

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

JULIANA BEKER GODOY

ASSINATURA MOLECULAR DE CITOCINAS NA DOENÇA DE ALZHEIMER E
ASSOCIAÇÕES CLÍNICAS NAS COORTES ROSMAP, MAYO E MSBB

CURITIBA

2025

JULIANA BEKER GODOY

ASSINATURA MOLECULAR DE CITOCINAS NA DOENÇA DE ALZHEIMER E
ASSOCIAÇÕES CLÍNICAS NAS COORTES ROSMAP, MAYO E MSBB

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Bioinformática no Setor de
Educação e Tecnologia, na Universidade Federal do
Paraná, como requisito parcial à obtenção de título de
Mestre em Bioinformática

Orientadora: Profa. Dra. Katia de Paiva Lopes
Co-orientador: Prof. Dr. Dieval Guizelini

CURITIBA

2025

Catalogação na publicação
Sistema de Bibliotecas UFPR

Godoy, Juliana Beker

Assinatura molecular de citocinas na doença de Alzheimer e associações clínicas nas coortes ROSMAP, MAYO e MSBB / Juliana Beker Godoy. - Curitiba, 2025.

1 recurso on-line : PDF.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Educação Profissional e Tecnológica, Programa de Pós-Graduação em Bioinformática, 2025.

Orientador: Dra. Katia de Paiva Lopes

Coorientador: Dr. Dieval Guizelini

1. Bioinformática. 2. Doença de Alzheimer. 3. Doenças Neuroinflamatórias. 4. Citocinas. 5. Transcriptoma. 6. Biomarcadores. 7. snRNA-Seq. I. Lopes, Katia de Paiva. II. Guizelini, Dieval. III. Título. IV. Universidade Federal do Paraná.

Bibliotecário: André A. Oliveira — CRB 9/2019



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE EDUCAÇÃO PROFISSIONAL E TECNOLÓGICA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO BIOINFORMÁTICA -
40001016066P4

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação BIOINFORMÁTICA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **JULIANA BEKER GODOY**, intitulada: **Assinatura molecular de Citocinas na doença de Alzheimer e associações clínicas nas coortes ROSMAP, Mayo e MSBB**, sob orientação da Profa. Dra. KATIA DE PAIVA LOPES, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestra está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 25 de Março de 2025.

Assinatura Eletrônica

09/04/2025 11:16:45.0

KATIA DE PAIVA LOPES

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

09/04/2025 10:56:37.0

VERÔNICA RODRIGUES DE MELO COSTA

Avaliador Externo (DEUTSCHES KREBSFORSCHUNGSZENTRUM)

Assinatura Eletrônica

09/04/2025 11:14:33.0

JERONIZA NUNES MARCCHAUOSKI

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

09/04/2025 15:27:02.0

GILDERLANIO SANTANA DE ARAÚJO

Avaliador Externo (LABORATÓRIO DE GENÉTICA HUMANA E
MÉDICA - UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ)

*Dedico este trabalho à minha mãe, Gilselena, que por muitas vezes escolheu sonhar
os meus sonhos ao invés dos dela. Obrigada.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha orientadora, Profa. Dra. Katia de Paiva Lopes, pela cuidadosa orientação ao longo destes mais de dois anos. Obrigada por me ensinar tanto sobre bioinformática e neurociência, pelas conversas e pela confiança na minha capacidade. Sua competência é inspiradora, e ser sua orientada foi uma das minhas maiores sortes e privilégios.

Agradeço ao meu co-orientador, Prof. Dr. Dieval Guizelini, pelas conversas e pelos *insights* sempre muito pontuais e necessários para o desenvolvimento deste projeto.

Agradeço à Suzana, não apenas pelo profissionalismo ao conduzir a secretaria da pós-graduação, mas também por ser um ser humano ímpar. Obrigada pelo apoio e pelo carinho.

Agradeço aos professores e aos meus colegas da bioinformática (Loren, Guilherme, Bruno, Elsa, Leonardo, Irapuru, Camila) pelo aprendizado e por sempre se disporem a me ajudar, seja com uma palavra ou um café.

Agradeço à minha família por todo o amor e suporte, em especial à minha mãe, Gilselena; à minha querida irmã, Maria; ao meu padrasto, Alípio; e à minha tia Zuleica. Obrigada por tudo e por serem a base das minhas conquistas.

Ao meu marido, Alexandre, minha eterna gratidão. A vida seria menos divertida sem você. Obrigada pelo carinho, pelo apoio incondicional e por compreender minha ausência ao longo destes anos. Eu te amo hoje e sempre.

Agradeço às minhas amigas Gabriela, Israella, Amanda “Lopa”, Fernanda, Ana Carolina e Jéssica. Que felicidade é compartilhar a vida, as grandes e as pequenas conquistas, com mulheres tão inspiradoras quanto vocês.

Agradeço aos meus amigos Lucas, Rodrigo, Jefferson, Pedrão, Bruno e Rafael pelas risadas e pelo companheirismo.

Agradeço à Universidade Federal do Paraná, aos seus professores, técnicos, servidores e terceirizados. Durante toda a minha infância e ao longo dos últimos 15 anos, tive acesso à saúde e à educação gratuitas e de qualidade, tanto como filha de servidora quanto como aluna do ensino médio, da graduação e da pós-graduação. Obrigada a todos os profissionais.

Agradeço à CAPES pela bolsa disponibilizada ao longo deste trabalho.

Agradeço aos voluntários das coortes ROSMAP e a todos os profissionais do *Rush Alzheimer's Disease Center*, cujos esforços possibilitaram o desenvolvimento deste trabalho.

RESUMO

A doença de Alzheimer (DA) é uma doença neurodegenerativa complexa associada à neuroinflamação crônica. Este estudo investigou o perfil de expressão de citocinas em amostras do córtex cerebral de indivíduos idosos com DA, a fim de identificar biomarcadores e compreender melhor a patogênese da doença. Utilizando dados de sequenciamento de RNA de alta profundidade, foram identificados um conjunto de citocinas cuja expressão está significativamente associada a diferentes aspectos do fenótipo da DA, incluindo declínio cognitivo, deposição de placas A β e emaranhados neurofibrilares. Também foram analisados dados de sequenciamento de núcleo único, o que permitiu a identificação de citocinas sendo expressas em células específicas, como microglia e astrócitos, que contribuem de forma significativa para a resposta inflamatória na DA. Além disso, foi observada uma correlação entre a expressão de algumas citocinas e o risco genético para a doença. Nossos resultados sugerem que a neuroinflamação mediada por citocinas desempenha um papel importante na progressão da DA e que a modulação da resposta imune pode ser uma estratégia promissora para o desenvolvimento de novas terapias.

Palavras-chave: Doença de Alzheimer; neuroinflamação; citocinas; transcriptoma; biomarcadores; sequenciamento de núcleo único.

ABSTRACT

Alzheimer's disease (AD) is a complex neurodegenerative condition associated with chronic neuroinflammation. This study investigated the cytokine gene expression profile in cerebral cortex samples from elderly individuals with AD to identify biomarkers and gain a deeper understanding of disease pathogenesis. Using high-depth RNA sequencing data, we identified a set of cytokines whose expression is significantly associated with different aspects of the AD phenotype, including cognitive decline, A β plaque deposition, and neurofibrillary tangles. Single-nucleus data analysis enabled the identification of specific cell types, such as microglia and astrocytes, that contribute significantly to the inflammatory response in AD. Furthermore, we observed a strong correlation between the expression of certain cytokines and genetic risk for the disease. Our findings suggest that cytokine-mediated neuroinflammation plays a crucial role in AD progression and that modulating the immune response may be a promising strategy for developing new therapies.

Key words: Alzheimer's disease; neuroinflammation; cytokines; transcriptome; biomarkers; single-nucleus RNASeq.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1: DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	22
FIGURA 2: DEPÓSITOS DE β -AMILÓIDE E EMARANHADOS NEUROFIBRILARES. 24	
FIGURA 3: DISTRIBUIÇÃO DOS VOLUNTÁRIOS DO ROSMAP CATEGORIZADOS DE ACORDO COM A IDADE DE ÓBITO E SEXO.....	36
FIGURA 4: DISTRIBUIÇÃO DOS ANOS DE EDUCAÇÃO FORMAL ENTRE OS PARTICIPANTES DO ROSMAP, CATEGORIZADOS PELO SEXO.....	37
FIGURA 5: DISTRIBUIÇÃO DOS VOLUNTÁRIOS DO ROSMAP CATEGORIZADOS DE ACORDO COM O DIAGNÓSTICO CLÍNICO E SEXO.....	38
FIGURA 6: PORCENTAGEM DE CÉLULAS POR GRUPO CELULAR NOS DADOS DE snRNA-SEQ.....	40
FIGURA 7: FLUXO DE TRABALHO UTILIZADO NA ANÁLISE DE EXPRESSÃO DE CITOCINAS ASSOCIADAS AO FENÓTIPO RELACIONADOS À DA.....	44
FIGURA 8: DISTRIBUIÇÃO DOS GENES EXPRESSOS E ASSOCIADOS AO FENÓTIPO POR CONJUNTO DE DADOS.....	45
FIGURA 9: ASSOCIAÇÃO ENTRE A EXPRESSÃO DE CITOCINAS NO BULK E O FENÓTIPO RELACIONADO À DA.....	46
FIGURA 10: GENES EXPRESSOS NOS DADOS DE snRNA-seq ASSOCIADOS AO FENÓTIPO RELACIONADO À DA.....	48
FIGURA 11: ANÁLISE DA EXPRESSÃO DO GENE IL15 EM DADOS DE BULK E snRNA-SEQ.....	50
FIGURA 12: ASSOCIAÇÕES ENTRE A EXPRESSÃO DE CITOCINAS E AS VARIÁVEIS DO FENÓTIPO RELACIONADAS À DA EM ESTUDOS EXTERNOS..	53
FIGURA 13: FLUXO DE TRABALHO UTILIZADO NA ANÁLISE DA CONTRIBUIÇÃO BIOLÓGICA SOBRE A EXPRESSÃO DE CITOCINAS.....	55
FIGURA 14: VARIAÇÃO PERCENTUAL DE CITOCINAS NO BULK EXPLICADA PELO FENÓTIPO.....	56
FIGURA 15: VARIAÇÃO PERCENTUAL DE CITOCINAS NA MICROGLIA EXPLICADA PELO FENÓTIPO.....	57
FIGURA 16: VARIAÇÃO PERCENTUAL DE CITOCINAS NOS OLIGODENDRÓCITOS	

EXPLICADA PELO FENÓTIPO.....	57
FIGURA 17: PC1 E PC2 DO BULK APÓS AJUSTE POR VARIÁVEIS TÉCNICAS.....	59
FIGURA 18: FLUXO DE TRABALHO UTILIZADO NA ANÁLISE DA CONTRIBUIÇÃO BIOLÓGICA SOBRE A EXPRESSÃO DE CITOCINAS.....	60
FIGURA 19: COMPONENTES PRINCIPAIS E VARIÁVEIS FENOTÍPICAS CORRELACIONADOS.....	62
FIGURA 20: AGRUPAMENTO DOS COMPONENTES PRINCIPAIS CORRELACIONADOS POSITIVAMENTE COM O FENÓTIPO RELACIONADOS À DA EM DESTAQUE.....	63
FIGURA 21: DISTRIBUIÇÃO DOS DECÍS DE DA-PRS.....	67
FIGURA 22: EXPRESSÃO MÉDIA DE CITOCINAS EM INDIVÍDUOS COM ALTO E BAIXO RISCO GENÉTICO PARA DA.....	71
FIGURA 23: TOP 5 CITOCINAS CORRELACIONADAS COM O RISCO GENÉTICO PARA O DESENVOLVIMENTO DA DOENÇA DE ALZHEIMER (DA-PRS).....	72
FIGURA 24: MÉDIA DOS COEFICIENTES DE CORRELAÇÃO ENTRE A EXPRESSÃO DE CITOCINAS E O RISCO GENÉTICO CALCULADO PARA O DESENVOLVIMENTO DE ALZHEIMER (DA-PRS).....	73
FIGURA 25: TESTE DE PERMUTAÇÃO.....	74
FIGURA 26: ANÁLISE DE ENRIQUECIMENTO FUNCIONAL DE GENES DE FAMÍLIAS DE CITOCINAS.....	75

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – RESUMO DAS CITOCINAS IDENTIFICADAS NOS DADOS DE BULK E snRNA-SEQ.....	44
TABELA 2 – CITOCINAS ASSOCIADAS A CADA FENÓTIPO AVALIADO NOS DADOS DE BULK RNA-SEQ.....	46
TABELA 3: CARGAS FATORIAIS DOS COMPONENTES PRINCIPAIS MAIS RELEVANTES CORRELACIONADOS COM O FENÓTIPO RELACIONADO À DA.....	64
TABELA 4: COMPONENTES PRINCIPAIS CORRELACIONADOS COM O FENÓTIPO...	65

LISTA DE ABREVIATURAS

A β	Proteína β -amiloide
APP	Proteína precursora amilóide
Ast	Astrócitos
BH	Método de Benjamini-Hochberg
bulk RNA-seq	Sequenciamento de RNA em tecido total
BA	Área Brodmann
CDR	<i>Clinical Dementia Rating</i>
DA	Doença de Alzheimer
DA-PRS	Risco poligênico para doença de Alzheimer
DAMPs	Padrões moleculares associados ao dano
DFT	Demência frontotemporal
End	Células endoteliais
Ext	Neurônios excitatórios
FDR	Taxa de descoberta falsa
GSEA	Análise de enriquecimento de conjuntos de genes
GWAS	Estudo de associação do genoma completo
Inh	Neurônios inibitórios
MCI	Comprometimento cognitivo leve
Mic	Microglia
NCI	Indivíduos cognitivamente saudáveis
mRNA	RNA mensageiro
Oli	Oligodendrócitos
OPN	Osteopontina
Opc	Células precursoras de oligodendrócitos
PCA	Análise de componentes principais
PC	Componentes principais
RNA-seq	Técnica de sequenciamento de RNA
SNC	Sistema nervoso central
snRNA-seq	Sequenciamento de RNA em núcleo único
SNPs	Polimorfismos de nucleotídeo único
TNF	Fator de necrose tumoral

LISTA DE SIGLAS

ADRDA	<i>Alzheimer's Disease and Related Disorders Association</i>
CCACE	<i>Center for Cognitive Ageing and Cognitive Epidemiology</i>
CERAD	<i>Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease</i>
DLPFC	Córtex pré-frontal dorsolateral
IGAP	<i>International Genomics of Alzheimer's Project</i>
MSBB	<i>Mount Sinai Brain Bank</i>
NINCDS	<i>National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke</i>
RADC	<i>Rush Alzheimer's Disease Center</i>
ROSMAP	<i>Religious Orders Study and Rush Memory and Aging Project</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	15
1.1 OBJETIVOS.....	17
1.1.1 Objetivos específicos.....	17
1.2 JUSTIFICATIVA.....	18
1.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	21
1.4 ORGANIZAÇÃO DA DISSERTAÇÃO.....	23
2 A DOENÇA DE ALZHEIMER.....	24
3 NEUROINFLAMAÇÃO E CITOCINAS.....	27
4 SEQUENCIAMENTO DE RNA.....	30
5 OBTENÇÃO DOS DADOS.....	32
5.1 COORTES DE ESTUDO DE ENVELHECIMENTO.....	32
5.1.1 Avaliação cognitiva e diagnóstico clínico.....	33
5.1.2 Taxa de declínio cognitivo e resiliência.....	34
5.1.3 Mensuração de deposição de A β e emaranhados neurofibrilares.....	34
5.1.4 Características da população do estudo.....	35
5.1.5 Dados de RNA-seq de cérebro humano.....	39
5.1.6 Dados de RNA-seq de núcleo único.....	39
5.2 REPLICAÇÃO DOS DADOS.....	40
5.2.1 <i>Mount Sinai Brain Bank</i>	41
5.2.2 <i>Mayo Clinic</i>	41
6 CITOCINAS ASSOCIADAS À DOENÇA DE ALZHEIMER.....	43
6.1 LISTA DE CITOCINAS.....	43
6.2 MÉTODOS.....	43
6.3 RESULTADOS.....	44
6.4 VALIDAÇÃO DAS ASSOCIAÇÕES.....	51
6.4.1 Materiais e métodos.....	51
6.4.2 Resultados.....	51

7 O FENÓTIPO INFLUENCIA NA EXPRESSÃO DE CITOCINAS?	54
7.1 MATERIAIS E MÉTODOS	54
7.2 RESULTADOS	55
8 INTEGRAÇÃO MULTIMODAL	58
8.1 MATERIAIS E MÉTODOS	58
8.2 RESULTADOS	60
9 O RISCO GENÉTICO E A IMUNOMODULAÇÃO	66
9.1 MATERIAIS E MÉTODOS	66
9.1.1 Pontuação do risco poligênico para DA	66
9.1.2 Avaliação da média de expressão de citocinas	67
9.1.3 Análise de associação entre a expressão de citocinas e DA-PRS	68
9.1.4 Testes de correlação e permutação	68
9.1.5 Análise de enriquecimento de conjuntos de genes	68
9.2 RESULTADOS	69
10 DISCUSSÃO	76
11 CONCLUSÕES	86
12 PUBLICAÇÕES	87
12.1 X-MEETING 2023	87
12.1.1 Resumo	87
12.2 AAIC NEUROSCIENCE NEXT 2024	89
12.2.1 Resumo	89
12.3 X-MEETING 2024	91
12.3.1 Resumo	91
REFERÊNCIAS	93
APÊNDICE A - PRIMEIRO RASCUNHO DO ARTIGO	109
APÊNDICE B - LISTA DE CITOCINAS	135
APÊNDICE C - VARIAÇÃO PERCENTUAL DE CITOCINAS NOS NEURÔNIOS EXCITATÓRIOS EXPLICADA PELO FENÓTIPO	140
APÊNDICE D - VARIAÇÃO PERCENTUAL DE CITOCINAS NOS NEURÔNIOS	

INIBITÓRIOS EXPLICADA PELO FENÓTIPO.....	141
APÊNDICE E - VARIAÇÃO PERCENTUAL DE CITOCINAS NOS ASTRÓCITOS EXPLICADA PELO FENÓTIPO.....	142
APÊNDICE F -VARIAÇÃO PERCENTUAL DE CITOCINAS NOS OPCs EXPLICADA PELO FENÓTIPO.....	143
APÊNDICE G - VARIAÇÃO PERCENTUAL DE CITOCINAS NAS CÉLULAS ENDOTELIAIS EXPLICADA PELO FENÓTIPO.....	144
APÊNDICE H - PC1 E PC2 DOS NEURÔNIOS EXCITATÓRIOS APÓS AJUSTE PELAS VARIÁVEIS TÉCNICAS.....	145
APÊNDICE I - PC1 E PC2 DOS NEURÔNIOS INIBITÓRIOS APÓS AJUSTE PELAS VARIÁVEIS TÉCNICAS.....	146
APÊNDICE J - PC1 E PC2 DA MICROGLIA APÓS AJUSTE PELAS VARIÁVEIS TÉCNICAS.....	147
APÊNDICE K - PC1 E PC2 DOS ASTRÓCITOS APÓS AJUSTE PELAS VARIÁVEIS TÉCNICAS.....	148
APÊNDICE L - PC1 E PC2 DOS OLIGODENDRÓCITOS APÓS AJUSTE PELAS VARIÁVEIS TÉCNICAS.....	149
APÊNDICE M - PC1 E PC2 DAS OPCs APÓS AJUSTE PELAS VARIÁVEIS TÉCNICAS.....	150
APÊNDICE N - COMPONENTES PRINCIPAIS DA ANÁLISE DO BULK RNA-SEQ...	151
APÊNDICE O - COMPONENTES PRINCIPAIS DOS NEURÔNIOS EXCITATÓRIOS.	154
APÊNDICE P - COMPONENTES PRINCIPAIS DOS NEURÔNIOS INIBITÓRIOS	156
APÊNDICE Q - COMPONENTES PRINCIPAIS DA MICROGLIA.....	158
APÊNDICE R - COMPONENTES PRINCIPAIS DOS ASTRÓCITOS.....	160
APÊNDICE S - COMPONENTES PRINCIPAIS DOS OLIGODENDRÓCITOS.....	162
APÊNDICE T - COMPONENTES PRINCIPAIS DOS OPCs.....	164
APÊNDICE U - COMPONENTES PRINCIPAIS DAS CÉLULAS ENDOTELIAIS....	166

1 INTRODUÇÃO

A Doença de Alzheimer (DA) é a principal causa de demência, responsável por cerca de dois terços dos casos, e destaca-se como a maior causa de incapacidade e dependência entre idosos em todo o mundo (WHO, 2023). A demência é uma síndrome clínica resultante de doenças ou lesões cerebrais, caracterizada pela perda de duas ou mais habilidades cognitivas (Arvanitakis et al., 2019). O comprometimento cognitivo na DA é heterogêneo; embora a perda de memória seja a manifestação mais comum, outras habilidades, como linguagem, funções visoespaciais e executivas, também podem ser afetadas, comprometendo de forma significativa a vida social e profissional dos pacientes (Knopman et al., 2021).

A DA patológica é uma condição neurodegenerativa progressiva, caracterizada pelo acúmulo de placas β -amilóides ($A\beta$) extracelulares, provenientes da clivagem incorreta da proteína precursora amilóide (APP), e pela deposição de emaranhados neurofibrilares intraneuronais, resultantes da hiperfosforilação da proteína tau (Gallardo & Holtzman, 2019; Long & Holtzman, 2019). Por muitos anos, a neuroinflamação foi vista como uma resposta secundária à deposição de proteínas neurotóxicas e à intensa morte neuronal observada nesses pacientes. No entanto, estudos recentes indicam que a fisiopatologia relacionada à DA vai além da disfunção neuronal, envolvendo também interações significativas com o sistema imunológico (Castro-Gomez & Heneka, 2024; Heneka et al., 2015; Raj et al., 2014; Prins et al., 2022).

A neuroinflamação é desencadeada pela ativação das células do sistema imunológico inato em resposta à presença de padrões moleculares associados ao dano, conhecidos como DAMPs. Os receptores envolvidos nesse reconhecimento estão amplamente distribuídos no sistema nervoso central (SNC), sendo expressos pela microglia, astrócitos, oligodendrócitos, células endoteliais e neurônios. A deposição de $A\beta$ e de emaranhados neurofibrilares no córtex desempenha o papel de agentes desencadeadores, alterando o perfil de expressão gênica em células gliais e neuronais através do reconhecimento destas moléculas pelos receptores de membrana. Esse reconhecimento leva à ativação da resposta inflamatória, com recrutamento e proliferação celular (Hansen et al., 2018).

A ativação de vias inflamatórias intracelulares estimula a produção de diferentes moléculas, como as citocinas, reconhecidos mediadores-chave na resposta neuroinflamatória (Sobue, Komine & Yamanaka, 2023). Em condições homeostáticas, as citocinas são fundamentais para o neurodesenvolvimento e a regulação de funções cognitivas, como transmissão e plasticidade sináptica, aprendizado e memória (Bourgognon e Cavanagh, 2020;

Zipp, Bittner & Schafer, 2023). Por outro lado, o acúmulo excessivo de proteínas neurotóxicas no parênquima cerebral, como observado em indivíduos com DA, possivelmente leva à ativação crônica das células gliais, desregulando a expressão de citocinas e propagando a lesão tecidual para outras regiões (Chen et al., 2024; Lau et al., 2021).

Níveis aumentados de moléculas inflamatórias como IL-18 e caspase-1 em microglia, astrócitos e neurônios foram encontrados no lobo frontal de pacientes com DA, co-localizadas com placas de A β e proteína tau hiperfosforilada (Ojala et al., 2009). Além disso, altas concentrações de IL-12, IL-16, IL-18, TGF β 1 foram encontrados no plasma e no líquido cefalorraquidiano de pacientes com DA, correlacionando-se com níveis de A β e tau, dependendo do grau da progressão da doença (Motta et al. 2007; Ojala et al., 2009; Oztürk et al. 2007; Zetterberg et al. 2004).

Não há um consenso quanto à participação das citocinas na progressão da DA. A variabilidade considerável entre os estudos e a complexidade do papel dessas moléculas na resposta neuroinflamatória evidenciam a necessidade de pesquisas adicionais, a fim de identificar possíveis biomarcadores e alvos terapêuticos (Zheng et al. 2016). Ensaios clínicos com anticorpos anti-amiloides indicam que o acúmulo de A β pode ser um gatilho necessário, mas não suficiente, para o desenvolvimento total da doença. Estudos em humanos e em modelos animais sugerem que a ativação microglial pode preceder a deposição de A β e tau nos tecidos corticais (Castro-Gomez & Heneka, 2024; Kepp et al., 2023; Selkoe & Hardy, 2016). Além disso, estudos de associação do genoma completo (GWAS) revelam enriquecimento significativo de genes de risco de DA associados à vias de ativação da resposta imunológica e funções fagocíticas, principalmente em microglia (Bellenguez et al., 2022; Jansen et al., 2019; Kunkle et al., 2019). Em conjunto, esses estudos sugerem que as respostas imunes inatas desempenham um papel importante e subjacente à progressão da DA.

Este trabalho visa avaliar a associação das citocinas expressas no córtex pré-frontal de pacientes idosos com as variáveis fenotípicas da DA. Para isso, foram utilizados dados transcriptômicos de duas coortes longitudinais, o *Religious Orders Study* e o *Rush Memory and Aging Project* (ROS/MAP). O ROSMAP consiste em coortes baseados na comunidade, projetados para investigar o envelhecimento. Por meio de rigorosas avaliações cognitivas e avaliações neuropatológicas após o falecimento, os pesquisadores avaliam um amplo espectro de características clínicas, moleculares e genéticas associadas a diferentes estágios da DA (Bennett et al., 2018). Utilizando testes de associação e correlação entre os dados transcriptômicos e fenotípicos obtidos desses estudos, este trabalho tem como objetivo avaliar como a expressão de citocinas por células do parênquima cerebral estão relacionadas com a

etiologia da DA. Pontuações de risco genético para o desenvolvimento da doença também foram utilizados para avaliar como os polimorfismos associados à DA estão correlacionados com a expressão de moléculas inflamatórias em cada grupo celular.

1.1 OBJETIVOS

Este estudo tem como objetivo geral investigar como a expressão de moléculas inflamatórias no cérebro de indivíduos idosos se relaciona com a progressão da DA, por meio da análise de dados transcriptômicos da coorte ROSMAP e sua integração com variáveis clínicas, neuropatológicas e genéticas.

1.1.1 Objetivos específicos

- A. Avaliar o perfil de expressão de citocinas no córtex cerebral e sua relação com marcadores clínicos e neuropatológicos da DA, utilizando dados de sequenciamento total de tecido (bulk RNA-seq) e de célula única (snRNA-seq) da coorte ROSMAP, com replicação de resultados de bulk RNA-seq nas coortes *Mayo Clinic* e *Mount Sinai Brain Bank* (MSBB);
- B. Quantificar o impacto de variáveis fenotípicas da DA na expressão de genes inflamatórios no córtex cerebral, utilizando modelos lineares mistos;
- C. Integrar dados transcriptômicos e fenotípicos com técnicas de análise de componentes principais e clusterização para identificar assinaturas inflamatórias associadas à DA;
- D. Investigar a associação entre a expressão de citocinas e a pontuação de risco genético (DA-PRS) para Alzheimer nos dados de snRNA-seq.

1.2 JUSTIFICATIVA

A DA é a quinta principal causa de morte entre idosos com mais de 65 anos (Wong, 2020), e seus impactos vão além dos prejuízos cognitivos, estendendo-se a consequências econômicas e sociais significativas — especialmente para as famílias e cuidadores dos pacientes (Grabher, 2018). Com o envelhecimento crescente da população, projeta-se uma epidemia de demência nas próximas décadas. Estima-se que o número de pessoas com DA alcance 78 milhões em 2030 e 153 milhões em 2050 (GBD 2019 Dementia Forecasting Collaborators, 2022). Atualmente, cerca de 55 milhões de pessoas vivem com demência no mundo, sendo mais de 60% residentes em países de baixa ou média renda (Nichols et al., 2022; Sengoku, 2020). Um estudo de Jia e colaboradores (2018) projeta que os custos socioeconômicos globais relacionados à DA podem atingir 2,54 trilhões de dólares em 2030 e 9,12 trilhões em 2050.

O processo neurodegenerativo na DA tem início com a atrofia hipocampal, progredindo para a degeneração dos neurônios piramidais nos córtices temporal, parietal e frontal. Esses eventos resultam em déficits cognitivos, além de alterações nos aspectos emocionais e de personalidade (Sun et al., 2022). No entanto, o acúmulo de proteínas neurotóxicas pode ter início até três décadas antes do aparecimento dos primeiros sintomas clínicos, provocando danos neuronais progressivos nas regiões cerebrais afetadas (Selkoe, 2012; Selkoe & Hardy, 2016). A maioria dos pacientes com DA é diagnosticada tardiamente, quando as alterações neurodegenerativas já se encontram em estágios avançados — um atraso ainda mais evidente nos casos de DA esporádica, cuja etiologia permanece pouco elucidada. A complexidade envolvida nas alterações neuroanatômicas e clínicas dificultam a identificação de biomarcadores específicos, tornando essencial a investigação dos mecanismos subjacentes à doença (Knopman et al. 2021; Selkoe & Hardy, 2016).

A neuroinflamação tem sido amplamente associada à fisiopatologia da DA, sendo caracterizada pela ativação de células gliais e pela presença de moléculas inflamatórias ao redor de depósitos proteicos neurotóxicos e neurônios danificados, conforme observado em análises de tecido cerebral (Heneka et al., 2015; McGeer & McGeer, 2002; Zhang et al., 2013). Estudos sugerem que a neuroinflamação pode atuar desde os estágios iniciais da doença e de forma independente, com citocinas pró- e anti-inflamatórias atuando em conjunto (Chen et al., 2024). Enquanto citocinas pró-inflamatórias são fundamentais para ativação e sustentação da resposta imune inicial, removendo depósitos A β e células mortas; citocinas

anti-inflamatórias limitam o dano inflamatório, promovendo uma resposta mais equilibrada e neuroprotetora (Zheng et al., 2016).

Citocinas e seus receptores são expressos constitutivamente em diferentes regiões do cérebro por células da glia e neurônios, e sua participação na plasticidade sináptica é um evento chave nos processos de aprendizado e consolidação da memória (Boulanger et al., 2001; Tonelli & Postolache, 2005). Além disso, a expressão de citocinas no SNC é crucial para a modulação de funções homeostáticas e cognitivas, incluindo a regulação do sono (Krueger, 2008), desenvolvimento neuronal (Deverman e Patterson, 2009), metabolismo dos neurotransmissores (Miller et al., 2009; Raison et al., 2006) e a manutenção da barreira hematoencefálica (Yarlagadda et al., 2009).

Porém, a expressão patológica e crônica destas moléculas pode comprometer o equilíbrio homeostático, levando a danos neuronais e déficits cognitivos (Bourgognon & Cavanagh, 2020). Em estudo realizado por Flores-Aguilar et al. (2021), o perfil de secreção de citocinas e o declínio cognitivo foram analisados em pacientes idosos sem demência. A expressão de citocinas pró-inflamatórias, como *IL1B*, *IL6* e eotaxina-3, foi significativamente elevada em indivíduos com deposição de A β em regiões corticais, correlacionando-se com pior desempenho em testes de velocidade de percepção visual. Estes achados indicam que o aumento da expressão de citocinas pode ser um evento precoce na DA, contribuindo criticamente para o declínio cognitivo associado à deposição de A β .

Por outro lado, a presença combinada de citocinas pró- e anti-inflamatórias cria um ambiente complexo, e a desregulação destes processos pode levar à inflamação crônica, acelerando a progressão da DA (Zheng et al., 2016). A complexidade da resposta neuroinflamatória dificulta a distinção clara entre as contribuições de cada célula glial nas fases aguda e crônica da doença. A falta de resolução temporal e espacial nas dinâmicas celulares contribuem para a dificuldade em caracterizar os papéis exatos da glia nas alterações histopatológicas encontradas em indivíduos com DA, como a deposição proteica e a morte neuronal (Vidovic & Spittau, 2024). Portanto, investigar os mecanismos neuroinflamatórios envolvidos nas perturbações da expressão gênica em cada tipo celular é essencial para o desenvolvimento de terapias que modulem a atividade glial e reduzam a neurodegeneração.

Um número crescente de estudos clínicos têm investigado a secreção de citocinas como alvo farmacológico, com o objetivo de modular a resposta inflamatória na DA. Medicamentos voltados para bloquear ou reduzir os efeitos de interleucinas e fatores de necrose tumoral apresentaram resultados promissores em estudos em humanos e animais, diminuindo a neuroinflamação, a fosforilação da tau, os déficits cognitivos e a perda sináptica

associada à DA (Baldwin et al., 2016; Butchart et al., 2015; Elcioğlu et al., 2016; Torres-Acosta et al., 2020; Xu et al., 2021). Contudo, a lacuna translacional entre estudos pré-clínicos e clínicos, a heterogeneidade dos sintomas e a sobreposição de desregulações de citocinas em diferentes condições, demandam mais pesquisas para elucidar as contribuições específicas das citocinas para a patogênese da DA. A complexidade envolvida no desenvolvimento de estratégias terapêuticas para DA também é impulsionada pela interação entre diversos tipos celulares e os depósitos de A β e tau (Yang et al., 2023). Assim, a compreensão abrangente dos mecanismos imunorreguladores das citocinas pode impulsionar o desenvolvimento de terapias mais específicas e eficazes (Chen et al., 2024; Melchiorri et al., 2023).

Fatores de risco genéticos também desempenham um papel crucial na etiologia da doença (Vidovic & Spittau, 2024; Wilson III et al., 2023). Estudos recentes de GWAS indicam que mais de 51% dos genes associados ao risco para DA estão enriquecidos em vias relacionadas ao sistema imunológico inato — muitos deles, como *APOE*, *TREM2* e *CD33*, são expressos por microglia e astrócitos (Bellenguez et al., 2022; Kunkle et al., 2019; Jansen et al., 2019). Além disso, variantes raras foram identificadas em genes essenciais à resposta imune, envolvidos na ativação microglial e em funções fagocíticas (Bis et al., 2020; Goate et al., 1991; Ray et al., 2024; Wightman et al., 2021).

Avanços recentes em tecnologias de sequenciamento de RNA em células únicas revelaram subpopulações microgliais associadas à placas A β com perfis de expressão gênica alterados acompanhados de baixa expressão de genes marcadores microgliais homeostáticos, indicando uma mudança em seu estado funcional (Green et al., 2024). Estudos em camundongos mostram que a expressão de *TREM2* e *APOE*, principais genes de risco para DA, são cruciais para a indução desses fenótipos microgliais, embora seus papéis — sejam benéficos ou prejudiciais — na neurodegeneração ainda não tenham sido totalmente elucidados (Sala Frigerio et al., 2019).

