underwent a 3.0 Tesla MRI scan to exclude structural diseases and also for co-registration with [^{18}F]FDG-PET images. Following the procedure outlined in Fazekas et al. [24], a neuroradiologist (EAAFF) performed a visual semi-quantitative assessment of a WMH scale, using the axial FLAIR se- Q15 quence. The following MRI sequences were acquired: sagittal 3D T1, axial T2 FSE, axial FLAIR, coronal T2 SPIR, and diffusion.

[^{18}F]FDG-PET imaging acquisition

To ensure blood glucose levels lower than 180 mg/ml, participants fasted for at least 4 hours prior to the intravenous injection of 370 MBq [^{18}F]FDG in a peripheral vein. Following the tracer injection, patients rested with eyes open and ears unplugged for 60 minutes in a calm, silent and slightly darkened room. Acquisition of the [^{18}F]FDG-PET data was run for 15 minutes (matrix = 256 × 256, zoom = 2.5, pixel size = 1.04 mm) using a Siemens Biograph PET-CT scanner (CTI/Siemens, Knoxville, TN, USA). Images were reconstructed with the ordered subset expectation maximization method (with six interactions and 16 subsets) and then smoothed with a 5 mm Gaussian filter. Data were also Q16 corrected for scattering, attenuation, and decay. Attenuation correction was performed using single helical computed tomography.

[^{18}F]FDG-PET imaging processing and analysis with SPM8

The following procedures were validated previously [25] and are used as a standard for PET and SPECT explora- Q17 tive analyses. All PET images of the participants were co-registered with the their MRI images (volumetric T1 sequence) and spatially normalized in SPM8 software (Wellcome Department of Cognitive Neurology, Functional Imaging Laboratory, London, UK) into a standard stereotactic space, based on the SPM8/Montreal Neurologic Institute space, using a 12-parameter linear affine normalization and a further nonlinear iteration algorithm. This was performed using an SPM8 template for [^{18}F]FDG-PET. Each of the scans was also individually smoothed with a Gaussian kernel to reduce the impact of misregistration into template space and to improve the signal-to-noise ratio. Images were then smoothed with a 4 mm full-width Gaussian kernel at half-maximum Gaussian filter. To ensure the analysis only included voxels mapping cerebral tissue, a default threshold of 0.8 of the mean uptake inside the brain was selected. Global uptake differences between brain scans were adjusted using the "proportional scaling" statistical parametric mapping (SPM) option. Once adjusted, radioactive counts for each participant were normalized with the average global counts of each group (i.e., the "global means" normalization approach). The relevant peak voxels were identified in terms of coordinates according to Talairach and Tournoux with the help of the Talairach Client software, and after conversion from the SPM/Montreal Q18 Neurological Institute space [26, 27].

Statistical analysis

Clinical and CSF data analyses were performed using SPSS version 17.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). PET data were analyzed on a voxel-by-voxel basis using the SPM8 software (Wellcome Department of Cognitive Neurology) in conjunction with MATLAB R2009a (The Mathworks Inc., USA). An analysis of variance (ANOVA) Q19 test was used to search for regional brain glucose metabolism (rBGM) differences across the three groups (naMCI, aMCI, and CG).

Post-hoc analyses with nonpaired t tests were used to examine differences between each pair of groups. SPM8 maps were generated with p <0.001 and the threshold for significance at the voxel level was set at p = 0.001 (Z score = 3.09) with a minimum extension of 10 voxels

UNCORRECTED PROOF

in the corresponding cluster. This is a classical threshold for functional PET and functional MRI studies [25], and has been used previously in studies related to MCI [9, 11, 28]. The initial exploratory analyses with SPM maps generated a t statistic for each voxel, thus constituting statistical parametric maps.

To explore the homogeneity of rBGM alterations between groups in particular areas, the higher Z scores within each map were identified, and a volumetric region of interest (ROI) in the corresponding cluster of voxels was generated. Subsequently, numeric values representing [^{18}F]FDG uptake measures in that cluster for each individual (after the whole normalization process) were obtained with the toolbox MarsBar for SPM [29] under the option "explore design/files and factors". With this approach, regions of particular interest—voxels in the precuneus—could be better explored.

A directed analysis of ROIs was also completed with the SPM8 software (small volume correction (SVC)). Areas in the temporoparietal association cortex were chosen based on previous reports of regions with typical metabolic impairment in early AD [30, 31]. The following areas were analyzed: posterior cingulate cortex, precuneus, angular gyrus, middle temporal gyrus, and inferior temporal gyrus.

