



FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE COIMBRA
MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA – TRABALHO FINAL

PEDRO MIGUEL ROSADO ALBUQUERQUE

Relevância dos biomarcadores de Neurodegeneração e de
Patologia Tau no Diagnóstico da Doença de Alzheimer

ARTIGO CIENTÍFICO ORIGINAL

ÁREA CIENTÍFICA DE NEUROLOGIA

Trabalho realizado sob a orientação de:

DOUTORA INÊS ESTEVES BALDEIRAS

PROFESSORA DOUTORA MARIA ISABEL JACINTO SANTANA

MARÇO/2023

FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE COIMBRA

TRABALHO FINAL DO 6º ANO MÉDICO COM VISTA À ATRIBUIÇÃO DO GRAU
DE MESTRE NO ÂMBITO DO CICLO DE ESTUDOS DE MESTRADO INTEGRADO
EM MEDICINA

Relevância dos Biomarcadores de Neurodegeneração e de Patologia Tau no Diagnóstico da Doença de Alzheimer

Relevance of Neurodegeneration and Tauopathy biomarkers in Alzheimer's Disease
diagnosis

Autores:

Pedro Miguel Rosado Albuquerque ¹, Maria Isabel Jacinto Santana ^{1,2,3}, Inês Esteves
Baldeiras ^{1,2}

¹ Faculdade de Medicina, Universidade de Coimbra, Portugal

² Centro de Neurociências e Biologia Celular (CNC): Centro de Inovação em Biomedicina e
Biotecnologia (CIBB), Universidade de Coimbra, Portugal

³ Departamento de Neurologia, Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, Portugal

Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, Portugal

Azinhaga de Santa Comba, Celas

3000-548 Coimbra

E-mail do autor: pedromrosado@protonmail.com

Índice

Resumo.....	4
Abstract.....	5
Introdução.....	6
Materiais e Métodos.....	8
Resultados.....	11
Discussão.....	18
Agradecimentos.....	21
Referências bibliográficas.....	22

Resumo

Introdução: Um importante avanço da investigação clínica da Doença de Alzheimer (DA) foi o desenvolvimento de biomarcadores, que refletem as principais vias de patologia cerebral na DA. A nível do Líquido Céfalo-Raquídeo (LCR), os níveis dos peptídeos beta-amilóide 42 e 40 (A β 42/A β 40) são usados como marcador de patologia amilóide; a proteína tau fosforilada no resíduo de treonina 181 (p-Tau181) como marcador de patologia tau; e os níveis de proteína tau total (t-Tau) ou de neurofilamento de cadeia leve (NfL) como marcadores de neurodegeneração. A razão p-Tau181/t-Tau foi também recentemente descrita como um marcador da velocidade de progressão da doença noutras patologias neurodegenerativas, como a Demência Frontotemporal (DFT). Neste trabalho, avaliamos a importância relativa dos marcadores de neurodegeneração e patologia tau no diagnóstico diferencial de DA e também a sua associação com a taxa de progressão de declínio cognitivo.

Materiais e Métodos: Neste estudo observacional retrospectivo incluímos 103 participantes: 25 Controlos Neurológicos (CN), 28 doentes com DFT e 50 com DA, submetidos a punção lombar (PL) para confirmação laboratorial de diagnóstico. Os biomarcadores de LCR (A β 42, A β 40, NfL, p-Tau181, t-Tau) foram quantificados por imunoensaio enzimático e a função cognitiva global avaliada através de Mini-Mental State Examination (MMSE) em primeira consulta (na data da PL) e em consulta de seguimento especializada de Demência.

Resultados: Encontrámos um aumento significativo dos valores de t-Tau e p-Tau181 e uma diminuição significativa da razão A β 42/40 no grupo de DA relativamente aos doentes com DFT e aos CN. Os valores de NfL estavam também significativamente aumentados na DA em relação aos CN, mas diminuídos em relação à DFT. Não observámos diferenças na razão p-Tau181/t-Tau entre DA e CN, mas observámos uma diminuição significativa nos doentes com DFT. No diagnóstico diferencial entre DA e DFT, observámos uma boa capacidade discriminativa dos marcadores avaliados, com superioridade da p-Tau181 relativamente a t-Tau. Na discriminação entre DA e CN, observámos uma excelente acuidade diagnóstica para a p-Tau181, t-Tau e NfL, sem diferenças significativas entre si. Não encontrámos qualquer associação entre a razão p-Tau181/t-Tau e as diferenças na pontuação de MMSE na avaliação inicial e de seguimento, nem com a taxa de progressão do declínio cognitivo nos doentes com DA.

Discussão: A p-Tau181 revelou uma ligeira superioridade relativamente aos marcadores de neurodegeneração no diagnóstico diferencial entre DA e DFT. Relativamente à razão p-Tau181/t-Tau, esta não revelou ser preditora de taxa de progressão de doença, quando aplicada a DA, necessitando de estudos adicionais que corroborem a presente evidência científica associada a outras patologias neurodegenerativas e a transponham para o contexto da DA.

Palavras-chave: Doença de Alzheimer, patologia Tau, diagnóstico diferencial, líquido céfalo-raquídeo, neurodegeneração, progressão da doença

Abstract

Introduction: An important breakthrough on the clinical investigation of Alzheimer's Disease (AD) was the development of biomarkers, that reflect main pathways of cerebral physiopathology in AD. In cerebrospinal fluid (CSF), beta-amyloid 42 and beta-amyloid 40 peptides (A β 42/ A β 40) are used as markers of amyloid pathology; phosphorylated Tau protein at threonine 181 (p-Tau181) as a marker of Tauopathy; and total tau (t-Tau) or neurofilament light chain (NfL) as markers of neurodegeneration. P-Tau181 to t-Tau ratio has also been recently described as a marker of disease progression rate on other neurodegenerative diseases, such as Frontotemporal Dementia (FTD). On this study we compared the relevance of neurodegeneration and tauopathy markers in the differential diagnosis of AD and their association with the rate of cognitive decline.

Methods: We included 103 participants in this retrospective observational study: 25 Neurological Controls (NC), 28 patients diagnosed with FTD, and 50 patients diagnosed with AD, who were submitted to lumbar puncture (LP) for laboratorial diagnosis confirmation. CSF biomarkers (A β 42, A β 40, NfL, p-Tau181, t-Tau) were assessed by enzymatic immunoassay and global cognitive function was assessed through Mini-Mental State Examination (MMSE) in a first evaluation (at the time of LP) and in a Dementia-specific follow-up evaluation.

Results: Significant higher t-Tau and p-Tau181 levels and a significant lower A β 42/40 ratio were found in the AD group in comparison to FTP and NC. NfL levels were also significantly higher in AD when compared to NC, but lower when compared to FTD. We did not find differences on p-Tau181/t-Tau ratio between AD and NC, but we significant lower values were seen in FTD patients. Regarding the differential diagnosis between AD and FTD, we found a good discriminative ability for all assessed markers, with superiority of p-Tau181 over t-Tau. P-Tau181, t-Tau and NfL showed excellent diagnostic accuracies in the distinction between AD and NC, without significant differences amongst them. We did not find any associations between p-Tau181/t-Tau ratio and MMSE score differences at baseline and follow-up evaluations and neither between this ratio and the cognitive decline rate in AD patients.

Discussion: P-Tau181 revealed a slight superiority over neurodegeneration markers in the differential diagnosis between AD and FTD. Regarding p-Tau181/t-Tau ratio, it did not show utility as predictor of disease progression rate, when applied to AD, and further investigation is needed to confirm the present evidence associated to other neurodegenerative diseases and translate it to AD's context.

Keywords: Alzheimer's Disease; Tauopathy; differential diagnosis; cerebrospinal fluid; neurodegeneration; disease progression

Introdução

A Doença de Alzheimer (DA) configura a causa mais comum de demência à escala mundial. No contexto português, estima-se que a incidência e prevalência desta doença continuem a sua tendência crescente, além da média europeia, tendo como fator principal o aumento da população acima da faixa etária dos 65 anos em simultâneo com o decréscimo da população total [1,2]. Apesar da tendência anterior de diminuição da prevalência, cujas justificações avançadas apontam para as consequências das políticas de saúde pública, particularmente respeitantes aos fatores de risco de diferentes variantes de demência, estima-se aumento da prevalência de 1.88 (2018) para 3.82 % em 2025 [3].