Considerando a complexidade e multifatorialidade da DA, a integração de dados multimodais se faz crucial para ampliar o conhecimento científico da DA, abrindo caminho para o desenvolvimento de abordagens personalizadas de diagnóstico e tratamento (Zhao et al., 2022). Utilizando uma abordagem integrativa, esse trabalho visa contribuir com observações relevantes para compreensão dos mecanismos moleculares complexos envolvidos no processo neuroinflamatório da DA, se beneficiando de um extenso volume de dados clínicos e moleculares de envelhecimento em indivíduos categorizados de acordo com a sua progressão cognitiva ao longo das avaliações anuais.

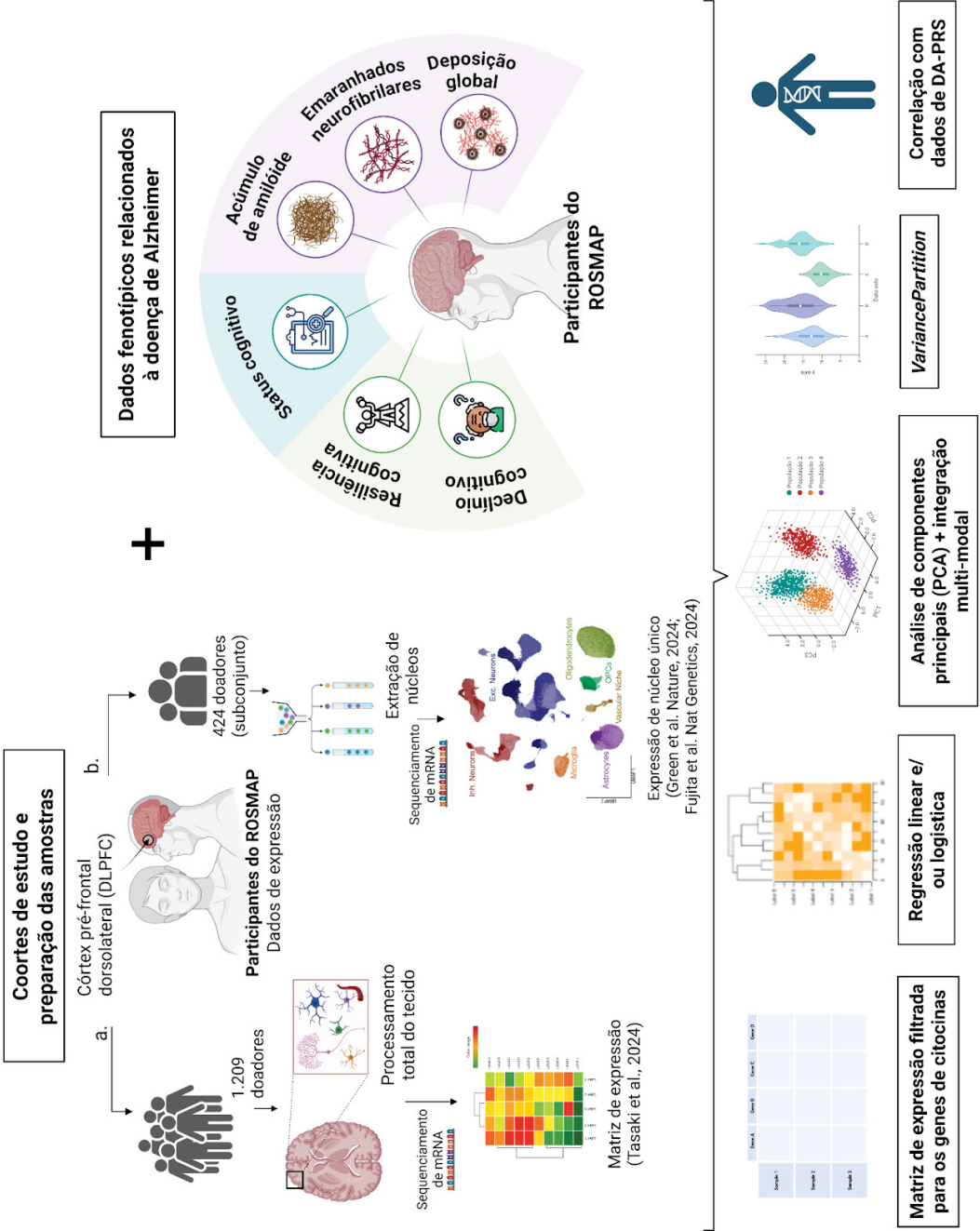
1.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Foi realizada uma análise do perfil de citocinas expressas no córtex pré-frontal de pacientes idosos com dados do estudo longitudinal de coorte sobre envelhecimento ROSMAP, conduzido pela *Rush Alzheimer's Disease Center* (RADC). Os dados incluíram 1.209 amostras de bulk RNA-seq e um subconjunto de 424 amostras de snRNA-seq, abrangendo 7 tipos celulares, incluindo: neurônios excitatórios (ext), neurônios inibitórios (inh), microglia (mic), astrócitos (ast), oligodendrócitos (oli), células precursoras de oligodendrócitos (opc) e células endoteliais (end) (FIGURA 1). Com base nas matrizes de expressão filtradas para os genes-alvo, foram avaliadas as citocinas expressas na região do córtex pré-frontal dorsolateral (DLPFC) que estavam significativamente associadas a variáveis fenotípicas relacionadas à DA. As amostras foram classificadas nas categorias: doença de Alzheimer (DA), comprometimento cognitivo leve (MCI) e indivíduos cognitivamente saudáveis (NCI).

Além disso, foi conduzida uma análise de redução de dimensionalidade dos dados transcriptômicos do ROSMAP, na qual os dez primeiros componentes principais foram correlacionados com as variáveis fenotípicas usando o método de Pearson. A análise integrativa multimodal de 3 camadas de dados (bulk RNA-seq, snRNA-seq e dados clínicos por indivíduo) permitiu identificar grupos de genes com perfis semelhantes de expressão e associação ao fenótipo da DA. Em seguida, foram identificadas as variáveis fenotípicas com maior percentual de contribuição na variação da expressão gênica de moléculas inflamatórias utilizando o pacote *VariancePartition* no R.

Por fim, utilizando os dados de risco poligênico para DA (DA-PRS) previamente calculados para o subconjunto de snRNA-seq, avaliou-se a correlação entre o risco genético e a expressão gênica, além de identificar quais famílias de citocinas correlacionadas ao DA-PRS apresentaram enriquecimento em grupos celulares específicos.

FIGURA 1: DELINEAMENTO EXPERIMENTAL



Fonte: A autora (2025)

1.4 ORGANIZAÇÃO DA DISSERTAÇÃO

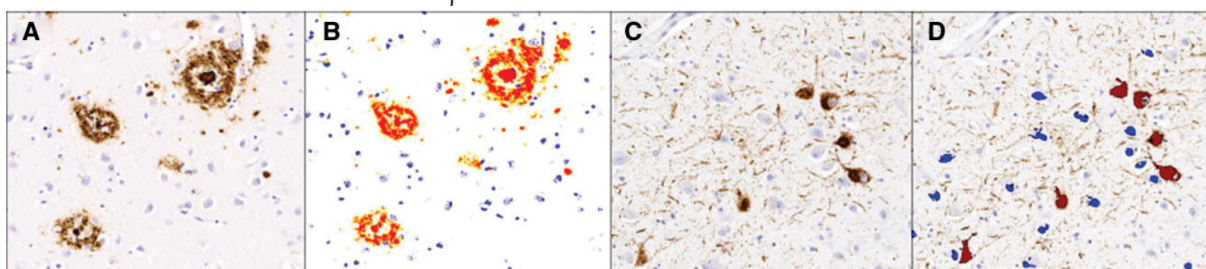
Esta dissertação está estruturada em 12 capítulos, sendo o atual dedicado à introdução. A revisão teórica sobre a fisiopatologia da DA, o processo neuroinflamatório envolvido em doenças neurodegenerativas e a contextualização do uso de sequenciamento de RNA estão divididos entre os capítulos 2 a 4.

O desenvolvimento do projeto foi distribuído entre os capítulos 5 e 10. A descrição dos dados de RNA-seq encontra-se no capítulo 5. Já o capítulo 6 apresenta a metodologia e os resultados obtidos nos testes de associação entre a expressão de citocinas e o fenótipo da DA. O capítulo 7 foca na integração multimodal dos dados transcriptômicos. A quantificação da influência do fenótipo na expressão gênica das moléculas inflamatórias é apresentada no capítulo 8. O capítulo 9 analisa o impacto do risco genético para o desenvolvimento de Alzheimer sobre a expressão de citocinas nos diferentes tipos celulares presentes no córtex. O capítulo 10 é dedicado à discussão dos resultados obtidos, e as conclusões do estudo encontram-se no capítulo 11. Por fim, o capítulo 12 apresenta as publicações e os prêmios recebidos ao longo deste trabalho.

2 A DOENÇA DE ALZHEIMER

A DA é uma condição neurodegenerativa caracterizada pela deposição de placas extracelulares de A β , também conhecidas como placas neuríticas, amplamente distribuídas por todo o córtex (FIGURA 2a-b). A presença de emaranhados neurofibrilares formados pela hiperfosforilação da proteína tau no interior das células nervosas também é uma característica histopatológica observada em autópsias de pacientes com DA (FIGURA 2 c-d). Inicialmente identificadas no lobo temporal medial, elas subsequentemente se propagam para as áreas corticais dos lobos temporal, parietal e frontal (Alzheimer et al., 1991; Arnold et al., 1991; Montine et al., 2012). A interação canônica e complexa entre as patologias amiloide e tau na progressão da DA é central no dogma da doença. A disseminação de agregados proteicos neurotóxicos e insolúveis pelo sistema nervoso central resulta em disfunção sináptica, danos estruturais neuronais e comprometimento cognitivo acentuado em indivíduos com DA. (Masters & O'Neill, 2011; Salminen et al., 2008).

FIGURA 2: DEPÓSITOS DE β -AMILÓIDE E EMARANHADOS NEUROFIBRILARES



Fonte: modificado de Kapasi et al. (2023)

Legenda: Imagens da análise de imunohistoquímica dos depósitos de β -amilóide (a) e emaranhados neurofibrilares (c), com as suas respectivas marcações digitais para quantificação computadorizada (b, d).

A DA é essencialmente um distúrbio de disfunção sináptica, resultando na degradação da integridade das redes neurais e da homeostase sináptica, afetando especialmente áreas críticas para as funções cognitivas (Knopman et al., 2021). Clinicamente, os sintomas incluem comprometimento cognitivo com perda proeminente de memória, dificuldades na fala expressiva, no processamento visual e espacial, e declínio das funções executivas, culminando em dependência total e, por fim, na morte prematura dos indivíduos acometidos. Embora possua uma relação genética complexa, a DA não é predominantemente hereditária. Entre os fatores de risco, como tabagismo, depressão, sedentarismo e diabetes mellitus, a idade é o principal fator associado ao desenvolvimento da doença (Long & Holtzman, 2019; Selkoe, 2012; Wong, 2020). Segundo dados da *Alzheimer's Association* (2024), a prevalência da DA

aumenta de forma acentuada com a idade: atinge 5% da população entre 65 e 74 anos, 13,2% entre 75 e 84 anos, e 33,4% dos indivíduos com 85 anos ou mais.

Peptídeos A β são gerados a partir clivagem sequencial da APP, uma proteína transmembrana encontrada predominantemente em sinapses neuronais, por meio das enzimas β -secretases e γ -secretases. Esse processo é conhecido como via amiloidogênica e resulta em peptídeos com 27 a 43 aminoácidos de comprimento. Os peptídeos A β resultantes, particularmente A β 40 e A β 42, exibem uma forte tendência a se agregar em oligômeros de maneira dependente da concentração, contribuindo para a fisiopatologia da DA (Goate et al., 1991; Haass & Willem, 2019; Haass & Selkoe, 2007; Thinakaran & Koo, 2008). A regulação da produção de A β está intimamente ligada à atividade sináptica e é modulada pelo ciclo sono-vigília, com aumento da produção durante a vigília e maior depuração via sistema linfático durante o sono (Boespflug & Iliff, 2018; Cirrito et al. 2005).

A tau é uma proteína associada a microtúbulos, distribuída pelo citoesqueleto das células nervosas, sendo crítica para a estabilização das estruturas axonais (Iqbal et al., 2005). Devido ao *splicing* alternativo, a tau é expressa em pelo menos seis isoformas, com predominância das isoformas 3R e 4R em pacientes com DA. Essas isoformas são propensas a modificações pós-traducionais, acumulando-se em estado hiperfosforilado nos corpos celulares e dendritos, formando emaranhados neurofibrilares intraneuronais. A formação e o acúmulo de emaranhados insolúveis interrompem as funções celulares saudáveis, contribuindo para a neurodegeneração (Kent et al., 2020; Medeiros et al., 2011). A atividade sináptica facilita a propagação dos emaranhados entre células vizinhas, já que os oligômeros de tau hiperfosforilada são liberadas no espaço extracelular, podendo ser internalizada por neurônios pós-sinápticos e células gliais (De Calignon et al., 2012; Wu et al., 2016). Um estudo recente de He et al. (2018) mostrou que a presença das placas A β também criam um ambiente favorável para a rápida amplificação e disseminação dos emaranhados pelo córtex.

No entanto, os mecanismos fisiopatológicos subjacentes ao desenvolvimento e progressão da doença ainda não são completamente compreendidos. De acordo com Wilson III e colaboradores (2023), além da dinâmica anormal e tóxica de proteínas, as doenças neurodegenerativas possuem uma variedade de marcadores celulares e moleculares que influenciam suas formas esporádicas e genéticas. Esses marcadores incluem oito elementos distintos: agregação patológica de proteínas, disfunção da rede sináptica e neuronal, proteostase aberrante, anormalidades do citoesqueleto, alteração da homeostase energética, defeitos de DNA e RNA, inflamação e morte de células neuronais. Em conjunto, esses fatores contribuem para o colapso da estrutura e função das redes neurais, tanto em modelos

pré-clínicos quanto em pacientes com essas patologias, resultando em perda de memória e declínio cognitivo (Jellinger, 2010; Wilson III et al., 2023). Embora se acredite que o processo fisiopatológico da DA seja impulsionado por defeitos combinados entre esses marcadores, estudos em humanos e modelos animais demonstram que a neuroinflamação desempenha um papel crucial na progressão da DA (McGeer & McGeer, 2013; Ransohoff, 2016; Heneka et al., 2015; Jung et al., 2019).

Nos últimos anos, um número crescente de estudos GWAS identificaram variantes de risco para desenvolvimento de DA em genes essenciais para ativação microglial e funções fagocíticas. Estes estudos indicam que mais de 51% dos genes de risco para DA estão enriquecidos em vias do sistema imunológico inato, muitos deles como *APOE*, *TREM2* e *CD33*, expressos por microglia e astrócitos ativados (Bis et al. 2020; Ray et al. 2024; Wightman et al. 2021). Embora a DA seja uma doença multifatorial com influências ambientais e comportamentais, também é importante estudar o papel específico dos fatores de risco genéticos conhecidos em mecanismos biológicos relacionados à etiologia da doença (Vidovic & Spittau, 2024; Wilson III et al. 2023).

3 NEUROINFLAMAÇÃO E CITOCINAS

O processo inflamatório faz parte da defesa do organismo, onde o sistema imune tem a função de identificar e remover possíveis ameaças. No SNC, o sistema imunológico inato apresenta características únicas que o diferenciam substancialmente das respostas imunes periféricas. A neuroinflamação, portanto, refere-se à resposta complexa do SNC à lesões ou doenças, marcada pela ativação das células gliais e pela liberação de mediadores inflamatórios. As células gliais, compostas pela microglia, astrócitos e oligodendrócitos, são os principais agentes dessa defesa e possuem papéis distintos entre si. Enquanto a microglia e os astrócitos participam da neuroproteção e do suporte neuronal, os oligodendrócitos são essenciais para a mielinização dos axônios. A interação entre esses grupos celulares regula tanto a função neuronal quanto a resposta neuroinflamatória, sendo mediada pela expressão de uma ampla gama de citocinas (Castro-Gomez & Heneka, 2024; Vidovic & Spital, 2024; Murdock & Tsai, 2023).

Classicamente secretadas em resposta a patógenos ou lesões, as citocinas são proteínas de sinalização pleiotrópicas de baixo peso molecular. São constitutivamente expressas por diferentes células do sistema imune; porém, no SNC, as citocinas são expressas por neurônios e células gliais ativadas. Dependendo de seu papel na comunicação celular, essas moléculas são categorizadas em diferentes famílias, que incluem: interleucinas, quimiocinas, fatores de necrose tumoral, interferons e fatores de crescimento, além de outras moléculas, como hormônios e proteínas do sistema complemento, com funções semelhantes às das citocinas (Chen et al., 2024; Cui et al., 2021; Dinarello, 2000).

Exercendo múltiplas funções biológicas em variados contextos, uma única citocina pode ser expressa por diversos grupos de células (Becher et al., 2017; Bourgoignon & Cavanagh, 2020; Miller et al., 2013). Essas moléculas modulam vários processos fisiológicos, como a maturação, proliferação e ativação de células imunológicas, além de influenciarem a plasticidade sináptica e a resposta neuroinflamatória, desempenhando um papel crucial no desenvolvimento e funcionamento do sistema nervoso. A variação na concentração destas proteínas pode fornecer informações valiosas sobre o diagnóstico, estágio e evolução de uma ampla gama de doenças, tornando-a uma área de pesquisa vital para o avanço da medicina e do tratamento médico (Liu et al., 2021).

Na DA, o acúmulo de proteínas no parênquima cerebral e a morte neuronal atuam como DAMPs, ativando componentes celulares e humorais do sistema imune inato no tecido cerebral (Masters & O'Neill, 2011; Salminen et al., 2008). O reconhecimento dos DAMPs

pela microglia leva à alterações no fenótipo, com consequente liberação de moléculas sinalizadoras que amplificam a inflamação e recrutam outras células, como os astrócitos. Consequentemente, a exposição prolongada a placas de A β e emaranhados neurofibrilares está associada à ativação crônica destas células e à liberação excessiva de mediadores inflamatórios, intensificando a neuroinflamação e contribuindo para a progressão da DA.

Por outro lado, estudos com culturas de células mostram que a ativação microglial pode preceder a deposição de emaranhados neurofibrilares, sugerindo que a neuroinflamação participa dos estágios iniciais da DA (Barbierato et al., 2017; Facci et al. 2018; Yu et al., 2014). Além disso, estudos genéticos reforçam o papel da microglia em doenças neurodegenerativas. O gene *TREM2*, um receptor amplamente expresso na microglia, apresenta polimorfismos associados ao risco aumentado de DA e outras demências. Já a transição da microglia para um fenótipo associado à doença está fortemente ligada a expressão de *TREM2* e *APOE*, outro gene de risco para DA (Keren-Shaul et al., 2017).

A ativação da cascata de sinalização mediada pela detecção dos DAMPs acarreta na conversão enzimática das moléculas precursoras pró-IL-1 β e pró-IL-18, para as formas biologicamente ativas: IL-1 β e IL-18, respectivamente (Schroder & Tschopp, 2010). Estudo realizado por Ojala e colaboradores (2009) indicou aumento na expressão de *IL18* no cérebro de pacientes com DA, particularmente no lobo frontal, independentemente do genótipo *APOE*. O *IL18* foi detectado em microglia, astrócitos e neurônios, co-localizando-se com placas de A β e tau. A exposição à A β também elevou a expressão de *IL1B* nas células microgliais, nos estágios iniciais da DA (Facci et al., 2018). A expressão de citocinas pró-inflamatórias amplifica a neuroinflamação, promovendo a expressão de outras moléculas, como *IL6* e *IL17*, e perpetuando o dano e a morte neuronal (Mantovani et al., 2019). A desregulação da expressão de citocinas pró-inflamatórias sugere que essas moléculas podem ser marcadores diagnósticos e alvos terapêuticos promissores (Chen et al., 2024).

Níveis de citocinas anti-inflamatórias também são significativamente elevados na DA. Indivíduos diagnosticados com DA apresentaram níveis aumentados de *IL1RA*, *IL33* e *IL10* no líquido cefalorraquidiano e plasma. A deposição de A β 40 e A β 42 está positivamente associada ao aumento citocinas anti-inflamatórias como *IL3* (McAlpine et al., 2021). Assim, a expressão de moléculas anti-inflamatórias pode representar um mecanismo compensatório em resposta aos níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias presentes na DA.

Esses dados evidenciam que a ativação do sistema imune inato é uma via de mão dupla, onde a ativação do sistema imune é essencial para manter a homeostase do SNC com efeito neuroprotetor, em contraponto, a excessiva ativação da cascata do sistema imune

retroalimenta as vias de sinalização aumentando a resposta imune e a formação das placas A β e emaranhados neurofibrilares. Portanto, a neuroinflamação crônica e a desregulação na expressão de citocinas sugerem que essas moléculas desempenham um papel crucial na patogênese e progressão da DA (Prins et al., 2022; Zheng et al., 2016).

4 SEQUENCIAMENTO DE RNA

A complexa interação entre processos moleculares pode ter efeitos tanto protetores quanto prejudiciais, especialmente no contexto da neuroinflamação. Essa complexidade representa um desafio considerável para a interpretação do perfil de expressão gênica associado a diversas patologias. A identificação de genes com expressão diferencial entre duas ou mais condições de interesse é uma das questões mais frequentemente abordadas na pesquisa científica.

Nesse cenário, a técnica de sequenciamento de RNA (RNA-seq) consolidou-se como a principal tecnologia para a análise da expressão gênica (Law et al., 2018; Mathys et al., 2019). Nos últimos 15 anos, estudos de GWAS identificaram loci de susceptibilidade associados à DA de início tardio (após os 65 anos). Entretanto, grande parte desses loci de risco localiza-se em regiões não codificantes, dificultando a associação com os mecanismos moleculares subjacentes à deterioração cognitiva (Guerreiro et al., 2013; Harold et al., 2009; Lambert et al., 2013). A complexidade do organismo humano não está apenas na quantidade de genes no genoma, mas também em seu intrincado padrão de regulação e expressão genética.

O avanço nas técnicas de sequenciamento molecular, como o sequenciamento em massa (bulk RNA-seq), possibilitou a comparação de perfis de transcriptomas de cérebros humanos, oferecendo *insights* moleculares sobre a fisiopatologia da DA (Mostafavi et al., 2019; Wan et al., 2020). O RNA-seq utiliza um método no qual os transcritos são convertidos em cDNA por transcrição reversa, e adaptadores são anexados às extremidades das moléculas resultantes. O sequenciamento pode ser realizado em uma única direção (sequenciamento de extremidade única) ou em ambas as direções (sequenciamento pareado). Os dados gerados são então comparados com um genoma de referência ou montados de novo, resultando em um perfil abrangente de expressão gênica e/ou em um mapa estrutural dos transcritos (Courtney et al., 2010).

Entretanto, a complexidade estrutural do cérebro, com sua diversidade de núcleos, camadas e tipos celulares, representa um grande desafio para os pesquisadores. Essa complexidade dificulta a distinção entre células neuronais suscetíveis e células não afetadas durante a progressão da DA. Além disso, mudanças no fenótipo celular dificultam a distinção entre variações na composição celular e alterações nas funções específicas de cada tipo celular. Assim, análises realizadas em nível de tecido podem mascarar as mudanças que ocorrem em grupos celulares específicos, especialmente em células menos abundantes (Courtney et al., 2010; Mathys et al., 2019).

Nesse contexto, a análise de sequenciamento de RNA de núcleo único, também conhecida como *single-nuclei* RNA-seq (snRNA-seq), surge como uma metodologia promissora para investigar a heterogeneidade celular no cérebro, permitindo o perfilamento individual de dezenas de milhares de células (Mathys et al., 2019). Estudos recentes demonstram que subpopulações microgлияis apresentam perfis transcricionais, respostas patológicas e interações celulares distintas, que variam inclusive entre sexos, contribuindo de formas diversas para a fisiopatologia da DA (Cain et al., 2023; Green et al., 2024; Mathys et al., 2019; Mathys et al., 2023).

A diversidade de perfis genéticos nas células do parênquima cerebral reflete a complexidade do organismo humano e sua suscetibilidade a doenças neurodegenerativas como a DA. Perturbações nesse sistema de regulação gênica podem desencadear processos patológicos. Assim, é crucial que futuras pesquisas sobre doenças neurodegenerativas priorizem a integração de dados e incluam pessoas de diferentes etnias na busca por biomarcadores.

5 OBTENÇÃO DOS DADOS

Os conjuntos de dados transcriptômicos utilizados neste estudo foram solicitados ao comitê de distribuição de dados da RADC (Chicago, USA), e aprovados para uso em 6 de junho de 2023, sob o número 5320. Os conjuntos de dados utilizados para a validação dos resultados foram acessados e baixados de repositórios públicos, conforme descrito nas seções abaixo.

5.1 COORTES DE ESTUDO DE ENVELHECIMENTO

Os dados utilizados nesta pesquisa provêm dos estudos de coorte clínico-patológicas longitudinais sobre o envelhecimento e demência, denominados *The Religious Orders Study* (ROS) e *Rush Memory and Aging Project* (MAP), coletivamente chamados de ROSMAP (Bennett et al., 2018).

O ROSMAP foi projetado para estudos relacionados à idade, possibilitando investigar a incidência de DA e os fatores de risco para o declínio cognitivo e outras condições em comunidades de idosos, possibilitando achados mais generalizáveis à população em geral do que estudos conduzidos em ambientes clínicos. O ROS, iniciado em 1994, recrutou freiras, padres e irmãos católicos dos EUA. Por outro lado, o MAP foi iniciado em 1997 e incluiu indivíduos recrutados de aproximadamente 40 comunidades de aposentados, edifícios residenciais para idosos e igrejas no nordeste de Illinois, EUA (Schneider et al., 2007). Ambas coortes foram aprovadas pelo Conselho de Revisão Institucional da *Rush University Medical Center* (equivalente ao Comitê de Ética em Pesquisa do Brasil), e a correspondência dos dados permite que os estudos sejam utilizados de forma conjunta.

No momento da admissão, todos os participantes não apresentavam demência conhecida e concordaram em realizar avaliações clínicas e cognitivas anuais. Eles também assinaram um Ato de Doação Anatômica, comprometendo-se a doar cérebro, medula espinhal, nervos e tecido muscular após o falecimento. Um termo de consentimento informado, juntamente com um consentimento para o compartilhamento dos dados, foi assinado por todos os participantes ou seus responsáveis legais. Para autópsias realizadas fora da *Rush University*, apenas o cérebro foi doado. Todos os participantes do MAP e algumas centenas do ROS também doaram amostras de sangue anualmente (Bennett et al., 2018). Nas seções a seguir são descritas as variáveis fenotípicas da DA utilizadas neste trabalho.

5.1.1 Avaliação cognitiva e diagnóstico clínico

O ROSMAP realiza uma avaliação abrangente das características neuropatológicas de cada participante. Todos os voluntários foram submetidos a avaliações clínicas anuais, que incluem exames físicos com ênfase na função neurológica, além de uma bateria de 21 testes neuropsicológicos. Dentre esses, 19 testes são comuns a ambos os estudos e abrangem cinco domínios cognitivos distintos: memória episódica, habilidade visuoespacial, velocidade perceptual, memória semântica e memória de trabalho. Essa abordagem possibilitou a criação de uma medida global da função cognitiva.

As avaliações clínicas foram realizadas por médicos especialistas cegos aos dados previamente coletados. Os resultados foram revisados por um neuropsicólogo certificado, responsável por determinar a presença e a gravidade do comprometimento cognitivo. A taxa de participação nas avaliações foi superior a 95%, e a consistência entre elas foi mantida, garantindo que todos os aspectos cruciais em relação à avaliação inicial fossem preservados.

Os participantes foram sistematicamente classificados quanto ao seu estado cognitivo, com base nos resultados das avaliações cognitivas e em critérios padronizados conforme as recomendações do *National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke* (NINCDS) e da *Alzheimer's Disease and Related Disorders Association* (ADRDA). Aqueles com comprometimento cognitivo leve (MCI) apresentaram comprometimento em um ou dois domínios, conforme identificado pelo neuropsicólogo, mas não receberam diagnóstico de demência pelo médico examinador. Os participantes também foram classificados em relação à DA e a outras condições prevalentes que podem impactar a função cognitiva, como demência vascular e demência por corpos de Lewy.

No momento da morte, um neurologista especializado em demência revisou todas as informações clínicas disponíveis e emitiu uma opinião sobre o diagnóstico clínico mais provável na época do falecimento. Esse processo foi realizado de forma cega em relação aos dados demográficos e aos achados histopatológicos *post-mortem*. Conferências de casos, envolvendo neurologistas e neuropsicólogos, foram organizados para alcançar consenso diagnóstico quando necessário.

Por fim, diagnósticos neuropatológicos da DA foram estabelecidos por um neuropatologista certificado cego à idade e os dados clínicos dos indivíduos. Esse processo de diagnóstico envolveu avaliações semiquantitativas da densidade da placa neurítica, conforme as diretrizes do *Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease* (CERAD), e foi integrado ao estadiamento de Braak, que categoriza a patologia do emaranhado neurofibrilar

dos estágios I a VI com base na distribuição e gravidade (Bennett et al., 2006; Bennett et al., 2018; De Jager et al., 2012).

5.1.2 Taxa de declínio cognitivo e resiliência

Com base nos resultados das avaliações cognitivas realizadas ao longo dos anos, a taxa de declínio cognitivo foi calculada utilizando modelos de efeitos mistos. Essa abordagem permitiu analisar as mudanças nas habilidades cognitivas ao longo do tempo, considerando fatores como idade, sexo e nível educacional. O declínio cognitivo de cada participante foi comparado à média do grupo, com ajustes para variações individuais (De Jager et al., 2012).

Para avaliar a resiliência cognitiva, além das variáveis demográficas, foram incluídas covariáveis adicionais no cálculo da taxa de declínio cognitivo. Neste caso, o modelo foi ajustado por mensurações patológicas obtidas nas autópsias do tecido nervoso, como carga global de patologia da DA, deposição de A β , emaranhados neurofibrilares, infartos cerebrais crônicos, microinfartos, doença do corpo de Lewy, TDP-43, esclerose hipocampal, angiopatia amiloide cerebral, aterosclerose cerebral e arteriolosclerose (De Jager et al., 2012).

5.1.3 Mensuração de deposição de A β e emaranhados neurofibrilares

A avaliação patológica incluiu autópsias cerebrais sistemáticas, nas quais cada cérebro foi pesado e seccionado em lâminas coronais de 1 cm, com um intervalo *post-mortem* médio de 8 a 9 horas. A mensuração da deposição de A β e de emaranhados neurofibrilares foi realizada com base na densidade média em oito regiões cerebrais: giro angular, cíngulo anterior, córtex calcarino, córtex entorrinal, hipocampo, temporal inferior, giro frontal médio e córtex frontal superior.

A quantificação de depósitos A β foi obtida utilizando seções de 20 micrômetros dessas regiões. Os depósitos foram visualizados utilizando a técnica de imuno-histoquímica com três anticorpos monoclonais específicos para A β e coloração de prata Bielschowsky modificada. As áreas de interesse foram delineadas manualmente e analisadas pelo software Stereo Investigator, com amostragem aleatória sistemática. A densidade de A β foi calculada com base na porcentagem de imagens positivas. Desde 2019, imagens digitais de lâminas coradas com o anticorpo 4G8 foram geradas pelo sistema de escaneamento Aperio AT2, e a análise digital foi realizada pelo algoritmo Positive Pixel Count do Aperio, ajustado para a intensidade de coloração de A β . Os dados históricos foram harmonizados com os novos dados

digitais, utilizando os escores digitais disponíveis ou estimando escores digitais a partir dos dados históricos; a média dos valores das oito regiões foi calculada se pelo menos quatro regiões apresentassem dados disponíveis (Kapasi et al., 2023).

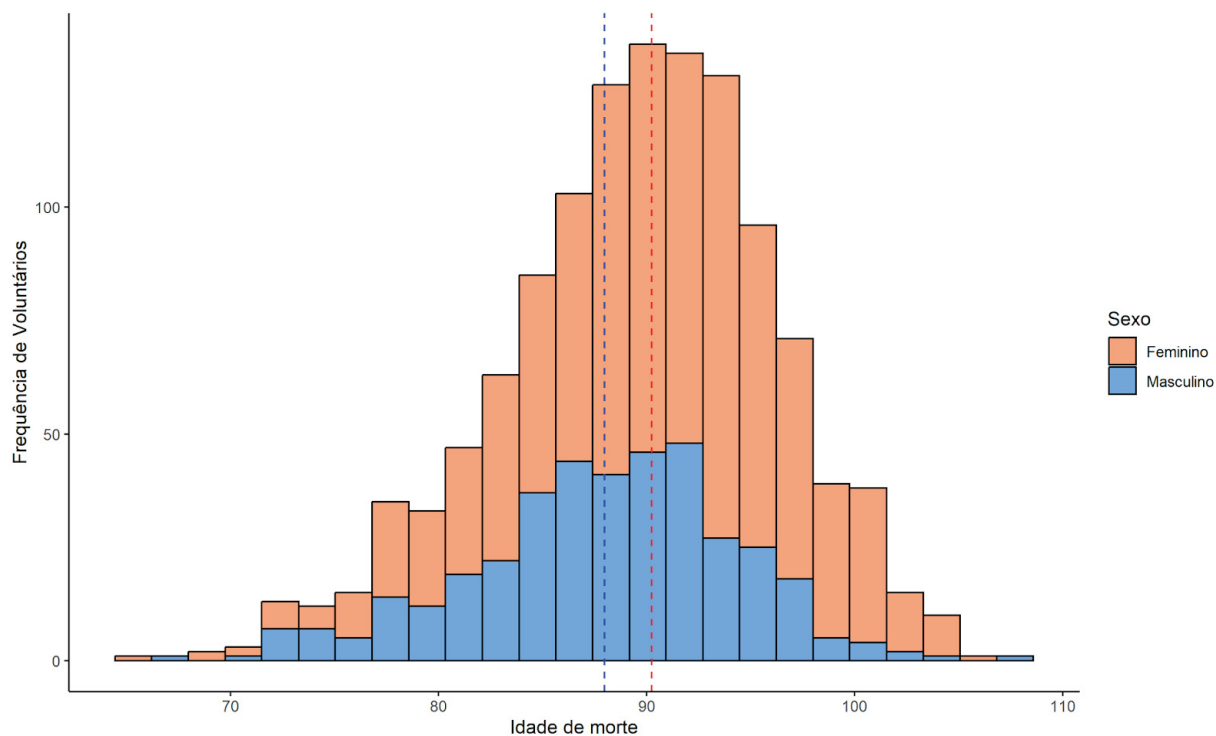
Para a mensuração dos emaranhados neurofibrilares, as medições históricas foram obtidas em seções de 20 micrômetros utilizando imuno-histoquímica com um anticorpo específico para tau fosforilada (AT8). A análise foi realizada da mesma forma que para A β , com delimitação manual das regiões e contagem por amostragem aleatória sistemática, resultando na densidade de tau-emaranhados calculada como contagem por mm², também transformada pela raiz quadrada. A partir de 2019, as lâminas coradas com AT8 foram processadas em um sistema de escaneamento Aperio AT2, e a análise digital foi conduzida pelo algoritmo Nuclear da Aperio Image Analysis Toolbox, que definiu parâmetros de pontuação para as intensidades de coloração. A carga total de emaranhados foi calculada e transformada pela raiz quadrada. Assim como para A β , os dados históricos foram harmonizados com os novos dados digitais, utilizando os escores digitais quando disponíveis ou estimando-os a partir dos dados históricos; a média dos valores foi calculada sob as mesmas condições (Kapasi et al., 2023).