Results

Ninety-five volunteers were included and classified into one of three groups: aMCI group (aMCI; n = 33), naMCI group (naMCI; n = 32), or without cognitive impairment group (CG; n = 30). Demographic, clinical, and CSF data are presented in Table 1. The CG had more years of formal education than aMCI patients (mean (M) and standard deviation (SD) of 12.9 (4.9) and 9.2 (4.0), respectively; p = 0.017). The MMSE was different between the CG and both MCI groups (M (SD) = 29.0 (1.0), 27.6 (1.5), and 27.8 (1.9) for CG, aMCI, and naMCI, respectively; p <0.000). No differences were found in age, gender, education, intensity of depressive or anxiety symptoms, presence of hypertension and diabetes, or MMSE scores among the aMCI and naMCI groups. Visual analysis of WMH [24] disclosed no differences across the groups.

In the subsample with available lumbar puncture (n = 54; aMCI, 28 patients; naMCI, 26 patients), CSF biomarker analysis depicted lower concentrations of CSF Aβ peptide in aMCI in relation to naMCI (M (SD) = 704 (248) and 918 (430), respectively; p = 0.04). No differences were found in tau, p-tau, and p-tau/Aβ protein ratio measures. To facilitate the visualization of the dispersion of CSF biomarkers values among aMCI and naMCI patients, Fig. 1a shows box-plot graphics of the Z scores (two groups combined) for CSF Aβ, tau, p-tau, and CSF Aβ/p-tau ratio.

Complete SPM8 data are presented in Table 2 and comprise the region of rBGM alterations in the ANOVA test and rBGM reductions in the post-hoc analysis, as well as its extension (number of voxels) and level of statistical significance. When compared with CG, naMCI exhibited statistically significant [^{18}F]FDG-PET rBGM reductions in the following Broadmann areas (BAs): right middle frontal gyrus (BA8 and BA9, p <0.001; and BA10, p = 0.001), right inferior frontal gyrus (BA9, p <0.001), two contiguous areas in the precuneus (BA7, p = 0.001), and another area in the left superior occipital gyrus (BA19, p <0.001). The naMCI group exhibited reduced rBGM in right middle frontal gyrus (BA46, p <0.001) in relation to aMCI.

The aMCI group showed decreased rBGM in relation to CG in the left precuneus (BA7 and BA31, p <0.001) and in the left middle temporal gyrus (BA39, p <0.001). When compared with naMCI, aMCI showed reduced rBGM in the left temporal lobe (p <0.001). Figure 2 shows an illustrative anatomic localization of the peak voxels of rBGM reductions as measured with [^{18}F]-FDG-PET.

Results from the ANOVA indicated a significantly larger number of years of education for the control group relative to aMCI subjects (p = 0.01, CG >aMCI). The ANOVA also showed a statistical tendency for the CG to be slightly older than aMCI subjects (p = 0.06). Because these variables—especially education—could possibly influence the metabolic pattern in prodromal AD [32, 33], an analysis controlling for age and education was conducted; the results were not significantly changed after controlling for age and education.

SVC analysis of the temporoparietal association cortex of the aMCI and naMCI groups against the CG disclosed significant areas of rBGM reduction, after correction for multiple comparisons (family-wise error correction method (FWE)), in the left precuneus (BA31) in the aMCI group (p_{FWE} = 0.025) and in two contiguous areas in the left angular gyrus (BA39) in the naMCI group (p_{FWE} = 0.033 and 0.040).

The authors also designed ROIs to extract mean radioactive counts of the areas with statistically significant rBGM reduction in the precuneus of the three groups (as detailed in Materials and methods). Box-plot graphics were also generated in efforts to investigate the possible heterogeneity of neurodegeneration in these areas across all subjects. The results are shown in Fig. 1b.

Discussion

Our results showed that naMCI patients presented a reduction of rBGM in the right prefrontal cortex relative to control patients, and in the right middle frontal gyrus relative to aMCI patients. Both MCI groups presented decreased rBGM with similar localization of decline, the precuneus, in relation to the CG. Additionally, the aMCI group had significantly lower levels of CSF Aβ peptide,