O impacto da demência na saúde pública coloca desafios à capacidade de resposta dos sistemas de saúde, mas também associa custos sociais e económicos. A gestão destas variáveis assenta na prevenção do declínio progressivo e sintomático do processo neurodegenerativo e no diagnóstico precoce, além da investigação clínica relacionada com a compreensão dos mecanismos fisiopatológicos subjacentes e desenvolvimento de estratégias modificadoras de doença [1,3].

Um importante avanço da investigação clínica da DA foi o desenvolvimento de biomarcadores de diagnóstico e/ou prognóstico, quer de líquido céfalo-raquídeo (LCR), quer de neuroimagem, que captam as principais vias de patologia cerebral na DA: placas amilóide, tranças neurofibrilares de proteína tau hiperfosforilada e neurodegeneração [4], possibilitando a classificação da demência enquanto espectro, desde estadios prodrómicos e pré-clínicos de doença [5,6], a demência estabelecida [7], encontrando-se devidamente suportados por evidência científica robusta e implementados na prática clínica corrente [8–12].

Paralelamente, os biomarcadores referidos permitem classificar os doentes de acordo com o sistema ATN [11], segundo o qual, a nível do LCR, os níveis dos peptídeos beta-amilóide 42 e 40 (A β 2/40) são usados como marcador de patologia amilóide (A+, configurando o continuum de DA), a proteína tau fosforilada no resíduo de treonina 181 (p-Tau181) como marcador de patologia tau (T+), e os níveis de proteína tau total (t-Tau) como marcador de neurodegeneração (N+). Embora previamente os marcadores de patologia Tau e de neurodegeneração fossem encarados como tendo um valor semelhante para o diagnóstico de DA baseado em biomarcadores [5,7], os critérios atuais para diagnóstico baseado em biomarcadores no LCR atribuem um papel superior ao marcador de patologia Tau [11]. Adicionalmente, a quantificação dos níveis de neurofilamento de cadeia leve (NfL) no LCR passou também a integrar a investigação neuroquímica, como marcador de neurodegeneração [13] tendo adquirido relevo em diversas patologias, nomeadamente na Demência Frontotemporal (DFT) [14].

Recentemente, vários estudos têm vindo a investigar o potencial da razão p-Tau181/t-Tau e do NfL no diagnóstico diferencial entre DFT e outras formas de demência [15–17] e entre subtipos integrantes do espectro de DFT [15,16,18–20]. De modo semelhante, estudos recentes levantam a hipótese de a razão p-Tau181/t-Tau poder ter valor clínico preditivo do declínio cognitivo e/ou funcional em doentes com diagnóstico de demência pertencente ao espectro da DFT [16,18,21], declínio motor

e/ou funcional em doentes com Doença de Parkinson [22] e disfunção cognitiva em doentes com Esclerose Lateral Amiotrófica [23]. A evidência atual sugere que possa existir uma relação inversa entre a razão p-Tau181/t-Tau e a velocidade de progressão da doença. De facto, na doença de Creutzfeldt-Jakob (CJD), uma forma de demência neurodegenerativa rapidamente progressiva, esta razão atinge valores muito baixos, e consegue diferenciar os doentes com CJD de outras doenças neurodegenerativas com muito boa acuidade diagnóstica [24]. Até à data, a limitação dos estudos conduzidos a estas patologias deixa em aberto a hipótese de a razão p-Tau181/t-Tau também poder ter utilidade na avaliação da progressão da doença no contexto da DA, bem como de outros tipos de demência ou doenças neurodegenerativas.

Enquadrando o acima descrito na realidade clínica do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra (CHUC), a DA e a DFT constituem as duas causas de demência mais frequente dos doentes em seguimento na Consulta de Demência, em concordância com a epidemiologia descrita para as duas entidades [25]. Para além disso, estas duas formas de demência podem ser difíceis de distinguir, particularmente em fases iniciais da doença [26], ou em formas atípicas da DA, como é o caso da variante frontal ou da variante logopénica [27].

Assim, um dos principais objetivos do presente estudo é avaliar a importância relativa dos marcadores do LCR de taupatia e neurodegeneração, p-Tau181, t-Tau e NfL, no diagnóstico diferencial entre DA e DFT, bem como na distinção entre DA e controlos neurológicos (CN). Um outro objetivo de interesse é investigar se a razão p-Tau181/t-Tau poderá ser um indicador da velocidade de progressão da disfunção cognitiva nos doentes com diagnóstico de DA estabelecida.

Materiais e Métodos

Desenho do estudo

O presente estudo é um estudo observacional retrospectivo, que combina uma análise de tipo caso-controlo no que respeita ao diagnóstico diferencial baseado em biomarcadores de LCR, e uma análise longitudinal no que respeita à relação entre biomarcadores de LCR e progressão do declínio cognitivo na DA.

Seleção dos participantes

A amostra em estudo foi constituída por 103 doentes investigados e seguidos no Serviço de Neurologia do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, Portugal, entre 2019 e 2022, divididos em 3 grupos diagnósticos: DA, DFT e CN.

Para integrar os grupos de estudo, recrutámos retrospectivamente 50 doentes diagnosticados com DA e 28 doentes com diagnóstico de DFT, de acordo com critérios internacionais standardizados [7,28,29]. Estes doentes são seguidos na Clínica de Demência do Serviço de Neurologia, em consulta de subespecialidade de Demência, com avaliação neurológica e neuropsiquiátrica contemplando anamnese detalhada, fornecida pelo doente e por informador colateral credível, exame objetivo e testes neuropsicológicos.

Selecionámos também 25 participantes sem deterioração cognitiva e sem doença do sistema nervoso central conhecida que configuraram o grupo de CN, recrutados tendo por base os registos clínicos do Serviço de Neurologia do CHUC.

Para os grupos de DA e DFT, definimos como critérios de inclusão a realização, no decurso da sua avaliação diagnóstica e planeamento terapêutico, punção lombar com determinação dos biomarcadores de LCR de DA, e, para os doentes de DA, avaliação longitudinal breve da cognição com seguimento concomitante em consulta de Demência. Excluimos participantes que exibiram critérios clínicos, laboratoriais e/ou imagiológicos para outras demências ou com diagnóstico não definitivo de demência (não preenchendo inequivocamente os critérios clínicos), doentes sem MMSE de linha de base temporalmente próximo à data da PL e indivíduos com comorbilidades em fase aguda.

No grupo de CN, incluímos indivíduos que, no âmbito dos seus cuidados de saúde, tivessem sido submetidos a punção lombar diagnóstica, para exclusão de patologia estrutural do sistema nervoso central. Maioritariamente incluíram-se indivíduos que fizeram punção lombar para exclusão de HSA ou meningite. Estes indivíduos apresentaram uma análise citoquímica normal no LCR e estado cognitivo normal de acordo com os resultados obtidos no teste global de cognição, sendo independentes nas suas atividades de vida diária. Excluimos participantes com: historial de doenças neurológicas ou psiquiátricas, incluindo doenças graves do sistema nervoso central; défice cognitivo; transtorno depressivo grave nos últimos 6 meses; historial de doença instável grave/crónica; historial de acidente cerebrovascular; abuso de substâncias ou medicamentos que interfiram na avaliação bioquímica e/ou de neuroimagem.

Recolha de dados

As variáveis de interesse ao estudo colhidas incluíram variáveis demográficas (género, idade à data da punção lombar) e dos biomarcadores de LCR (quantificação de A β 42, A β 40, p-Tau181, t-Tau e NfL na amostra de LCR colhida para diagnóstico). Para os doentes de DA recolheu-se também a pontuação no teste de memória breve Mini-Mental State Examination (MMSE) realizado à data da punção lombar e em avaliação de seguimento, bem como o tempo decorrido entre os dois momentos de avaliação neuropsicológica.

As variáveis demográficas e resultantes de exames complementares de diagnóstico em estudo foram recolhidas indiretamente através dos registos clínicos da Clínica de Demência do Serviço de Neurologia do CHUC e posteriormente anonimizadas e integradas em base de dados criada para o efeito.