Por fim, uma medida composta da carga patológica global da DA foi desenvolvida a partir das mensurações dos depósitos de A β e dos emaranhados neurofibrilares. A modelagem dessa variável fenotípica envolveu a normalização de cada contagem bruta em relação ao desvio padrão da média do respectivo índice neuropatológico na mesma região. Em seguida, as pontuações escalonadas foram calculadas como médias, resultando em uma avaliação abrangente da patologia associada à DA (Bennett et. al., 2006; Kapasi et al., 2023).

5.1.4 Características da população do estudo

Foram sequenciadas amostras de tecido da região do córtex pré-frontal dorsolateral, também conhecida como DLPFC, de 1.209 voluntários dos estudos ROSMAP. A idade média de entrada nos estudos foi de 80,56 anos ($\pm$ 6,9), enquanto a idade média ao falecimento foi de 89,1 anos ($\pm$ 6,6). Os coortes são formados majoritariamente por mulheres (68,07%), cuja idade média de morte é maior em comparação aos homens: 90,23 anos ($\pm$ 6,6) contra 87,97 anos ($\pm$ 6,38) (FIGURA 3). Os participantes de ambos os estudos são predominantemente pessoas brancas não latinas (97,52%), com uma média de 16,1 anos ($\pm$ 3,52) de educação formal, sendo significativamente diferente entre os sexos (FIGURA 4).

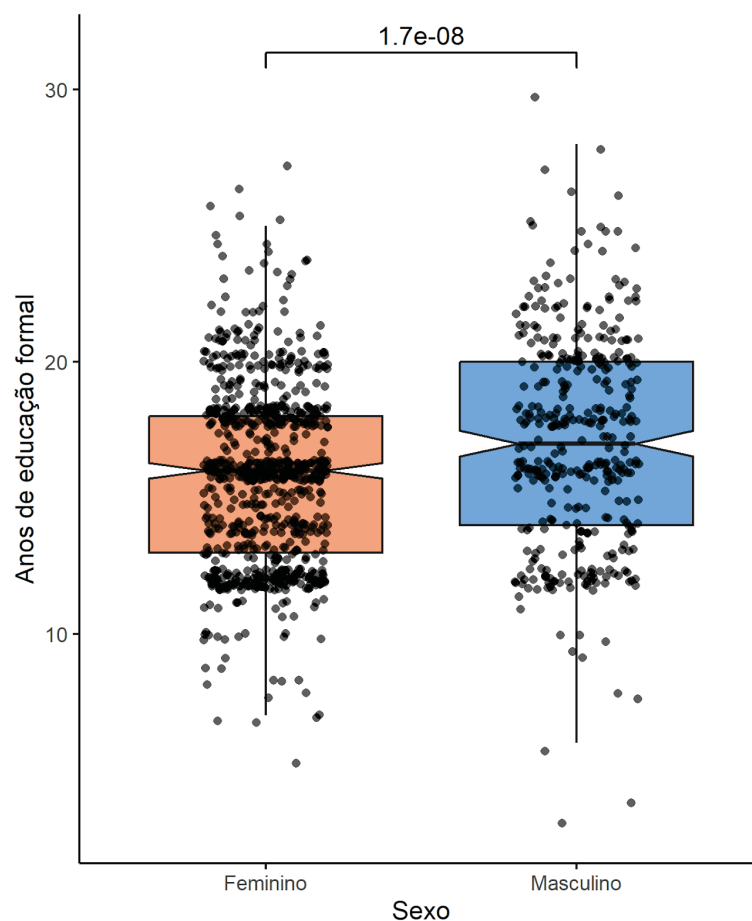
FIGURA 3: DISTRIBUIÇÃO DOS VOLUNTÁRIOS DO ROSMAP CATEGORIZADOS DE ACORDO COM A IDADE DE ÓBITO E SEXO



FONTE: a Autora (2025)

Legenda: Frequência dos voluntários de acordo com a idade no momento do óbito. As barras do histograma são coloridas de acordo com o sexo do voluntário. As linhas tracejadas verticais representam a idade média de morte para homens (azul) e mulheres (vermelha).

FIGURA 4: DISTRIBUIÇÃO DOS ANOS DE EDUCAÇÃO FORMAL ENTRE OS PARTICIPANTES DO ROSMAP, CATEGORIZADOS PELO SEXO

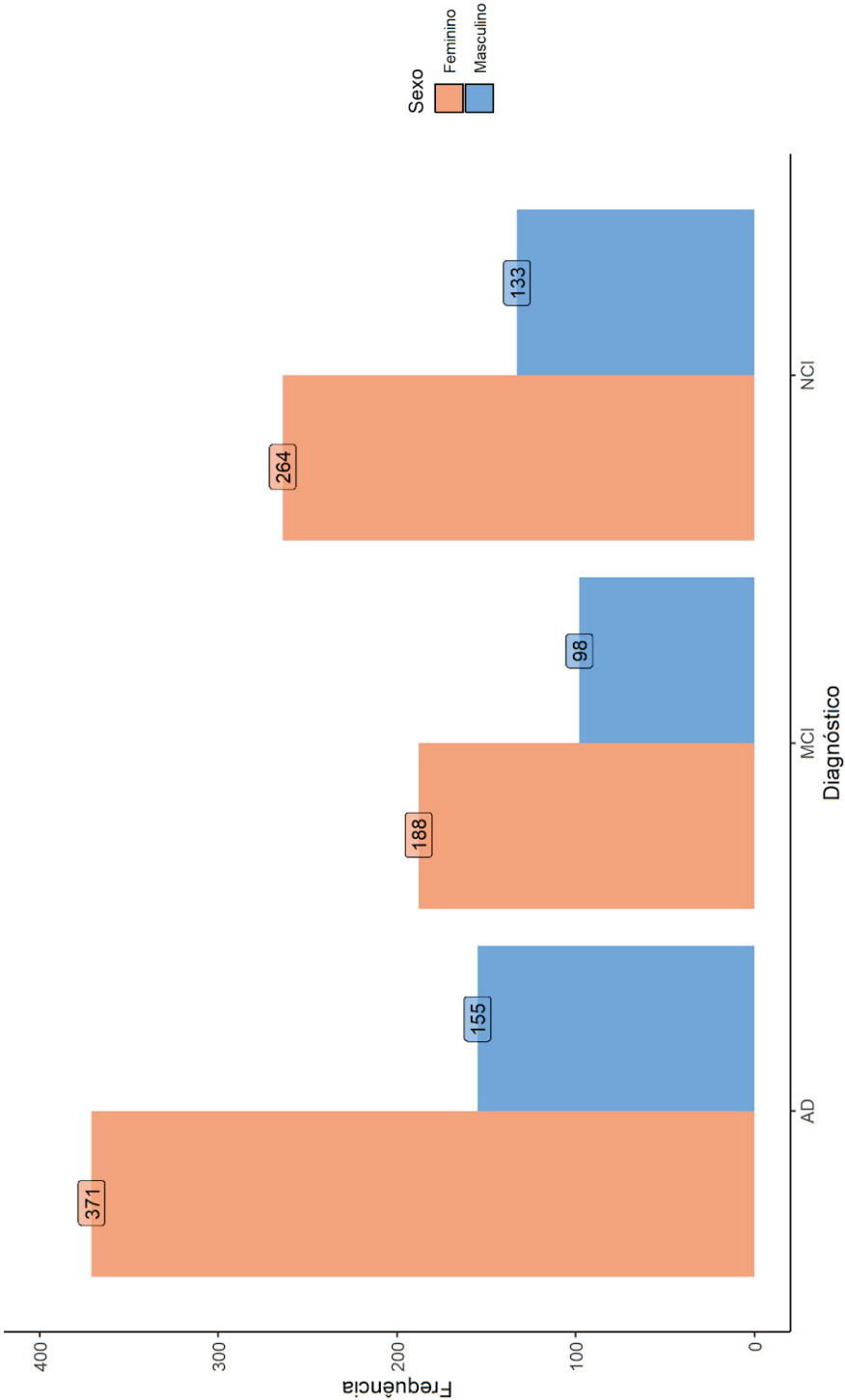


FONTE: a Autora (2025)

Legenda: Distribuição da quantidade de anos de educação formal dos voluntários do ROSMAP agrupados por sexo. Foi aplicado um teste t de *Student* entre os grupos. A barra superior representa o valor de significância do teste estatístico ($p\text{-nominal} = 1,7 \times 10^{-8}$).

Ao todo, 43,51% dos voluntários foram diagnosticados com DA, com predominância de mulheres nesse grupo (70,53%) (FIGURA 5). Os demais voluntários apresentaram comprometimento cognitivo leve (MCI; 23,66%) ou foram classificados como controles (NCI; 32,84%). As coortes são compostas principalmente por pacientes portadores de dois alelos $\epsilon 3$ do gene *APOE* (60,74%), como esperado. Os indivíduos que carregam pelo menos um alelo $\epsilon 4$ da *APOE* correspondem a 25,1% dos dados de RNASeq.

FIGURA 5: DISTRIBUIÇÃO DOS VOLUNTÁRIOS DO ROSMAP CATEGORIZADOS DE ACORDO COM O DIAGNÓSTICO CLÍNICO E SEXO



FONTE: a Autora (2025)

Legenda: Gráfico de barras representando a frequência do diagnóstico clínico mais provável no momento da morte. Os dados foram agrupados de acordo com o sexo.

5.1.5 Dados de RNA-seq de cérebro humano

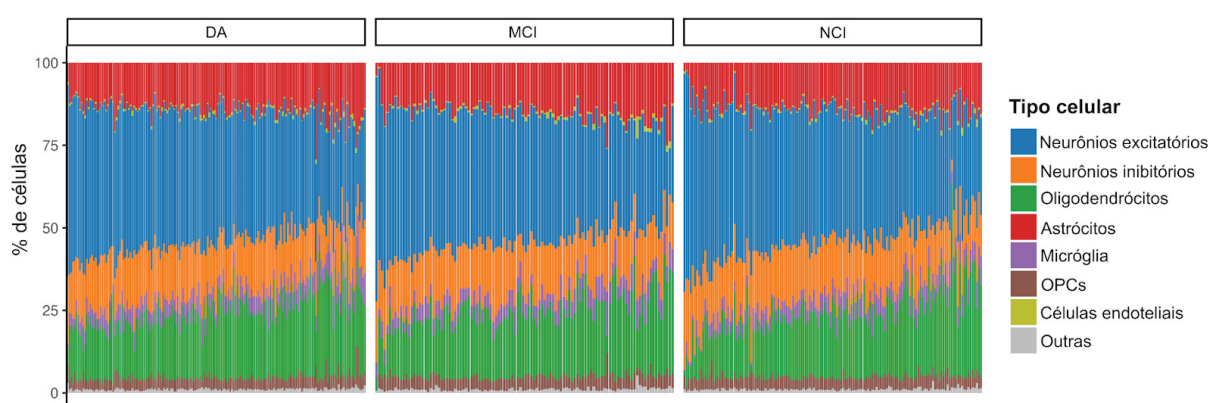
Como já descrito detalhadamente por Gilad et al. (2023) e Lopes et al. (2023), a extração e análise do RNA dos 1.209 participantes do ROSMAP foi conduzida a partir de amostras congeladas da substância cinzenta do DLPFC, utilizando o kit Chemagic RNA Tissue (Perkin Elmer). A concentração e a qualidade do RNA foram verificadas e 500 ng de RNA total foram usados para preparar bibliotecas de RNA-seq, com a remoção de RNA ribossômico utilizando o kit RiboGold (Illumina). As bibliotecas foram geradas na plataforma NovaSeq 6000 (Illumina), com 40–50 milhões de leituras pareadas de 150 bp. O processamento dos dados envolveu o alinhamento das leituras ao genoma de referência humano (GRCh38) utilizando o *software* STAR v2.6, e a quantificação de genes com Kallisto v0.46 com anotações de genoma e transcriptoma do GENCODE (versão 27 GRCh38). O processamento dos dados de RNA-seq incluiu alinhamento de sequências, verificação da qualidade, quantificação de genes e transcritos, e normalização. A matriz de contagem de genes normalizada foi transformada em log2 e convertida em contagens por milhão (CPM), seguida de normalização quantílica com a função `voom` do pacote limma. Um modelo de regressão linear foi aplicado para ajustar os dados a fatores técnicos que poderiam influenciar os resultados, como o intervalo *post-mortem*, lote de sequenciamento, número de qualidade do RNA (RQN) e métricas adicionais do Picard e Kallisto. Isso garantiu que as análises *downstream* fossem robustas e livres de viés. Além disso, as extensões das isoformas 3' UTR foram calculadas e genes com extensões faltantes ou uniformes de UTR entre as amostras foram filtrados. Os dados de comprimento de UTR foram transformados em log2 e ajustados para os confundidores mencionados (Tasaki et al., 2022).

5.1.6 Dados de RNA-seq de núcleo único

Os dados de sequenciamento de RNA de núcleo único (snRNA-seq) foram obtidos a partir de um fragmento congelado da região do DLPFC de um subconjunto de 424 participantes dos 1.209 sequenciados nos dados de tecido total. Após o descongelamento, a substância branca foi removida por dissecação e a substância cinzenta foi homogeneizada para criar uma suspensão nuclear. A princípio, núcleos foram isolados de 479 amostras de tecido DLPFC, processados em 60 lotes, cada um composto por oito doadores equilibrados por diagnóstico clínico e sexo. Bibliotecas de RNA-seq de núcleo único foram preparadas utilizando o kit *10x Genomics 3 Gene Expression* e sequenciadas. A identificação dos

doadores originais em cada lote foi realizada por meio de polimorfismos de nucleotídeo único. Foram retidos mais de 1,64 milhão de perfis de núcleos de alta qualidade de 465 participantes, classificados em oito tipos principais de células e 96 subpopulações. Após a remoção de células de baixa qualidade, foram realizadas análises de expressão gênica diferencial e enriquecimento de conjuntos de genes para caracterizar as subpopulações. No final, foram identificados sete tipos principais de células: neurônios excitatórios (ext), neurônios inibitórios (inh), microglias (mic), astrócitos (ast), oligodendrócitos (oli), células precursoras de oligodendrócitos (opc) e células endoteliais (end). A proporção de células anotadas por indivíduo pode ser observada na figura 6. Com a remoção de duplicatas, foram aprovadas 424 amostras no controle de qualidade (Green et al, 2024). Os participantes apresentaram uma mediana de 3.824 núcleos sequenciados.

FIGURA 6: PORCENTAGEM DE CÉLULAS POR GRUPO CELULAR NOS DADOS DE snRNA-SEQ



Fonte: A autora (2025)

Legenda: Proporção média de (39,54%) neurônios excitatórios, (15,68%) neurônios inibitórios, (20,36%) oligodendrócitos, (13,97%) astrócitos, (5,12%) microglia, (3,58%) OPCs e (0,63%) células endoteliais. Os voluntários do ROSMAP foram classificados em DA (doença de Alzheimer), MCI (comprometimento cognitivo leve) e controles (NCI).

5.2 REPLICAÇÃO DOS DADOS

Para replicar os resultados obtidos nas análises posteriores, utilizamos dados de bulk RNA-Seq provenientes de duas fontes externas: *Mount Sinai Brain Bank* (MSBB) e *Mayo Clinic*, descritas a seguir. Ambos os conjuntos de dados estão disponíveis na plataforma Synapse.org, operada pela Sage Bionetworks. Os modelos estatísticos foram ajustados considerando idade no momento do óbito, sexo e anos de estudo, sempre que essas informações estavam disponíveis, para minimizar vieses demográficos e garantir maior precisão nas associações observadas.

5.2.1 Mount Sinai Brain Bank

O estudo MSBB compreende 316 cérebros humanos *post-mortem* provenientes dos centros de pesquisa Mount Sinai e JJ Peters VA Medical Center, localizados em Nova Iorque (EUA). As amostras deste estudo foram selecionadas com base em rigorosos critérios de inclusão e exclusão, garantindo uma representação abrangente da DA em várias gravidades cognitivas e neuropatológicas.

Técnicas histopatológicas foram conduzidas para a mensuração dos depósitos de A β e tau, seguindo o protocolo CERAD, amplamente utilizado para o diagnóstico de demências. Cada amostra de tecido cerebral foi pontuada de acordo com a densidade e localização dos emaranhados neurofibrilares, classificando as lesões em seis estágios conforme a escala de Braak. Além disso, a escala *Clinical Dementia Rating* (CDR) foi empregada para avaliar o estado cognitivo dos indivíduos. Os dados demográficos da coorte indicam uma predominância de indivíduos de ascendência europeia, com idade média de falecimento de 84,7 anos e desvio padrão de $\pm 9,7$ anos (Wang et al., 2018).

Neste estudo, quatro áreas específicas de Brodmann foram selecionadas para o perfil molecular com base em análises anteriores de vulnerabilidade regional à DA: o giro parahipocampal (BA 36), o giro frontal inferior (BA 44), o giro temporal superior (BA 22) e o pólo frontal (BA 10). As regiões cerebrais foram dissecadas de blocos de tecido coronal congelados e armazenadas a -80°C para posterior isolamento e sequenciamento de RNA. O sequenciamento foi realizado utilizando o TruSeq RNA Sample Preparation Kit v2 (Illumina), com subsequente depleção de RNA ribossômico, conforme descrito por Wang e colaboradores (2018). Este conjunto de dados inclui o sequenciamento de 1.282 amostras de 316 indivíduos únicos, cujos dados estão disponíveis na plataforma Synapse sob o código syn2580853.

5.2.2 Mayo Clinic

O conjunto de dados transcriptômicos da *Mayo Clinic*, disponível sob o código syn27024965 na plataforma Synapse, inclui o sequenciamento de 597 amostras de 355 indivíduos. O estudo Mayo RNAseq analisa perfis de expressão gênica de amostras cerebrais *post-mortem* obtidas do *Mayo Brain Bank* e do *Banner Sun Health Institute*, com foco em duas regiões específicas: o córtex temporal e o cerebelo. Este estudo consiste em 84 casos de DA, 84 casos de paralisia supranuclear progressiva (PSP) e 80 controles. O estudo foi

aprovado pelo Conselho de Revisão Institucional da *Mayo Clinic* e foi conduzido em conformidade com os padrões éticos e regulatórios para pesquisas envolvendo seres humanos.

O estudo é predominantemente composto por indivíduos norte-americanos de ascendência caucasiana, com idade mínima de 60 anos para todos os participantes, exceto os controles, cuja idade mínima foi de 50 anos a fim de equilibrar o tamanho das amostras. Os diagnósticos clínicos seguiram os critérios do NINCDS e ADRDA. As avaliações histológicas realizadas após o falecimento confirmaram os critérios neuropatológicos para DA, quantificando a deposição de placas de A β e emaranhados de tau hiperfosforilada, conforme os protocolos CERAD e Braak. A preparação das bibliotecas foi conduzida utilizando o TruSeq RNA Sample Prep Kit, com o sequenciamento das amostras realizado na plataforma Illumina HiSeq2000, com leituras de 101 pares de bases (Allen et al., 2016).

6 CITOCINAS ASSOCIADAS À DOENÇA DE ALZHEIMER

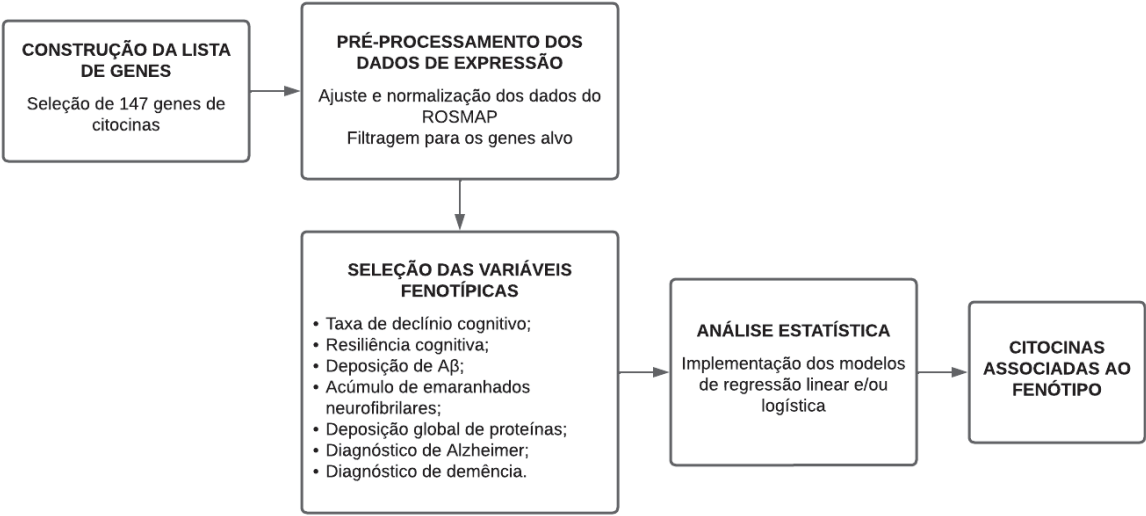
6.1 LISTA DE CITOCINAS

Para este projeto, foi construída uma lista com 147 genes de citocinas utilizada na análise descrita neste capítulo e nos capítulos subsequentes. A lista foi construída baseada no material suplementar de dois estudos: no mapeamento da rede regulatória de genes de citocinas em humanos, publicado por Santoso e colaboradores (2020), e complementada pela lista curada por Cui e colaboradores (2023), voltada ao desenvolvimento de um dicionário de respostas imunes à moléculas inflamatórias. As informações foram cruzadas para remover genes duplicados, resultando em uma lista consolidada de 147 genes com os seus respectivos códigos ENSEMBL. Além disso, para cada citocina foi anotada a família na qual elas pertencem com no mínimo um artigo de referência na literatura. Os genes de citocinas presentes nessa lista foram classificados em 6 grupos de família: interleucinas, fatores de crescimento, quimiocinas, fator de necrose tumoral (TNF), complemento e um conjunto adicional que inclui outras moléculas com funções análogas, como alguns hormônios. A lista encontra-se no apêndice A.

6.2 MÉTODOS

Para avaliar a associação entre a expressão de citocinas nos dados do ROSMAP e o fenótipo da DA, os dados de expressão gênica foram previamente ajustados e normalizados, conforme descrito nas seções 5.1.5 e 5.1.6, e, por fim, filtrados para os genes de interesse. Para esta análise, foram selecionadas as seguintes variáveis fenotípicas disponíveis nos coortes do ROSMAP: taxa de declínio cognitivo, resiliência cognitiva, deposição de A β , acúmulo de emaranhados neurofibrilares, carga patológica global e diagnóstico clínico de DA e demência. Em seguida, foram implementados modelos de regressão linear para variáveis contínuas e modelos de regressão logística para variáveis categóricas. Ambos os modelos foram ajustados para idade no momento do óbito, sexo e anos de educação, a fim de controlar potenciais fatores de confusão. O fluxo de trabalho adotado nesta análise pode ser encontrado na figura 7.

FIGURA 7: FLUXO DE TRABALHO UTILIZADO NA ANÁLISE DE EXPRESSÃO DE CITOCINAS ASSOCIADAS AO FENÓTIPO RELACIONADOS À DA



Fonte: A autora (2025)

6.3 RESULTADOS

Foram identificadas 49 citocinas expressas nos conjuntos de dados de transcriptoma, tanto do bulk RNA-seq como de snRNA-seq (TABELA 1). Dentre as citocinas expressas no córtex pré-frontal, 31 apresentaram associação com no mínimo uma variável de fenótipo da DA. Oito citocinas apresentaram resultados significativos apenas nos dados de bulk RNA-seq, onze apresentaram associações significativas tanto em bulk quanto em snRNA-seq, e doze apresentaram associação apenas nos dados de snRNA-seq, conforme detalhado na Tabela 1.

TABELA 1 – RESUMO DAS CITOCINAS IDENTIFICADAS NOS DADOS DE BULK E snRNA-SEQ

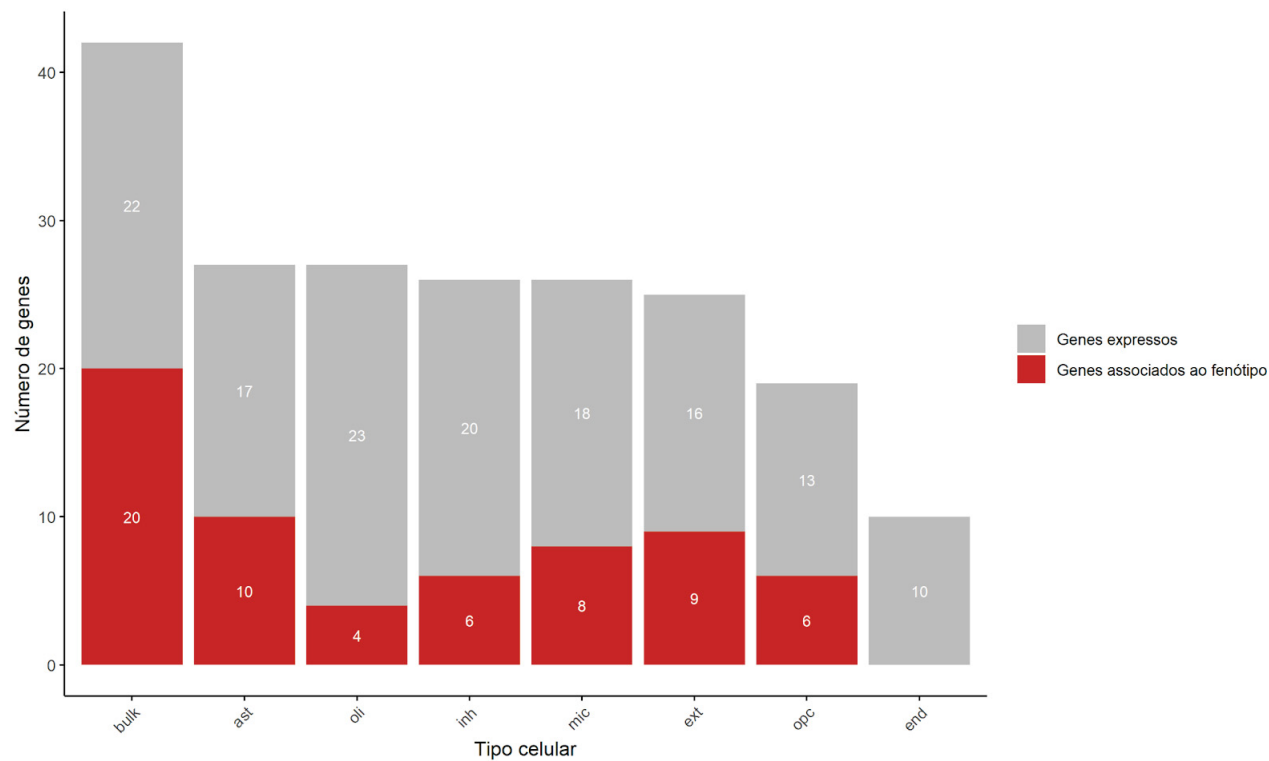
Categoria	Citocinas
Expressas nos dados de transcriptoma do DLPFC (bulk e/ou snRNA-seq)	<i>CX3CL1, IL32, DCN, IGF1, HGF, KITLG, CXCL2, THPO, FLT3LG, IL11, TNFSF13B, EBI3, TGFB1, C5, CCL2, VEGFA, TNFSF4, SPP1, TNFSF10, IL1B, PSPN, TNFSF9, C3, IL33, FGF2, EGF, CXCL14, CTF1, IL18, CCL28, IL34, TNFSF13, CXCL5, IL15, GDNF, IL12A, CXCL8, IL16, IL17D, NOG, CSF1, TNFSF12, CXCL13, IL7, CXCL17, IL1A, TNFSF8, IFNA13, IFNA2</i>
Associadas a pelo menos um fenótipo (geral)	<i>C3, C5, CCL2, CCL28, CSF1, CTF1, CXCL14, CXCL17, DCN, EGF, GDNF, HGF, IFNA2, IGF1, IL12A, IL15, IL18, IL33, IL7, KITLG, NOG, PSPN, SPP1, TGFB1, THPO, TNSF10, TNSF12, TNSF13, TNSF13B, TNSF4, TNSF8</i>
Associadas apenas em bulk RNA-seq	<i>IGF1, CCL2, TNSF4, PSPN, TNSF13, IL12A, NOG, DCN</i>

Associadas em ambos (bulk e snRNA-seq)	<i>THPO, SPP1, IL15, TGFBI, HGF, IL33, IL18, TNSF12, CSF1, CTF1, EGF</i>
Associadas apenas em snRNA-seq	<i>IL7, C5, GDNF, CXCL14, CCL28, TNSF10, C3, TNSF13B, TNSF8, IFNA2, CXCL17, KITLG</i>

FONTE: a Autora (2025)

Nos dados de bulk RNA-seq, foram identificados 42 genes de citocinas expressos, dos quais 20 apresentaram associação significativa com alguma das variáveis testadas (FIGURA 8). A taxa de declínio cognitivo teve o maior número de associações significativas, com 15 citocinas associadas a essa variável (FIGURA 9; TABELA 2). Em seguida, a densidade de emaranhados neurofibrilares e o diagnóstico de DA mostraram associação com 14 genes cada. A deposição global de proteínas e a resiliência cognitiva foram associadas a 10 genes cada. Por fim, o diagnóstico de demência e a deposição de A β apresentaram 9 e 7 genes associados, respectivamente. As citocinas associadas a cada fenótipo estão listadas na Tabela 2.

FIGURA 8: DISTRIBUIÇÃO DOS GENES EXPRESSOS E ASSOCIADOS AO FENÓTIPO POR CONJUNTO DE DADOS

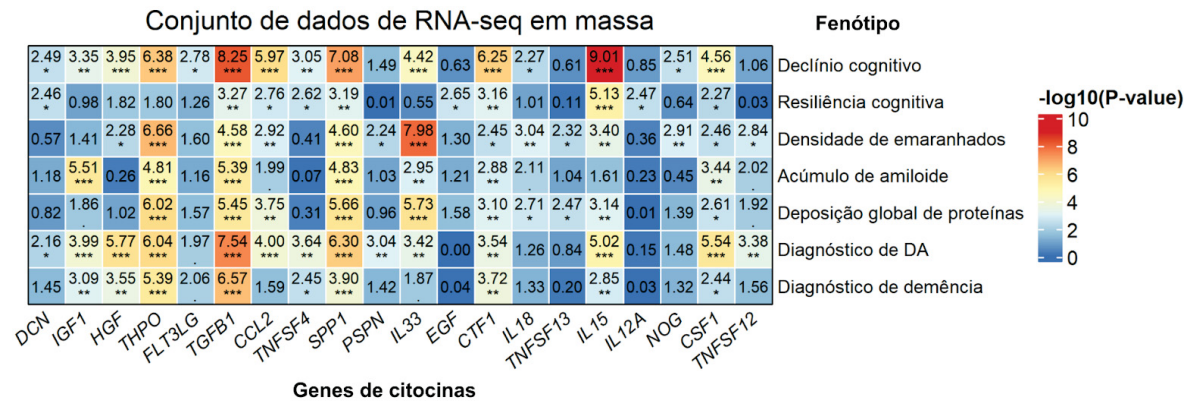


FONTE: a Autora (2025)

Legenda: Gráfico de barras representando a quantidade de genes de citocinas expressos nos dados de bulk e snRNA-seq, por tipo celular (ast = astrócitos, end = células endoteliais, ext = neurônios excitatórios, inh = neurônios inibitórios, mic = microglia, oli = oligodendrócitos, opc = células precursoras de oligodendrócitos). Genes expressos sem associação significativa com as variáveis fenotípicas relacionadas à DA estão

representados em cinza. Genes com pelo menos uma associação significativa nas análises de regressão linear e/ou logística estão destacados em vermelho.

FIGURA 9: ASSOCIAÇÃO ENTRE A EXPRESSÃO DE CITOCINAS NO BULK E O FENÓTIPO RELACIONADO À DA



FONTE: a Autora (2025)

Legenda: Mapa de calor com os valores de p nominais em escala logarítmica dos testes de associação entre os genes de citocinas expressos e as variáveis do fenótipo da DA. O gráfico é colorido de acordo com os valores de significância da análise de regressão linear e/ou logística, sendo o mais significativamente colorido como vermelho e o menos como azul. Os asteriscos representam os valores de p ajustados pelo teste de BH (** FDR < 0,001, * FDR < 0,01, * FDR < 0,05).