UNCORRECTED PROOF

Table 1 Demographic, neuropsychological, and CSF data for the sample

	CG (n = 30)	aMCI (n = 33)	naMCI (n = 32)	p value (two-tailed) Multiple comparison
Age (years)[a]	69.5 (6.4)	72.6 (5.5)	69.8 (5.8)	0.065
Gender (female/male)[b]	24/6	20/13	23/9	0.23
Education (years)[a]	12.9 (4.9)	9.2 (4.0)	11.8 (4.3)	0.018 CG × aMCI (p = 0.017)
GDS[c]	–	1.5 (1.3)	1 (1.4)	0.113
GAI[c]	–	6.6 (4.3)	5.1 (4.1)	0.181
Hypertension[b]	–	19 (57 %)	15 (46 %)	0.388
Diabetes mellitus[b]	–	7 (21 %)	3 (9 %)	0.186
MMSE[a]	29.0 (1.0)	27.6 (1.5)	27.8 (1.9)	0.000 CG × aMCI and naMCI (p <0.003)
CSF Aβ[c,d]	–	704 (248)	918 (430)	0.044
CSF tau[c,d]	–	258 (125)	247 (110)	0.84
CSF p-tau[c,d]	–	44 (12)	43 (14)	0.97
CSF p-tau/Aβ protein[d]		0.07 (0.05)	0.06 (0.04)	0.13
WMH visual scale[b] [24]	0: 06 (20 %)	0: 04 (12 %)	0: 04 (13 %)	0.525
	I: 13 (43 %)	I: 16 (49 %)	I: 18 (56 %)	
	II: 08 (27 %)	II: 09 (27 %)	II: 10 (31 %)	
	III: 03 (10 %)	III: 04 (12 %)	III: 0 (0 %)	

Data presented as mean (standard deviation)
[a]Analysis of variance (post-hoc test: Bonferroni)
[b]Chi-square test
[c]t test
[d]Subsample of 54 subjects (26 naMCI patients and 28 aMCI patients), Mann–Whitney test (not normally distributed)
aMCI amnestic mild cognitive impairment, *Aβ* amyloid beta, *CG* control group, *CSF* cerebrospinal fluid, *GAI* Geriatric Anxiety Scale, *GDS* Geriatric Depression Scale (15 items), *MMSE* Mini-Mental State Examination, *naMCI* nonamnestic mild cognitive impairment, *p-tau* phosphorylated-tau, *WMH* white matter hyperintensities

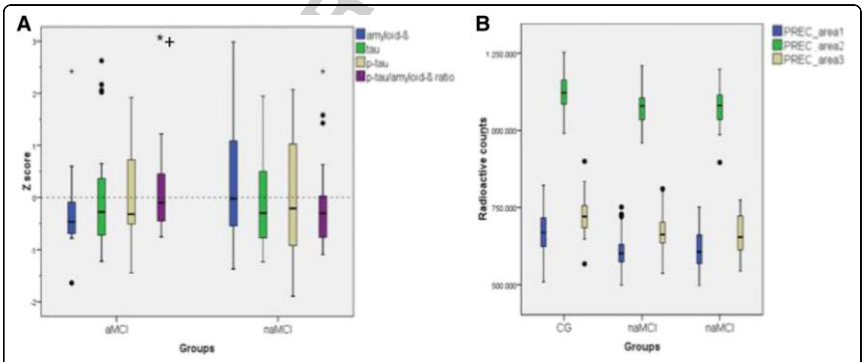


Fig. 1 Box-plot graphics for CSF biomarkers and mean radioactive counts. **a** *Z* scores for CSF Aβ, tau, p-tau, and p-tau/Aβ ratio proteins in each group. **b** Mean radioactive counts in the three areas of the precuneus which presented rBGM differences between aMCI and CG (PREC_area 1 and 2) and naMCI and CG (PREC_area 3). *1.5 times the interquartile range, *more than 1.5 times the interquartile range; +value is actually 5.1 SD (outlier). *aMCI* amnestic mild cognitive impairment, *CG* control group, *naMCI* nonamnestic mild cognitive impairment, *p-tau* phosphorylated tau

UNCORRECTED PROOF

Table 2 rBGM comparison between aMCI, naMCI, and CG using SPM8[a]

	Z score	*p* value	Cluster size (number of voxels)	Peak voxel coordinates (Talairach)		
aMCI × CG[b]						
Left middle temporal gyrus, BA39	3.51	<0.001	41	−46	−67	20
Left precuneus, BA31	3.17	<0.001	33	−4	−51	32
Left precuneus, BA7	3.33	<0.001	15	−2	−63	64
aMCI × naMCI[b]						
Left temporal lobe	3.62	<0.001	167	−44	−45	2
naMCI × control group[b]						
Right inferior frontal gyrus, BA9	3.80	<0.001	34	46	11	29
Right middle frontal gyrus, BA9	3.40	<0.001	51	34	34	28
Right middle frontal gyrus, BA8	3.32	<0.001	51	32	29	39
Right middle gyrus, BA10	3.24	0.001	11	38	45	16
Left superior occipital gyrus, BA19	3.42	<0.001	41	−42	−72	28
Left precuneus, BA7	3.20	0.001	32	0	−63	60
Left parietal lobe, BA7	3.16	0.001	32	−4	−62	70
naMCI × aMCI[b]						
Right middle frontal gyrus, BA46	3.33	<0.001	19	51	29	26

[a]Results at the peak voxel level (global analysis, analysis of variance and post-hoc nonpaired *t* test). SPM8 software from Wellcome Department of Cognitive Neurology (Functional Imaging Laboratory, London, UK)
[b]Uncorrected for multiple comparisons
aMCI amnestic mild cognitive impairment, *BA* Broadmann area, *CG* control group, *naMCI* nonamnestic mild cognitive impairment, *rBGM* regional brain glucose metabolism

UNCORRECTED PROOF

indicating increased deposition in the brain, and decreased left temporal lobe metabolism relative to the naMCI group.