Os doseamentos de biomarcadores foram efetuados a partir de amostras de LCR colhidas no decurso da investigação diagnóstica dos doentes, seguindo o protocolo de armazenamento e processamento de amostras de LCR do CHUC. Os procedimentos pré-analíticos e analíticos foram conduzidos no Laboratório de Neuroquímica do Serviço de Neurologia do CHUC de acordo com as guidelines BIOMARKAPD [30]. As amostras de LCR foram colhidas em tubos estéreis de polipropileno, centrifugados a 1800 g, 10 minutos a 4°C, divididas em tubos de polipropileno de 10 mL e armazenadas a -80°C até à data de análise.

Os níveis de A β 42, A β 40, p-Tau181 e t-Tau no LCR, foram quantificados sequencialmente por imunoensaio enzimático por quimioluminescência, recorrendo à plataforma automatizada Lumipulse G600II (Fujirebio, Gante, Bélgica), de acordo com as instruções do fabricante.

O controlo de qualidade externo foi executado no âmbito do Programa de Controlo de Qualidade da Associação de Alzheimer para Biomarcadores de LCR [31].

A dicotomização entre valores normais (-) / não normais (+) foi definida de acordo com os valores de referência previamente determinados [32], com A β 42 < 543 pg/ml ou A β 42/40 < 0,068 classificando o perfil A+ (prevalecendo o valor de A β 42/40 em caso de discordância); p-Tau > 51 pg/ml classificando o perfil T+ e t-Tau > 335 pg/ml classificando o perfil N+.

Para a quantificação de NfL no LCR, usou-se uma alíquota diferente da utilizada para os biomarcadores clássicos de DA, que foi diluída 1:1 e analisada em duplicado através de um imunoensaio enzimático manual previamente validado (NF-light; Uman Diagnostics, Suécia) [13], segundo as instruções do fabricante.

A avaliação cognitiva breve foi conduzida segundo a adaptação à população portuguesa do MMSE [33], no qual uma menor pontuação se relaciona com uma maior gravidade de defeito cognitivo, adaptada ao nível de escolaridade da população avaliada (adotando como valores de referência pontuação \leq 15 para população analfabeta, \leq 22 para população com 1 a 11 anos de escolaridade e \leq 27 para população com 11 ou mais anos de escolaridade, admitindo pontuação variando entre 0 e 30).

Definimos variação de MMSE como o valor absoluto da diferença entre a pontuação de MMSE nos dois momentos distintos de avaliação (linha de base - MMSE1; e seguimento - MMSE2). A taxa de

progressão anual de doença foi calculada através da variação da pontuação no MMSE, dividida pelo número de meses que distam entre as duas avaliações e multiplicada por 12.

Análise de dados

A análise estatística foi realizada recorrendo aos programas Statistical Package for the Social Sciences (SPSS), versão 27 para Windows, e MedCalc, versão 14.8.1 para Windows, admitindo significância estatística quando valor de p inferior a 0,05.

Em primeira instância, procedemos à caracterização descritiva das variáveis género, classificação ATN (variáveis nominais), idade, $A\beta_{2}$, $A\beta_{40}$, $A\beta_{2/40}$, p-Tau, t-Tau, p-Tau/t-Tau, NfL (variáveis contínuas), na amostra em estudo, para os grupos DA, DFT e CN. Para o grupo de DA, caracterizámos ainda as variáveis relacionadas com a avaliação neuropsicológica.

Para analisar a normalidade da distribuição das variáveis quantitativas contínuas foram aplicados os testes de Kolmogorov-Smirnov e Shapiro-Wilk.

Uma vez que os valores de biomarcadores de LCR não se encontraram normalmente distribuídos, as diferenças entre grupos de diagnóstico foram avaliadas pelo teste de Kruskal-Wallis, aplicando posteriormente o método post-hoc de Dunn para determinar quais os grupos que demonstraram diferença estatisticamente significativa.

A apreciação da sensibilidade (S) e especificidade (E) das variáveis p-Tau181, t-Tau, razão p-Tau/t-Tau e NfL no diagnóstico diferencial entre DA e DFT e entre DA e CN fez-se com recurso a análise Receiver Operator Characteristic Curve (curvas ROC). Para cada variável, procedemos ao cálculo da Área sob a Curva (AUC) e dos pontos de corte que maximizavam sensibilidade e especificidade, segundo o Índice de Youden (S+E-1). Com o objetivo de avaliar o potencial relativo entre estes biomarcadores no diagnóstico diferencial, aplicámos o método de Hanley e McNeil, que avaliou a existência de diferenças significativas entre as curvas apresentadas.

O coeficiente de correlação não paramétrico ρ de Spearman, no grupo de DA, foi calculado para averiguar a presença de associações lineares entre os biomarcadores de LCR (p-Tau181, t-Tau, razão p-Tau/t-Tau e NfL) aquando da PL, e as pontuações de MMSE na linha de base e a variação das pontuações de MMSE ao longo do tempo (taxa de deterioração cognitiva). Posteriormente, dividimos artificialmente a amostra de doentes com DA em dois subgrupos, tendo por base a média da razão p-Tau181/t-Tau, distinguindo o subgrupo em que p-Tau/t-Tau foi igual ou superior à média, e outro grupo no qual esta foi inferior. Através de análise de medidas repetidas, investigámos a existência de diferenças significativas entre as médias marginais estimadas de progressão da doença entre estes dois subgrupos.

Ética

O estudo foi conduzido em conformidade com os princípios éticos e legais, nomeadamente em concordância com a Declaração de Helsínquia (1964), e foi submetido à Comissão de Ética da instituição Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, obtendo parecer favorável.

Resultados

Características clínicas e demográficas da amostra

As características demográficas e bioquímicas dos 103 doentes integrados no estudo encontram-se sumariadas na Tabela 1 e representadas graficamente na Figura 1.

Não se observaram diferenças entre os grupos relativamente à distribuição de género, nem à idade à data da PL. Relativamente aos biomarcadores no LCR, evidenciaram-se diferenças estatisticamente significativas entre os grupos para todos os marcadores avaliados e respetivas razões, que se refletiram na distribuição dos perfis ATN nos diferentes grupos. O grupo DA apresentou maioritariamente perfil integrante do contínuo A+ (n = 49) e um indivíduo com perfil A- (n = 1), mas com confirmação de patologia amilóide em PET-amilóide. O grupo DFT incluiu indivíduos com perfil A-T-N- (n = 17), A-T-N+ (n = 6), A-T+N+ (n = 4), A+T+N+ (n = 1). Em oposição, o grupo CN apresentou perfil A-T-N- na sua totalidade (n = 25).

Nas comparações dois a dois dos diferentes biomarcadores, constatámos evidência de diferença significativa para os valores de A β 2 entre os grupos DA versus DFT (p < 0,001) e DA versus CN (p < 0,001), com valores mais baixos no grupo DA. Relativamente ao par DFT versus CN não se observaram diferenças significativas (p = 0,319). Para a A β 40, os níveis estavam significativamente mais elevados no grupo DA versus DFT (p = 0,001) e DA versus CN (p = 0,030), sem diferença entre o par DFT versus CN (p = 1). Tal resultou numa razão A β 2/40 significativamente diminuída em DA versus DFT (p < 0,001) e DA versus CN (p < 0,001), sem evidência de diferença entre o par DFT versus CN (p = 0,916).

Relativamente à p-Tau181, observámos um aumento significativo deste marcador nos doentes DA versus DFT (p < 0,001) e DA versus CN (p < 0,001), mais uma vez sem diferenças entre o par DFT versus CN (p = 0,216). Quanto ao marcador de morte neuronal t-Tau, observou-se um aumento significativo nos doentes DA versus DFT (p < 0,001), DA versus CN (p < 0,001) e DFT versus CN (p = 0,004). Já para o NfL, o grupo com valores mais elevados foi a DFT, seguido pela DA, sendo esta diferença estatisticamente significativa para as comparações DFT versus DA, DFT versus CN e também DA versus CN (p < 0,001 para todas as comparações).

Quanto à razão p-Tau181/t-Tau, observámos valores significativamente diminuídos nos doentes com DFT em relação aos doentes com DA (p < 0,001) e ao grupo controlo (p < 0,001), sem diferença entre o par DA versus CN (p = 1).