TABELA 2 – CITOCINAS ASSOCIADAS A CADA FENÓTIPO AVALIADO NOS DADOS DE BULK RNA-SEQ

Fenótipo	Citocinas associadas
Declínio cognitivo	DCN, IGF1, HGF, THPO, FLT3LG, TGFB1, CCL2, TNFSF4, SPP1, IL33, CTF1, IL18, IL15, NOG, CSF1
Emaranhados neurofibrilares	HGF, THPO, TGFB1, CCL2, SPP1, PSPN, IL33, CTF1, IL18, TNFSF13, IL15, NOG, CSF1, TNFSF12
Diagnóstico de DA	DCN, IGF1, HGF, THPO, TGFB1, CCL2, TNFSF4, SPP1, PSPN, IL33, CTF1, IL15, CSF1, TNFSF12
Deposição global de proteínas	THPO, TGFB1, CCL2, SPP1, IL33, CTF1, IL18, TNFSF13, IL15, CSF1
Resiliência cognitiva	DCN, TGFB1, CCL2, TNFSF4, SPP1, EGF, CTF1, IL15, IL12A, CSF1
Diagnóstico de demência	IGF1, HGF, THPO, TGFB1, TNFSF4, SPP1, CTF1, IL15, CSF1
Deposição de Aβ	IGF1, THPO, TGFB1, SPP1, IL33, CTF1, CSF1

FONTE: a Autora (2025)

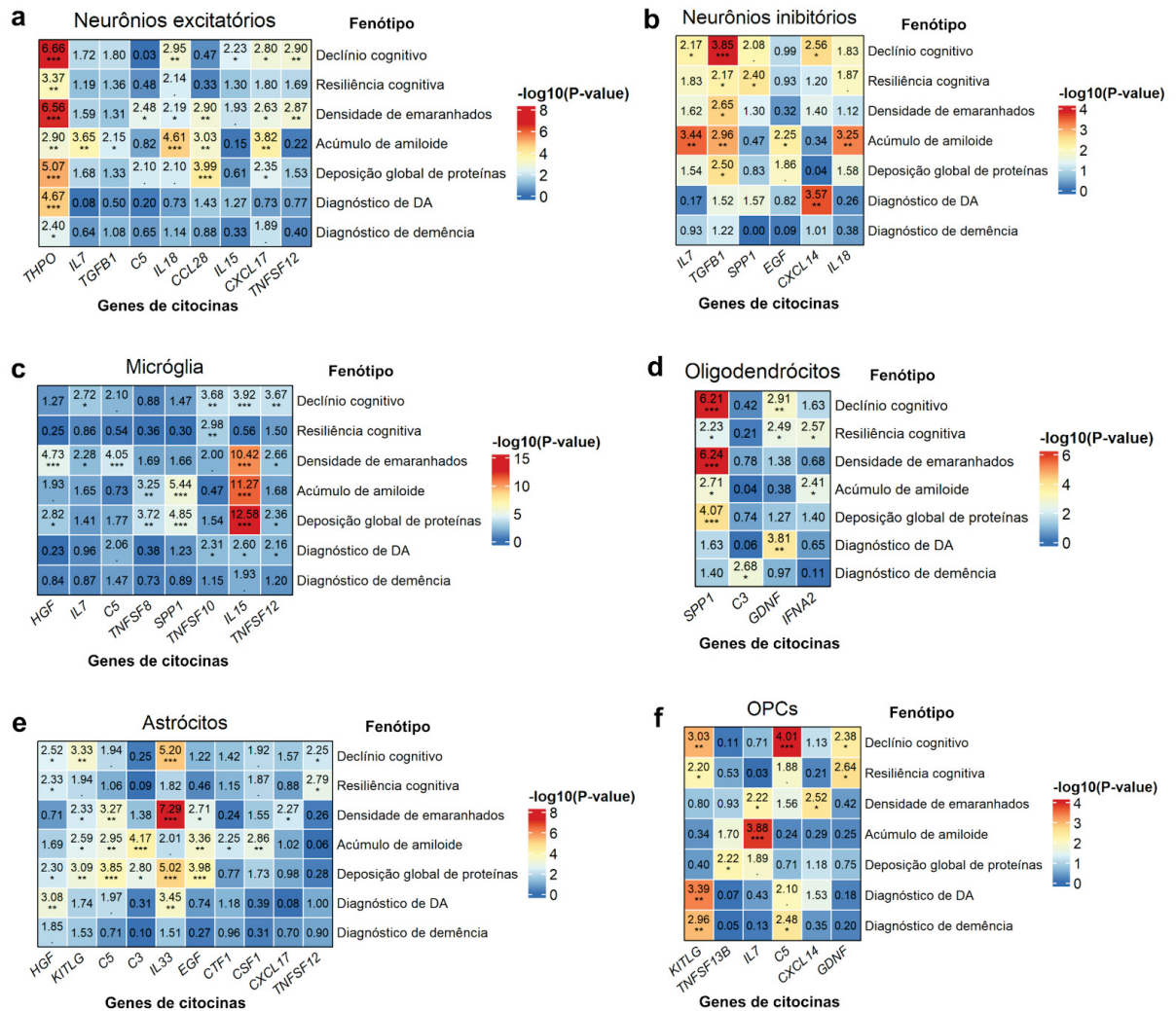
O gene *IL15* apresentou a associação mais significativa com o fenótipo, especificamente com a taxa de declínio cognitivo ao longo dos anos, após a correção de Bonferroni (FIGURA 9; p-ajustado = $6,85 \times 10^{-9}$; $r^2 = 0,063$). O *SPP1*, reconhecido por

desencadear processos neuroinflamatórios através da ativação microglial (Lopes et al., 2023), também exibiu forte associação com o declínio cognitivo (FIGURA 9; p -ajustado = $5,78 \times 10^{-7}$; $r^2 = 0,056$), assim como o gene da citocina imunossupressora *TGFB1* (FIGURA 9; p -ajustado = $3,97 \times 10^{-8}$; $r^2 = 0,06$).

Em relação à análise de snRNA-seq, este conjunto de dados revelou perfis específicos de expressão de citocinas entre os diferentes grupos celulares anotados (FIGURA 8; FIGURA 10). A maior quantidade de citocinas expressas foi observada em oligodendrócitos e astrócitos, com 27 genes expressos em cada um desses grupos (FIGURA 8). Desses, quatro genes apresentaram associação significativa com o fenótipo nos oligodendrócitos e dez nos astrócitos (FIGURA 8). Neurônios inibitórios e micróglia expressaram 26 genes, com seis e oito associações significativas, respectivamente (FIGURA 8). Neurônios excitatórios expressaram 25 citocinas, sendo nove associadas a variáveis patológicas da DA (FIGURA 8). Por fim, as OPCs expressaram 19 genes, dos quais seis apresentaram associação significativa, enquanto células endoteliais expressaram 10 genes sem qualquer associação detectada (FIGURA 8). Nesse *dataset*, as células endoteliais representam menos de 1% do conjunto total, portanto, no futuro será interessante refazer essa análise com um *dataset* enriquecido com essas células (FIGURA 6).

O painel de figuras abaixo (FIGURA 10) apresenta os genes com associações significativas com ao menos uma variável fenotípica da DA. Como já foi descrito, os astrócitos apresentaram o maior número de genes associados ao fenótipo, sendo a mais significativa ocorrendo entre a expressão de *IL33* e o acúmulo de emaranhados neurofibrilares (FIGURA 10e; p -ajustado = $3,57 \times 10^{-7}$; $r^2 = 0,14$). Esse gene também apresentou associações relevantes com o declínio cognitivo (FIGURA 10e; p -ajustado = $4,39 \times 10^{-5}$; $r^2 = 0,07$), a deposição global de proteínas neurotóxicas (FIGURA 10e; p -ajustado = $6,66 \times 10^{-5}$; $r^2 = 0,07$) e o diagnóstico de DA (FIGURA 10e; p -ajustado = $2,48 \times 10^{-3}$; $r^2 = 0,06$) entre os participantes do estudo. Porém, entre todos os grupos celulares, a associação com maior significância foi observada na microglia entre a expressão de *IL15* e a carga patológica total de proteínas no córtex (FIGURA 10c; p -ajustado = $1,82 \times 10^{-12}$; $r^2 = 0,14$), seguida pelas associações com o acúmulo de A β (p -ajustado = $3,72 \times 10^{-11}$; $r^2 = 0,16$) e a deposição de emaranhados neurofibrilares (p -ajustado = $2,64 \times 10^{-10}$; $r^2 = 0,16$).

FIGURA 10: GENES EXPRESSOS NOS DADOS DE snRNA-seq ASSOCIADOS AO FENÓTIPO RELACIONADO À DA



FONTE: a Autora (2025)

Legenda: Mapas de calor ilustrando os resultados das análises de regressão linear e/ou logística entre a expressão de citocinas em cada grupo celular e as variáveis relacionadas à DA. O gráfico é colorido de acordo com os valores de p nominais em escala logarítmica, assim como as legendas. Os asteriscos representam os valores de p ajustados pelo teste de BH (***) $FDR < 0,001$, ** $FDR < 0,01$, * $FDR < 0,05$). As células endoteliais não são representadas neste quadro uma vez que nenhum gene-alvo foi significativamente associado às variáveis selecionadas.

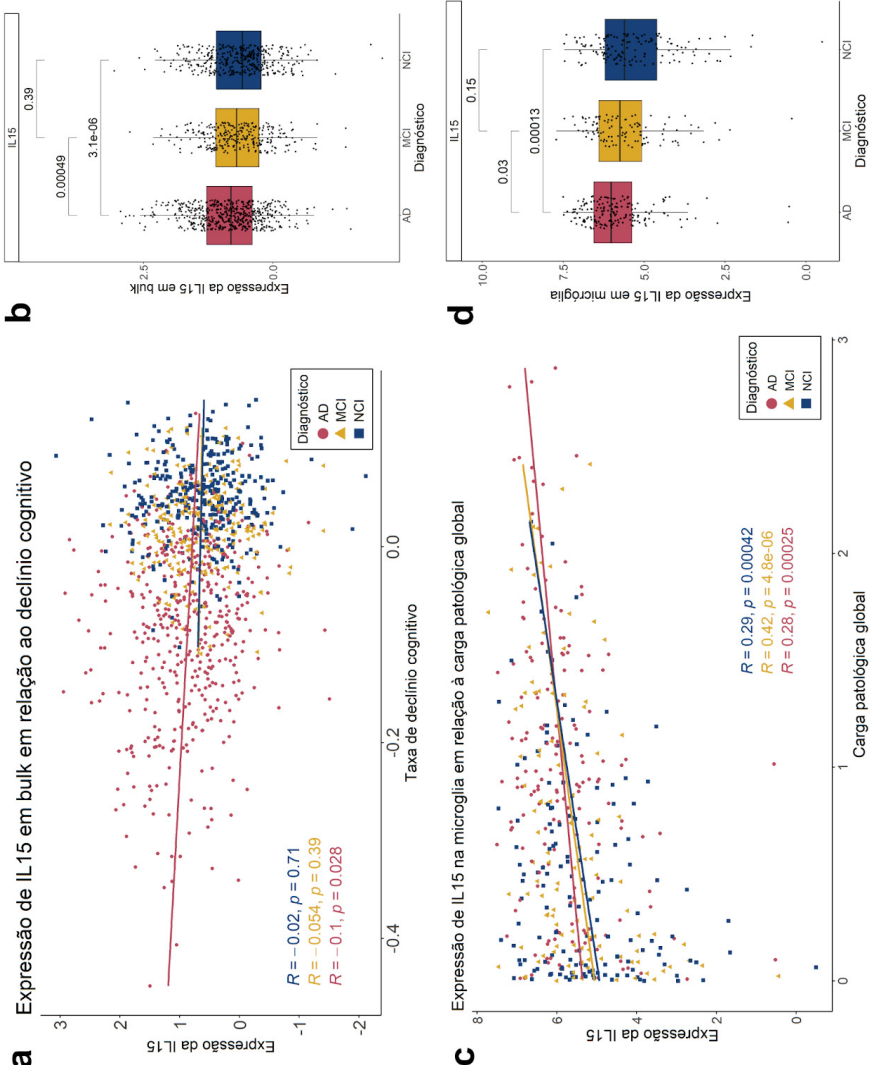
Uma análise comparativa mais profunda entre os dados de bulk RNA-seq e snRNA-seq revelou outras diferenças relevantes na expressão de citocinas associadas à DA. Nos dados de bulk RNA-seq, a expressão do gene *IL7* não foi detectada. No entanto, nos dados de snRNA-seq, a expressão de *IL7* foi identificada e apresentou associação significativa (p -ajustado $\leq 0,05$) com o fenótipo da DA nos neurônios excitatórios (FIGURA 10a), neurônios inibitórios (FIGURA 10b), microglia (FIGURA 10c) e células OPC (FIGURA 10f).

O gene *SPP1* é outro exemplo que ilustra como a expressão de citocinas no córtex pode exibir associações fenotípicas distintas entre os dados de snRNA-seq. Nos dados de bulk

(FIGURA 9), o *SPP1* apresentou associação significativa com todas as variáveis utilizadas nesse estudo. Enquanto na microglia, sua expressão se relaciona especificamente com a deposição de A β e o acúmulo total de proteínas no córtex (FIGURA 10c). Nos oligodendrócitos, o *SPP1* está fortemente associado ao comprometimento cognitivo, presença de agregados neurofibrilares e A β no córtex, a deposição global de proteínas e a resiliência cognitiva (FIGURA 10d). Já nos astrócitos, não foram observadas associações significativas entre o gene *SPP1* e as variáveis estudadas (FIGURA 10e; p -ajustado $\leq 0,05$).

Dentre todos os genes analisados, o *IL15* destacou-se por apresentar associações particularmente fortes com o fenótipo em ambos os *datasets* (FIGURA 9; FIGURA 10c). Para explorar mais detalhadamente a relação do *IL15* com as variáveis fenotípicas relacionadas à DA, foi implementado um modelo de regressão logística categorizando os indivíduos pelo diagnóstico clínico. Conforme observado na figura 11a, a expressão elevada de *IL15* no bulk em portadores de DA está significativamente associada à maior taxa de declínio cognitivo ao longo dos anos ($R = -0,1$; $p < 0,03$). Além disso, a média de expressão desse gene no bulk é significativamente maior ($p < 0,01$) em pacientes com DA em comparação aos pacientes com MCI e controles (FIGURA 11b). Já na microglia (FIGURA 11c), sua superexpressão correlaciona-se positivamente com a deposição global de A β e tau hiperfosforilada no tecido cerebral dos voluntários diagnosticados com MCI ($R = 0,42$; $p < 0,001$). A expressão desse gene na microglia também foi significativamente elevada em pacientes com DA (FIGURA 11d); porém, não foram observadas diferenças entre a média de expressão do gene *IL15* entre voluntários cognitivamente saudáveis e aqueles com comprometimento cognitivo leve nos dois *datasets* (FIGURA 11b e 11d).

FIGURA 11: ANÁLISE DA EXPRESSÃO DO GENE *IL15* EM DADOS DE BULK E snRNA-SEQ



FONTE: a Autora (2025)

Legenda: a) Gráfico de dispersão mostrando a associação da expressão de *IL15* nos dados em bulk RNA-seq com o declínio cognitivo. Os participantes foram categorizados com base em seu diagnóstico clínico, sendo: doença de Alzheimer (DA; vermelho), comprometimento cognitivo leve (MCI; amarelo) e nenhum comprometimento (NCI; azul). b) Nível de expressão da *IL15* em dados de bulk RNA-seq para indivíduos categorizados. Os dados são apresentados em boxplots, com a mediana indicada por uma linha horizontal. Os valores de p nominais foram mostrados na parte superior e calculados usando testes t unilaterais. c) Diagrama de dispersão ilustrando a associação entre a expressão de *IL15* na microglia e a carga patológica global, agrupando os voluntários por diagnóstico. d) Nível de expressão diferencial da *IL15* na microglia agrupando os voluntários por diagnóstico.

6.4 VALIDAÇÃO DAS ASSOCIAÇÕES

Para a replicação dos resultados obtidos, as matrizes de expressão do MSBB e *Mayo Clinic*, descritas na seção 5.2, foram filtradas para os genes de interesse, utilizando a mesma lista de 147 genes descrita anteriormente. Além disso, em ambos os estudos, foram utilizadas apenas as amostras sequenciadas de regiões funcionalmente conectadas à região do DLPFC sequenciada nos dados do ROSMAP, conforme descrito na seção abaixo (6.4.1).

6.4.1 Materiais e métodos

No estudo MSBB, foram selecionadas as amostras sequenciadas da região do lobo frontal, correspondendo a área BA10, equivalente à região sequenciada no ROSMAP resultando em um total de 306 amostras únicas. Para os testes de associação, foram utilizadas as variáveis fenotípicas mensuradas, sendo elas: pontuações do CERAD, o estágio de Braak, a Avaliação Clínica de Demência (CDR) e a densidade de placas neuríticas.

No conjunto de dados da *Mayo Clinic*, a matriz de expressão foi filtrada para conter os dados de sequenciamento da região do córtex temporal resultando em 258 amostras. Para os testes de associação, foram utilizadas as pontuações de estágios de Braak e as classificações de Thal, que descrevem o padrão progressivo de deposição de emaranhados neurofibrilares e placas de A β na DA, respectivamente. O diagnóstico no momento da morte também foi incluído.

Os testes de replicação utilizaram o mesmo modelo de regressão linear e/ou logística descrito na Seção 6.2 deste capítulo. Os modelos foram ajustados para idade no momento do óbito, sexo e etnia, quando disponíveis. Os valores de p foram corrigidos pelo método de Bonferroni.

6.4.2 Resultados

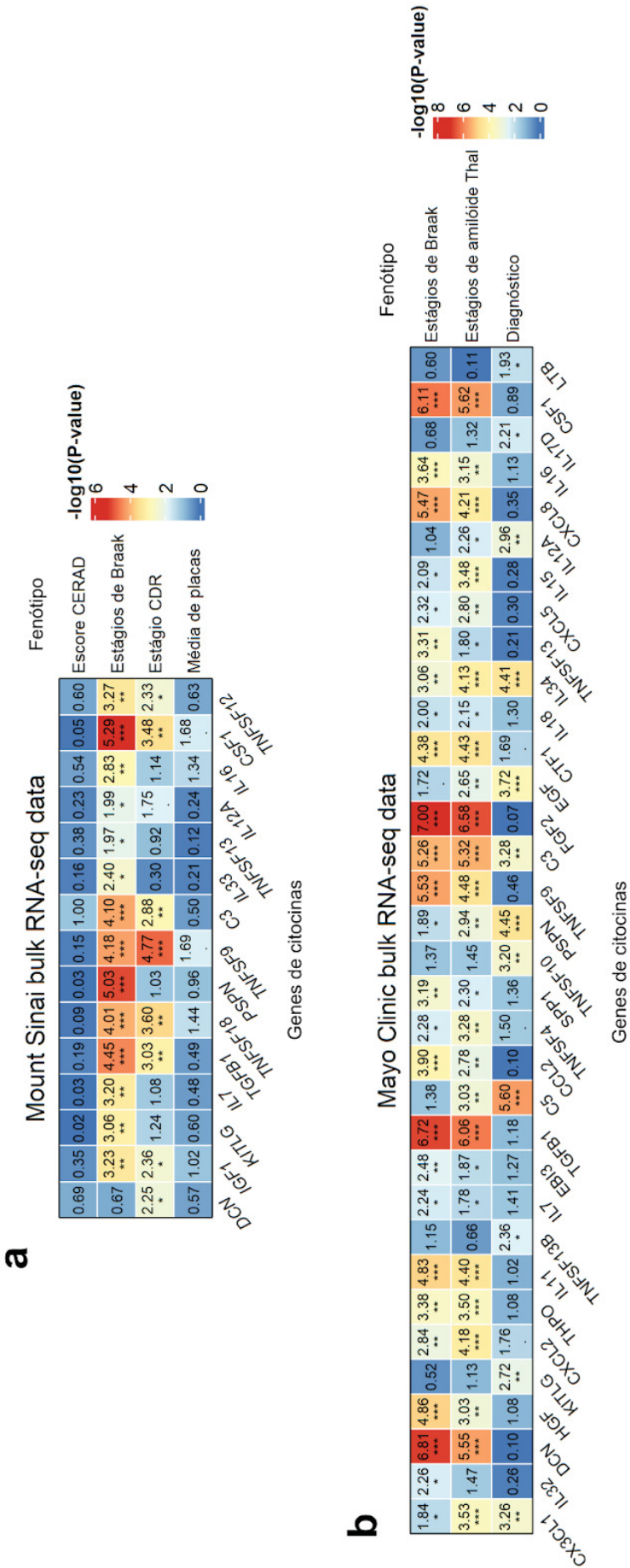
Entre os participantes do MSBB, 15 citocinas apresentaram associações significativas com variáveis fenotípicas analisadas (FIGURA 12a). Destes, 9 genes (*DCN*, *IGF1*, *TGFBI*, *PSPN*, *IL33*, *TNFSF13*, *IL12A*, *CSF1* e *TNFSF12*) também foram expressos e associados nos dados de bulk RNA-seq do ROSMAP. A associação mais forte foi entre *CSF1* e o estágio de Braak, que foi também o fenótipo com maior número de associações. Não foi observada

nenhuma associação significativa entre as citocinas detectadas na matriz de expressão gênica do MSBB, o escore de CERAD, e a deposição de placas no córtex pré-frontal.

No estudo da *Mayo Clinic*, identificou-se um número ainda maior de citocinas associadas ao fenótipo, com 34 genes no total (FIGURA 12b). Entre eles, 15 genes (*DCN*, *HGF*, *THPO*, *TGFB1*, *CCL2*, *TNFSF4*, *SPP1*, *PSPN*, *EGF*, *CTF1*, *IL18*, *TNFSF13*, *IL15*, *IL12A* e *CSF1*) também demonstraram significância nas análises de regressão linear e/ou logística com os dados do ROSMAP. A variável Thal foi associada a 28 genes, enquanto a associação de maior significância foi encontrada entre *FGF2* e Braak.

Esses achados reforçam a consistência dos resultados obtidos previamente na coorte ROSMAP, validando as associações observadas entre a expressão de citocinas e os fenótipos relacionados à DA.

FIGURA 12: ASSOCIAÇÕES ENTRE A EXPRESSÃO DE CITOCINAS E AS VARIÁVEIS DO FENOTÍPICAS RELACIONADAS À DA EM ESTUDOS EXTERNOS



FONTE: a Autora (2025)

Legenda: Quadro com os mapas de calor com os resultados dos testes de associação entre a expressão de citocinas e o fenótipo da DA utilizando os dados de sequenciamento dos estudos a) MSBB e b) Mayo Clinic. O gráfico é colorido de acordo com os valores de p nominais em escala logarítmica, assim como as legendas. Os asteriscos representam os valores de p ajustados pelo teste de BH (***) FDR < 0,001, ** FDR < 0,01, * FDR < 0,05).

7 O FENÓTIPO INFLUENCIA NA EXPRESSÃO DE CITOCINAS?

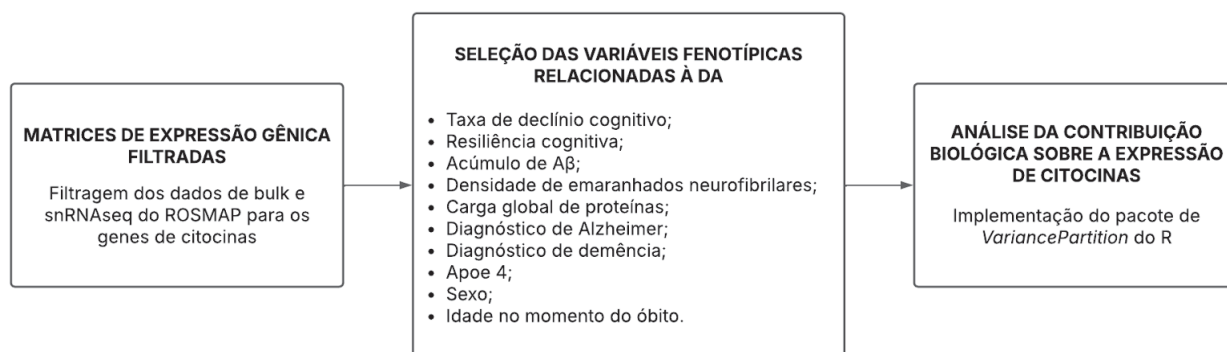
Os ensaios genômicos em larga escala transformaram nossa compreensão das bases moleculares de diversas patologias, permitindo a identificação de variações associadas ao estado clínico, ao tipo celular e à genética regulatória. Com os recentes avanços nos estudos transcriptômicos, os dados tornaram-se cada vez mais complexos, devido à integração de diferentes fontes de variação biológica e técnica. Assim, a quantificação e interpretação dessas fontes de variabilidade representam um dos maiores desafios na análise de dados moleculares (Hoffman & Schadt, 2016). Neste capítulo, apresentamos a metodologia empregada e os resultados obtidos para identificar e quantificar as variáveis fenotípicas relacionadas à DA com maior influência sobre a expressão de moléculas inflamatórias no córtex pré-frontal dos voluntários do estudo ROSMAP.

7.1 MATERIAIS E MÉTODOS

Para quantificar e interpretar as múltiplas fontes de variação biológica nos dados de expressão gênica do ROSMAP, utilizamos a função *variancePartition* do R. Essa abordagem emprega modelos lineares mistos para particionar a variância atribuível a diferentes variáveis do estudo, permitindo uma compreensão detalhada da contribuição de cada variável para a expressão gênica. O método gera resultados tanto a nível genômico quanto por gene, facilitando a identificação de genes que seguem ou se desviam das tendências genômicas.

As variáveis fenotípicas incluídas nessa análise foram: declínio cognitivo, resiliência cognitiva, cognição global, deposição de A β , densidade de emaranhados neurofibrilares, carga global de proteínas patológicas, diagnóstico de DA e idade ao falecer. Considerando que o alelo ϵ 4 do gene *APOE* é o principal fator de suscetibilidade genética para a DA esporádica, os indivíduos portadores de um ou dois alelos ϵ 4 foram agrupados na variável 'Apoe 4', com o objetivo de avaliar sua influência na expressão gênica das citocinas no parênquima cerebral. A contribuição do sexo dos voluntários na variabilidade da expressão gênica também foi considerada nessa análise. O fluxo de trabalho utilizado na análise deste capítulo pode ser encontrado na figura 13.

FIGURA 13: FLUXO DE TRABALHO UTILIZADO NA ANÁLISE DA CONTRIBUIÇÃO BIOLÓGICA SOBRE A EXPRESSÃO DE CITOCINAS



FONTE: a Autora (2025)

7.2 RESULTADOS

A análise dos dados de bulk RNA-seq dos 1.209 indivíduos do ROSMAP indicou que dentre as variáveis associadas à DA, à idade ao falecer foi o principal fator de variação na expressão de citocinas, explicando 3,29% da expressão do *C3* e 2,38% na variação do *IL18* (FIGURA 14). O declínio cognitivo e a deposição de emaranhados neurofibrilares também tiveram participação relevante na expressão das citocinas nos dados do bulk. No caso do declínio cognitivo, 2,8% da variância nos níveis de *IL15* e 2% de *SPPI* foram explicados por essa variável. A deposição de emaranhados neurofibrilares também foi uma importante fonte de variabilidade, influenciando em 2,6% na expressão do gene *IL33* no bulk.

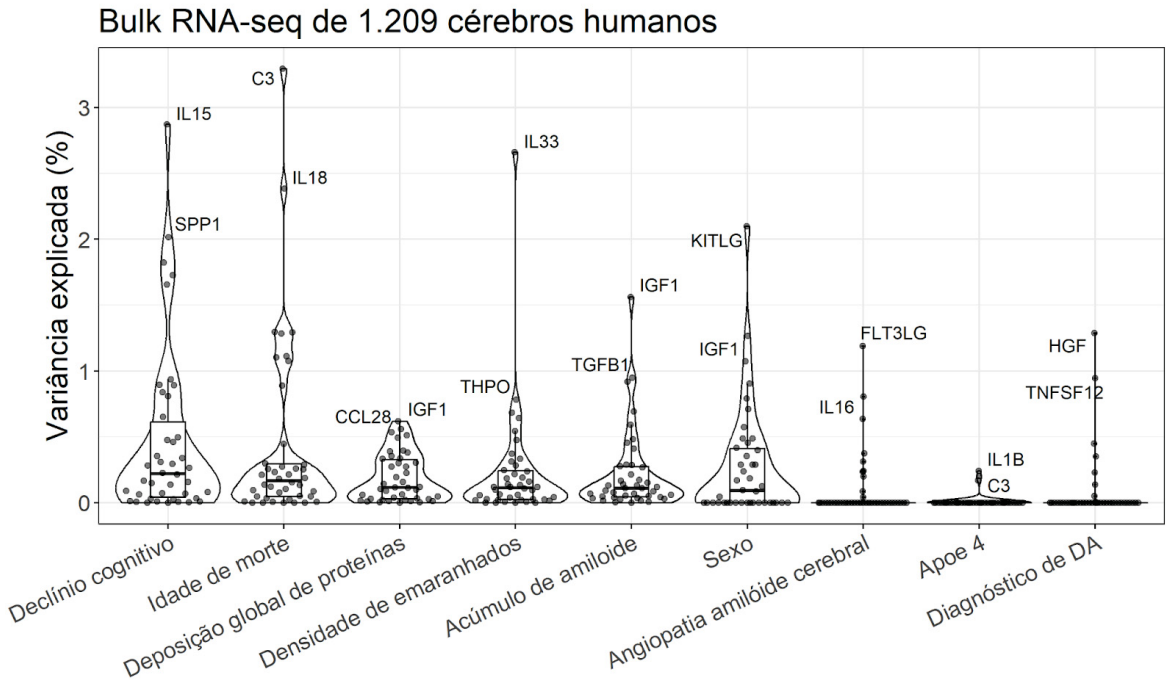
Entre os sete tipos celulares, a maior variação percentual foi observada na microglia (FIGURA 15). Os resultados das análises utilizando o método de *variancePartition* revelaram que a deposição de Aβ (8,6%) e a densidade dos emaranhados (6,76%) foram os principais fatores de contribuição para a variação nos níveis de *IL15* nesse tipo celular.

Em oligodendrócitos (FIGURA 16), o declínio cognitivo (5,5%) e a densidade dos emaranhados (4,4%) foram importantes fontes de variação nos níveis de *SPPI*. O diagnóstico de DA é outra variável com impacto de aproximadamente 4% na variação da expressão dos genes *CX3XL1* e *DCN*.

No geral, as variáveis fenotípicas relacionadas à DA com maior contribuição percentual para a variação na expressão de citocinas nos dados de sequenciamento de bulk e núcleo único foram: o declínio cognitivo, o diagnóstico de DA, a densidade dos emaranhados e a deposição de Aβ no parênquima cerebral. Os resultados da análise de *VariancePartition*

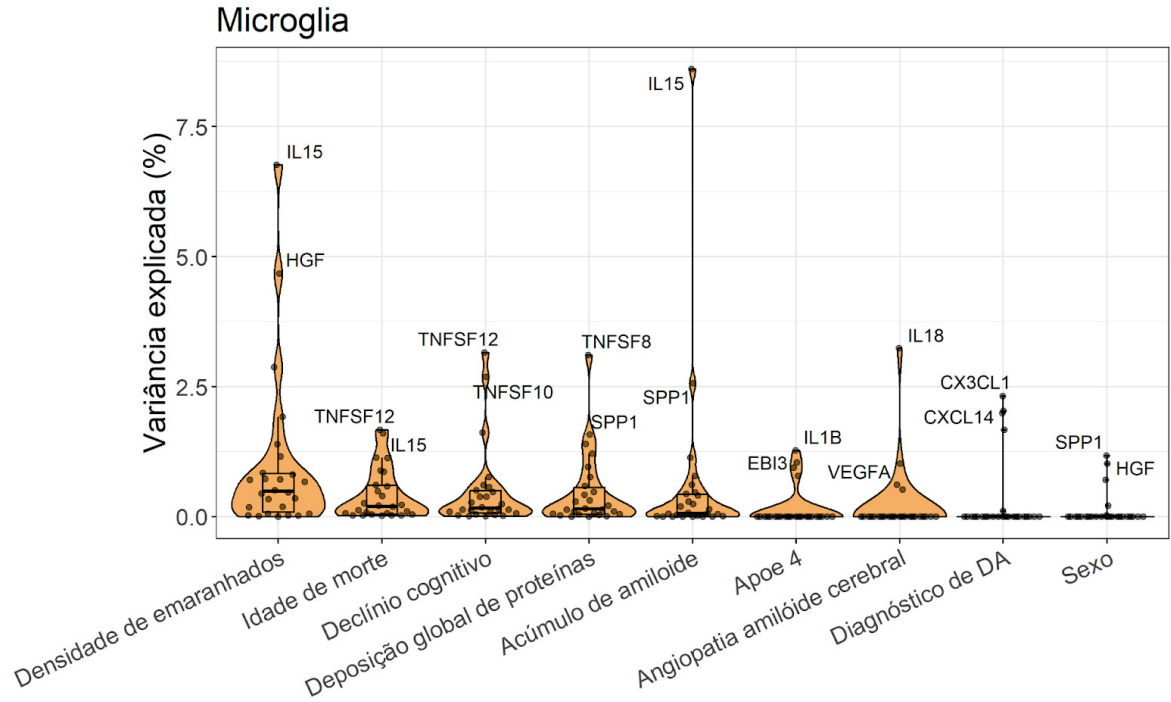
para os outros grupos celulares anotados nos dados de snRNA-seq podem ser encontrados nos apêndices de C a G.