Reduction of rBGM in the precuneus was seen in both the aMCI and naMCI groups relative to the CG. This area is believed to be an important component of the default mode network, a network that is structurally and functionally affected in normal aging and more prominently, and very early, in AD [34–36]. The precuneus and posterior cingulate cortex seem to be particularly vulnerable to Aβ deposition and metabolic dysfunction [36, 37]. Lower rBGM and cerebral blood flow in this region are commonly associated with a faster rate of progression from MCI to AD [28, 30, 31, 38].

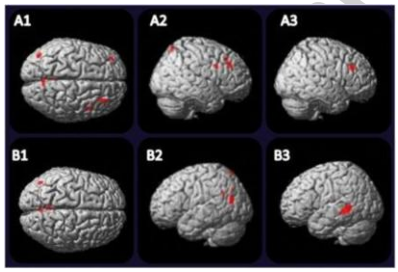


Fig. 2 Illustrative anatomic localization of the peak voxels of rBGM reductions as measured with [^{18}F]-FDG-PET. **a1**, **a2** naMCI rBGM reductions in relation to the CG, predominantly in right prefrontal areas but also in the precuneus and a left prefrontal area without statistic significance; **a3** naMCI rBGM reductions in relation to the aMCI group (right prefrontal area). **b1**, **b2** Bilateral metabolic reduction in the precuneus, parietal, and temporal cortex is seen in the aMCI group in comparison with normal older subjects; **b3** hypometabolism is also noted the left temporal lobe in aMCI in relation to naMCI

These results indicate that both the aMCI and naMCI groups have significant rBGM reductions in the posteromedial parietal cortex relative to the CG. These data are in line with Clerici et al. [9], who found that subjects with single-domain aMCI and naMCI have significant medial parietal cortex (posterior cingulate cortex) hypometabolism in relation to normal older subjects. The authors also reported additional metabolic reductions in the medial temporal lobe of aMCI in relation to naMCI, which was not replicated in the results outlined in the present article. However, our results do indicate that aMCI subjects still had a reduction of rBGM in the left temporal lobe not seen in naMCI (Table 2).

Our findings—that there is an rBGM reduction in the right prefrontal areas in the naMCI group in relation to the CG, and to a lesser extent in relation to the aMCI group—suggest there is some relation with an rBGM reduction in the right prefrontal areas and the impairments of executive function and attention, but not

memory deficits, presented by naMCI patients. The dorsolateral prefrontal cortex is classically associated with executive functions and has strong anatomic and functional connections to attentional and executive brain networks [39, 40]. These findings are in agreement with previous studies that revealed blood flow and volumetric reductions in frontal lobes of patients with naMCI [10, 11].

A volumetric reduction in the left dorsolateral prefrontal cortex was shown in single-domain dysexecutive MCI relative to the control group [11]. Nobili et al. [10] reported blood flow reductions in the right frontal cortex of naMCI patients as compared with patients with subjective memory complaints. However, methodological differences such as a high rate of depression and WMH in the naMCI group, use of SPECT instead of PET, and the analysis of preselected ROIs disallow an easy comparison between the results presented in the present study and those published previously. In the former study, vascular disease or depression may have accounted in part for the frontal hypoperfusion. Small white matter and subcortical vascular lesions correlate negatively with dorsolateral prefrontal cortex activity, and thus could be responsible for executive and attentional dysfunctions [41, 42]. As described, any subjects with clinically diagnosed depression, depression that restricted normal daily activity, or cerebral infarcts were excluded. Notably, we found no differences in cerebrovascular risk factors and WMH intensity on MRI across the groups. Thus, even though MRI may miss cortical microinfarcts in some cases, vascular disease is unlikely to be the main cause of the frontal hypometabolism in the naMCI group [43].

aMCI subjects had lower levels of Aβ peptide as compared with the naMCI subjects (Table 1). A meta-analysis of the relationship between brain amyloid biomarkers in normal older adults suggested a closer relationship between brain amyloid with memory function than with other cognitive functions [44]. A similar correlation has been shown in aMCI but not naMCI patients [45]. The fact that lower Aβ levels in the CSF are thus linked to a greater deposition of amyloid plaques in the brain possibly indicates that the aMCI subgroup is more similar to a pathological state of AD than the naMCI group [46, 47]. This relationship further suggests that aMCI patients are more likely than naMCI patients to be diagnosed with AD in the future [48]. In line with our finding, lower cortical Aβ deposition measured with [^{11}C]PIB-PET was also found in naMCI in comparison with aMCI [49].