No que respeita ao grupo de DA (n = 42), avaliámos a pontuação de MMSE1 na linha de base, a pontuação de MMSE2 em avaliação de seguimento, e a variação da pontuação MMSE ao longo do tempo (em anos). A pontuação de MMSE1, à data da PL, apresentou um valor médio de 20,33 \pm 4,68 pontos, variando entre 11 e 30, enquanto a pontuação de MMSE2 registou um valor médio de 15,57 \pm 5,49 pontos, variando entre 3 e 27. A diminuição média no MMSE entre avaliações foi de 4,76 \pm 4,45 pontos, variando entre 0 e 23. Tendo em conta o tempo entre avaliações (14,21 \pm 5,99, variando entre

6 e 31 meses), registou-se uma diminuição média da pontuação de MMSE por ano de $4,17 \pm 3,64$, variando entre 0 e 13,14.

Tabela 1 - Análise descritiva das características demográficas, clínicas e bioquímicas da amostra em estudo.

	CN	DA	DFT	p
Total (N)	25	50	28	
Género feminino, n (%)	15 (60)	30 (60)	14 (50)	> 0,05
Idade à data da PL, anos	60,0 (5,90) *	64,1 (7,1)	63,9 (6,5)	> 0,05
Classificação ATN, perfil (n)	A-T-N- (25)	A+T+N+ (44), A+T-N- (2), A+T+N- (2), A+T-N+ (1), A-T+N+ (1)	A-T-N- (17), A-T-N+ (6), A-T+N+ (4), A+T+N+ (1)	< 0,001
A β 2, pg/ml	1072 (389)	518 (125)	876 (342)	< 0,001
A β 40, pg/ml	9776 (2644)	11931 (3313)	9470 (4625)	0,001
A β 2/40	0,108 (0,016)	0,045 (0,009)	0,098 (0,022)	< 0,001
p-Tau181, pg/ml	27,4 (6,9)	137,3 (66,6)	43,5 (35,9)	< 0,001
t-Tau, pg/ml	172 (65)	813 (382)	360 (237)	< 0,001
p-Tau181/t-Tau	0,169 (0,040)	0,171 (0,024)	0,122 (0,039)	< 0,001
NfL, pg/ml	493 (164) **	1257 (500) ***	3545 (2479)	< 0,001

Abreviaturas: CN = Controlos Neurológicos; DA = Doença de Alzheimer; DFT = Demência Frontotemporal; A = patologia amilóide; T = patologia Tau; N = neurodegeneração; PL = punção lombar; A β 2 = Beta-amilóide 42; A β 40 = Beta-amilóide 40; p-Tau181 = Tau fosforilada no resíduo de Treonina 181; t-Tau = Tau total; NfL = Neurofilamento de cadeia leve.

Valores referentes a variáveis contínuas encontram-se expressos em média (desvio-padrão). *n = 23; **n = 16; ***n = 49

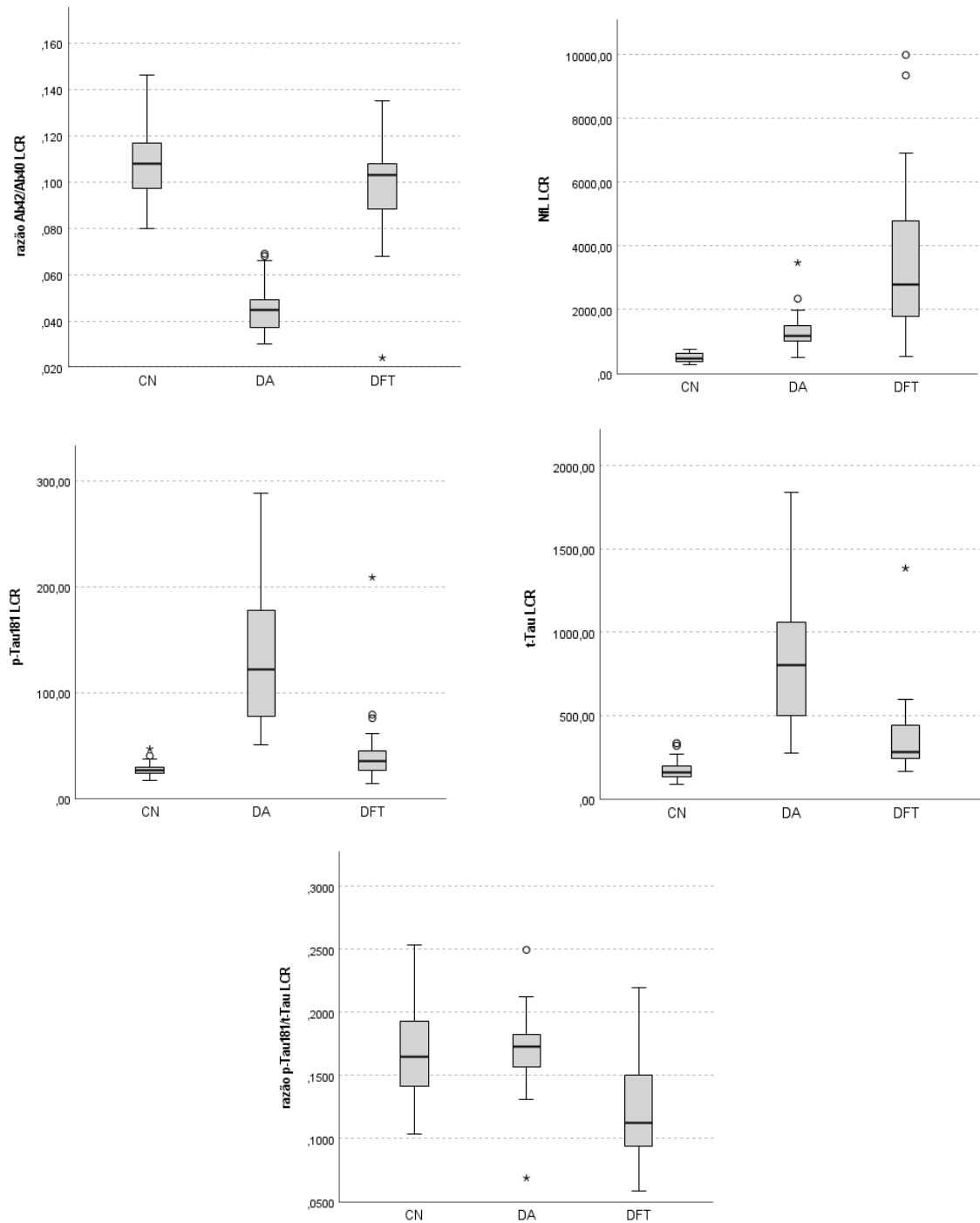


Figura 1 - Representação gráfica dos valores da razão $A\beta_{42}/40$, p-Tau181, t-Tau, razão p-Tau181/t-Tau e NfL nos grupos diagnósticos DA, DFT e CN.

Abreviaturas: CN = Controlos Neurológicos; DA = Doença de Alzheimer; DFT = Demência Frontotemporal; LCR = líquido céfalo-raquídeo; $A\beta_{42}$ = Beta-amilóide 42; $A\beta_{40}$ = Beta-amilóide 40; p-Tau181 = Tau fosforilada no resíduo de Treonina 181; t-Tau = Tau total; NfL = Neurofilamento de cadeia leve.

Valores referentes a $A\beta_{42}/40$, p-Tau181, t-Tau e NfL encontram-se expressos em pg/ml. Os boxplots mostram os percentis 10, 25, 50, 75, 90 e outliers.

Utilidade dos biomarcadores no diagnóstico diferencial entre DA, DFT e CN

Tendo como objetivo a comparação do poder relativo dos diferentes biomarcadores no diagnóstico diferencial entre as entidades clínicas DA versus DFT e DA versus CN, foi efetuada uma análise ROC.

Comparando o potencial discriminativo entre DA (n = 49) e DFT (n = 28), obtivemos curvas com significância estatística para todos os marcadores analisados (p-Tau181, t-Tau, razão p-Tau181/t-Tau e NfL; $p < 0,001$), configurando um poder de discriminação entre diagnósticos robusto (AUC > 0,80; Figura 2).