FIGURA 14: VARIAÇÃO PERCENTUAL DE CITOCINAS NO BULK EXPLICADA PELO FENÓTIPO



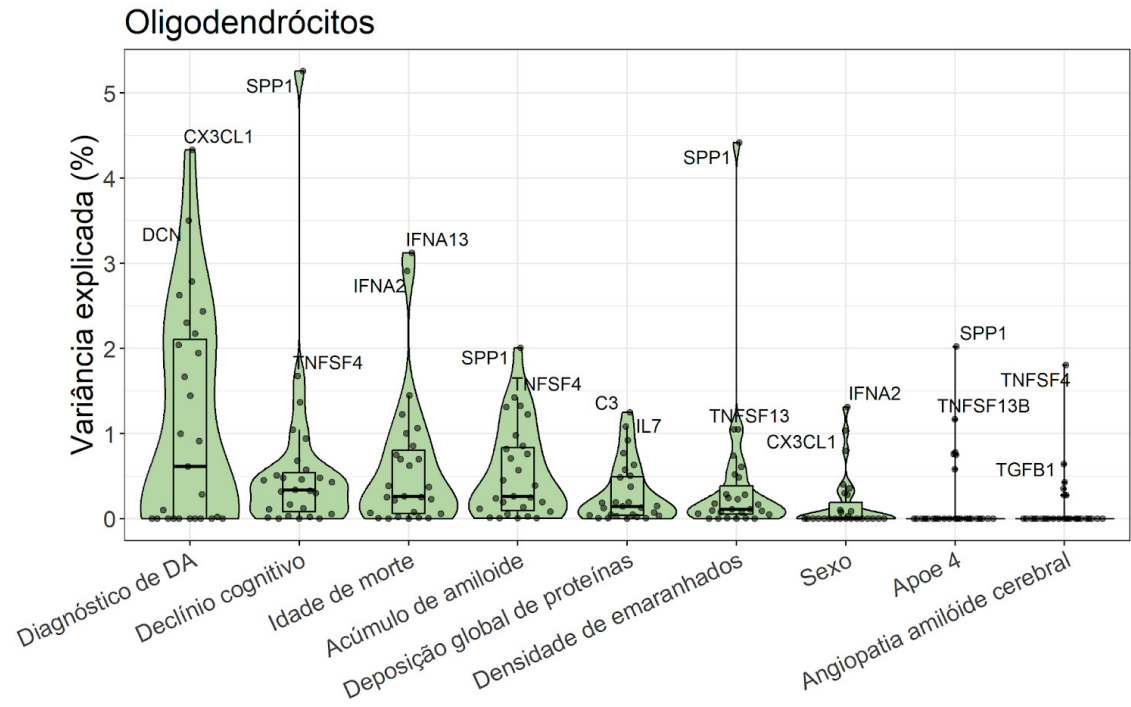
FONTE: a Autora (2025)

FIGURA 15: VARIAÇÃO PERCENTUAL DE CITOCINAS NA MICROGLIA EXPLICADA PELO FENÓTIPO



FONTE: a Autora (2025)

FIGURA 16: VARIAÇÃO PERCENTUAL DE CITOCINAS NOS OLIGODENDRÓCITOS EXPLICADA PELO FENÓTIPO



FONTE: a Autora (2025)

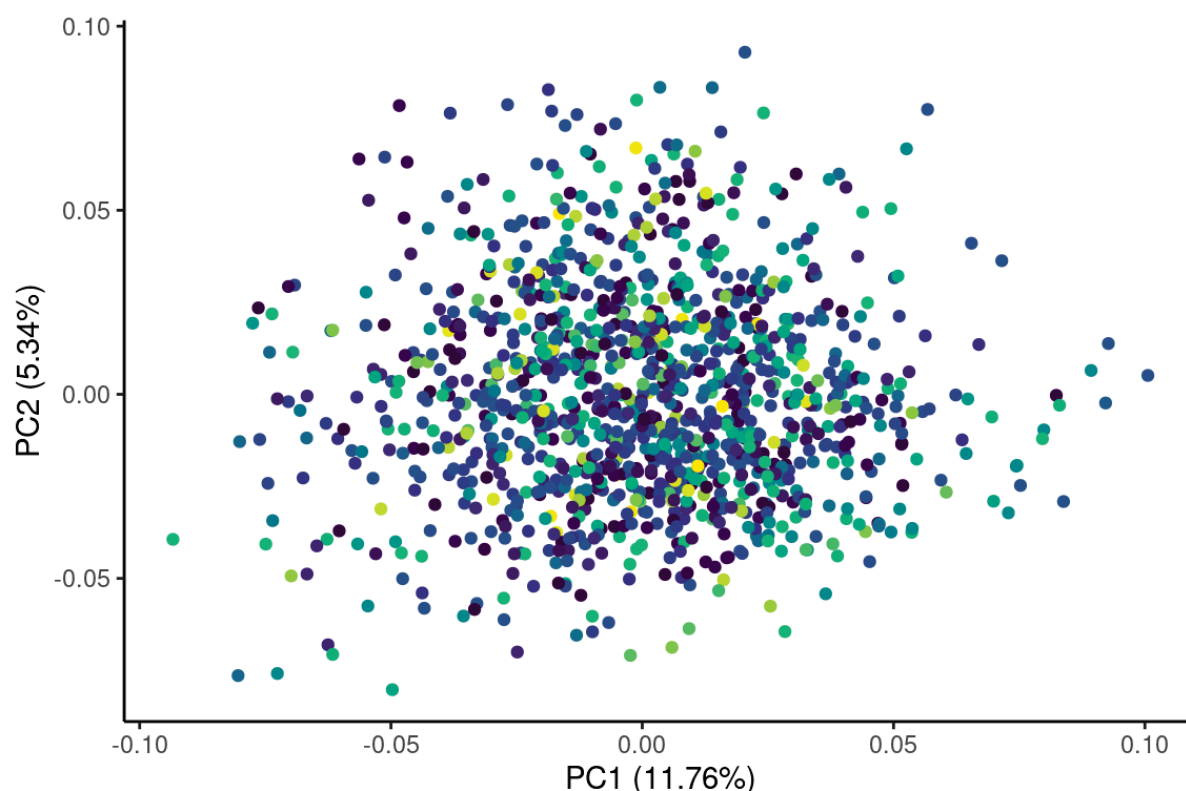
8 INTEGRAÇÃO MULTIMODAL

Nos últimos anos, avanços significativos nos métodos de integração de dados têm permitido a identificação de vias de sinalização, biomarcadores e mecanismos-chave em diversas patologias, aprimorando as hipóteses biológicas formuladas a partir de dados moleculares e fenotípicos (Tesi et al., 2023). Este capítulo apresenta as estratégias empregadas na integração de três camadas de dados modais: bulk RNA-seq, snRNA-seq e dados clínicos individuais. Os resultados dessa análise visam aprofundar — ou, ao menos, expandir — a compreensão dos mecanismos moleculares inflamatórios envolvidos na fisiopatologia da DA, proporcionando uma visão holística das vias neuroinflamatórias associadas à sua patogênese.

8.1 MATERIAIS E MÉTODOS

Inicialmente, as matrizes de expressão gênica foram filtradas para incluir apenas as citocinas expressas em cada um dos conjuntos de dados do ROSMAP (bulk e snRNA-seq). Em seguida, foi conduzida uma análise de componentes principais (PCA) a fim de extrair os dez primeiros componentes (PCs) dos dados de bulk RNA-seq e de cada um dos sete tipos celulares anotados nos dados de snRNA-seq. A análise de PCA foi conduzida utilizando o pacote 'prcomp' do R, que aplica a decomposição em valores singulares (SVD) para calcular os PCs. A validade dos PCs foi confirmada por meio da análise da variância explicada, onde consideramos apenas os componentes que contribuíram com pelo menos 60% da variância cumulativa. Os componentes principais foram interpretados com base nas cargas fatoriais de cada gene, sendo que aqueles com maiores valores absolutos foram considerados mais relevantes para explicar a variância observada nos dados. Os PCs retidos explicaram mais de 62% da variância cumulativa no bulk RNA-seq e nos dados de snRNA-seq capturaram pelo menos 70% da variância em cada grupo celular. Após o ajuste pelas variáveis técnicas (FIGURA 17), os PCs retidos foram usados em análises posteriores. Os PCs identificados nos dados de snRNA-seq encontram-se nos apêndices H a M.

FIGURA 17: PC1 E PC2 DO BULK APÓS AJUSTE POR VARIÁVEIS TÉCNICAS



Fonte: A autora (2025)

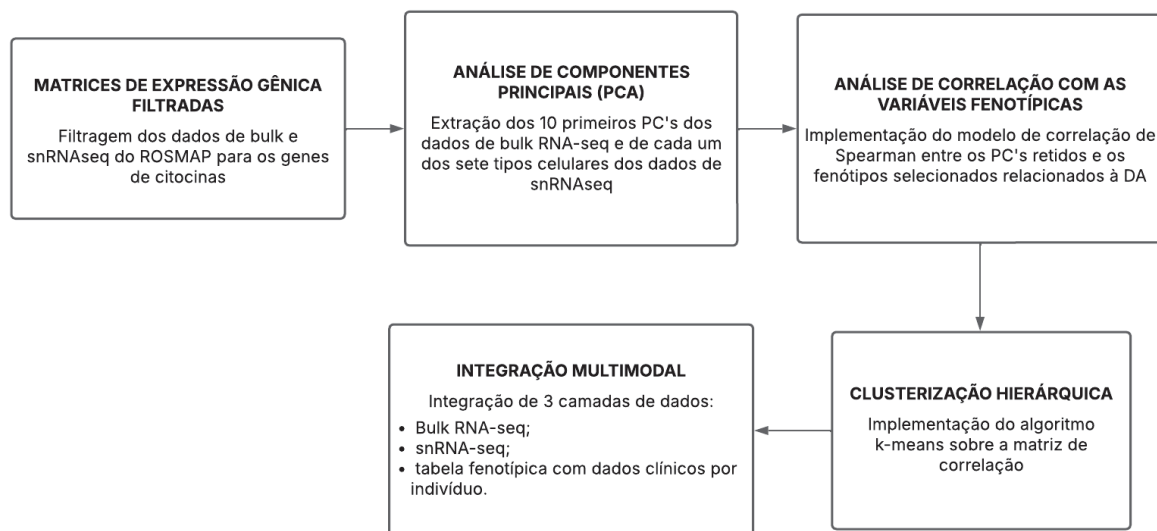
Após a identificação dos componentes, calculamos a correlação de Spearman entre os PCs com as seguintes medidas fenotípicas: declínio cognitivo, resiliência cognitiva, cognição global, deposição de A β , densidade de emaranhados neurofibrilares, carga global de proteínas patológicas, diagnóstico de DA e idade ao falecer.

Para identificar possíveis padrões subjacentes nos conjuntos de dados, aplicamos o algoritmo de clusterização k-means à matriz de correlação. Este método agrupou as variáveis com base nas semelhanças nos perfis de correlação identificados pelo método de Spearman, facilitando a identificação e visualização de grupos com perfis fenotípicos e transcriptômicos similares. O k-means foi escolhido por sua escalabilidade e eficiência (Petegrosso et al., 2020; Reel et al., 2021), visando minimizar a variabilidade dentro de cada cluster e maximizar a variabilidade entre eles. Esse método é especialmente útil para integrar dados biológicos multidimensionais e reduzir a dimensionalidade do conjunto.

Para uma análise mais detalhada dos relacionamentos entre as variáveis fenotípicas e transcriptômicas, a matriz de correlação foi clusterizada hierarquicamente. Diferente do k-means, que define os grupos de maneira prévia, a clusterização hierárquica constrói uma árvore de agrupamento (dendrograma), permitindo uma visualização hierárquica das

semelhanças. Esse método foi utilizado para explorar a organização natural dos dados, oferecendo *insights* sobre a estrutura dos agrupamentos e permitindo a análise em diferentes níveis de granularidade. O dendograma com a descrição do fluxo de trabalho pode ser encontrado na figura abaixo (FIGURA 18).

FIGURA 18: FLUXO DE TRABALHO UTILIZADO NA ANÁLISE DA CONTRIBUIÇÃO BIOLÓGICA SOBRE A EXPRESSÃO DE CITOCINAS



Fonte: A autora (2025)

8.2 RESULTADOS

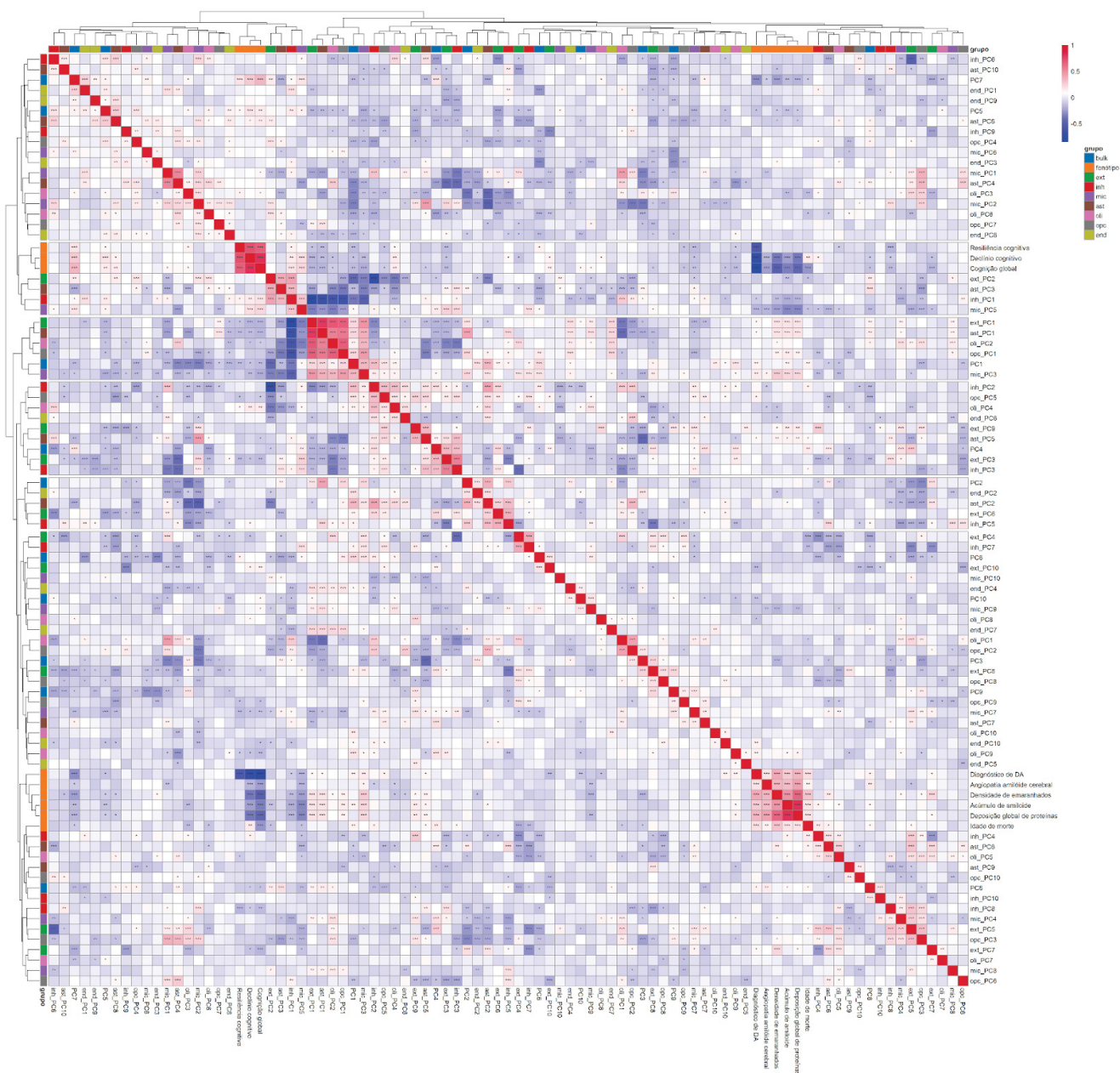
Os resultados da análise de integração multimodal, mostraram que os PC1, PC3, PC4, PC5, PC6, PC7, PC8 e PC10 do bulk RNA-seq foram significativamente correlacionadas com pelo menos uma variável fenotípica (FIGURA 19). O PC1, com a maior contribuição na variância neste conjunto de dados (19,19%), foi impulsionada por fatores de crescimento (*CSF1*, *FGF2*, *HGF*), quimiocinas (*CXCL8*, *CCL2*) e genes como *SPPI*, *EBI3*, *C3* e *TGFB1*, sugerindo uma atuação conjunta entre essas moléculas (TABELA 3). Utilizando o método de Spearman (TABELA 4), este componente foi positivamente correlacionado com o diagnóstico de DA ($\rho = 0,1279$; valor de $p = 0,008$), deposição de A β ($\rho = 0,13336$; valor de $p = 6,44 \times 10^{-3}$) e a idade no momento do óbito ($\rho = 0,13$; valor de $p = 0,007$).

Em nível celular, os neurônios excitatórios mostraram o maior número de PCs correlacionados com fenótipo, com 9 PCs associados ao fenótipo: ext_PC1, ext_PC2, ext_PC4, ext_PC5, ext_PC7, ext_PC8, ext_PC9, ext_PC10 (FIGURA 19). As correlações mais expressivas com o fenótipo foram observadas no primeiro componente principal dos

neurônios excitatórios (ext_PC1; 21,61% de variância), dos astrócitos (ast_PC1; 15,51%) e das OPCs (opc_PC1; 14,61%). Esses componentes mostraram correlações positivas com a deposição de emaranhados neurofibrilares, A β e acúmulo global de proteínas neurotóxicas (FIGURA 20; TABELA 4). Além disso, os PC1 dos astrócitos e dos neurônios excitatórios foram positivamente associados ao diagnóstico clínico de DA (FIGURA 20; TABELA 4). Os componentes principais extraídos dos oligodendrócitos também apresentaram um número significativo de PCs correlacionados com o fenótipo relacionados à DA, com 8 componentes relacionados a pelo menos uma variável (FIGURA 19). O PC2 dos oligodendrócitos, com contribuição de 9,82% na variância dos dados, foi positivamente correlacionado apenas à deposição de emaranhados neurofibrilares no córtex (TABELA 4). Já o PC3 foi inversamente associado ao acúmulo de A β ($\rho = -0,14$; valor de $p = 0,004$) e à idade de óbito ($\rho = -0,15$; valor de $p = 0,002$).

Ao avaliar os coeficientes de carga de cada um destes PCs, os genes *CSF1*, *PSPN*, *TNFSF13B*, *SPP1* e *FGF2* apresentaram altos coeficientes fatoriais positivos (TABELA 3). Sendo que cada gene, contribuiu com a formação de no mínimo dois dos três componentes discutidos. Em contraste, *IL7* e *IL18* exibiram as maiores cargas fatoriais negativas entre esses três componentes, indicando que sua alta expressão está inversamente correlacionada com a formação destes PCs (TABELA 3). O *IL7* também foi o principal gene contribuinte para a formação do PC1 dos neurônios inibitórios e do PC5 da microglia, com uma carga fatorial alta e positiva, o que indica uma correlação positiva com a formação desses componentes. Esses PCs foram inversamente correlacionados com a deposição de emaranhados neurofibrilares, A β e acúmulo global de proteínas (FIGURA 19; TABELA 4).

FIGURA 19: COMPONENTES PRINCIPAIS E VARIÁVEIS FENOTÍPICAS CORRELACIONADOS



FONTE: a Autora (2025)

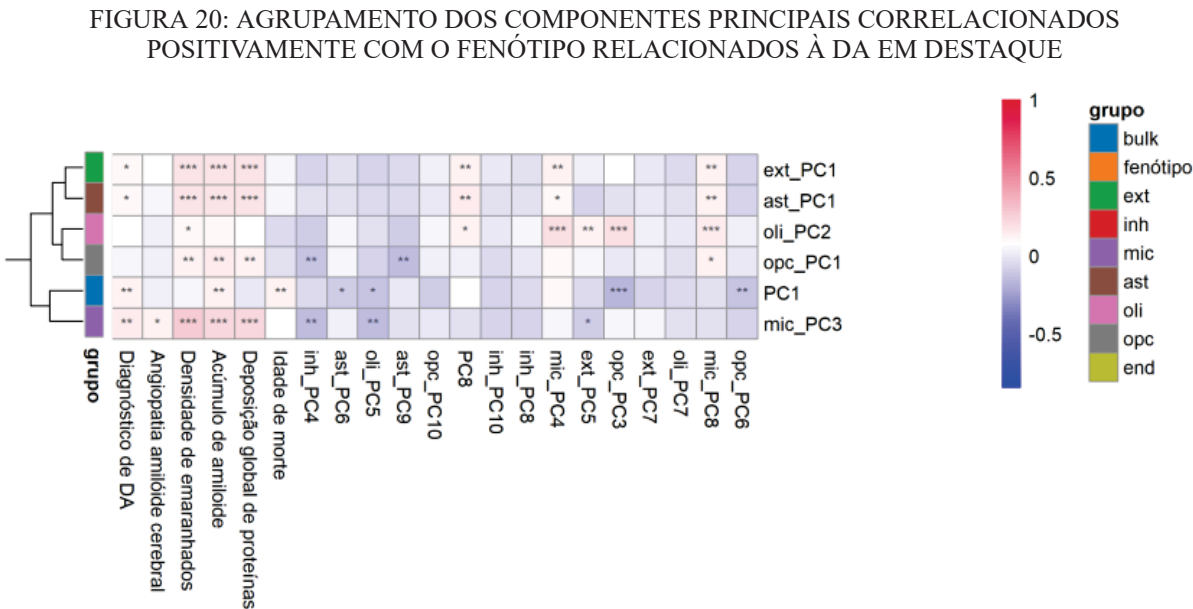
Legenda: Mapa de calor ilustrando as correlações entre os componentes principais obtidos utilizando os dados de bulk RNA-seq e snRNA-seq e as variáveis fenotípicas relacionadas à doença de Alzheimer (DA). O método de correlação de Pearson foi conduzido utilizando os PCs e o fenótipo da DA. O gráfico é colorido de acordo com os coeficientes de correlação, sendo que aqueles positivamente correlacionados são coloridos como vermelhos e inversamente como azuis. Os asteriscos representam os valores de p ajustados pelo teste de BH (***)

FDR < 0,001, ** FDR < 0,01, * FDR < 0,05). O gráfico em alta definição pode ser encontrado neste link: <https://bit.ly/43AdJDJ>.

Além disso, foi observada uma correlação positiva entre o PC3 da microglia e o diagnóstico de DA, o acúmulo de A β , a densidade de emaranhados neurofibrilares e o acúmulo global de proteínas no parênquima cerebral (FIGURA 20; TABELA 4). Esse componente explicou 8,92% da variação na expressão de citocinas na microglia, com a *IL15*

sendo o principal gene contribuinte, apresentando alta carga fatorial positiva. Os genes *TNFSF13B*, *C5* e *SPP1* também contribuíram de forma substancial para a formação deste componente.

Por fim, a análise de k-means revelou que os PCs correlacionados positivamente com as variáveis fenotípicas — PC1 do bulk RNA-seq, PC1 dos neurônios excitatórios, PC1 dos astrócitos, PC1 das OPCs, PC2 dos oligodendrócitos e PC3 da microglia — agruparam-se juntos (FIGURA 20), refletindo semelhanças em seus perfis de expressão. Esse agrupamento sugere uma forte relação entre esses componentes e os traços fenotípicos associados à DA, demonstrando como a integração multimodal da bioinformática pode ser utilizada para inferência de processos celulares.



Fonte: A Autora (2025)

Legenda: Em destaque, componentes principais clusterizados juntos na análise de *k-means* e correlacionados positivamente com as variáveis fenotípicas relacionadas à DA. Imagem adaptada da Figura 19.

TABELA 3: CARGAS FATORIAIS DOS COMPONENTES PRINCIPAIS MAIS RELEVANTES CORRELACIONADOS COM O FENÓTIPO RELACIONADO À DA

Ranking	bulk_PC1		ast_PC1		ext_PC1		opc_PC1		mic_PC3		oli_PC2	
	Gene	Carga	Gene	Carga	Gene	Carga	Gene	Carga	Gene	Carga	Gene	Carga
1	TGFB1	0,2783	IL17	-0,3577	IL18	-0,3433	IL7	-0,4528	IL15	0,4109	IL7	-0,4592
2	CSF1	0,2773	CSF1	0,3294	IL7	-0,3382	TGFB1	-0,3727	TNFSF13B	0,3853	TGFB1	-0,4389
3	FGF2	0,2726	CXCL17	-0,3069	TGFB1	-0,3355	CXCL17	-0,3609	TGFB1	-0,3195	CXCL17	-0,4282
4	C3	0,2315	C5	-0,2924	CXCL17	-0,3138	IL18	-0,3587	C3	-0,3120	SPP1	0,3891
5	EBI3	0,2260	PSPN	0,2416	CXCL14	0,2561	FGF2	0,3516	C5	0,3007	IL18	-0,3098
6	HGF	0,2195	IL18	-0,2311	SPP1	0,2501	TNFSF13B	0,3275	IL14	-0,2402	TNFSF13B	0,2371
7	SPP1	0,2181	TNFSF13B	0,2303	FGF2	0,2317	C5	0,2214	IGF1	-0,2312	GDNF	0,1343
8	TNFSF13	0,1948	CX3CL1	0,2302	PSPN	0,2275	CSF1	0,2115	SPP1	0,2075	TNFSF4	0,1244
9	CXCL8	0,1939	SPP1	0,2208	C5	-0,2263	GDNF	0,1470	TNFSF10	-0,2058	IGF1	-0,1169
10	CCL2	0,1919	TGFB1	-0,2130	THPO	-0,2219	IL17D	0,1392	VEGF4	0,1930	C5	0,1060

FONTE: a Autora (2025)

Legenda: Top 10 genes de citocinas com as maiores cargas fatoriais absolutas nos componentes principais correlacionados positivamente com as variáveis da DA.

TABELA 4: COMPONENTES PRINCIPAIS CORRELACIONADOS COM O FENÓTIPO

Fenótipo	PC1		ast_PC1		ext_PC1		opc_PC1		mic_PC3		oli_PC2		oli_PC3		mic_PC5		inh_PC1	
	ρ	valor de p	ρ	valor de p	ρ	valor de p	ρ	valor de p	ρ	valor de p	ρ	valor de p	ρ	valor de p	ρ	valor de p	ρ	valor de p
Diagnóstico de DA	0,13	0,008	0,11	0,025	0,1	0,03	0,05	0,3	0,15	0,0019	0,07	0,14	-0,08	0,12	-0,17	0,0006	-0,1	0,03
Acúmulo de amiloide	0,13	0,0064	0,18	0,0002	0,16	0,0007	0,15	0,002	0,22	0,00000 ₉	0,09	0,063	-0,14	0,0041	-0,3	1,39	-0,2	0,0000 ₇
Deposição de emaranhados neurofibrilares	0,04	0,387	0,16	0,0008	0,17	0,0007	0,13	0,006	0,27	2,06	0,11	0,023	-0,07	0,14	-0,23	0,0000 ₀₁	-0,14	0,004
Acúmulo global de proteínas	0,007	0,882	0,162	0,0009	0,16	0,0009	0,1	0,008	0,23	0,00000 ₂	0,07	0,108	-0,07	0,14	-0,31	5,8	-0,19	0,0009
Idade ao óbito	0,13	0,0076	0,05	0,3	0,04	0,4	-0,03	0,5	0,073	0,13	-0,04	0,405	-0,15	0,002	-0,11	0,022	-0,08	0,12

FONTE: a Autora (2025)

Legenda: Coeficientes de correlação de Spearman (ρ) e valores de significância (valor de p) entre os componentes principais extraídos dos dados de bulk e snRNA-seq e as variáveis fenotípicas relacionadas à DA. PC1 = primeiro componente principal do bulk (19,79% de variância); ast_PC1 = primeiro componente principal dos astrócitos (15,51% de variância); ext_PC1 = primeiro componente principal dos neurônios excitatórios (21,67% de variância); opc_PC1 = primeiro componente principal das células precursoras de oligodendrócitos (14,61% de variância); mic_PC3 = terceiro componente principal da microglia (8,92% de variância); oli_PC2 = segundo componente principal dos oligodendrócitos (9,85%); oli_PC3 = terceiro componente principal dos oligodendrócitos (6,8% de variância); mic_PC5 = quinto componente principal da microglia (5,31% de variância); inh_PC1 = primeiro componente principal dos neurônios inibitórios (16,74% de variância).

9 O RISCO GENÉTICO E A IMUNOMODULAÇÃO

Pesquisas de GWAS sobre a DA identificaram genes candidatos associados à doença, muitos dos quais apresentam alta expressão em células gliais (Bellenguez et al., 2022; Jansen et al., 2019; Kunkle et al., 2019). Como discutido anteriormente, essas células desempenham papéis fundamentais na neuroinflamação, na depuração de A β e na manutenção da homeostase cerebral. No entanto, a influência da variabilidade gênica entre diferentes tipos celulares na progressão da DA ainda não está completamente elucidada (Yang et al., 2023). Neste capítulo, apresentamos as metodologias empregadas e os resultados obtidos na análise da influência do risco genético sobre a expressão de citocinas no córtex cerebral de pacientes idosos, bem como possíveis variações nas associações de acordo com os diferentes níveis de suscetibilidade à demência.

9.1 MATERIAIS E MÉTODOS

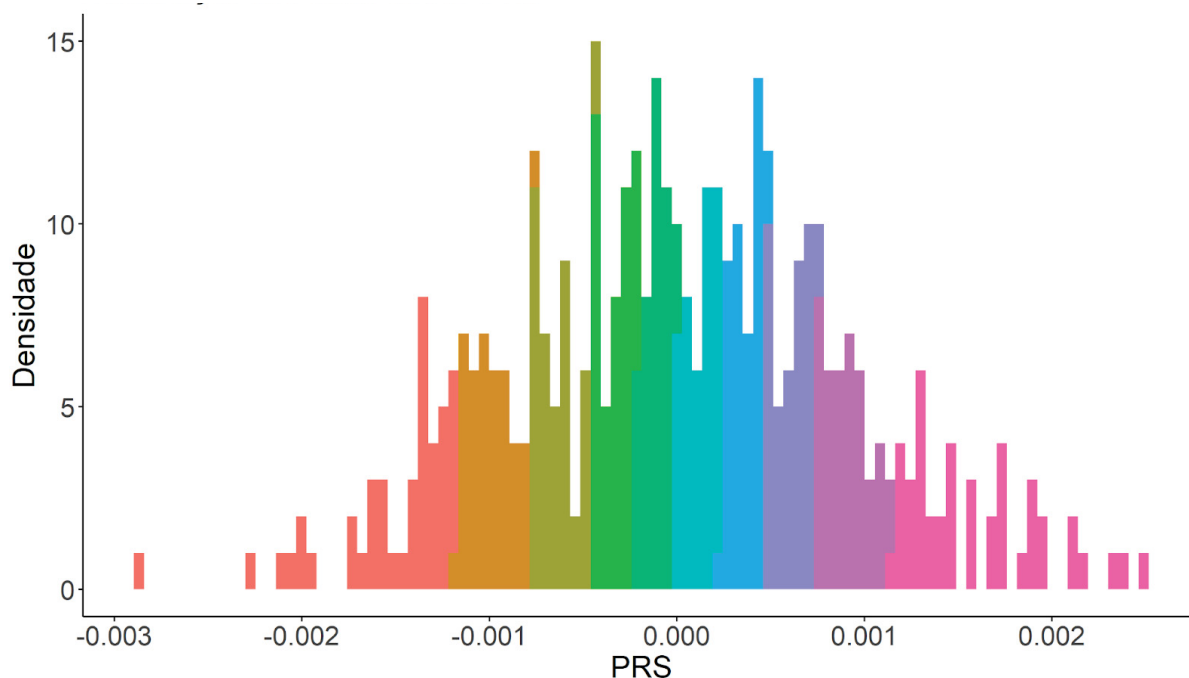
9.1.1 Pontuação do risco poligênico para DA

As pontuações de risco poligênico para a DA (DA-PRS) para os 424 indivíduos sequenciados nos dados de snRNA-seq do ROSMAP foram previamente calculadas e descritas por Tasaki e colaboradores (2019). Essas pontuações foram derivadas de variantes genéticas identificadas em estudos de GWAS, especificamente nos dados genéticos do *International Genomics of Alzheimer's Project* (IGAP) e do *Center for Cognitive Ageing and Cognitive Epidemiology* (CCACE). O estudo IGAP realizou uma meta-análise em dois estágios com 25.580 casos de demência de Alzheimer e 48.466 controles, identificando 11.632 polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs), incluindo variantes significativas nas regiões *APOE* e *TOMM40*. Já os dados do CCACE incluíram 314.278 participantes e foram ajustados para excluir indivíduos sobrepostos com a coorte ROSMAP, garantindo a integridade das estatísticas de resumo utilizadas para a seleção dos SNPs no cálculo do DA-PRS. As pontuações calculadas foram normalizadas subtraindo-se a média do PRS entre todos os indivíduos e dividindo pelo desvio padrão.

Para avaliar o impacto do risco genético de DA sobre a expressão de citocinas no córtex pré-frontal, estratificamos em decis as pontuações de DA-PRS previamente calculadas (FIGURA 21). Os indivíduos estratificados no primeiro decil foram categorizados como de

baixo risco para DA, enquanto aqueles no último decil foram classificados como de alto risco para o desenvolvimento da doença.

FIGURA 21: DISTRIBUIÇÃO DOS DECÍIS DE DA-PRS



FONTE: a Autora (2025)

Legenda: Distribuição das pontuações de PRS estratificadas em decis para os 424 voluntários do subconjunto de snRNAseq do ROSMAP.

9.1.2 Avaliação da média de expressão de citocinas

Para avaliar se os voluntários categorizados como de alto e baixo risco para DA apresentavam diferenças significativas na expressão de citocinas, analisamos a média de expressão de cada gene nos sete grupos celulares e comparamos os resultados por meio de testes de hipótese. Para essa análise, os dados de expressão foram filtrados para os genes-alvo e organizados de acordo com o grupo celular, o decil de PRS e o identificador do gene. Foram retidos os dados de expressão dos indivíduos estratificados no primeiro e último decil, e calculadas as médias de expressão para cada gene entre os grupos celulares. O teste t de Student foi aplicado para verificar a presença de diferenças significativas entre os grupos de alto e baixo risco. Também foram calculadas as médias e os desvios padrão, e as diferenças entre os grupos foram corrigidas para múltiplas comparações pelo método de Bonferroni. Os resultados foram visualizados em boxplots, nos quais os pontos representam as médias de expressão de cada citocina nos diferentes decis de PRS (FIGURA 22).

9.1.3 Análise de associação entre a expressão de citocinas e DA-PRS

A relação entre a expressão de citocinas e o DA-PRS foi analisada por regressão linear generalizada. O modelo foi ajustado para idade e sexo dos participantes dos estudos por meio da função `'glm'` do R. Os valores de significância foram corrigidos para múltiplas comparações pelo método de Benjamini-Hochberg (BH). Diante da ausência de valores-p significativos após a correção pela taxa de descoberta falsa (FDR), optou-se por considerar os valores-p nominais para identificar possíveis associações em um contexto exploratório. Citocinas com valores-p nominais iguais ou inferiores a 0,01 foram visualizadas em gráficos de dispersão, com linhas de tendência e intervalos de confiança de 95% (FIGURA 23).

9.1.4 Testes de correlação e permutação

Utilizando o método de Pearson, avaliamos também as correlações entre a expressão de citocinas e o DA-PRS. Para isso, foi implementada a função `'cor'` do R, que calculou o coeficiente de correlação entre o escore poligênico de cada indivíduo e a matriz de expressão filtrada para os genes-alvo. Os dados de expressão foram agrupados por tipo celular e identificador do gene. A significância das correlações foi avaliada por meio da função `'cor.test'`, que gerou os valores de p correspondentes. Para corrigir o efeito de comparações múltiplas, aplicamos o ajuste de BH aos valores de p, obtendo os valores de FDR para cada correlação. Os resultados foram representados em gráficos de violino e boxplots, ilustrando a distribuição dos coeficientes de correlação médios por tipo celular (FIGURA 24).

Em seguida, a significância das correlações entre a expressão de citocinas e o PRS foi avaliada por meio de um teste de permutação. Foram realizadas 1.000 permutações dos valores de expressão gênica, e, em cada permutação, a correlação foi recalculada. A distribuição nula, obtida a partir da média das correlações permutadas, foi usada para calcular os valores-p das correlações observadas, que foram posteriormente ajustados para múltiplas comparações pela FDR, utilizando o método de BH (FIGURA 25).