There was no difference in tau and p-tau proteins levels between the aMCI and naMCI groups. The tau and p-tau proteins are associated with neurofibrillary tangles, which are more associated with synaptic dysfunction, brain atrophy, and cognitive and functional impairment than Aβ [8, 46, 47]. Together with brain atrophy and [^{18}F]FDG-PET hypometabolism, tau and p-tau are classified as biomarkers of neural injury or degeneration [8]. The CSF tau and p-tau results are in partial agreement with the [^{18}F]FDG-PET findings, showing similar precuneus hypometabolism in both MCI groups, thereby potentially indicating that the two MCI groups are not in different stages of neural degeneration. Interestingly, a recent study found cognitively normal subjects with positive biomarkers of neurodegeneration and no Aβ accumulation [50]. Those same subjects, however, later developed Aβ deposits [50], indicating that the trajectories of Aβ accumulation and injury biomarkers may be independent from one another [51]. These findings may help explain the results in the biomarker profile of the present study's naMCI group, which showed similar neuronal injury biomarkers in both MCI groups but less brain Aβ deposition in naMCI patients.

The additional frontal hypometabolism in naMCI, however, remains an open question. Cerami et al. [52] recently reported a follow-up cohort study of MCI accessed with [^{18}F]FDG-PET at diagnosis, including eight naMCI patients. In Cerami et al.'s study, two patients with naMCI and frontal hypometabolism later developed frontotemporal lobar degeneration (FTLD), implying that FTLD remains a possible explanation for the development of frontal hypometabolism in naMCI patients. The authors of the current study believe this explanation to be unlikely, however, primarily because none of our participants presented with behavioral changes, which are a major clinical feature in FTLD and were an exclusionary criterion in our study.

Executive dysfunction and impaired attention are both unspecific findings that are related to the prefrontal cortex [39, 40, 53], and may be present in several etiologies without concomitant neurodegeneration, such as in psychiatric diseases [53]. The hypometabolism seen in the naMCI group may therefore be due to a "functional network dysregulation" of the attentional and executive networks, although with still unknown origin.

Clinical follow-up and reappraisal of biomarkers for the naMCI group is crucial in determining the outcome and probable etiological diagnosis of naMCI patients. The naMCI group could be composed of patients with different etiological entities, such as aging-associated executive and processing speed dysfunctions [37], prodromic presentation of non-AD neurodegenerative diseases [52], atypical presentations of AD (e.g., frontal executive AD) [54], nondegenerative cognitive impairment (e.g., vascular disease), and even preamnestic forms of MCI owing to AD. Follow-up is fundamental in drawing any conclusions about this issue. Taking into account the possibility of non-Aβ degeneration [50, 51] and the fact that executive function is an unspecific finding, naMCI is probably a different type of degeneration than aMCI, not necessarily a milder one. This distinction can only be clarified with a long-term follow-up.

UNCORRECTED PROOF

Our study has some limitations. First, because naMCI probably represents a heterogeneous group, additional studies with larger patient samples are needed. Second, additional investigations of naMCI samples should be performed using other imaging biomarkers modalities, such as volumetric analysis with MRI, and other variables, such as genetic analysis, measures of cognitive reserve, lifestyle, and so forth. Third, [^{18}F]FDG-PET imaging was acquired in the resting state. For that reason, discussions relating rBGM to neuropsychological functions (i.e., frontal hypometabolism and executive function) should be considered only speculative; more investigation is warranted before these observations can be confirmed. Finally, our patient population was a convenience sample from the community; future studies would benefit from incorporating a variety of different populations (e.g., subjects from a tertiary memory clinic).

Conclusions

The naMCI and aMCI groups presented some similarities in their biomarker profile. Both groups presented the same levels of tau and p-tau proteins in the CSF and a reduction of rBGM in parietal areas (mainly the precuneus) relative to controls. However, some important differences were noted between the two groups: aMCI patients had lower levels of Aβ peptide in the CSF and left temporal hypometabolism and increased right prefrontal cortex rBGM relative to naMCI patients. Ultimately, these results illustrate that aMCI patients had a biomarker profile more similar to MCI owing to AD, while naMCI patients illustrate a different—and varied—pattern of degeneration.