Para a p-Tau181, obtivemos uma AUC = 0,945 (IC 95%: 0,880-1,009), com uma sensibilidade de 100% e especificidade de 82,1% para um valor de corte de 50,3 pg/ml. Para a t-Tau, a AUC foi de 0,878 (IC 95%: 0,793-0,962), com sensibilidade de 79,6% e especificidade de 82,1% para um valor de corte de 455,5 pg/ml. Para a razão p-Tau181/t-Tau, o valor de corte foi de 0,153, apresentando uma sensibilidade de 83,7% e especificidade de 82,1% (Y de 0,821), para uma AUC = 0,861 (IC 95%: 0,764-0,958). Relativamente ao NfL (mais baixo DA do que na DFT), o valor de corte de 1865 apresentou uma sensibilidade de 93,9% e especificidade de 75%, com AUC = 0,838 (IC 95%: 0,720-0,956).

Pela análise comparativa das diferenças entre as AUC relativas a cada biomarcador, comprovámos a significância da diferença entre a AUC das curvas p-Tau181 e t-Tau ($p = 0,028$), tendo a curva p-Tau181 potencial discriminativo superior à curva t-Tau no diagnóstico diferencial entre doentes com DA e doentes com DFT. Não verificámos qualquer diferença significativa entre a AUC das curvas p-Tau181 e razão p-Tau181/t-Tau ($p = 0,112$), p-Tau181 e NfL ($p = 0,082$), t-Tau e razão p-Tau181/t-Tau ($p = 0,785$), t-Tau e NfL ($p = 0,530$) e NfL e p-Tau181/t-Tau ($p = 0,726$), no que respeita ao potencial de discriminar entre DA e DFT.

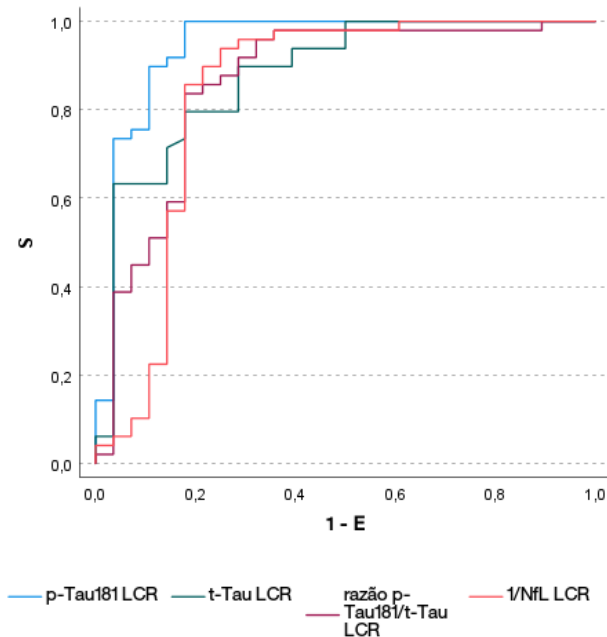


Figura 2 - Análise por curvas ROC da Sensibilidade e Especificidade dos biomarcadores no diagnóstico diferencial entre DA e DFT.

Abreviaturas: S = sensibilidade; E = especificidade; LCR = líquido céfalo-raquídeo; p-Tau181 = Tau fosforilada no resíduo de Treonina 181; t-Tau = Tau total; NfL = Neurofilamento de cadeia leve.

Comparando o potencial discriminativo entre DA (n = 49) e CN (n = 16), obtivemos curvas com significância estatística para as variáveis p-Tau181, t-Tau e NfL ($p < 0,001$), configurando um poder de discriminação robusto ($AUC > 0,800$; Figura 3). Para a razão p-Tau181/t-Tau a curva observada não apresentou significado estatístico ($p = 0,773$, com $AUC = 0,472$, IC 95%: 0,281-0,663).

Para a p-Tau181, obtivemos uma curva perfeita, com $AUC = 1,000$ (IC 95%: 1-1), sensibilidade de 100% e especificidade de 100% para um valor de corte de 48,75 pg/ml. Para a t-Tau, o valor de corte de 246,5 pg/ml demonstrou sensibilidade de 100% e especificidade de 93,7%, (Y de 0,937), com $AUC = 0,995$ (IC 95%: 0,983-1,007). O NfL apresentou uma sensibilidade de 87,8% e especificidade de 100%, para um valor de corte de 754 pg/ml, com uma $AUC = 0,968$ (IC 95%: 0,933-1,004).

O método de análise comparativa das diferenças entre as AUC não demonstrou diferenças significativas entre as curvas (p-Tau181 versus t-Tau: $p = 0,395$; p-Tau181 versus NfL: $p = 0,078$; t-Tau versus NfL: $p = 0,138$).

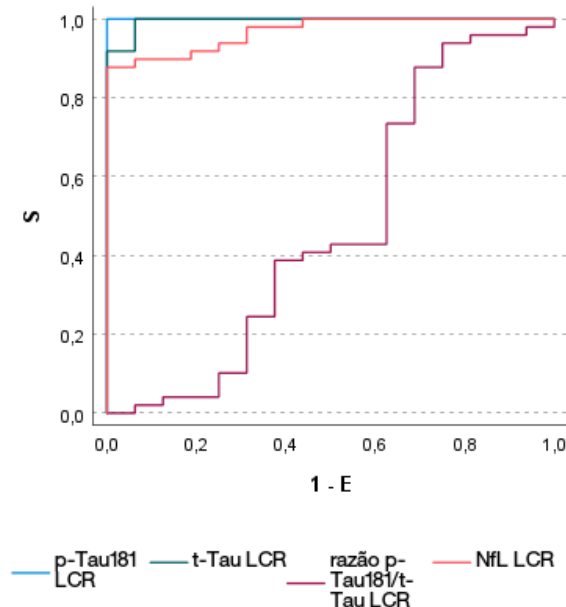


Figura 3 - Análise por curvas ROC da Sensibilidade e Especificidade dos biomarcadores no diagnóstico diferencial entre DA e CN.

Abreviaturas: S = sensibilidade; E = especificidade; LCR = líquido céfalo-raquídeo; p-Tau181 = Tau fosforilada no resíduo de Treonina 181; t-Tau = Tau total; NfL = Neurofilamento de cadeia leve.

Relação entre a razão p-Tau181/t-Tau e taxa de progressão da DA

Não encontramos correlação entre qualquer dos marcadores de neurodegeneração / taupatia avaliados (t-Tau, NfL, p-Tau181 e razão p-Tau181/t-Tau) e a taxa de progressão da doença nos doentes com DA (Tabela 2).

Tabela 2 - Correlações entre níveis de t-Tau, p-Tau181, NfL no LCR e razão p-Tau181/t-Tau e MMSE1, MMSE2 e taxa de progressão de doença no grupo diagnóstico de DA.

	MMSE1	Taxa de progressão DA	MMSE2
t-Tau	$\rho = -,228$	$\rho = -,187$	
	$\rho = 0,128$	$\rho = 0,235$	
	*	***	
p-Tau181	$\rho = -,193$	$\rho = -,177$	
	$\rho = 0,198$	$\rho = 0,262$	
	*	***	
NfL	$\rho = -,102$	$\rho = ,242$	
	$\rho = 0,505$	$\rho = 0,122$	
	**	***	
p-Tau181/t-Tau	$\rho = ,061$	$\rho = -,140$	$\rho = ,240$
	$\rho = 0,690$	$\rho = 0,377$	$\rho = 0,120$
	*	***	****

Abreviaturas: DA = Doença de Alzheimer; LCR = líquido céfalo-raquídeo; p-Tau181 = Tau fosforilada no resíduo de Treonina 181; t-Tau = Tau total; NfL = Neurofilamento de cadeia leve; MMSE1 = Mini-Mental State Examination na avaliação de linha de base; MMSE2 = pontuação de Mini-Mental State Examination na avaliação de seguimento; ρ = coeficiente de correlação de Spearman. *n = 46 **n = 45; ***n = 42; ****n = 43.

Tendo por base o valor médio registado de razão p-Tau181/t-Tau no grupo de DA (0,173), dividimos os doentes num subgrupo que apresentava o valor desta razão igual ou superior à média (n = 19), e outro no qual o valor desta razão era inferior à média descrita (n = 23). Fomos então avaliar se a taxa de progressão do declínio cognitivo era diferente entre estes dois subgrupos.