9.1.5 Análise de enriquecimento de conjuntos de genes

A partir dos resultados da regressão linear entre a expressão de citocinas e o DA-PRS, realizamos uma análise de enriquecimento de conjuntos de genes (GSEA). Para essa análise, agrupamos os genes expressos com base em suas famílias anotadas. Primeiramente, para cada

tipo celular, geramos listas ranqueadas de genes, ordenadas pelos valores-t obtidos na análise de regressão linear descrita na Seção 9.1.3 deste capítulo. Além disso, criamos uma lista adicional que reúne todos os genes expressos, independentemente do tipo celular, denominada “Tudo” (FIGURA 26).

Os genes expressos foram agrupados por famílias de citocinas, gerando vetores distintos para cada uma. Em seguida, utilizamos o pacote `fgsea()` no R para identificar quais famílias de citocinas estavam significativamente associadas ao PRS nos dados de snRNA-seq. Para minimizar vieses relacionadas ao tamanho dos conjuntos, normalizamos os resultados e aplicamos o ajuste para múltiplas comparações pelo método de BH, destacando as famílias com valores-p ajustados significativos ($p \leq 0,05$).

Os resultados foram apresentados em gráficos de barras, nos quais as famílias com significância estatística são destacadas acima da linha de referência correspondente ao limiar de significância ($-\log_{10}(0,05)$). Assim, foi possível identificar quais famílias de citocinas associadas ao PRS estavam super-representadas em cada grupo celular anotado (FIGURA 26).

9.2 RESULTADOS

Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas na produção média de moléculas inflamatórias entre indivíduos com alto e baixo risco genético para DA (FIGURA 22). No entanto, a expressão de cinco citocinas apresentaram associações significativas (p nominal $\leq 0,01$) com as pontuações de DA-PRS, utilizando o modelo de regressão linear generalizada. Os níveis de *C5* e *IL33* em astrócitos, assim como os de *CCL28* em neurônios excitatórios, apresentaram associação inversa com o risco aumentado de DA (FIGURA 23). Em contrapartida, a alta expressão de *HGF* em neurônios excitatórios e de *SPP1* na microglia esteve positivamente associada a pontuações mais altas de risco genético.

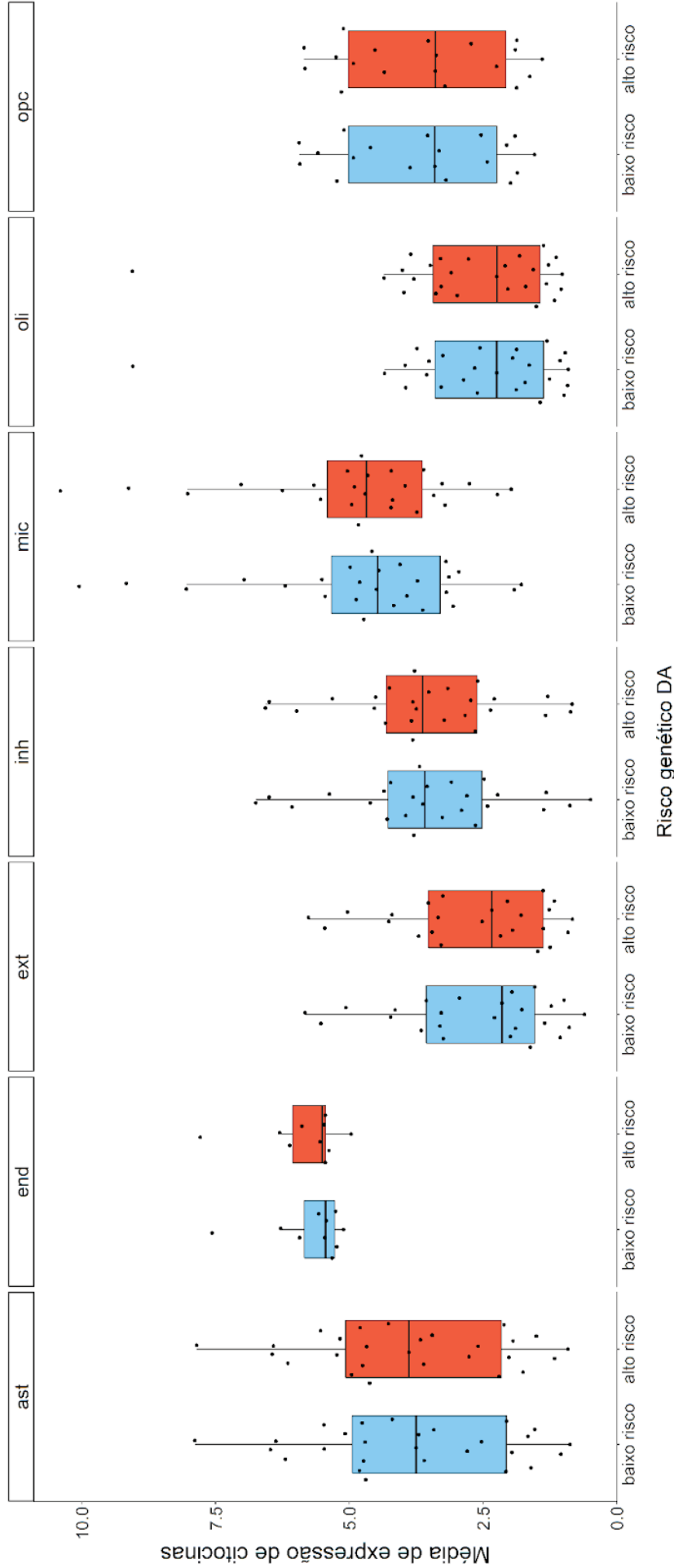
As médias de correlação entre o DA-PRS e a expressão gênica indicaram que indivíduos com risco elevado para DA apresentaram níveis mais altos de expressão de citocinas derivadas da microglia e dos oligodendrócitos (FIGURA 24). As associações observadas foram confirmadas pelo teste de permutação (FIGURA 25). A comparação dos valores de p das correlações observadas com as médias das correlações permutadas confirmou a significância dos resultados, indicando que quanto maior o risco genético para o desenvolvimento de DA, maior a expressão de citocinas pela microglia e pelos

oligodendrócitos (FIGURA 25). Esses achados ressaltam a importância do sequenciamento de célula única para esse tipo de análise.

Embora a correlação média entre o risco de DA e a expressão de proteínas inflamatórias tenha sido maior em astrócitos e neurônios inibitórios, essas associações não foram estatisticamente significativas (FIGURA 24). A distribuição das correlações permutadas corroborou esses resultados, uma vez que não foram observadas diferenças significativas entre as médias das correlações permutadas e a correlação observada (FIGURA 25).

Por fim, a análise de GSEA revelou um enriquecimento significativo de genes da família de fatores de crescimento em indivíduos com maior pontuação de risco genético para o desenvolvimento de DA (p nominal = 0,00085) (FIGURA 26). A nível celular, essa via mostrou-se significativamente enriquecida em astrócitos (p nominal = 0,0218) e oligodendrócitos (p nominal = 0,0189). Nos oligodendrócitos, observou-se também que as interleucinas estavam negativamente reguladas em indivíduos com alto risco genético para DA. As quimiocinas, por sua vez, apresentaram associação inversa com o risco genético em neurônios inibitórios, indicando uma regulação negativa dessa via em pacientes com pontuações elevadas de PRS.

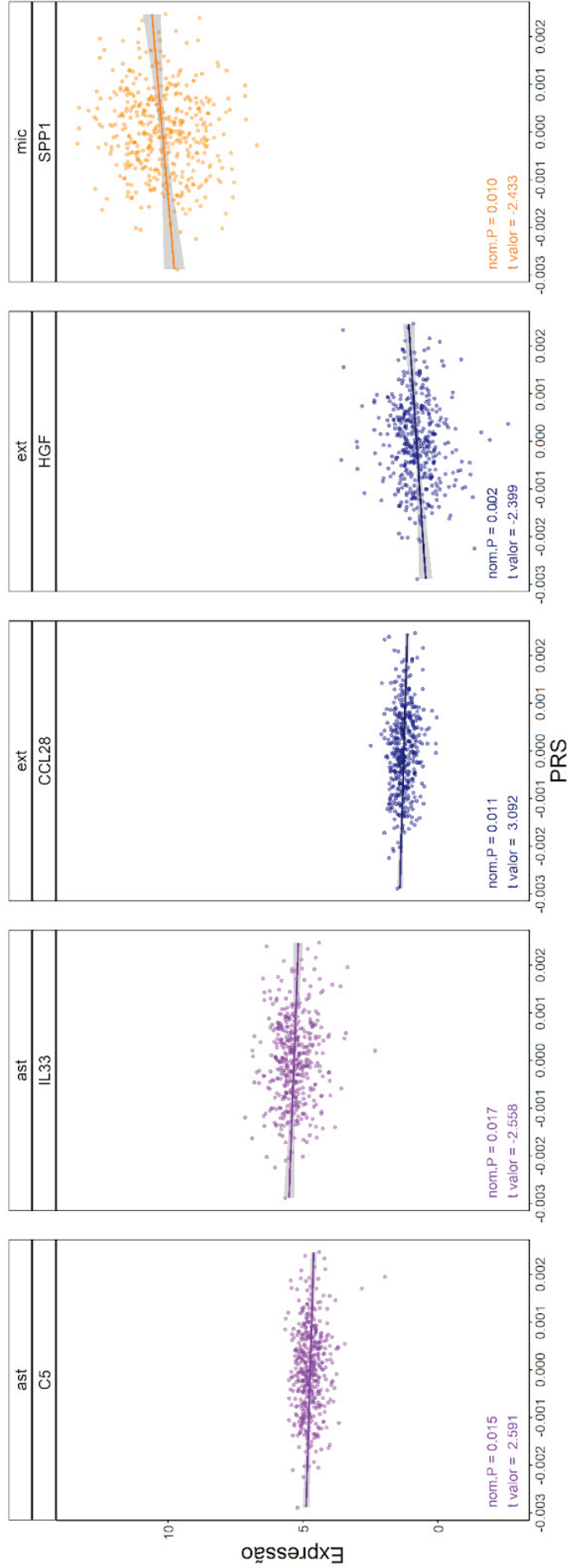
FIGURA 22: EXPRESSÃO MÉDIA DE CITOCINAS EM INDIVÍDUOS COM ALTO E BAIXO RISCO GENÉTICO PARA DA



FONTE: a Autora (2025)

Distribuição da média de expressão de citocinas no córtex pré-frontal de voluntários do estudo ROSMAP, sequenciados por snRNA-seq. As siglas representam os seguintes tipos celulares: ast = astrócitos, end = células endoteliais, ext = neurônios excitatórios, inh = neurônios inibitórios, mic = microglia, oli = oligodendrócitos, opc = células precursoras de oligodendrócitos. Os voluntários foram categorizados conforme suas pontuações de risco genético para a DA (DA-PRS), estratificadas em decis: baixo risco (1º décil; azul) e alto risco (10º décil; vermelho).

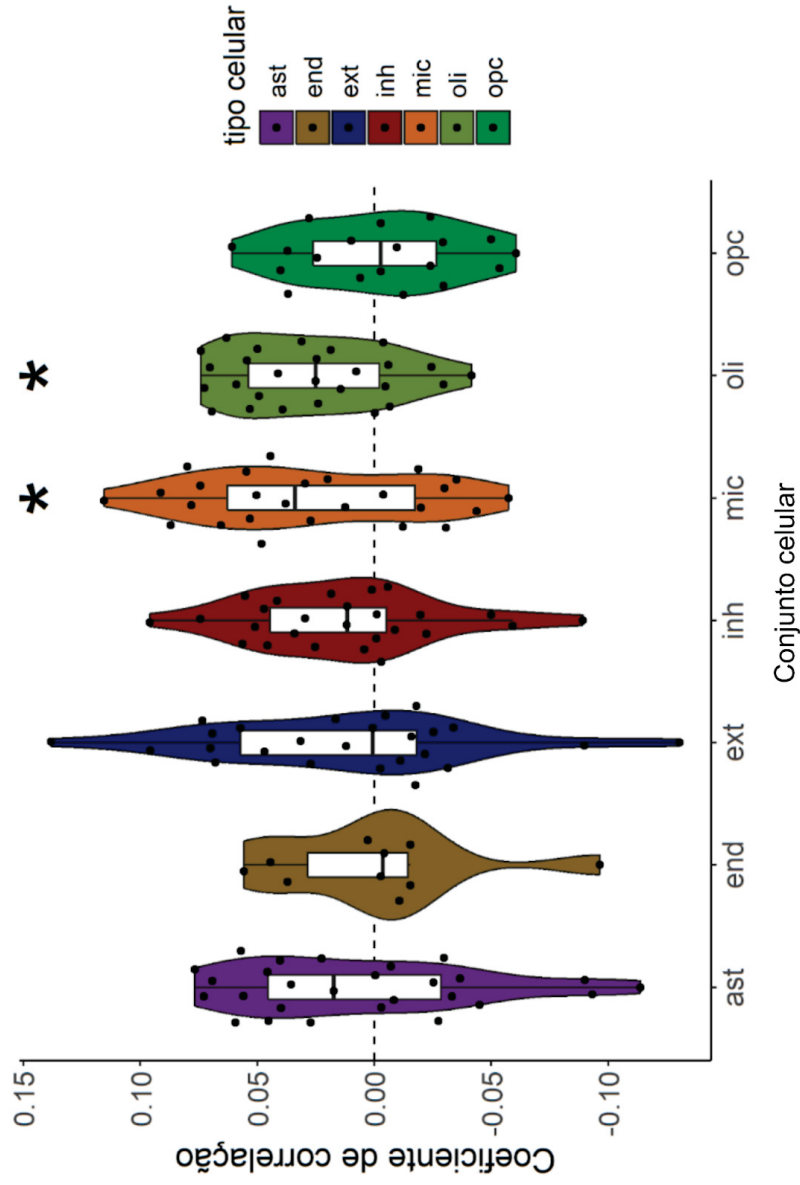
FIGURA 23: TOP 5 CITOCINAS CORRELACIONADAS COM O RISCO GENÉTICO PARA O DESENVOLVIMENTO DA DOENÇA DE ALZHEIMER (DA-PRS)



FONTE: a Autora (2025)

Legenda: Gráficos de dispersão representando a correlação entre a expressão gênica de citocinas (snRNA-seq) e as pontuações de risco genético para demência de Alzheimer (DA-PRS). Cada ponto representa a expressão de um gene em um indivíduo. Valores nominais de p e estatísticas t estão indicados nos respectivos gráficos. As cores indicam os tipos celulares: ast = astrócitos, ext = neurônios excitatórios, mic = microglia.

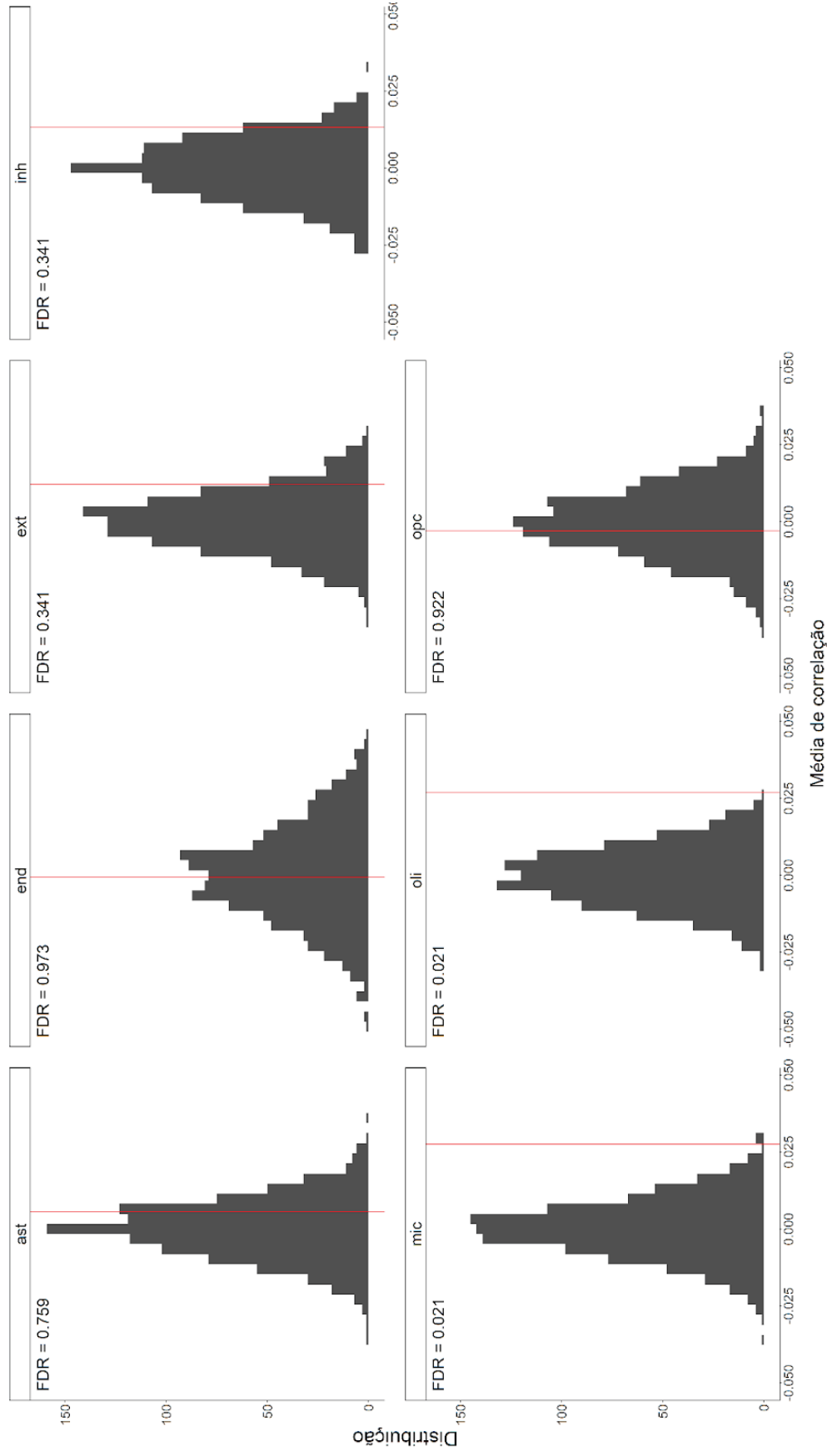
FIGURA 24: MÉDIA DOS COEFICIENTES DE CORRELAÇÃO ENTRE A EXPRESSÃO DE CITOCINAS E O RISCO GENÉTICO CALCULADO PARA O DESENVOLVIMENTO DE ALZHEIMER (DA-PRS)



FONTE: a Autora (2025)

Legenda: Cada ponto do gráfico representa a correlação média entre a expressão de um gene de citocina específico por tipo celular e o DA-PRS calculado para os 424 indivíduos sequenciados nos dados de snRNA-seq da coorte ROSMAP. Os asteriscos representam os valores de FDR menores ou iguais a 0,01 obtidos no teste de permutação. O gráfico é colorido acordo com o tipo celular (ast = astrócitos, end = células endoteliais, ext = neurônios excitatórios, inh = neurônios inibitórios, mic = microglia, oli = oligodendrócitos, opc = células precursoras de oligodendrócitos).

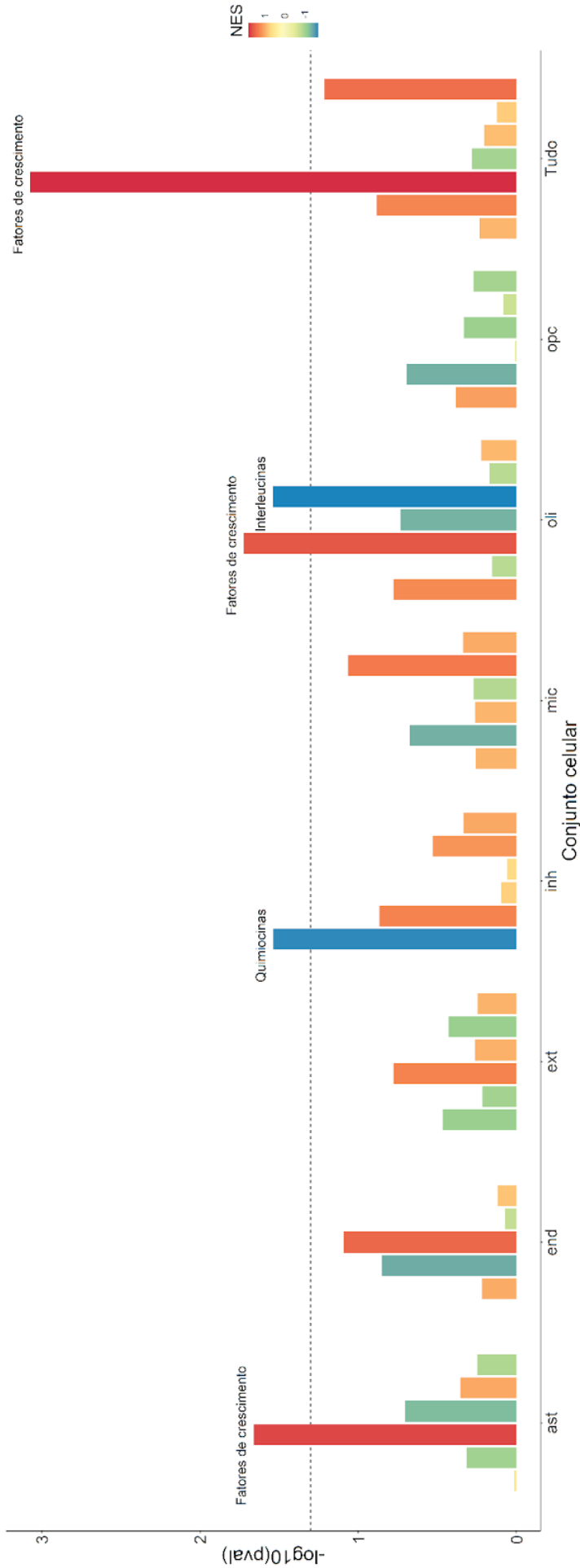
FIGURA 25: TESTE DE PERMUTAÇÃO



FONTE: a Autora (2025)

Legenda: Distribuição das correlações médias entre a pontuação de risco genético para DA (DA-PRS) e a expressão de citocinas em diferentes tipos celulares, calculada a partir de 1.000 permutações. A seta vermelha indica a correlação observada nos dados reais. Cada painel representa um tipo celular: ast = astrócitos, end = células endoteliais, ext = neurônios excitatórios, inh = neurônios inibitórios, mic = microglia, oli = oligodendrócitos, opc = células precursoras de oligodendrócitos.

FIGURA 26: ANÁLISE DE ENRIQUECIMENTO FUNCIONAL DE GENES DE FAMÍLIAS DE CITOCINAS



FONTE: a Autora (2025)

Legenda: Famílias de citocinas significativamente enriquecidas em associação ao risco genético para DA (DA-PRS) por tipo celular, com base em dados de snRNA-seq. O eixo y mostra os valores de p ajustados em escala log 10, e o eixo x representa os tipos celulares: ast = astrócitos, end = células endoteliais, ext = neurônios excitatórios, inh = neurônios inibitórios, mic = microglia, oli = oligodendrócitos, opc = células precursoras de oligodendrócitos. As barras são coloridas de acordo com a pontuação de enriquecimento normalizada (NES), considerando as diferenças no tamanho do conjunto de genes. Valores positivos de NES (vermelho) indicam enriquecimento da via, enquanto valores negativos (azul) indicam depleção dos genes associados a DA-PRS no tipo celular correspondente.

10 DISCUSSÃO

Ao todo, 49 genes de citocinas foram expressos no tecido cortical dos voluntários do ROSMAP, dos quais 31 apresentaram associações significativas com o fenótipo da DA (TABELA 1). Nos dados de bulk RNA-seq, foram identificadas 42 citocinas, sendo que 20 mostraram associação significativa com as variáveis clínicas relacionadas à doença (FIGURA 8; FIGURA 9). Nas análises de snRNA-seq, genes de citocinas também se associaram de forma significativa ao fenótipo em todos os tipos celulares anotados, com exceção das células endoteliais (FIGURA 8; FIGURA 10). Porém, será interessante repetir essa análise futuramente com um dataset enriquecido para esse tipo celular.

No bulk, a associação mais forte foi observada entre o gene *IL15* e o declínio cognitivo (FIGURA 9). O *IL15* codifica a proteína pró-inflamatória interleucina-15 (IL-15), geralmente expressa por astrócitos e outras células do SNC em condições homeostáticas. Durante a resposta inflamatória, sua expressão aumenta consideravelmente, sendo também detectada na microglia, onde desempenha um papel fundamental na regulação da reatividade glial (Gómez-Nicola et al., 2006; 2008; Huang et al., 2007). Estudos prévios mostram que concentrações elevadas de IL-15 em amostras de soro e líquido cefalorraquidiano de pacientes com DA correlacionam-se com o comprometimento cognitivo e níveis aumentados de tau total e fosforilada (Taipa et al., 2019; Janelidze et al., 2018; Popp et al., 2017; Daniilidou et al., 2023; Rentzos & Rombos, 2012; Gertje, 2023).

Neste estudo, a expressão de *IL15* foi significativamente maior em pacientes diagnosticados clinicamente com DA em comparação aos indivíduos com comprometimento cognitivo leve (MCI) e controles sem demência (FIGURA 11b). Além disso, a elevada expressão de *IL15* em pacientes com DA foi significativamente correlacionada a uma taxa mais acelerada de declínio cognitivo ao longo dos anos (FIGURA 11a). Em indivíduos com MCI, *IL15* não apresentou correlação significativa com o comprometimento cognitivo, sugerindo que seu envolvimento com esse fenótipo pode ocorrer principalmente em estágios mais avançados da doença (FIGURA 11a). Estudos anteriores corroboram com este achado, já que níveis de IL-15 no soro e no líquido cefalorraquidiano de pacientes com MCI e indivíduos controles não apresentaram diferenças significativas entre os grupos (Huang et al., 2015).

Por outro lado, em indivíduos com MCI, a expressão de *IL15* na microglia correlacionou-se positivamente com a deposição global de proteínas neurotóxicas (FIGURA 11c). Adicionalmente, análises de regressão linear e/ou logística revelaram uma forte

associação entre a expressão microglial de *IL15* e marcadores neuropatológicos, incluindo a deposição global de proteínas, a densidade de emaranhados neurofibrilares e o acúmulo de A β (FIGURA 10c). Esses achados sugerem que a deposição de proteínas neurotóxicas nos estágios iniciais da DA pode estar fortemente associada à expressão de *IL15* na microglia, possivelmente modulando sua atividade e favorecendo a progressão da doença para estágios mais graves. No entanto, experimentos laboratoriais são necessários para confirmar essa hipótese. Por fim, vale destacar que a associação entre *IL15* e A β não foi observada nos dados de bulk RNA-seq (FIGURA 9), diferentemente do que foi identificado nos dados de snRNA-seq — possivelmente devido à heterogeneidade celular presente nesse conjunto de dados.

Um estudo recente de Green et al. (2024) identificou subpopulações microgliais específicas que, além de expressarem genes de suscetibilidade à DA, como *APOE* e *TREM2*, estão associadas à deposição de A β e a um declínio cognitivo mais acentuado. Em culturas de células microgliais, o bloqueio de *IL15* preserva o fenótipo homeostático, inibindo a via MAPK e a produção de citocinas pró-inflamatórias (Gomez-Nicola et al., 2010). Esses achados sugerem que a expressão de *IL15* pela microglia pode desempenhar um papel importante nos mecanismos subjacentes à progressão da DA, modulando o fenótipo celular e promovendo a produção de moléculas mediadoras durante a resposta neuroinflamatória.

Para investigar padrões de citocinas co-expressos no contexto da DA, foi conduzida uma análise de aprendizado de máquina não supervisionado, utilizando uma abordagem de integração multimodal que combinou três camadas de dados: bulk RNA-seq, snRNA-seq e dados clínicos individuais (FIGURA 19). A extração dos componentes principais das matrizes de expressão revelou que o PC1 do bulk representou a principal fonte de variabilidade na expressão gênica, explicando 19,19% da variância dos dados (APÊNDICE N). A análise de correlação de Spearman indicou associação positiva entre o PC1, o diagnóstico de DA e o acúmulo de A β (FIGURA 19; FIGURA 20; TABELA 4). Este componente é composto pelos genes: *TGFB1*, *CSF1*, *FGF2*, *C3*, *EBI3*, *HGF*, *SPP1*, *TNFSF13*, *CXCL8* e *CCL2*, com altas cargas fatoriais positivas (TABELA 3). As análises de regressão linear e/ou logística corroboram esse achado, uma vez que, entre esses dez genes, o *TGFB1*, *CSF1* e *SPP1* mostraram fortes associações com as mesmas variáveis fenotípicas (FIGURA 9). Esses resultados indicam um padrão de citocinas com ação sinérgica co-expressos e correlacionados com o acúmulo de A β entre os voluntários diagnosticados com DA. Esse perfil pode refletir mecanismos neuroinflamatórios subjacentes que possivelmente contribuem para a

neurodegeneração, caracterizando o risco da progressão da doença. Porém, mais análises são necessárias para comprovação dessa hipótese e fogem do contexto desta dissertação.

Os componentes principais extraídos dos dados de *single nuclei* mostraram que o PC3 da microglia (mic_PC3) foi correlacionada positivamente com diagnóstico de DA, o acúmulo de A β , densidade de emaranhados neurofibrilares e o acúmulo global de proteínas no parênquima cerebral (FIGURA 20; TABELA 4). Este componente, responsável por 8,92% da variância total (APÊNDICE Q), refletiu principalmente a contribuição de citocinas inflamatórias como *TNFSF13B*, *C5* e *SPPI*, cujas cargas fatoriais foram particularmente elevadas (TABELA 3). Porém, o *IL15* foi o gene com a maior carga fatorial positiva, confirmando os achados discutidos acima e sugerindo a forte associação desse gene com o fenótipo relacionado à DA (TABELA 3).

Os primeiros componentes principais dos astrócitos e neurônios excitatórios foram responsáveis por 15,51% (ast_PC1; APÊNDICE R) e 21,61% (ext_PC1; APÊNDICE O) da variação gênica, respectivamente. Além disso, apresentaram correlações positivas com o diagnóstico clínico de DA e os marcadores neuropatológicos da doença (FIGURA 20; TABELA 4). O PC2 dos oligodendrócitos contou com 9,82% de participação na variabilidade da expressão de citocinas (oli_PC2; APÊNDICE S), e apresentou correlação positiva unicamente com a deposição de emaranhados neurofibrilares no córtex (FIGURA 20; TABELA 4). Os genes *SPPI*, *TGFB1* e *TNFSF13B* apresentaram as maiores cargas fatoriais absolutas em grande parte desses componentes (TABELA 3), sugerindo forte influência na variação gênica observada e nas correlações com o fenótipo.

Nos dados de bulk, o gene *SPPI* apresentou associação significativa com todas as variáveis testadas neste estudo (FIGURA 9). Em contrapartida, nas análises de snRNA-seq, a associação com o fenótipo mostrou-se dependente do tipo celular, com resultados distintos em neurônios inibitórios (FIGURA 10b), microglia (FIGURA 10c) e oligodendrócitos (FIGURA 10d). O gene *SPPI* codifica a osteopontina (OPN), uma fosfoproteína que atua como citocina e desempenha um papel central em respostas imunes tanto protetoras quanto patogênicas (Sala Frigerio et al., 2019). Evidências sugerem que a expressão de *SPPI* é fundamental para o desenvolvimento cerebral, além de mediar respostas fagocíticas e pró-inflamatórias, sendo um gene-chave na resposta microglial às placas de A β na DA (Green et al., 2024; Schepper et al., 2023; Shen et al., 2022). Estudos com modelos experimentais de DA indicam que a expressão de *SPPI* diferencia a microglia em um subconjunto patogênico, caracterizado pela expressão de citocinas pró-inflamatórias e pela inibição da via fagocítica TREM2/TAM,

comprometendo a degradação de A β e promovendo a progressão da DA por meio de respostas inflamatórias exacerbadas (Qiu et al., 2023).

Em um estudo recente (Lopes et al., 2024), a superexpressão de *SPP1* no cérebro foi associada a um risco aumentado para diagnósticos neurodegenerativos graves, como a DA. Além disso, quando expressa por tipos celulares específicos — como os subgrupos 3, 12 e 13 da microglia —, a expressão de *SPP1* foi relacionada a um comprometimento cognitivo mais acentuado (Lopes et al., 2024). Corroborando esses achados, o declínio cognitivo foi uma importante fonte de variabilidade na expressão desse gene tanto nos dados de bulk (FIGURA 14) quanto nos oligodendrócitos (FIGURA 16). A expressão de *SPP1* nos oligodendrócitos também mostrou forte associação com o declínio cognitivo e com a densidade de emaranhados neurofibrilares (FIGURA 10d).

Além do *SPP1*, o *TGFBI* também foi um importante contribuinte para a formação dos componentes principais relacionados à neuropatologia da DA, embora com padrões distintos entre os dados de bulk e snRNA-seq (TABELA 3). Estudos anteriores indicam que os efeitos do *TGFBI* podem ser complexos, variando conforme a concentração e os tipos celulares envolvidos (Su et al., 2023). O *TGFBI* foi altamente associado ao fenótipo de DA nos dados do bulk, apresentando associação significativa com todas as variáveis clínicas da DA (FIGURA 9). Porém, em nível celular, foi significativamente associado ao fenótipo apenas em células neuronais (FIGURA 10a-b). Em neurônios excitatórios, a expressão desse gene esteve ligada exclusivamente à deposição de A β (FIGURA 10a). Enquanto nos neurônios inibitórios, sua expressão foi fortemente relacionada com o declínio cognitivo e, em menor grau, com o acúmulo de A β , densidade de emaranhados neurofibrilares, deposição global de proteínas e resiliência cognitiva (FIGURA 10b). Estudos anteriores mostram que o *TGFBI* tem um papel essencial na plasticidade sináptica, além de ser fundamental para a ativação e diferenciação da microglia e astrócitos (Doyle et al., 2010; Hu et al., 2018; Spittau et al., 2020). Em modelos de toxicidade induzida por A β , sua superexpressão favoreceu a remoção de placas senis, restaurou a plasticidade sináptica no hipocampo e a retenção de memória (Caruso et al., 2019; De Lucia et al., 2016; Hu et al., 2018; Tominaga & Suzuki, 2019).