Abbreviations

[^{18}F]FDG-PET: Positron emission tomography with 18F-fluordeoxyglucose; AD: Alzheimer's disease; aMCI: Amnestic mild cognitive impairment; Aβ: Amyloid beta; ANOVA: Analysis of variance; BA: Broadmann area; CG: Control group; CSF: Cerebrospinal fluid; FTLD: Frontotemporal lobar degeneration; FWE: Family-wise error correction method; GDS: Geriatric Depression Scale; M: Mean; MCI: Mild cognitive impairment; MMSE: Mini-Mental State Examination; MRI: Magnetic resonance imaging; naMCI: Nonamnestic mild cognitive impairment; p-tau: Phosphorylated tau; rBGM: Regional brain glucose metabolism; ROI: Region of interest; SD: Standard deviation; SPM: statistical parametric mapping; SVC: Small volume correction; WMH: White matter hyperintensities.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

AMNC and FHGP conceived of the study, participated in its design and coordination, and drafted the manuscript. RN, SMDB, and CAB participated in study design and coordination. FLSD and SP performed statistical analysis with SPM. LS, MOdO, and PHFdV performed neuropsychological evaluations. CRO and EAAFF reviewed all the neuroimaging data. HRG performed CSF measurements. All authors revised the final manuscript critically for important intellectual content and approved the final version.

Acknowledgements

The authors thank Dr Kirk Daffner for his critical comments and review of the manuscript, as well as Dr Igor Yakushev for all his important help with MarsBar for SPM. This study was funded by grants from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) numbers 2011/18245-4 and 2009/17398-1 in Brazil. FHGP was also sponsored by the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES)/Brazil and Lemann Foundation, as part of his PhD research in the program Science without Borders (number 99999.003029/2014-00).

Author details

[1]Department of Radiology/Nuclear Medicine Center/LIM43, Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil. [2]Trav. Ovídio Pires de Campos S/N, prédio do Centro de Medicina Nuclear, 2 andar – LIM43, Cerqueira Cesar, São Paulo CEP 05403-010, Brazil. [3]Department of Neurology, Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil. [4]Department of Psychiatry/LIM21, Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil.

Received: 12 May 2015 Accepted: 18 August 2015

References

1. Petersen RC, Smith GE, Waring SC, Ivnik RJ, Tangalos EG, Kokmen E. Mild cognitive impairment: clinical characterization and outcome. Arch Neurol. 1999;56:303–8.
2. Peterson RC. Mild cognitive impairment. N Engl J Med. 2011;364:2227–34.
3. 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. 2014;256:240–6.
4. Espinosa A, Alegret M, Valero S, Vinyes-Junqué G, Hernández I, Mauleón A, et al. A longitudinal follow-up of 550 mild cognitive impairment patients: evidence for large conversion to dementia rates and detection of major risk factors involved. J Alzheimers Dis. 2013;34:769–80.
5. Tatsuoka C, Tseng H, Jaeger J, Varadi F, Smith MA, Yamada T, et al. Modeling the heterogeneity in risk of progression to Alzheimer's disease across cognitive profiles in mild cognitive impairment. Alzheimers Res Ther. 2013;5:14.
6. Han JW, Kim TH, Lee SB, Park JH, Lee JJ, Huh Y, et al. Predictive validity and diagnostic stability of mild cognitive impairment subtypes. Alzheimers Dement. 2012;8:553–9.
7. Mitchell AJ, Shiri-Feshki M. Rate of progression of mild cognitive impairment to dementia: meta-analysis of 41 robust inception cohort studies. Acta Psychiatr Scand. 2009;119:252–65.
8. Jack CR, Knopman DS, Jagust WJ, Petersen RC, Weiner MW, Aisen PS, et al. Tracking pathophysiological processes in Alzheimer's disease: an updated hypothetical model of dynamic biomarkers. Lancet Neurol. 2013;12:207–16.
9. Clerici F, Del-sole A, Chiti A, Maggiore L, Lecchi M, Pomati S, et al. Differences in hippocampal metabolism between amnestic and non-amnestic MCI subjects: automated FDG-PET image analysis. Q J Nucl Med Mol Imaging. 2009;53:646–57.
10. Nobili F, Frisoni GB, Portet F, Verhey F, Rodriguez G, Caroli A, et al. Brain SPECT in subtypes of mild cognitive impairment. Findings from the DESCRIPA multicenter study. J Neurol. 2008;255:1344–53.
11. Pa J, Boxer A, Chao LL, Gazzaley A, Freeman K, Kramer J, et al. Clinical-neuroimaging characteristics of dysexecutive mild cognitive impairment. Ann Neurol. 2009;65:414–23.
12. He J, Farias S, Martinez O, Reed B, Mungas D, Decarli C. Differences in brain volume, hippocampal volume, cerebrovascular risk factors, and apolipoprotein E4 among mild cognitive impairment subtypes. Arch Neurol. 2009;66:1393–9.
13. Petersen RC, Roberts RO, Knopman DS, Boeve BF, Geda YE, Ivnik RJ, et al. Arch Neurol. 2009;66:1447–55
14. Clark L, Delano-Wood L, Libon D, McDonald C, Nation D, Bangen KJ, et al. Are empirically-derived subtypes of mild cognitive impairment consistent with conventional subtypes? J Int Neuropsychol Soc. 2013;19:635–45.
15. Folstein MF, Folstein SE, McHugh PR. "Mini-mental state". A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. J Psychiatr Res. 1975;12:189–98.