A análise de Medidas Repetidas estimou valores médios de 20,32 pontos no MMSE1 e de 15,84 pontos no MMSE2 no subgrupo com razão p-Tau181/t-Tau $\geq 0,173$. No subgrupo com razão p-Tau181/t-Tau $< 0,173$, obtivemos uma média de 20,35 pontos no MMSE1 e de 15,35 pontos no MMSE2. O efeito da razão p-Tau181/t-Tau na diferença de variação de MMSE nos dois subgrupos não assumiu significado estatístico ($p = 0,873$; Figura 4).

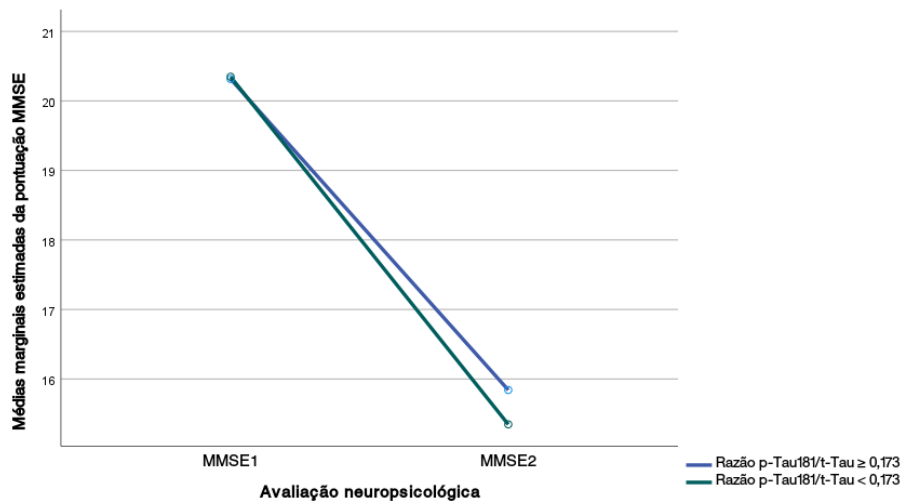


Figura 4 - Representação do efeito da razão p-Tau181/t-Tau na média estimada de variação entre MMSE1 e MMSE2 no grupo de DA.

Abreviaturas: p-Tau181 = Tau fosforilada no resíduo de Treonina 181; t-Tau = Tau total; MMSE1 = pontuação de Mini-Mental State Examination na avaliação de linha de base; MMSE2 = pontuação de Mini-Mental State Examination na avaliação de seguimento.

Discussão e Conclusão

Em virtude da sua prevalência e evolução natural, a patologia demencial, independentemente da sua etiologia, continua e continuará a ser um campo importante de produção de conhecimento científico mundialmente. A evidência existente demonstra incapacidade em esclarecer inequivocamente os mecanismos fisiopatológicos subjacentes e em encontrar terapêuticas modificadoras de doença eficazes e seguras [34,35].

Neste trabalho avaliamos o potencial dos marcadores de neurodegeneração e patologia tau do LCR no diagnóstico diferencial entre DA e DFT (a primeira e segunda causa de demência na Consulta de Demência do CHUC, respetivamente) e um grupo de controlos neurológicos. Investigamos também o potencial destes marcadores, nomeadamente da razão p-Tau181/t-Tau, como indicador da velocidade de progressão da disfunção cognitiva nos doentes com diagnóstico de DA. Os nossos resultados confirmaram a boa acuidade diagnóstica da t-Tau, p-Tau181 e NfL na distinção entre DA e DFT e entre DA e CN, apontando uma capacidade ligeiramente superior da p-Tau181 no diagnóstico diferencial entre DA e DFT. Não encontramos, contudo, qualquer relação entre os marcadores avaliados e a taxa de progressão do declínio cognitivo dos doentes com DA.

A nossa investigação demonstrou diferenças significativas entre os valores de t-Tau e NfL entre os dois grupos de doentes com demência (DA e DFT) e o grupo controlo, em conformidade com a literatura mais recente [15–17], uma vez que ambas denotam a magnitude do processo neurodegenerativo. Contudo, enquanto na DA os valores médios de t-Tau foram significativamente mais altos do que na DFT, o inverso ocorreu para o NfL, com os valores mais elevados a serem encontrados no grupo de doentes com DFT [36–38]. Os valores superiores de NfL na DFT parecem resultar de uma degeneração dos lobos temporal e frontal mais proeminente e acentuada no tempo, e de um envolvimento subcortical superior, por comparação com a DA [39].

Encontramos também diferenças significativas entre os valores de A β 42/40 e p-Tau181 nas comparações entre grupos DA versus DFT e DA versus CN, mas não em DFT versus CN, consistentes com a evidência atual [40,41], na medida em que a razão A β 42/40 é atualmente entendida como marcador de patologia amilóide, um marcador de estado da DA, não sendo expectável alteração relevante nos doentes com DFT. Por seu lado, a p-Tau181 é entendida como marcador de patologia Tau, podendo estar presente no grupo de doentes de DFT que apresentam depósitos de proteína Tau cerebrais, mas não no grupo de doentes de DFT, que apresenta outro tipo de depósitos, como sejam os depósitos de proteína TDP-43 [16,20]. Tendo em conta as variações da proteína Tau e p-Tau181, observamos uma diminuição significativa da razão p-Tau181/t-Tau nos doentes com DFT relativamente à DA e CN, que reflete o aumento da t-Tau (neurodegeneração), sem aumento concomitante da p-Tau181 (hiperfosforilação da Tau). Não observamos, contudo, uma diferença significativa nesta razão entre os grupos DA versus CN, quando seria biologicamente expectável uma medida de neurodegeneração superior na DA em relação à população controlo, mas que parece ser contrabalançada pelo efeito da hiperfosforilação da Tau [41].

A análise das curvas ROC confirmou a boa acuidade dos marcadores de neurodegeneração e taupatia no diagnóstico diferencial entre DA e DFT, e na distinção entre DA e Controlos, corroborando a prática clínica convencional. Quando comparamos as curvas entre si, encontrámos uma ligeira superioridade da p-Tau181 em relação à t-Tau para identificar doentes com DA, com valores acima de 50,3 pg/mL a apoiarem claramente este diagnóstico. Já valores de NfL mais elevados (superiores a 1865 pg/mL) apontam no sentido de um diagnóstico mais provável de DFT. Relativamente à razão p-Tau181/t-Tau, não encontrámos qualquer valor adicional desta variável relativamente aos restantes biomarcadores isolados no diagnóstico diferencial entre DA e DFT.

Nos estudos de Pijnenburg YAL et al [16], Meeter LHH et al [18] e Fenu G et al [21], foram relatadas associações significativas entre os valores de razão p-Tau181/t-Tau e a taxa de progressão da doença. A nossa hipótese inicial consistia em que a um valor menor da razão em estudo, correspondente a componente neurodegenerativo mais preponderante, se associava um valor maior de taxa de progressão da doença, avaliado através da diminuição do MMSE ao longo do tempo. A análise realizada não permitiu comprovar esta hipótese, constatando a inexistência de associação significativa entre as duas variáveis, para os doentes de DA. Também não encontrámos qualquer associação entre os valores individuais dos marcadores de neurodegeneração (t-Tau e NfL) e patologia Tau (p-Tau181) e os valores iniciais do MMSE ou a sua taxa anual de variação. Estes resultados não estão de acordo com o descrito na literatura, a qual sugere que valores mais elevados de biomarcadores de neurodegeneração ou patologia Tau se associam a maiores taxas de declínio cognitivo, quer na DA [42–44], quer na DFT [42,45].

De referir contudo, que o facto da razão p-Tau181/t-Tau se encontrar diminuída nos doentes de DFT relativamente à DA suporta a noção de que esta razão se associa inversamente à velocidade de progressão da demência, uma vez que a DFT tem tipicamente um curso mais rápido de progressão do que a DA [46], traduzindo-se em trajetórias funcionais e de atividades de vida diária com maior decréscimo de desempenho na linha de base e longitudinalmente [47,48], assim como menor sobrevida [49]. Sabe-se ainda que esta progressão da disfunção global difere ao longo do espectro de variantes da DFT [50].