Embora geralmente considerado anti-inflamatório, níveis elevados de *TGFBI* em cérebros de pacientes com DA foram associados a maior expressão de citocinas pró-inflamatórias, como *IL1B* e *TNF*, sugerindo possível contribuição na propagação da resposta neuroinflamatória (Grammas & Ovase, 2002). Em pacientes com DA, os níveis de *TGFBI* no líquido cefalorraquidiano e no plasma estão elevados em comparação aos controles (Tominaga & Suzuki, 2019). Polimorfismos no *TGFBI* foram associados ao maior risco de

progressão para DA em indivíduos com MCI, independentemente da presença do alelo $\epsilon 4$ da *APOE*, possivelmente devido à desregulação entre citocinas pró- e anti-inflamatórias (Arosio et al., 2007). Esses achados destacam o papel multifacetado do *TGFB1* na DA, com impacto sobre processos como neurogênese, manutenção sináptica, ativação microglial e desempenho cognitivo. Embora o *TGFB1* tenha sido apontado como um potencial alvo terapêutico na DA, resultados atuais e anteriores são conflitantes, indicando a necessidade de mais pesquisas para esclarecer o papel exato desse gene na imunomodulação de doenças neurodegenerativas (Abdolmaleky & Zhou, 2023).

O gene *TNFSF13B* apresentou as maiores cargas fatoriais no PC1 dos astrócitos e das células precursoras de oligodendrócitos, no PC3 da microglia e no PC2 dos oligodendrócitos (TABELA 3). Conforme discutido anteriormente, esses componentes agruparam-se em um mesmo *cluster* na análise multimodal e também exibiram correlações positivas com o fenótipo da DA (FIGURA 20), sugerindo a participação de *TNFSF13B* na progressão da doença. Esse gene pertence à família do fator de necrose tumoral (TNF), composta por 18 genes que desempenham papéis-chave na modulação da inflamação, com ações que variam entre efeitos pró-inflamatórios e anti-inflamatórios. Seus pares ligante-receptor estão envolvidos em uma variedade de processos fisiológicos, como morte e sobrevivência celular, neurogênese, estabilização de circuitos neurais e modulação comportamental (Wallach, 2018). Nas análises de regressão linear e/ou logística, *TNFSF13B* foi significativamente associado apenas ao acúmulo global de proteínas nas células precursoras de oligodendrócitos. No entanto, outros genes da mesma família, como *TNFSF4*, *TNFSF8*, *TNFSF10*, *TNFSF12* e *TNFSF13*, apresentaram associações significativas com pelo menos uma variável fenotípica nos dados de bulk e/ou snRNA-seq (FIGURA 9; FIGURA 10), reforçando o possível papel dessa família de citocinas na expressão do fenótipo relacionado à DA.

Além disso, a abordagem de aprendizado de máquina não supervisionado aplicada aos dados transcriptômicos e fenotípicos revelou que o PC1 dos neurônios inibitórios (inh_PC1) e o PC5 da microglia (mic_PC5) estavam inversamente correlacionados com a deposição de emaranhados neurofibrilares, A β e o acúmulo global de proteínas neurotóxicas (FIGURA 19; TABELA 4). Os genes *IL7* e *IL18* tiveram as maiores cargas fatoriais positivas dentre esses dois PCs (TABELA 3). Em relação ao *IL7*, a análise comparativa entre os dados do bulk e snRNA-seq mostrou diferenças relevantes em sua expressão. Embora a expressão de *IL7* não tenha sido detectada nos dados de bulk, esse gene foi identificado e apresentou associação significativa com o fenótipo nos dados de snRNA-seq (FIGURA 10). Na análise de regressão linear e/ou logística, o *IL7* foi associada com o acúmulo de A β em neurônios excitatórios

(FIGURA 10a); com o acúmulo de A β e declínio cognitivo em neurônios inibitórios e microglia (FIGURA 10b-c); e, por fim, e com a deposição de A β e emaranhados em células OPCs (FIGURA 10f).

O gene *IL7* parece exercer um papel duplo na neuroinflamação, influenciando a homeostase imunológica. Em um estudo recente (Zhang et al., 2024), níveis plasmáticos de *IL7* estavam significativamente reduzidos em pacientes com DA portadores do alelo APOE ϵ 4, apresentando correlação negativa com o grau de atrofia hipocampal. Esses achados sugerem que concentrações mais baixas de *IL7* podem estar associadas a maior neurodegeneração em indivíduos com DA. Em outro estudo (Taipa et al., 2019), níveis de *IL7* em portadores de DA foram positivamente correlacionados com o comprometimento cognitivo. Por outro lado, níveis circulantes de *IL7* foram frequentemente indetectáveis no líquido cefalorraquidiano de pacientes com a doença (Aksnes et al., 2021; Janelidze et al., 2018; Popp et al., 2017), e indivíduos com acúmulo de A β não apresentaram diferenças significativas na expressão desse gene em amostras de tecido cortical de diferentes regiões cerebrais (Flores-Aguilar et al., 2021).

O gene *IL18* codifica a interleucina-18 (IL-18), uma potente citocina pró-inflamatória, cuja ativação desencadeia a liberação de outras citocinas, promovendo uma resposta imune robusta (Kelley et al., 2019). No SNC, essa interleucina é amplamente expressa em células como microglia, astrócitos e neurônios, com receptores distribuídos em várias regiões (Walsh et al., 2014). Nos cérebros de pacientes com DA, *IL18* colocaliza-se com depósitos de A β e emaranhados neurofibrilares, e seus níveis elevados no cérebro, plasma e líquido cefalorraquidiano têm sido associados à progressão da doença (Ojala & Sutinen, 2017; Piancone et al., 2021; Scarabino et al., 2020). Estudos experimentais indicam que maiores concentrações desta citocina podem estimular a produção de A β e a hiperfosforilação da tau; porém, a correlação clínica com a gravidade da DA permanece incerta (Ojala et al., 2008; Sutinen et al., 2012; Ojala et al., 2009; Motta et al., 2007). Corroborando com estudos anteriores, o *IL18* foi significativamente associado ao declínio cognitivo e à deposição de proteínas tanto nos dados de bulk quanto em neurônios (FIGURA 9; FIGURA 10a-b).

Para investigar a influência de variantes genéticas na expressão de citocinas no córtex, avaliamos a associação entre os níveis de citocinas e as pontuações de risco poligênicas (DA-PRS) previamente calculadas para a DA em todos os 424 indivíduos do conjunto de dados de núcleo único do ROSMAP. Não foram observadas diferenças significativas na expressão média de citocinas entre indivíduos categorizados como de alto e baixo risco genético para o desenvolvimento da DA (FIGURA 22). No entanto, a análise de regressão

linear entre o DA-PRS e a expressão gênica revelou que a expressão de *SPPI* foi positivamente correlacionada com o risco genético para a DA, considerando os valores de p nominais (FIGURA 23). Em outras palavras, quanto maior o risco genético para DA, maior é a expressão de *SPPI* pela microglia, reforçando a forte associação desse gene com o fenótipo observado em pacientes com DA.

Além do *SPPI*, outros quatro genes também mostraram associação significativa com o DA-PRS. Por exemplo, a expressão de *C5* em astrócitos foi inversamente correlacionada ao risco genético, considerando o valor de p nominal (FIGURA 23). A proteína C5, codificada pelo gene de mesmo nome, integra o sistema complemento e está relacionada à reatividade microglial e ao acúmulo de agregados, como A β , em contextos de Alzheimer (Crehan, 2012; Doens, 2014). Um estudo comparativo demonstrou que, entre indivíduos assintomáticos e sintomáticos com a forma autossômica dominante da DA, os níveis séricos de C5 são elevados em relação aos não-carreadores, sugerindo seu envolvimento precoce em processos inflamatórios e a possível influência de variações genéticas na expressão desse gene (Muenchhoff, 2019).

Estudos mostram que a C5a — produto da clivagem da proteína C5 e mediador inflamatório — e seus receptores, CD88 e C5L2, são altamente expressos em micróglia associada a placas amiloides em modelos murinos de DA (Ager et al., 2010). A expressão desses receptores foi aumentada em tecidos cerebrais de pacientes e modelos animais com DA, especialmente em regiões com acúmulo de emaranhados neurofibrilares (Fonseca et al., 2013; Novak et al., 2017). No presente estudo, a expressão de C5 por astrócitos associou-se fortemente à deposição de emaranhados, ao acúmulo de A β e à carga protéica global (FIGURA 10e), enquanto na micróglia, limitou-se à densidade de emaranhados (FIGURA 10c). Estudos clínicos mostram que níveis elevados de C5a estão associados a maior inflamação e declínio cognitivo. Já a modulação do eixo C5a em modelos animais de Alzheimer reduziu a carga amiloide, atenuou a astrogliose e preservou marcadores sinápticos, neuronais e a função cognitiva (Ioannou et al., 2023; Landlinger et al., 2015; Schartz et al., 2024; Gomez-Arboledas et al., 2024; Carvalho et al., 2022; Fella et al., 2022; Panayiotou et al., 2019; Li et al., 2023; Yang et al., 2024). Embora a literatura estabeleça uma forte associação entre a micróglia e o gene C5, nossos resultados sugerem que os astrócitos também podem ser alvo importante para futuras investigações na modulação da resposta neuroinflamatória nesse contexto.

Além do *C5*, a expressão do gene *IL33* nos astrócitos também foi inversamente associado ao alto risco de desenvolvimento da demência de Alzheimer. O *IL33* atua tanto

como fator de transcrição quanto como citocina, promovendo propagação da resposta neuroinflamatória através do aumento da expressão de citocinas, ativação e proliferação de células gliais como astrócitos e microglia (Yasuoka et al., 2011; Rao et al., 2022). A concentração de *IL33* é crucial para seus efeitos no SNC, e sua participação em processos neurodegenerativos tem sido amplamente discutida, embora com resultados divergentes (Guo et al., 2022). Em pacientes com DA, estudos prévios mostram que níveis elevados de *IL33*, e seu receptor ST2, colocalizam-se com a deposição de A β e tau hiperfosforilada no tecido cortical (Xiong et al., 2014). Já em camundongos *IL33*^{-/-}, deficiência na expressão desse gene levou ao declínio cognitivo acompanhada do rápido acúmulo e baixa depuração de emaranhados neurofibrilares e perda intensa de neurônios do córtex cerebral (Carlock et al., 2017; Wu et al., 2021; Lou et al., 2018). Esses estudos sugerem que a participação da *IL33* na maturação e/ou manutenção das redes neuronais cruciais para a manutenção da cognição.

A expressão de *IL33* mostrou forte associação com múltiplas variáveis clínicas da DA nos dados de bulk, incluindo declínio cognitivo, deposição de A β e emaranhados neurofibrilares, deposição global de proteínas e diagnóstico clínico (FIGURA 9). Em nível celular, essas associações foram restritas aos astrócitos (FIGURA 10e), com destaque para a contribuição percentual relativa da deposição de emaranhados na variabilidade da expressão do *IL33*, tanto em bulk (FIGURA 14) quanto em astrócitos (APÊNDICE E). Esses achados corroboram evidências anteriores que sugerem uma forte associação entre a expressão de *IL33* e a progressão da tau no tecido cerebral. A maior expressão de *IL33* em indivíduos de baixo risco genético para DA (FIGURA 23) pode ter um efeito neuroprotetor, já que a expressão desse gene parece ser crucial para a manutenção do estado cognitivo.

Um achado particularmente relevante foi que indivíduos com maior predisposição genética à DA foram significativamente correlacionados à maior expressão de citocinas derivadas da microglia e os oligodendrócitos (FIGURA 24; FIGURA 25). Além disso, a análise de enriquecimento celular revelou que genes pertencentes à família de fatores de crescimento com alta correlação com o risco genético, estão positivamente enriquecidos nos oligodendrócitos, astrócitos e nos tipos celulares agrupados (FIGURA 26), sugerindo o enriquecimento dessa via nesses grupos de células em indivíduos com maior suscetibilidade genética para DA.

Fatores de crescimento têm sido apontados como promissores alvos terapêuticos na DA, devido à sua participação na plasticidade e na manutenção do sistema nervoso central, bem como na regulação do sistema colinérgico e da fosforilação da proteína tau, ambos processos afetados na patologia (Lauzon et al., 2015). Os dados obtidos neste trabalho

indicam que múltiplos genes membros da família dos fatores de crescimento apresentaram relação significativa com o fenótipo. O *HGF*, positivamente associado a altas pontuações de risco genético para DA (FIGURA 23), foi associado à deposição de emaranhados neurofibrilares e deposição global de proteínas na microglia (FIGURA 10c). No bulk, o *CSF1* foi associado significativamente com todas as variáveis do fenótipo (FIGURA 9). A análise de integração multimodal confirmou a forte relação da expressão do *CSF1* com o fenótipo, já que este gene teve uma alta carga fatorial positiva tanto no PC1 do bulk quanto o PC1 dos astrócitos (TABELA 3), contribuindo de forma relevante para as formações destes componentes que foram posteriormente correlacionados com o acúmulo de emaranhados neurofibrilares e A β , além do diagnóstico clínico de DA (FIGURA 19; FIGURA 20; TABELA 4).

No contexto da DA, uma série de estudos prévios correlacionam a expressão desregulada de citocinas como *TNF*, *IL1B*, *IL6*, *IL10*, *IL3*, *IL2* com a fisiopatologia e progressão da DA (Abdolmaleky & Zhou, 2023; Calsolaro & Edison, 2016; Culjak et al., 2020; Dhapola et al., 2021; Leng & Edison, 2021; Plantone et al., 2023). Entretanto, essas citocinas ou não foram expressas nos dados transcriptômicos dos voluntários do ROSMAP ou, quando detectadas, não apresentaram relação significativa com o fenótipo neste estudo.

A complexidade da resposta advindo da ação das citocinas torna difícil a distinção entre mecanismos envolvidos exclusivamente na regulação da homeostase ou desencadeamento de respostas inflamatórias (Bourgognon & Cavanagh, 2020). O envelhecimento tem sido constantemente associado à neuroinflamação e à maior expressão de moléculas e mediadores inflamatórios, contribuindo potencialmente para a ativação e perpetuação de vias que agravam condições neurodegenerativas, como a DA. A alta idade média no momento do falecimento ($89,1 \pm 6,6$ anos; FIGURA 3) observada entre os voluntários do ROSMAP pode impactar significativamente os resultados obtidos, uma vez que a idade é reconhecidamente um dos maiores fatores de risco não genéticos para desenvolvimento da DA (Alzheimer's Association, 2024).

Em países do sul global, disparidades sociais parecem exercer um impacto maior sobre a cognição do que o envelhecimento em si. No Brasil, a educação foi identificada como o principal fator de risco para o comprometimento cognitivo (Da Ros, 2025). Assim, a alta escolaridade dos participantes deste estudo (FIGURA 4) pode comprometer a representatividade dos achados, especialmente ao considerar contextos com maior vulnerabilidade social. Além disso, todos os participantes incluídos neste estudo apresentam ancestralidade genética predominantemente europeia, restringindo a generalização dos

achados para outras populações. Portanto, investigações futuras devem priorizar a inclusão de populações mais diversas, com indivíduos de diferentes etnias, regiões geográficas e contextos de miscigenação e socioculturais, como ocorre no Brasil. Porém, até o momento, este é o estudo mais abrangente já conduzido sobre a expressão de citocinas em tipos celulares do cérebro humano, com base no maior conjunto amostral disponível.

11 CONCLUSÕES

Este estudo evidencia a complexidade da neuroinflamação na doença de Alzheimer (DA), revelando um perfil molecular diversificado de citocinas associadas à progressão da doença. Observamos que os padrões de associação entre a expressão gênica de moléculas inflamatórias e o fenótipo da DA variam conforme o tipo celular, ressaltando a importância de análises específicas por tipo celular para a compreensão mais precisa dos mecanismos envolvidos na neuroinflamação. Nossos resultados indicam que os genes *IL15*, *SPP1*, *TGFB1*, *IL33* e *IL7* parecem desempenhar papéis importantes na patogênese da DA na microglia, astrócitos e/ou oligodendrócitos, modulando a reatividade celular e a neurodegeneração, porém ensaios laboratoriais são necessários para confirmação dessa hipótese. Além disso, identificamos um padrão de expressão de citocinas que pode caracterizar um perfil inflamatório específico relacionado à DA (*SPP1*, *CSF1*, *TNFSF13B*, *TGFB1*, *IL7*, *IL18*, *C5*, *IL15*). A associação entre a expressão de citocinas e o risco genético para a doença sugere que a genética individual pode influenciar a resposta inflamatória e a progressão da doença, principalmente em microglia e oligodendrócitos. Embora este estudo tenha fornecido importantes *insights* sobre o papel das citocinas na DA, algumas limitações devem ser consideradas. A alta escolaridade, a homogeneidade genética, predominantemente europeia, e a avaliação da expressão destes genes em estágios já avançados do comprometimento cognitivo podem influenciar os resultados. Além disso, a análise focou em um conjunto de citocinas, e futuros estudos podem explorar um espectro mais amplo de moléculas inflamatórias, incluindo moléculas não codificantes (miRNA, piRNA, circRNA). No entanto, nossos resultados sugerem que a análise integrada de dados genômicos e transcriptômicos pode revelar novos biomarcadores e alvos terapêuticos para a DA.

Após a publicação do artigo, os códigos e as análises realizadas neste trabalho estarão disponíveis no repositório: https://github.com/bekerjuliana/Cytokines_public_release.

12 PUBLICAÇÕES

Essa dissertação viabilizou a publicação dos trabalhos listados abaixo. A formatação dos resumos segue as normas específicas de cada congresso. Quando pertinente, as seções trazem detalhes sobre o evento e mencionam premiações ou destaques recebidos.

12.1 X-MEETING 2023

Trabalho apresentado no 19º Congresso Brasileiro de Bioinformática: X-Meeting 2023, em formato de pôster em junho de 2023 (Curitiba, PR). Disponível em: <https://www.even3.com.br/anais/xmeeting2023/638215-human-brain-and-blood-single-cell-analysis-reveals-cell-type-specific-cytokines/>, sob o número ISBN 978-65-272-0061-1.

12.1.1 Resumo

HUMAN BRAIN AND BLOOD SINGLE-CELL ANALYSIS REVEALS CELL-TYPE SPECIFIC CYTOKINES

Juliana Beker Godoy¹, Dieval Guizelini¹, Katia de Paiva Lopes^{1,2}

¹Graduate Program in Bioinformatics, Sector of Professional and Technological Education, Federal University of Parana (UFPR), Curitiba, PR, Brazil

²Rush Alzheimer's Disease Center, Rush University Medical Center, Chicago, IL, USA

ABSTRACT

Beyond pathological protein aggregation, altered oxidative metabolism, mitochondrial dysfunction, and impaired neuronal networks, neuroinflammation response has been correlated in recent years with the pathophysiology of several neurodegenerative diseases, including Alzheimer's disease (AD). The immune system uses cytokines, which are signaling proteins, to identify and eliminate threats through the inflammatory process. This process involves a wide range of immune cells. Since the differences in gene expression and cytokine release profiles are related to several conditions, it is crucial to study the role of this group of proteins in the progression of AD to design effective and personalized therapies. Therefore, this study aims to analyze transcriptome expression profiles among the inflammatory molecules that are transcribed and secreted during the triggering of the inflammation cascade

in the brain parenchyma and blood myeloid and lymphoid cells. We analyzed expression data from post-mortem human brain samples obtained from two longitudinal clinical-pathologic cohort studies of aging and AD: The Religious Orders Study (ROS) and the Rush Memory and Aging Project (MAP). To check the profile of cytokines expression in individuals with different levels of β -amyloid deposition in the brain we used two different datasets. The summary stats from the bulk RNASeq of 1,210 donors, and the single-nucleus RNASeq (snRNASeq) of 48 individuals composed of 80,660 single-nucleus transcriptomes. The bulk data revealed a significant upregulation of SPP1 expression in the prefrontal cortex of AD patients compared to controls (Adj p-value = $1.15E-06$). Since the bulk RNASeq is a heterogeneous dataset, it is also important to check what we can find at the single-cell level. Then, we evaluated the profile of cytokine expression secreted by astrocytes, microglia, inhibitory neurons, excitatory neurons, oligodendrocytes, oligodendrocytes precursor cells, endothelial cells, and pericytes. Our findings revealed that SPP1 is highly expressed in microglia and oligodendrocytes, which is correlated with synaptic loss in AD. We observed the higher expression of CX3CL1 in excitatory neurons and CXCL14 in inhibitory neurons in the snRNA-seq data. Finally, we observed the upregulated expression of the KITLG gene in excitatory neurons and inhibitory neurons, highlighting the role of these cells in neuroinflammation in AD. Due to the growing interest in investigating blood-based markers for the diagnosis and prognosis of AD, we also analyzed a dataset of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) downloaded from the Seurat guided tutorial, which comprised 2,700 single cells RNA sequencing (scRNA-seq). While CCL5 is consistently upregulated in AD brain tissues according to recent studies, we didn't observe this in our brain tissue dataset. However, we did notice an upregulation of CCL5 in PBMC data in NK cells and T CD8+ cells, along with a higher expression of IL32 in these same clusters. In conclusion, our findings link AD pathology and critical inflammatory cytokines, revealing significant upregulation of SPP1, CX3CL1, CXCL14, KITLG, and CCL5 in specific cell types, highlighting the importance of diving into cell-specific datasets while chasing novel therapeutic targets and biomarkers candidates for neurodegenerative diseases, including AD.

Acknowledgments: We thank all the ROSMAP participants, the staff at the Rush Alzheimer's Disease Center, and Satija's Lab for making these datasets available.

Financial support: This project is supported by the CAPES fellowship.

12.2 AAIC NEUROSCIENCE NEXT 2024

Trabalho selecionado para apresentação oral com transmissão online e simultânea para 6 hubs em diferentes continentes, sendo um dos quatro representantes do hub brasileiro. Trabalho também apresentado em formato de pôster online e presencial em Porto Alegre, RS.

12.2.1 Resumo

INVESTIGATING CYTOKINE BRAIN CELL-SPECIFIC EFFECTS IN ALZHEIMER'S DISEASE

Juliana Beker Godoy¹, Ricardo A. Vialle^{1,2,3}, Shinya Tasaki^{2,3}, Yanling Wang^{2,3}, Vilas Menon⁴, Philip L. De Jager⁵, David A. Bennett^{2,3}, Dieval Guizelini¹, Katia de Paiva Lopes^{1,2,3}

¹Professional and Technological Education Sector, Federal University of Paraná, Curitiba, Brazil

²Rush Alzheimer's Disease Center, Rush University Medical Center, Chicago, Illinois, USA

³Department of Neurological Sciences, Rush University Medical Center, Chicago, Illinois, USA

⁴Columbia University Irving Medical Center, New York, NY, USA

⁵Department of Neurology, College of Physicians and Surgeons, Columbia University and the New York Presbyterian Hospital, New York, NY, USA

Keywords: RNA-seq; cytokine; neuroinflammation.

Background: Neuroinflammation is one of the hallmarks that contributes to the neurodegenerative process, in a wide range of diseases, including Alzheimer's Dementia (AD). To elucidate whether pathology accumulation and cognitive decline were linked with inflammation in the human brain, we studied the association of cell-type specific expression of cytokines with AD traits in older adults.

Method: We analyzed RNA sequencing data from post-mortem human brain samples collected from two longitudinal clinical-pathologic cohort studies: the Religious Orders Study and the Rush Memory and Aging Project (ROS/MAP). We leveraged bulk RNA-seq data from 1,210 individuals and single-nuclei profiles from a subset of 424 samples, encompassing seven major cell types. Participants underwent annual clinical and cognitive evaluations, ranging from Controls, Mild Cognitive Impairment and AD diagnosis. The cytokine expression levels were assessed using a panel of 147 genes. Linear and/or logistic regressions were conducted between the cytokine expression and phenotypic data, including cognitive decline, amyloid deposition, tangle density, global AD pathology burden, and clinical

diagnosis. All models were adjusted for age, sex, and education to control for potential confounding factors.

Results: A total of 49 cytokines were expressed in the cortex, from which 31 showed significant association with AD traits (Bonferroni P value < 0.05). Eight cytokines showed significant results only when using the bulk RNA-seq (*IGF1*, *CCL2*, *TNSF4*, *PSPN*, *TNSF13*, *IL12A*, *NOG* and *DCN*), eleven had significant associations in both single-nuclei and bulk (*THPO*, *SPPI*, *IL15*, *TGFB1*, *HGF*, *IL33*, *IL18*, *TNSF12*, *CSF1*, *CTF1* and *EGF*) and twelve showed association only in the single-nuclei (*IL7*, *C5*, *GDNF*, *CXCL14*, *CCL28*, *TNSF10*, *C3*, *TNSF13B*, *TNSF8*, *IFNA2*, *CXCL17* and *KITLG*). Highlighting a few examples, we noticed that higher expression of the chemokine *CCL28* was associated with tangles (Adj p = 1.27×10^{-3}) and amyloid (Adj p = 9.41×10^{-4}) exclusively in the excitatory neurons. *TNSF10* was associated with cognitive decline (Adj p = 2.11×10^{-4}) and clinical AD (Adj p = 4.91×10^{-3}) only in microglia cells.

Conclusion: Neuropathologic associations suggest that we must dive into the human brain's specific cell types to better understand the potential mechanisms behind neuroinflammation.

12.3 X-MEETING 2024

Trabalho apresentado no 20º Congresso Brasileiro de Bioinformática: X-Meeting 2024, em formato de pôster em junho de 2024 (Salvador, BA). Menção honrosa na categoria RNA e Transcriptômica no QIAGEN Digital Insights Excellence Award. Disponível em: <https://www.even3.com.br/anais/xmeeting-2024/831857-integrative-analysis-of-cytokine-expression-variation-in-the-aged-human-brain/>, sob o nº ISBN: 978-65-272-0843-3.

12.3.1 Resumo

INTEGRATIVE ANALYSIS OF CYTOKINE EXPRESSION VARIATION IN THE AGED HUMAN BRAIN

Juliana Beker Godoy¹, Ricardo A. Vialle^{1,2,3}, Shinya Tasaki^{2,3}, Yanling Wang^{2,3}, Vilas Menon⁴, Philip L. De Jager⁵, David A. Bennett^{2,3}, Dieval Guizelini¹, Katia de Paiva Lopes^{1,2,3}

¹Professional and Technological Education Sector, Federal University of Paraná, Curitiba, Brazil

²Rush Alzheimer's Disease Center, Rush University Medical Center, Chicago, Illinois, USA

³Department of Neurological Sciences, Rush University Medical Center, Chicago, Illinois, USA

⁴Columbia University Irving Medical Center, New York, NY, USA

⁵Department of Neurology, College of Physicians and Surgeons, Columbia University and the New York Presbyterian Hospital, New York, NY, USA

Keywords: single-nucleus RNASeq; cytokine; human brain; transcriptomics integration.

Neurodegenerative diseases involve progressive neuron loss, with Alzheimer's disease (AD) being the primary cause of dementia, accounting for 70% of cases. While its etiology remains uncertain, recent studies highlight the crucial role of neuroinflammation in AD pathogenesis. Cytokines, vital for maintaining homeostasis and coordinating immune responses in the brain, have emerged as notable contributors to AD progression. This study applies a framework integration to evaluate the correlation between cytokine expression and AD phenotype in aged brains. We examined RNA sequencing data from post-mortem human brain samples from two longitudinal clinical-pathologic cohorts: the Religious Orders Study and the Rush Memory and Aging Project (ROS/MAP). We used bulk RNA-seq data from 1,210 individuals and single-nuclei profiles from a subset with 424 samples, covering seven brain cell type groups. Participants underwent annual clinical and cognitive assessments, ranging from controls to AD diagnosis. A total of 49 cytokines were expressed in the cortex. We filtered the gene

expression matrices to use only the cytokines for the principal component analysis (PCA). Ten first principal components (PCs) were retained, capturing more than 62% and 70% of the cumulative variance in bulk and single-nuclei datasets, respectively. These PCs were used to calculate Spearman correlation with phenotypic measurements including cognitive decline, amyloid deposition, tangle density, global AD pathology burden, and age of death. We also ran the *variancePartition* (VP) R function to interpret drivers of cytokines expression. PC1, PC5, PC6, PC7, and PC10 from the bulk dataset were associated with at least one phenotype variable. PC1 accounts for the majority of bulk variance (19.19%), driven by growth factors (*CSF1*, *FGF2*, *HGF*), chemokines (*CXCL8*, *CCL2*), and genes as *SPPI*, *C3*, and *TGFB1*. This component was positively correlated with amyloid deposition ($\rho = 0.13336$; p-value = 6.44×10^{-3}) and AD diagnosis ($\rho = 0.1279$; p-value = 0.008). At the cell type level, excitatory neurons showed the highest number of phenotype-associated PCs recapitulating the bulk associations, while other cell types showed some distinct effects. Specifically, microglia PC3 strongly correlated with AD diagnosis, tau and amyloid deposition, while microglia PC5 showed a strong inverse association with these variables. Oligodendrocyte PC2 (9.85% variance explained) was exclusively linked with neurofibrillary tangles ($\rho = 0.11132$; p-value = 0.0231). Furthermore, we noticed that the AD-associated genetic risk factor APOE $\epsilon 4$ had a minor impact on pro-inflammatory cytokine expression, explaining about 2% of *SPPI* in oligodendrocytes, 1% of *IL1B* in microglia, 1% of *IL17D* in inhibitory neurons, and 1% of *TNFSF12* in excitatory neurons. In conclusion, the methods used here allowed us to integrate distinct expression matrices and chase the variables that potentially affect the expression of cytokines in the brain. These findings highlight distinct neuroinflammation patterns across different brain cell types and the impact of phenotype on cytokine expression, providing insights for targeted therapeutic strategies in AD.

REFERÊNCIAS

- ABDOLMALEKY, H. M.; ZHOU, J.-R. Underlying Mechanisms of Brain Aging and Neurodegenerative Diseases as Potential Targets for Preventive or Therapeutic Strategies Using Phytochemicals. **Nutrients**, v. 15, n. 15, p. 3456, 2023.
- AGER, R. R.; FONSECA, M. I.; CHU, S. H.; SANDERSON, S. D.; TAYLOR, S. M.; WOODRUFF, T. M.; TENNER, A. J. Microglial C5aR (CD88) expression correlates with amyloid-beta deposition in murine models of Alzheimer's disease. **Journal of Neurochemistry**, v. 113, n. 2, p. 389–401, 2010.
- AKSNES, M.; AASS, H. C. D.; TIIMAN, A.; et al. Associations of cerebrospinal fluid amyloidogenic nanoplaques with cytokines in Alzheimer's disease. **Translational neurodegeneration**, v. 10, n. 1, p. 18, 2021.
- ALLEN, M.; CARRASQUILLO, M. M.; FUNK, C.; et al. Human whole genome genotype and transcriptome data for Alzheimer's and other neurodegenerative diseases. **Scientific Data**, v. 3, n. 1, p. 1–10, 2016.
- ALZHEIMER, A.; FÖRSTL, H.; LEVY, R. On certain peculiar diseases of old age. **History of psychiatry**, v. 2, n. 5 Pt 1, p. 71–101, 1991.
- ALZHEIMER'S ASSOCIATION. 2024 Alzheimer's disease facts and figures. **Alzheimer's & Dementia**, v. 20, n. 3, p. 700–789, 2024.
- ARNOLD, S. E.; HYMAN, B. T.; FLORY, J.; DAMASIO, A. R.; VAN HOESSEN, G. W. The topographical and neuroanatomical distribution of neurofibrillary tangles and neuritic plaques in the cerebral cortex of patients with Alzheimer's disease. **Cerebral cortex (New York, N.Y. : 1991)**, v. 1, n. 1, p. 103–16, 1991.
- AROSIO, B.; BERGAMASCHINI, L.; GALIMBERTI, L.; et al. +10 T/C polymorphisms in the gene of transforming growth factor-beta1 are associated with neurodegeneration and its clinical evolution. **Mechanisms of ageing and development**, v. 128, n. 10, p. 553–7, 2007.
- ARVANITAKIS, Z.; SHAH, R. C.; BENNETT, D. A. Diagnosis and Management of Dementia: Review. **JAMA**, v. 322, n. 16, p. 1589–1599, 2019.
- BALDWIN, A. G.; BROUGH, D.; FREEMAN, S. Inhibiting the Inflammasome: A Chemical Perspective. **Journal of medicinal chemistry**, v. 59, n. 5, p. 1691–710, 2016.
- BARBIERATO, M.; BORRI, M.; FACCI, L.; et al. Expression and Differential Responsiveness of Central Nervous System Glial Cell Populations to the Acute Phase Protein Serum Amyloid A. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 12158, 2017.
- BECHER, B.; SPATH, S.; GOVERMAN, J. Cytokine networks in neuroinflammation.

Nature reviews. Immunology, v. 17, n. 1, p. 49–59, 2017.

BELLAVER, B.; POVALA, G.; FERREIRA, P. C. L.; et al. Astrocyte reactivity influences amyloid- β effects on tau pathology in preclinical Alzheimer's disease. **Nature medicine**, v. 29, n. 7, p. 1775–1781, 2023.

BELLENGUEZ, C.; KÜÇÜKALI, F.; JANSEN, I. E.; et al. New insights into the genetic etiology of Alzheimer's disease and related dementias. **Nature Genetics**, v. 54, n. 4, p. 412–436, 2022.

BENNETT, D. A.; SCHNEIDER, J. A.; TANG, Y.; ARNOLD, S. E.; WILSON, R. S. The effect of social networks on the relation between Alzheimer's disease pathology and level of cognitive function in old people: a longitudinal cohort study. **The Lancet. Neurology**, v. 5, n. 5, p. 406–12, 2006.

BENNETT, D. A.; BUCHMAN, A. S.; BOYLE, P. A.; et al. Religious Orders Study and Rush Memory and Aging Project. **Journal of Alzheimer's disease: JAD**, v. 64, n. s1, p. S161–S189, 2018.

BIS, J. C.; JIAN, X.; KUNKLE, B. W.; et al. Whole exome sequencing study identifies novel rare and common Alzheimer's-Associated variants involved in immune response and transcriptional regulation. **Molecular psychiatry**, v. 25, n. 8, p. 1859–1875, 2020.

BOESPFLUG, E. L.; ILIFF, J. J. The Emerging Relationship Between Interstitial Fluid-Cerebrospinal Fluid Exchange, Amyloid- β , and Sleep. **Biological psychiatry**, v. 83, n. 4, p. 328–336, 2018.

BOULANGER, L. M.; HUH, G. S.; SHATZ, C. J. Neuronal plasticity and cellular immunity: shared molecular mechanisms. **Current opinion in neurobiology**, v. 11, n. 5, p. 568–78, 2001.

BOURGOGNON, J.-M.; CAVANAGH, J. The role of cytokines in modulating learning and memory and brain plasticity. **Brain and neuroscience advances**, v. 4, p. 2398212820979802, 2020.

BUTCHART, J.; BROOK, L.; HOPKINS, V.; et al. Etanercept in Alzheimer disease: A randomized, placebo-controlled, double-blind, phase 2 trial. **Neurology**, v. 84, n. 21, p. 2161–8, 2015.