UNCORRECTED PROOF

16. Brucki SMD, Nitrini R, Caramelli P, Bertolucci PH, Okamoto IH. Sugestões para o uso do mini-exame do estado mental no Brasil. Arq Neuropsiquiatr. 2003;61:777–81.
17. Nitrini R, Caramelli P, Porto CS, Charchat-Fichman H, Formigoni AP, Carthery-Goulart, et al. Brief cognitive battery in the diagnosis of mild Alzheimer's disease in subjects with medium and high levels of education. Dement Neuropsychol. 2007;1:32–6.
18. Sunderland T, Hill JL, Mellow AM, Lawlor BA, Gundersheimer J, Newhouse PA, et al. Clock drawing in Alzheimer's disease: a novel measure of dementia severity. J Am Geriatr Soc. 1989;37:725–9.
19. Takada LT, Caramelli P, Fichman HC, Porto CS, Bahia VS, Anghinah R, et al. Comparison between two tests of delayed recall for the diagnosis of dementia. Arq Neuropsiquiatr. 2006;64:35–40.
20. de Gobbi Porto FH, Spindola L, de Oliveira MO, Vale PH F d, Orsini M, Nitrini R. A score based on screening tests to differentiate mild cognitive impairment from subjective memory complaints. Neurol Int. 2013;5, e16.
21. Sheikh JI, Yesavage JA. Geriatric Depression Scale (GDS): recent evidence and development of a shorter version. Clin Gerontol. 1986;5:165–73.
22. Pachana NA, Byrne GJ, Siddle H, Koloski N, Harley E, Arnold E. Development and validation of the Geriatric Anxiety Inventory. Int Psychogeriatr. 2007;19:103–14.
23. Pfeffer RI, Kurosaki TT, Harrah Jr CH, Chance JM, Filos S. Measurement of functional activities in older adults in the community. J Gerontol. 1982;37:323–9.
24. Fazekas F, Chawluk JB, Alavi A, Hurtig WI, Zimmerman RA. MR signal abnormalities at 1.5 T in Alzheimer's dementia and normal aging. AJR Am J Roentgenol. 1987;149:351–6.
25. Signorini M, Paulesu E, Friston K, Perani D, Colleluori A, Lucignani G, et al. Rapid assessment of regional cerebral metabolic abnormalities in single subjects with quantitative and nonquantitative [18F]FDG PET: a clinical validation of statistical parametric mapping. Neuroimage. 1999;9:63–80.
26. Lancaster JL, Woldorff MG, Parsons LM, Liotti M, Freitas CS, Rainey L, et al. Automated Talairach atlas labels for functional brain mapping. Hum Brain Mapp. 2000;10:120–31.
27. Lancaster JL, Rainey LH, Summerlin JL, Freitas CS, Fox PT, Evans AC, et al. Automated labeling of the human brain: a preliminary report on the development and evaluation of a forward-transform method. Hum Brain Mapp. 1997;5:238–42.
28. Drzezga A, Lautenschlager N, Siebner H, Riemenschneider M, Willoch F, Minoshima S, et al. Cerebral metabolic changes accompanying conversion of mild cognitive impairment into Alzheimer's disease: a PET follow-up study. Eur J Nucl Med Mol Imaging. 2003;30:1104–13.
29. MarsBaR region of interest toolbox for SPM. http://marsbarsourceforge.net/ (2015).
30. Jagust WJ, Landau SM, Shaw LM, Trojanowski JQ, Koeppe RA, Reiman EM, et al. Relationships between biomarkers in aging and dementia. Neurology. 2009;73:1193–9.
31. Landau SM, Harvey D, Madison CM, Koeppe RA, Reiman EM, Foster NL, et al. Associations between cognitive, functional, and FDG-PET measures of decline in AD and MCI. Neurobiol Aging. 2011;32:1207–18.
32. Garibotto V, Borroni B, Kalbe E, Herholz K, Salmon E. Education and occupation as proxies for reserve in aMCI converters and AD FDG-PET evidence. Neurology. 2008;71:1342–9.
33. Morbelli S, Perneczky R, Drzezga A, Frisoni G, Caroli A, Berckel B, et al. Metabolic networks underlying cognitive reserve in prodromal Alzheimer disease: a European Alzheimer disease consortium project. J Nucl Med. 2013;54:894–902.
34. Buckner R. The serendipitous discovery of the brain's default network. Neuroimage. 2012;62:1137–45.
35. Leech R, Sharp D. The role of the posterior cingulate cortex in cognition and disease. Brain. 2014;137:12–32.