Há várias limitações deste estudo que podem ter contribuído para o facto de não termos encontrado qualquer evidência de associação entre os marcadores avaliados e a taxa de progressão do declínio cognitivo. Por um lado, o reduzido tamanho do subgrupo de doentes de DA com avaliação longitudinal (n = 42), que se traduziu num reduzido poder estatístico para extrapolação de associações entre variáveis. Por outro lado, a análise longitudinal encontrou-se limitada temporalmente, contemplando somente dois momentos de avaliação neuropsicológica distanciados por um intervalo não superior a 31 meses (mediana de 12 meses), ao que se soma o tempo desconhecido entre o diagnóstico clínico e a punção lombar, podendo ser responsável por um enviesamento dos dados recolhidos. Paralelamente, não foi tido em linha de conta o estadió de demência evidenciado pelos doentes aquando da primeira avaliação, e que pode explicar variações maiores ou menores da pontuação de MMSE para um mesmo intervalo temporal restrito. Neste sentido, seriam relevantes estudos contemplando avaliação neuropsicológica longitudinal em múltiplos momentos de consulta, separadas por intervalo de tempo semelhante e avaliando diferencialmente a amostra em estudo de

acordo com a severidade do defeito cognitivo. O estudo foi também limitado pela natureza própria do MMSE, um teste breve de memória, uma vez que a escolha de outros testes mais específicos para a DA teria limitado ainda mais o número de doentes incluídos.

Concluindo, o nosso estudo identificou o aumento da p-Tau181 no LCR como o marcador mais sugestivo de um diagnóstico de DA, enquanto que o aumento de NfL se revelou um marcador mais indicativo de DFT. A razão p-Tau181/t-Tau também poderá ter alguma utilidade no diagnóstico diferencial entre DA e DFT, contudo não revelou nenhuma associação com a progressão do declínio cognitivo nos doentes com DA. É necessária investigação futura, com população mais alargada e avaliações temporais mais rigorosas e detalhadas, no sentido de esclarecer a validade e relevância clínica da razão pTau181/t-Tau como eventual marcador da taxa de progressão da DA.

Agradecimentos

A conceptualização, escrita e defesa da presente tese de Mestrado contou com o apoio de várias pessoas às quais, pela relevância da sua intervenção, demonstro a minha gratidão.

Em primeiro lugar, à Doutora Inês Baldeiras, responsável pela minha orientação no presente trabalho, pela introdução ao mundo da investigação científico-clínica no âmbito da Neurologia e Neurociências, pautada por incondicionais apoio e disponibilidade, aconselhamento assertivo, estimulação de espírito crítico e procura incessante pela integração de investigação de qualidade na realidade clínica.

Agradeço à Professora Doutora Maria Isabel Santana, na qualidade de co-orientadora e docente de Neurologia, por despoletar o meu interesse em investigar na área das Neurociências, em particular no que respeita à Demência, e por apoiar o desenvolvimento do presente tema de investigação.

Agradeço à Dra. Marisa Lima, neuropsicóloga do CHUC, pela disponibilidade e auxílios incansáveis na elaboração do desenho do estudo, bem como pelo enquadramento da avaliação neuropsicológica na realidade clínica.

Agradeço aos colegas e amigos que trilharam este caminho comigo, pela partilha de ideias, companheirismo e entajuda.

Dirijo um agradecimento final à minha família, por possibilitarem a minha formação académica, e por serem pilares de apoio e incentivo em todos os momentos, nunca esquecendo todo o caminho percorrido.

Referências bibliográficas

1. Santana I, Farinha F, Freitas S, Rodrigues V, Carvalho Á. Epidemiologia da Demência e da Doença de Alzheimer em Portugal: Estimativas da Prevalência e dos Encargos Financeiros com a Medicação. *Acta Med Port.* 2015;28(2):182–8.
2. Gonçalves-Pereira M, Cardoso A, Verdelho A, Alves da Silva J, Caldas De Almeida M, Fernandes A, et al. The prevalence of dementia in a Portuguese community sample: A 10/66 Dementia Research Group study. *BMC Geriatr.* 2017;17(1).
3. Georges J, Bintener C, Miller O. Dementia in Europe Yearbook 2019: Estimating the prevalence of dementia in Europe. *Alzheimer Europe.* 2020;1–108.
4. Klyucherev TO, Olszewski P, Shalimova AA, Chubarev VN, Tarasov V V., Attwood MM, et al. Advances in the development of new biomarkers for Alzheimer's disease. *Translational Neurodegeneration.* 2022;11(1):1–24.
5. Albert MS, DeKosky ST, Dickson D, Dubois B, Feldman HH, Fox NC, et al. The diagnosis of mild cognitive impairment due to Alzheimer's disease: Recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimer's and Dementia.* 2011;7(3):270–9.
6. Sperling RA, Aisen PS, Beckett LA, Bennett DA, Craft S, Fagan AM, et al. Toward defining the preclinical stages of Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimer's and Dementia.* 2011;7(3):280–92.
7. McKhann GM, Knopman DS, Chertkow H, Hyman BT, Jack CR, Kawas CH, et al. The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: Recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimer's and Dementia.* 2011;7(3):263–9.
8. Simonsen AH, Herukka SK, Andreasen N, Baldeiras I, Bjerke M, Blennow K, et al. Recommendations for CSF AD biomarkers in the diagnostic evaluation of dementia. *Alzheimer's & Dementia.* 2017;13(3):274–84.
9. Zetterberg H, Blennow K. Moving fluid biomarkers for Alzheimer's disease from research tools to routine clinical diagnostics. Vol. 16, *Molecular Neurodegeneration.* BioMed Central Ltd; 2021.
10. Ehrenberg AJ, Khatun A, Coomans E, Betts MJ, Capraro F, Thijssen EH, et al. Relevance of biomarkers across different neurodegenerative. *Alzheimers Res Ther.* 2020;12(1):22.
11. Jack CR, Bennett DA, Blennow K, Carrillo MC, Dunn B, Haeberlein SB, et al. NIA-AA Research Framework: Toward a biological definition of Alzheimer's disease. Vol. 14, *Alzheimer's and Dementia.* Elsevier Inc.; 2018. p. 535–62.

12. Baldeiras I, Silva-Spínola A, Lima M, Leitão MJ, Durães J, Vieira D, et al. Alzheimer's Disease Diagnosis Based on the Amyloid, Tau, and Neurodegeneration Scheme (ATN) in a Real-Life Multicenter Cohort of General Neurological Centers. *Journal of Alzheimer's Disease*. 2022;90(1):419–32.
13. Zerr I, Schmitz M, Karch A, Villar-Piqué A, Kanata E, Golanska E, et al. Cerebrospinal fluid neurofilament light levels in neurodegenerative dementia: Evaluation of diagnostic accuracy in the differential diagnosis of prion diseases. *Alzheimer's and Dementia*. 2018;14(6):751–63.
14. Silva-Spínola A, Lima M, Leitão MJ, Durães J, Tábuas-Pereira M, Almeida MR, et al. Serum neurofilament light chain as a surrogate of cognitive decline in sporadic and familial frontotemporal dementia. *Eur J Neurol*. 2022;29(1):36–46.
15. Abu-Rumeileh S, Mometto N, Bartoletti-Stella A, Polischi B, Oppi F, Poda R, et al. Cerebrospinal fluid biomarkers in patients with frontotemporal dementia spectrum: A single-center study. *Journal of Alzheimer's Disease*. 2018;66(2):551–63.
16. Pijnenburg YAL, Verwey NA, van der Flier WM, Scheltens P, Teunissen CE. Discriminative and prognostic potential of cerebrospinal fluid phosphoTau/tau ratio and neurofilaments for frontotemporal dementia subtypes. *Alzheimer's and Dementia: Diagnosis, Assessment and Disease Monitoring*. 2015;1(4):505–12.
17. Fialova L, Bartos A, Svarcova J. Neurofilaments and tau proteins in cerebrospinal fluid and serum in dementias and neuroinflammation. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*. 2017;161(3):286–95.
18. Meeter LHH, Vijverberg EG, Del Campo M, Rozemuller AJM, Donker Kaat L, de Jong FJ, et al. Clinical value of neurofilament and phospho-tau/tau ratio in the frontotemporal dementia spectrum. *Neurology*. 2018;90(14):e1231–9.
19. Hu WT, Watts K, Grossman M, Glass J, Lah JJ, Hales C, et al. Reduced CSF p-Tau181 to Tau ratio is a biomarker for FTLD-TDP. *Neurology*. 2013;81(22):1945.
20. Borroni B, Benussi A, Archetti S, Galimberti D, Parnetti L, Nacmias B, et al. Csf p-tau181/tau ratio as biomarker for TDP pathology in frontotemporal dementia. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener*. 2015;16(1–2):86–91.
21. Fenu G, Oppo V, Serra G, Loreface L, Di Sefano F, Deagostini D, et al. Relationship between CSF tau biomarkers and structural brain MRI measures in frontotemporal lobar degeneration. *J Neurol Sci*. 2022;442.
22. Zhang J, Mattison HA, Liu C, Ghingina C, Auinger P, McDermott MP, et al. Longitudinal assessment of tau and amyloid beta in cerebrospinal fluid of Parkinson disease. *Acta Neuropathol*. 2013;126(5):671–82.
23. Gong Z, Gao L, Lu Y, Wang Z. CSF p-tau as a potential cognition impairment biomarker in ALS. *Front Neurol*. 2022;13.