36. Buckner RL, Snyder AZ, Shannon BJ, LaRossa G, Sachs R, Fotenos AF, et al. Molecular, structural, and functional characterization of Alzheimer's disease: evidence for a relationship between default activity, amyloid, and memory. J Neurosci. 2005;25:7709–17.
37. Fjell A, McEvoy L, Holland D, Dale A, Walhovd K. Alzheimer's disease neuroimaging initiative. What is normal in normal aging? Effects of aging, amyloid and Alzheimer's disease on the cerebral cortex and the hippocampus. Prog Neurobiol. 2014;117:20–40.
38. Johnson KA, Moran EK, Becker JA, Blacker D, Fischman AJ, Albert MS. Single photon emission computed tomography perfusion differences in mild cognitive impairment. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 2007;78:240–7.
39. Szczepanski S, Knight R. Insights into human behavior from lesions to the prefrontal cortex. Neuron. 2014;83:1002–18.
40. Li W, Qin W, Liu H, Fan L, Wang J, Jiang T, et al. Subregions of the human superior frontal gyrus and their connections. Neuroimage. 2013;78:46–58.
41. Reed BR, Eberling JL, Mungas D, Weiner M, Kramer JH, Jagust WJ. Effects of white matter lesions and lacunes on cortical function. Arch Neurol. 2004;61:1545–50.
42. Murray ME, Senjem ML, Petersen RC, Hollman JH, Preboske GM, Weigand SD, et al. Functional impact of white matter hyperintensities in cognitively normal elderly. Arch Neurol. 2010;67:1379–85.
43. Gouw A, Seewann A, Flier W, Barkhof F, Rozemuller A, Scheltens P, et al. Heterogeneity of small vessel disease: a systematic review of MRI and histopathology correlations. J Neurol Neurosurg Psychiatr. 2011;82:126–35.
44. Hedden T, Oh H, Younger AP, Patel TA. Meta-analysis of amyloid-cognition relations in cognitively normal older adults. Neurology. 2013;80:1341–8.
45. Haldenwanger A, Eling P, Kastrup A, Hildebrandt H. Correlation between cognitive impairment and CSF biomarkers in amnesic MCI, non amnesic MCI, and Alzheimer's disease. J Alzheimers Dis. 2010;22:971–80.
46. 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;5:228–34.
47. Mattsson N, Zetterberg H, Hansson O, Andreasen N, Parnetti L, Jonsson M, et al. CSF biomarkers and incipient Alzheimer disease in patients with mild cognitive impairment. JAMA. 2009;302:385–93.
48. Alexopoulos P, Guo LH, Jiang M, Bujo H, Grimmer T, Förster S, et al. Amyloid cascade and tau pathology cerebrospinal fluid markers in mild cognitive impairment with regards to Alzheimer's disease cerebral metabolic signature. J Alzheimers Dis. 2013;36:401–8.
49. Pike KE, Savage G, Villemagne VL, Ng S, Moss SA, Maruff P, et al. Beta-amyloid imaging and memory in non-demented individuals: evidence for preclinical Alzheimer's disease. Brain. 2007;130:2837–44.
50. Jack Jr CR, Wiste HJ, Weigand SD, Knopman DS, Lowe V, Vemuri P, et al. Amyloid-first and neurodegeneration first profiles characterize incident amyloid PET positivity. Neurology. 2013;81:1732–40.
51. Jack Jr CR, Wiste HJ, Knopman DS, Vemuri P, Mielke MM, Weigand SD, et al. Rates of b-amyloid accumulation are independent of hippocampal neurodegeneration. Neurology. 2014;82:1605–12.
52. Cerami C, Della Rosa PA, Magnani G, Santangelo R, Marcone A, Cappa SF, et al. Brain metabolic maps in mild cognitive impairment predict heterogeneity of progression to dementia. Neuroimage Clin. 2015;7:187–94.
53. Rabinovici GD, Stephens ML, Possin KL. Executive dysfunction. Continuum (Minneap Minn). 2015;21:646–59.
54. Woodward M, Brodaty H, Boundy K, Ames D, Blanch G, Balshaw R. Does executive impairment define a frontal variant of Alzheimer's disease? Int Psychogeriatr. 2010;22:1280–90.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit

BioMed Central

UNCORRECTED PROOF