24. Leitão MJ, Baldeiras I, Almeida MR, Ribeiro MH, Santos AC, Ribeiro M, et al. CSF Tau proteins reduce misdiagnosis of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease suspected cases with inconclusive 14-3-3 result. *J Neurol.* 2016;263(9):1847–61.
25. Onyike CU, Diehl-Schmid J. The Epidemiology of Frontotemporal Dementia. *Int Rev Psychiatry.* 2013;25(2):130.
26. Li P, Quan W, Wang Z, Liu Y, Cai H, Chen Y, et al. Early-stage differentiation between Alzheimer's disease and frontotemporal lobe degeneration: Clinical, neuropsychology, and neuroimaging features. *Front Aging Neurosci.* 2022;14:1262.
27. Dubois B, Feldman HH, Jacova C, Hampel H, Molinuevo JL, Blennow K, et al. Advancing research diagnostic criteria for Alzheimer's disease: the IWG-2 criteria. *Lancet Neurol.* 2014;13(6):614–29.
28. Rascovsky K, Hodges JR, Knopman D, Mendez MF, Kramer JH, Neuhaus J, et al. Sensitivity of revised diagnostic criteria for the behavioural variant of frontotemporal dementia. *Brain.* 2011;134(9):2456–77.
29. Gorno-Tempini ML, Hillis AE, Weintraub S, Kertesz A, Mendez M, Cappa SF, et al. Classification of primary progressive aphasia and its variants. *Neurology.* 2011;76(11):1006–14.
30. Del Campo M, Mollenhauer B, Bertolotto A, Engelborghs S, Hampel H, Simonsen AH, et al. Recommendations to standardize preanalytical confounding factors in Alzheimers and Parkinsons disease cerebrospinal fluid biomarkers: An update. Vol. 6, *Biomarkers in Medicine.* 2012. p. 419–30.
31. Mattsson N, Andreasson U, Persson S, Arai H, Batish SD, Bernardini S, et al. The Alzheimer's Association external quality control program for cerebrospinal fluid biomarkers. *Alzheimer's and Dementia.* 2011;7(4).
32. Leitão MJ, Silva-Spínola A, Santana I, Olmedo V, Nadal A, Le Bastard N, et al. Clinical validation of the Lumipulse G cerebrospinal fluid assays for routine diagnosis of Alzheimer's disease. *Alzheimers Res Ther.* 2019;11(1).
33. Guerreiro, M., Silva, A.P., Botelho, M.A., Leitão, O., Castro Caldas, A., & Garcia, C. (1994). Adaptação à população portuguesa da tradução do "Mini Mental State Examination" (MMSE). *Revista Portuguesa de Neurologia*, 1,9.
34. Kim CK, Lee YR, Ong L, Gold M, Kalali A, Sarkar J. Alzheimer's Disease: Key Insights from Two Decades of Clinical Trial Failures. *Journal of Alzheimer's Disease.* 2022;87(1):83–100.
35. Yiannopoulou KG, Anastasiou AI, Zachariou V, Pelidou SH. Reasons for Failed Trials of Disease-Modifying Treatments for Alzheimer Disease and Their Contribution in Recent Research. *Biomedicines.* 2019;7(4).
36. Forgrave LM, Ma M, Best JR, DeMarco ML. The diagnostic performance of neurofilament light chain in CSF and blood for Alzheimer's disease, frontotemporal dementia, and amyotrophic

- lateral sclerosis: A systematic review and meta-analysis. *Alzheimer's & Dementia: Diagnosis, Assessment & Disease Monitoring*. 2019;11:730.
37. Abu-Rumeileh S, Capellari S, Stanzani-Maserati M, Polischi B, Martinelli P, Caroppo P, et al. The CSF neurofilament light signature in rapidly progressive neurodegenerative dementias. *Alzheimers Res Ther*. 2018; 10(1).
 38. Körtvelyessy P, Heinze HJ, Prudlo J, Bittner D. CSF biomarkers of neurodegeneration in progressive non-fluent aphasia and other forms of frontotemporal dementia: Clues for pathomechanisms? *Front Neurol*. 2018;9:504.
 39. Bocchetta M, Malpetti M, Todd EG, Rowe JB, Rohrer JD. Looking beneath the surface: the importance of subcortical structures in frontotemporal dementia. *Brain Commun*. 2021;3(3).
 40. Constantinides VC, Paraskevas GP, Boufidou F, Bourbouli M, Pyrgelis ES, Stefanis L, et al. CSF A β 2 and A β 2/A β 0 Ratio in Alzheimer's Disease and Frontotemporal Dementias. *Diagnostics*. 2023;13(4).
 41. Álvarez-Sánchez L, Peña-Bautista C, Ferré-González L, Balaguer A, Baquero M, Casanova-Estruch B, et al. Assessment of Plasma and Cerebrospinal Fluid Biomarkers in Different Stages of Alzheimer's Disease and Frontotemporal Dementia. *International Journal of Molecular Sciences* 2023, Vol 24, Page 1226. 2023;24(2):1226.
 42. Chouliaras L, Thomas A, Malpetti M, Donaghy P, Kane J, Mak E, et al. Differential levels of plasma biomarkers of neurodegeneration in Lewy body dementia, Alzheimer's disease, frontotemporal dementia and progressive supranuclear palsy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2022;93(6).
 43. McGrowder DA, Miller F, Vaz K, Nwokocha C, Wilson-Clarke C, Anderson-Cross M, et al. Cerebrospinal Fluid Biomarkers of Alzheimer's Disease: Current Evidence and Future Perspectives. *Brain Sci*. 2021;11(2):1–56.
 44. Kester MI, Van Der Vlies AE, Blankenstein MA, Pijnenburg YAL, Van Elk EJ, Scheltens P, et al. CSF biomarkers predict rate of cognitive decline in Alzheimer disease. *Neurology*. 2009; 73(17):1353–8.
 45. Ljubenkov PA, Staffaroni AM, Rojas JC, Allen IE, Wang P, Heuer H, et al. Cerebrospinal fluid biomarkers predict frontotemporal dementia trajectory. *Ann Clin Transl Neurol*. 2018; 5(10):1250–63.
 46. Leroy M, Bertoux M, Skrobala E, Mode E, Adnet-Bonte C, Le Ber I, et al. Characteristics and progression of patients with frontotemporal dementia in a regional memory clinic network. *Alzheimers Res Ther*. 2021;13(1):1–11.
 47. Giebel CM, Knopman D, Mioshi E, Khondoker M. Distinguishing Frontotemporal Dementia From Alzheimer Disease Through Everyday Function Profiles: Trajectories of Change. *J Geriatr Psychiatry Neurol*. 2021;34(1):66–75.

48. Mioshi E, Kipps CM, Dawson K, Mitchell J, Graham A, Hodges JR. Activities of daily living in frontotemporal dementia and Alzheimer disease. *Neurology*. 2007;68(24):2077–84.
49. Roberson ED, Hesse JH, Rose KD, Slama H, Johnson JK, Yaffe K, et al. Frontotemporal dementia progresses to death faster than Alzheimer disease. *Neurology*. 2005;65(5):719–25.
50. Mioshi E, Hsieh S, Savage S, Hornberger M, Hodges JR. Clinical staging and disease progression in frontotemporal dementia. *Neurology*. 2010;74(20):1591–7.