CAIN, A.; TAGA, M.; MCCABE, C.; et al. Multicellular communities are perturbed in the aging human brain and Alzheimer's disease. **Nature neuroscience**, v. 26, n. 7, p. 1267–1280, 2023.

CARLOCK, C.; WU, J.; SHIM, J.; MORENO-GONZALEZ, I.; PITCHER, M. R.; HICKS, J.; SUZUKI, A.; IWATA, J.; QUEVADO, J.; LOU, Y. Interleukin33 deficiency causes tau

- abnormality and neurodegeneration with Alzheimer-like symptoms in aged mice. **Translational Psychiatry**, v. 7, art. e1164, 2017.
- DE CALIGNON, A.; POLYDORO, M.; SUÁREZ-CALVET, M.; et al. Propagation of tau pathology in a model of early Alzheimer's disease. **Neuron**, v. 73, n. 4, p. 685–97, 2012.
- CALSOLARO, V.; EDISON, P. Neuroinflammation in Alzheimer's disease: Current evidence and future directions. **Alzheimer's & dementia: the journal of the Alzheimer's Association**, v. 12, n. 6, p. 719–32, 2016.
- CARUSO, G.; FRESTA, C. G.; MUSSO, N.; et al. Carnosine Prevents A β -Induced Oxidative Stress and Inflammation in microglial Cells: A Key Role of TGF- β 1. **Cells**, v. 8, n. 1, 2019.
- CARVALHO, K.; SCHATZ, N. D.; BALDERRAMA-GUTIERREZ, G.; LIANG, H. Y.; CHU, S. H.; SELVAN, P.; GOMEZ-ARBOLEDAS, A.; PETRISKO, T. J.; FONSECA, M. I.; MORTAZAVI, A.; TENNER, A. J. Modulation of C5a-C5aR1 signaling alters the dynamics of AD progression. **Journal of Neuroinflammation**, v. 19, art. 178, 2022.
- CASTRO-GOMEZ, S.; HENEKA, M. T. Innate immune activation in neurodegenerative diseases. **Immunity**, v. 57, n. 4, p. 790–814, 2024.
- CHEN, Z.; BALACHANDRAN, Y. L.; CHONG, W. P.; CHAN, K. W. Y. Roles of Cytokines in Alzheimer's Disease. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 25, n. 11, 2024.
- CIRRITO, J. R.; YAMADA, K. A.; FINN, M. B.; et al. Synaptic activity regulates interstitial fluid amyloid-beta levels in vivo. **Neuron**, v. 48, n. 6, p. 913–22, 2005.
- COURTNEY, E.; KORNFELD, S.; JANITZ, K.; JANITZ, M. Transcriptome profiling in neurodegenerative disease. **Journal of neuroscience methods**, v. 193, n. 2, p. 189–202, 2010.
- CREHAN, H.; HARDY, J.; POCOCK, J. Microglia, Alzheimer's disease, and complement. **International Journal of Alzheimer's Disease**, v. 2012, p. 1–10, 2012.
- CUI, A.; HUANG, T.; LI, S.; et al. Dictionary of immune responses to cytokines at single-cell resolution. **Nature**, v. 625, n. 7994, p. 377–384, 2024.
- CULJAK, M.; PERKOVIC, M. N.; UZUN, S.; et al. The Association between TNF-alpha, IL-1 alpha and IL-10 with Alzheimer's Disease. **Current Alzheimer research**, v. 17, n. 11, p. 972–984, 2020.
- DA ROS, L. U.; BORELLI, W. V.; DE BASTIANI, M. A.; AGUZZOLI, C. S.; SCHILLING, L. P.; SANTAMARÍA-GARCÍA, H. A.; PASCOAL, T. A.; ROSA-NETO, P.; DA COSTA, J. C.; IBÁÑEZ, A.; SUEMOTO, C. K.; ZIMMER, E. R. Socioeconomic and health-related disparities associated with healthy brain aging in Latin American countries. **Alzheimer's & Dementia**, v. 20, suppl. 7, e093131, 2025.
- DANIILIDOU, M.; EROLI, F.; ALANKO, V.; et al. Alzheimer's disease biomarker profiling

in a memory clinic cohort without common comorbidities. **Brain communications**, v. 5, n. 5, p. fcad228, 2023.

DE JAGER, P. L.; SHULMAN, J. M.; CHIBNIK, L. B.; et al. A genome-wide scan for common variants affecting the rate of age-related cognitive decline. **Neurobiology of aging**, v. 33, n. 5, p. 1017.e1–15, 2012.

DE LUCIA, C.; RINCHON, A.; OLMOS-ALONSO, A.; et al. microglia regulate hippocampal neurogenesis during chronic neurodegeneration. **Brain, behavior, and immunity**, v. 55, p. 179–190, 2016.

DEVERMAN, B. E.; PATTERSON, P. H. Cytokines and CNS development. **Neuron**, v. 64, n. 1, p. 61–78, 2009.

DHAPOLA, R.; HOTA, S. S.; SARMA, P.; et al. Recent advances in molecular pathways and therapeutic implications targeting neuroinflammation for Alzheimer's disease. **Inflammopharmacology**, v. 29, n. 6, p. 1669–1681, 2021.

DINARELLO, C. A. Proinflammatory cytokines. **Chest**, v. 118, n. 2, p. 503–8, 2000.

DOENS, D.; FERNÁNDEZ, P. L. Microglia receptors and their implications in the response to amyloid β for Alzheimer's disease pathogenesis. **Journal of Neuroinflammation**, v. 11, art. 48, 2014.

DOYLE, K. P.; CEKANAVICIUTE, E.; MAMER, L. E.; BUCKWALTER, M. S. TGF β signaling in the brain increases with aging and signals to astrocytes and innate immune cells in the weeks after stroke. **Journal of neuroinflammation**, v. 7, p. 62, 2010.

ELCIOĞLU, H. K.; ASLAN, E.; AHMAD, S.; et al. Tocilizumab's effect on cognitive deficits induced by intracerebroventricular administration of streptozotocin in Alzheimer's model. **Molecular and cellular biochemistry**, v. 420, n. 1–2, p. 21–8, 2016.

FACCI, L.; BARBIERATO, M.; ZUSSO, M.; SKAPER, S. D.; GIUSTI, P. Serum amyloid A primes microglia for ATP-dependent interleukin-1 β release. **Journal of Neuroinflammation**, v. 15, n. 1, p. 1–11, 2018.

FELLA, E.; PAPACHARALAMBOUS, R.; KYNIGOPOULOS, D.; et al. Pharmacological activation of the C5a receptor leads to stimulation of the β -adrenergic receptor and alleviates cognitive impairment in a murine model of familial Alzheimer's disease. **Frontiers in Immunology**, v. 13, art. 947071, 2022.

FLORES-AGUILAR, L.; IULITA, M. F.; ORCIANI, C.; et al. Cognitive and brain cytokine profile of non-demented individuals with cerebral amyloid-beta deposition. **Journal of neuroinflammation**, v. 18, n. 1, p. 147, 2021.

FONSECA, M. I.; MCGUIRE, S. O.; COUNTS, S. E.; TENNER, A. J. Complement

activation fragment C5a receptors, CD88 and C5L2, are associated with neurofibrillary pathology. *Journal of Neuroinflammation*, v. 10, art. 25, 2013.

GALLARDO, G.; HOLTZMAN, D. M. Amyloid- β and Tau at the Crossroads of Alzheimer's Disease. *Advances in experimental medicine and biology*, v. 1184, p. 187–203, 2019.

GBD 2019 DEMENTIA FORECASTING COLLABORATORS. Estimation of the global prevalence of dementia in 2019 and forecasted prevalence in 2050: an analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *The Lancet. Public health*, v. 7, n. 2, p. e105–e125, 2022.

GERTJE, E. C.; JANELIDZE, S.; VAN WESTEN, D.; CULLEN, N.; STOMRUD, E.; PALMQVIST, S.; HANSSON, O.; MATTSSON-CARLGREN, N. Associations between CSF markers of inflammation, white matter lesions, and cognitive decline in individuals without dementia. *Neurology*, v. 100, n. 17, p. e1812–e1824, 2023.

GOATE, A.; CHARTIER-HARLIN, M. C.; MULLAN, M.; et al. Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature*, v. 349, n. 6311, p. 704–6, 1991.

GOMEZ-ARBOLEDAS, A.; FONSECA, M. I.; KRAMAR, E.; CHU, S.-H.; SCHARTZ, N. D.; SELVAN, P.; WOOD, M. A.; TENNER, A. J. C5aR1 signaling promotes region- and age-dependent synaptic pruning in models of Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia*, v. 20, n. 3, p. 2173–2190, 2024.

GÓMEZ-NICOLA, D.; DONCEL-PÉREZ, E.; NIETO-SAMPEDRO, M. Regulation by GD3 of the proinflammatory response of microglia mediated by interleukin-15. *Journal of neuroscience research*, v. 83, n. 5, p. 754–62, 2006.

GOMEZ-NICOLA, D.; VALLE-ARGOS, B.; NIETO-SAMPEDRO, M. Blockade of IL-15 activity inhibits microglial activation through the NFkappaB, p38, and ERK1/2 pathways, reducing cytokine and chemokine release. *Glia*, v. 58, n. 3, p. 264–76, 2010.

GÓMEZ-NICOLA, D.; VALLE-ARGOS, B.; PITA-THOMAS, D. W.; NIETO-SAMPEDRO, M. Interleukin 15 expression in the CNS: blockade of its activity prevents glial activation after an inflammatory injury. *Glia*, v. 56, n. 5, p. 494–505, 2008.

GRABHER, B. J. Effects of Alzheimer Disease on Patients and Their Family. *Journal of nuclear medicine technology*, v. 46, n. 4, p. 335–340, 2018.

GRAMMAS, P.; OVASE, R. Cerebrovascular transforming growth factor-beta contributes to inflammation in the Alzheimer's disease brain. *The American journal of pathology*, v. 160, n. 5, p. 1583–7, 2002.

GREEN, G. S.; FUJITA, M.; YANG, H.-S.; et al. Cellular communities reveal trajectories of brain ageing and Alzheimer's disease. *Nature*, v. 633, n. 8030, p. 634–645, 2024.

- GUERREIRO, R.; WOJTAS, A.; BRAS, J.; et al. TREM2 variants in Alzheimer's disease. **The New England journal of medicine**, v. 368, n. 2, p. 117–27, 2013.
- GUO, H.; BOSSILA, E. A.; MA, X.; ZHAO, C.; ZHAO, Y. Dual Immune Regulatory Roles of Interleukin-33 in Pathological Conditions. **Cells**, v. 11, n. 20, p. 3237, 2022.
- HAASS, C.; SELKOE, D. J. Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 8, n. 2, p. 101–12, 2007.
- HAASS, C.; WILLEM, M. Secreted APP Modulates Synaptic Activity: A Novel Target for Therapeutic Intervention? **Neuron**, v. 101, n. 4, p. 557–559, 2019.
- HANSEN, D. V.; HANSON, J. E.; SHENG, M. microglia in Alzheimer's disease. **The Journal of cell biology**, v. 217, n. 2, p. 459–472, 2018.
- HAROLD, D.; ABRAHAM, R.; HOLLINGWORTH, P.; et al. Genome-wide association study identifies variants at CLU and PICALM associated with Alzheimer's disease. **Nature genetics**, v. 41, n. 10, p. 1088–93, 2009.
- HE, Z.; GUO, J. L.; MCBRIDE, J. D.; et al. Amyloid- β plaques enhance Alzheimer's brain tau-seeded pathologies by facilitating neuritic plaque tau aggregation. **Nature medicine**, v. 24, n. 1, p. 29–38, 2018.
- HENEKA, M. T.; CARSON, M. J.; EL KHOURY, J.; et al. Neuroinflammation in Alzheimer's disease. **The Lancet. Neurology**, v. 14, n. 4, p. 388–405, 2015.
- HOFFMAN, G. E.; SCHADT, E. E. variancePartition: interpreting drivers of variation in complex gene expression studies. **BMC bioinformatics**, v. 17, n. 1, p. 483, 2016.
- HU, Y.; CHEN, W.; WU, L.; et al. TGF- β 1 Restores Hippocampal Synaptic Plasticity and Memory in Alzheimer Model via the PI3K/Akt/Wnt/ β -Catenin Signaling Pathway. **Journal of Molecular Neuroscience**, v. 67, n. 1, p. 142–149, 2018.
- HUANG, C.-W.; TSAI, M.-H.; CHEN, N.-C.; et al. Clinical significance of circulating vascular cell adhesion molecule-1 to white matter disintegrity in Alzheimer's dementia. **Thrombosis and haemostasis**, v. 114, n. 6, p. 1230–40, 2015.
- HUANG, Z.; HA, G. K.; PETITTO, J. M. IL-15 and IL-15R alpha gene deletion: effects on T lymphocyte trafficking and the microglial and neuronal responses to facial nerve axotomy. **Neuroscience letters**, v. 417, n. 2, p. 160–4, 2007.
- IOANNOU, M.; FELLA, E.; PAPACHARALAMBOUS, R.; KYNIGOPOULOS, D.; PANAYIOTOU, E. Treatment of the CRND8 mouse model for cerebral amyloid angiopathy, exhibited increased levels of neuron specific enolase in brain tissue following long-term treatment with a modified C5a receptor agonist, accompanied by improved cognitive function.

Biochemical and Biophysical Research Communications, v. 675, p. 78–84, 2023.

IQBAL, K.; ALONSO, A. DEL C.; CHEN, S.; et al. Tau pathology in Alzheimer disease and other tauopathies. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1739, n. 2–3, p. 198–210, 2005.

JANELIDZE, S.; MATTSSON, N.; STOMRUD, E.; et al. CSF biomarkers of neuroinflammation and cerebrovascular dysfunction in early Alzheimer disease. **Neurology**, v. 91, n. 9, p. e867–e877, 2018.

JANSEN, I. E.; SAVAGE, J. E.; WATANABE, K.; et al. Genome-wide meta-analysis identifies new loci and functional pathways influencing Alzheimer's disease risk. **Nature genetics**, v. 51, n. 3, p. 404–413, 2019.

JELLINGER, K. A. Basic mechanisms of neurodegeneration: a critical update. **Journal of cellular and molecular medicine**, v. 14, n. 3, p. 457–87, 2010.

JIA, J.; WEI, C.; CHEN, S.; et al. The cost of Alzheimer's disease in China and re-estimation of costs worldwide. **Alzheimer's & dementia : the journal of the Alzheimer's Association**, v. 14, n. 4, p. 483–491, 2018.

JUNG, Y. J.; TWEEDIE, D.; SCERBA, M. T.; GREIG, N. H. Neuroinflammation as a Factor of Neurodegenerative Disease: Thalidomide Analogs as Treatments. **Frontiers in cell and developmental biology**, v. 7, p. 313, 2019.

KAPASI, A.; POIRIER, J.; HEDAYAT, A.; et al. High-throughput digital quantification of Alzheimer disease pathology and associated infrastructure in large autopsy studies. **Journal of neuropathology and experimental neurology**, v. 82, n. 12, p. 976–986, 2023.

KELLEY, N.; JELTEMA, D.; DUAN, Y.; HE, Y. The NLRP3 Inflammasome: An Overview of Mechanisms of Activation and Regulation. **International journal of molecular sciences**, v. 20, n. 13, p. 3328, 2019.

KENT, S. A.; SPIRES-JONES, T. L.; DURRANT, C. S. The physiological roles of tau and A β : implications for Alzheimer's disease pathology and therapeutics. **Acta neuropathologica**, v. 140, n. 4, p. 417–447, 2020.

KEPP, K. P.; ROBAKIS, N. K.; HØILUND-CARLSEN, P. F.; SENSI, S. L.; VISSSEL, B. The amyloid cascade hypothesis: an updated critical review. **Brain : a journal of neurology**, v. 146, n. 10, p. 3969–3990, 2023.

KEREN-SHAUL, H.; SPINRAD, A.; WEINER, A.; et al. A Unique microglia Type Associated with Restricting Development of Alzheimer's Disease. **Cell**, v. 169, n. 7, p. 1276–1290.e17, 2017.

KNOPMAN, D. S.; AMIEVA, H.; PETERSEN, R. C.; et al. Alzheimer disease. **Nature reviews. Disease primers**, v. 7, n. 1, p. 33, 2021.

- KRUEGER, J. M. The role of cytokines in sleep regulation. **Current pharmaceutical design**, v. 14, n. 32, p. 3408–16, 2008.
- KUNKLE, B. W.; GRENIER-BOLEY, B.; SIMS, R.; et al. Genetic meta-analysis of diagnosed Alzheimer's disease identifies new risk loci and implicates A β , tau, immunity and lipid processing. **Nature genetics**, v. 51, n. 3, p. 414–430, 2019.
- LAMBERT, J. C.; IBRAHIM-VERBAAS, C. A.; HAROLD, D.; et al. Meta-analysis of 74,046 individuals identifies 11 new susceptibility loci for Alzheimer's disease. **Nature genetics**, v. 45, n. 12, p. 1452–8, 2013.
- LANDLINGER, C.; OBERLEITNER, L.; GRUBER, P.; NOIGES, B.; YATSYK, K.; SANTIC, R.; MANDLER, M.; STAFFLER, G. Active immunization against complement factor C5a: a new therapeutic approach for Alzheimer's disease. **Journal of Neuroinflammation**, v. 12, art. 150, 2015.
- LAU, S.-F.; FU, A. K. Y.; IP, N. Y. Cytokine signaling convergence regulates the microglial state transition in Alzheimer's disease. **Cellular and molecular life sciences : CMLS**, v. 78, n. 10, p. 4703–4712, 2021.
- LAUZON, M.-A.; DAVIAU, A.; MARCOS, B.; FAUCHEUX, N. Growth factor treatment to overcome Alzheimer's dysfunctional signaling. **Cellular signalling**, v. 27, n. 6, p. 1025–38, 2015.
- LAW, C. W.; ALHAMDOOSH, M.; SU, S.; et al. RNA-seq analysis is easy as 1-2-3 with limma, Glimma and edgeR. **F1000Research**, v. 5, p. ISCB Comm J-1408, 2016.
- LENG, F.; EDISON, P. Neuroinflammation and microglial activation in Alzheimer disease: where do we go from here? **Nature reviews. Neurology**, v. 17, n. 3, p. 157–172, 2021.
- LI, Zhilian; WU, Huifang; LUO, Yi; TAN, Xianpei. Correlation of serum complement factor 5a level with inflammatory response and cognitive function in patients with Alzheimer's disease of different severity. **BMC Neurology**, v. 23, art. 319, 2023.
- LIU, C.; CHU, D.; KALANTAR-ZADEH, K.; et al. Cytokines: From Clinical Significance to Quantification. **Advanced science (Weinheim, Baden-Wurttemberg, Germany)**, v. 8, n. 15, p. e2004433, 2021.
- LONG, J. M.; HOLTZMAN, D. M. Alzheimer Disease: An Update on Pathobiology and Treatment Strategies. **Cell**, v. 179, n. 2, p. 312–339, 2019.
- LOPES, K. DE P.; YU, L.; SHEN, X.; et al. Associations of cortical SPP1 and ITGAX with cognition and common neuropathologies in older adults. **Alzheimer's & dementia : the journal of the Alzheimer's Association**, v. 20, n. 1, p. 525–537, 2024.
- LOU, Y.; CARLOCK, C.; WU, J. Glymphatic efficiency is a critical factor for using abnormal

- tau in peripheral tissues as biomarker for Alzheimer's disease. *Biomarkers in Applications*, v. 2018, n. 3, art. 100030, 2018.
- MANTOVANI, A.; DINARELLO, C. A.; MOLGORA, M.; GARLANDA, C. Interleukin-1 and Related Cytokines in the Regulation of Inflammation and Immunity. **Immunity**, v. 50, n. 4, p. 778–795, 2019.
- MASTERS, S. L.; O'NEILL, L. A. J. Disease-associated amyloid and misfolded protein aggregates activate the inflammasome. **Trends in molecular medicine**, v. 17, n. 5, p. 276–82, 2011.
- MATHYS, H.; DAVILA-VELDERRAIN, J.; PENG, Z.; et al. Single-cell transcriptomic analysis of Alzheimer's disease. **Nature**, v. 570, n. 7761, p. 332–337, 2019.
- MATHYS, H.; PENG, Z.; BOIX, C. A.; et al. Single-cell atlas reveals correlates of high cognitive function, dementia, and resilience to Alzheimer's disease pathology. **Cell**, v. 186, n. 20, p. 4365–4385.e27, 2023.
- MCALPINE, C. S.; PARK, J.; GRICIUC, A.; et al. Astrocytic interleukin-3 programs microglia and limits Alzheimer's disease. **Nature**, v. 595, n. 7869, p. 701–706, 2021.
- MCGEER, P. L.; MCGEER, E. G. Local neuroinflammation and the progression of Alzheimer's disease. **Journal of neurovirology**, v. 8, n. 6, p. 529–38, 2002.
- MCGEER, P. L.; MCGEER, E. G. The amyloid cascade-inflammatory hypothesis of Alzheimer disease: implications for therapy. **Acta neuropathologica**, v. 126, n. 4, p. 479–97, 2013.
- MEDEIROS, R.; BAGLIETTO-VARGAS, D.; LAFERLA, F. M. The role of tau in Alzheimer's disease and related disorders. **CNS neuroscience & therapeutics**, v. 17, n. 5, p. 514–24, 2011.
- MELCHIORRI, D.; MERLO, S.; MICALLEF, B.; BORG, J.-J.; DRÁFI, F. Alzheimer's disease and neuroinflammation: will new drugs in clinical trials pave the way to a multi-target therapy? **Frontiers in pharmacology**, v. 14, p. 1196413, 2023.
- MILLER, A. H.; HAROON, E.; RAISON, C. L.; FELGER, J. C. Cytokine targets in the brain: impact on neurotransmitters and neurocircuits. **Depression and anxiety**, v. 30, n. 4, p. 297–306, 2013.
- MONTINE, T. J.; PHELPS, C. H.; BEACH, T. G.; et al. National Institute on Aging-Alzheimer's Association guidelines for the neuropathologic assessment of Alzheimer's disease: a practical approach. **Acta neuropathologica**, v. 123, n. 1, p. 1–11, 2012.
- MOTTA, M.; IMBESI, R.; DI ROSA, M.; STIVALA, F.; MALAGUARNERA, L. Altered plasma cytokine levels in Alzheimer's disease: correlation with the disease progression.

Immunology letters, v. 114, n. 1, p. 46–51, 2007.

MOSTAFAVI, S.; GAITERI, C.; SULLIVAN, S. E.; et al. A molecular network of the aging human brain provides insights into the pathology and cognitive decline of Alzheimer's disease. **Nature neuroscience**, v. 21, n. 6, p. 811–819, 2018.

MUENCHHOFF, J.; POLJAK, A.; THALAMUTHU, A.; GUPTA, V. B.; CHATTERJEE, P.; RAFTERY, M.; MASTERS, C. L.; MORRIS, J. C.; BATEMAN, R. J.; FAGAN, A. M.; MARTINS, R. N.; SACHDEV, P. S. Changes in the plasma proteome at asymptomatic and symptomatic stages of autosomal dominant Alzheimer's disease. **Scientific Reports**, v. 6, art. 29078, 2016.

MURDOCK, M. H.; TSAI, L.-H. Insights into Alzheimer's disease from single-cell genomic approaches. **Nature Neuroscience**, v. 26, n. 2, p. 181–195, 2023.

NICHOLS, E.; STEINMETZ, J. D.; VOLLSET, S. E.; et al. Estimation of the global prevalence of dementia in 2019 and forecasted prevalence in 2050: an analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. **The Lancet Public Health**, v. 7, n. 2, p. e105–e125, 2022.

NOVAK, P.; CENTE, M.; KOSIKOVA, N.; AUGUSTIN, T.; KVETNANSKY, R.; NOVAK, M.; FILIPCIK, P. Stress-induced alterations of immune profile in animals suffering by tau protein-driven neurodegeneration. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 38, p. 243–259, 2018.

OJALA, J.; ALAFUZOFF, I.; HERUKKA, S.-K.; et al. Expression of interleukin-18 is increased in the brains of Alzheimer's disease patients. **Neurobiology of aging**, v. 30, n. 2, p. 198–209, 2009.

OJALA, J. O.; SUTINEN, E. M. The Role of Interleukin-18, Oxidative Stress and Metabolic Syndrome in Alzheimer's Disease. **Journal of clinical medicine**, v. 6, n. 5, p. 55, 2017.

OJALA, J. O.; SUTINEN, E. M.; SALMINEN, A.; PIRTILÄ, T. Interleukin-18 increases expression of kinases involved in tau phosphorylation in SH-SY5Y neuroblastoma cells. **Journal of neuroimmunology**, v. 205, n. 1–2, p. 86–93, 2008.

OZTÜRK, C.; OZGE, A.; YALIN, O. O.; et al. The diagnostic role of serum inflammatory and soluble proteins on dementia subtypes: correlation with cognitive and functional decline. **Behavioural neurology**, v. 18, n. 4, p. 207–15, 2007.

PANAYIOTOU, E.; FELLA, E.; ANDREOU, S.; PAPACHARALAMBOUS, R.; GERASIMOU, P.; COSTEAS, P.; ANGELI, S.; KOUSIAPPA, I.; PAPACOSTAS, S.; KYRIAKIDES, T. C5aR agonist enhances phagocytosis of fibrillar and non-fibrillar A β amyloid and preserves memory in a mouse model of familial Alzheimer's disease. **PLoS One**, v. 14, n. 12, e0225417, 2019.

- PETEGROSSO, R.; LI, Z.; KUANG, R. Machine learning and statistical methods for clustering single-cell RNA-sequencing data. **Briefings in bioinformatics**, v. 21, n. 4, p. 1209–1223, 2020.
- PIANCONE, F.; LA ROSA, F.; MARVENTANO, I.; SARESELLA, M.; CLERICI, M. The Role of the Inflammasome in Neurodegenerative Diseases. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 26, n. 4, p. 953, 2021.
- PLANTONE, D.; PARDINI, M.; RIGHI, D.; et al. The Role of TNF- α in Alzheimer's Disease: A Narrative Review. **Cells**, v. 13, n. 1, p. 54, 2023.
- PRINS, S.; DE KAM, M. L.; TEUNISSEN, C. E.; GROENEVELD, G. J. Inflammatory plasma biomarkers in subjects with preclinical Alzheimer's disease. **Alzheimer's research & therapy**, v. 14, n. 1, p. 106, 2022.
- POPP, J.; OIKONOMIDI, A.; TAUTVYDAITĖ, D.; et al. Markers of neuroinflammation associated with Alzheimer's disease pathology in older adults. **Brain, behavior, and immunity**, v. 62, p. 203–211, 2017.
- QIU, Y.; SHEN, X.; RAVID, O.; et al. Definition of the contribution of an Osteopontin-producing CD11c⁺ microglial subset to Alzheimer's disease. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 120, n. 6, p. e2218915120, 2023.
- RAISON, C. L.; CAPURON, L.; MILLER, A. H. Cytokines sing the blues: inflammation and the pathogenesis of depression. **Trends in immunology**, v. 27, n. 1, p. 24–31, 2006.
- RANSOHOFF, R. M. How neuroinflammation contributes to neurodegeneration. **Science (New York, N.Y.)**, v. 353, n. 6301, p. 777–83, 2016.
- RAJ, T.; ROTHAMEL, K.; MOSTAFAVI, S.; et al. Polarization of the effects of autoimmune and neurodegenerative risk alleles in leukocytes. **Science (New York, N.Y.)**, v. 344, n. 6183, p. 519–23, 2014.
- RAO, X.; HUA, F.; ZHANG, L.; LIN, Y.; FANG, P.; CHEN, S.; YING, J.; WANG, X. Dual roles of interleukin-33 in cognitive function by regulating central nervous system inflammation. **Journal of Translational Medicine**, v. 20, art. 369, 2022.
- RAY, N. R.; KUNKLE, B. W.; HAMILTON-NELSON, K.; et al. Extended genome-wide association study employing the African genome resources panel identifies novel susceptibility loci for Alzheimer's disease in individuals of African ancestry. **Alzheimer's & Dementia**, v. 20, n. 8, p. 5247–5261, 2024.
- REEL, P. S.; REEL, S.; PEARSON, E.; TRUCCO, E.; JEFFERSON, E. Using machine learning approaches for multi-omics data analysis: A review. **Biotechnology advances**, v. 49,

p. 107739, 2021.

RENTZOS, M.; ROMBOS, A. The role of IL-15 in central nervous system disorders. **Acta neurologica Scandinavica**, v. 125, n. 2, p. 77–82, 2012.

SALA FRIGERIO, C.; WOLFS, L.; FATTORELLI, N.; et al. The Major Risk Factors for Alzheimer's Disease: Age, Sex, and Genes Modulate the microglia Response to A β Plaques. **Cell reports**, v. 27, n. 4, p. 1293–1306.e6, 2019.

SALMINEN, A.; OJALA, J.; SUURONEN, T.; KAARNIRANTA, K.; KAUPPINEN, A. Amyloid-beta oligomers set fire to inflammasomes and induce Alzheimer's pathology. **Journal of cellular and molecular medicine**, v. 12, n. 6A, p. 2255–62, 2008.

SANTOSO, C. S.; LI, Z.; LAL, S.; et al. Comprehensive mapping of the human cytokine gene regulatory network. **Nucleic acids research**, v. 48, n. 21, p. 12055–12073, 2020.

SCARABINO, D.; PECONI, M.; BROGGIO, E.; et al. Relationship between proinflammatory cytokines (Il-1 β , Il-18) and leukocyte telomere length in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. **Experimental gerontology**, v. 136, p. 110945, 2020.

SCHARTZ, N. D.; LIANG, H. Y.; CARVALHO, K.; CHU, S. H.; MENDOZA-ARVILLA, A.; PETRISKO, T. J.; GOMEZ-ARBOLEDAS, A.; MORTAZAVI, A.; TENNER, A. J. C5aR1 antagonism suppresses inflammatory glial responses and alters cellular signaling in an Alzheimer's disease mouse model. **Nature Communications**, v. 15, art. 7028, 2024.

SCHEPPER, S. D.; GE, J. Z.; CROWLEY, G.; et al. Perivascular cells induce microglial phagocytic states and synaptic engulfment via SPP1 in mouse models of Alzheimer's disease. **Nature Neuroscience**, v. 26, n. 3, p. 406–415, 2023.

SCHNEIDER, J. A.; ARVANITAKIS, Z.; BANG, W.; BENNETT, D. A. Mixed brain pathologies account for most dementia cases in community-dwelling older persons. **Neurology**, v. 69, n. 24, p. 2197–204, 2007.

SCHRODER, K.; TSCHOPP, J. The inflammasomes. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 821–32, 2010.

SELKOE, D. J. Preventing Alzheimer's disease. **Science (New York, N.Y.)**, v. 337, n. 6101, p. 1488–92, 2012.

SELKOE, D. J.; HARDY, J. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years. **EMBO molecular medicine**, v. 8, n. 6, p. 595–608, 2016.

SENGOKU, R. Aging and Alzheimer's disease pathology. **Neuropathology : official journal of the Japanese Society of Neuropathology**, v. 40, n. 1, p. 22–29, 2020.

SHEN, X.; QIU, Y.; WIGHT, A. E.; KIM, H.-J.; CANTOR, H. Definition of a mouse microglial subset that regulates neuronal development and proinflammatory responses in the brain. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**,

v. 119, n. 8, p. e2116241119, 2022.

SOBUE, A.; KOMINE, O.; YAMANAKA, K. Neuroinflammation in Alzheimer's disease: microglial signature and their relevance to disease. **Inflammation and Regeneration**, v. 43, n. 1, p. 1–6, 2023.

SPITTAU, B.; DOKALIS, N.; PRINZ, M. The Role of TGF β Signaling in microglia Maturation and Activation. **Trends in immunology**, v. 41, n. 9, p. 836–848, 2020.

SU, C.; MIAO, J.; GUO, J. The relationship between TGF- β 1 and cognitive function in the brain. **Brain research bulletin**, v. 205, p. 110820, 2023.

SUN, E.; MOTOLANI, A.; CAMPOS, L.; LU, T. The Pivotal Role of NF- κ B in the Pathogenesis and Therapeutics of Alzheimer's Disease. **International journal of molecular sciences**, v. 23, n. 16, p. 8972, 2022.

SUTINEN, E. M.; PIRTTILÄ, T.; ANDERSON, G.; SALMINEN, A.; OJALA, J. O. Pro-inflammatory interleukin-18 increases Alzheimer's disease-associated amyloid- β production in human neuron-like cells. **Journal of neuroinflammation**, v. 9, p. 199, 2012.

TAIPA, R.; DAS NEVES, S. P.; SOUSA, A. L.; et al. Proinflammatory and anti-inflammatory cytokines in the CSF of patients with Alzheimer's disease and their correlation with cognitive decline. **Neurobiology of aging**, v. 76, p. 125–132, 2019.

TASAKI, S.; GAITERI, C.; PETYUK, V. A.; et al. Genetic risk for Alzheimer's dementia predicts motor deficits through multi-omic systems in older adults. **Translational Psychiatry**, v. 9, n. 1, p. 1–11, 2019.

TASAKI, S.; XU, J.; AVEY, D. R.; et al. Inferring protein expression changes from mRNA in Alzheimer's dementia using deep neural networks. **Nature Communications**, v. 13, n. 1, p. 1–15, 2022.

TESI, N.; VAN DER LEE, S.; HULSMAN, M.; HOLSTEGE, H.; REINDERS, M. Bioinformatics Strategies for the Analysis and Integration of Large-Scale Multiomics Data. **The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences**, v. 78, n. 4, p. 659–662, 2023.

THINAKARAN, G.; KOO, E. H. Amyloid precursor protein trafficking, processing, and function. **The Journal of biological chemistry**, v. 283, n. 44, p. 29615–9, 2008.

TOMINAGA, K.; SUZUKI, H. I. TGF- β Signaling in Cellular Senescence and Aging-Related Pathology. **International journal of molecular sciences**, v. 20, n. 20, p. 5002, 2019.

TONELLI, L. H.; POSTOLACHE, T. T. Tumor necrosis factor alpha, interleukin-1 beta, interleukin-6 and major histocompatibility complex molecules in the normal brain and after peripheral immune challenge. **Neurological research**, v. 27, n. 7, p. 679–84, 2005.

- TORRES-ACOSTA, N.; O'KEEFE, J. H.; O'KEEFE, E. L.; ISAACSON, R.; SMALL, G. Therapeutic Potential of TNF- α Inhibition for Alzheimer's Disease Prevention. **Journal of Alzheimer's disease : JAD**, v. 78, n. 2, p. 619–626, 2020.
- VIDOVIC, N.; SPITTAU, B. microglial Transforming Growth Factor- β Signaling in Alzheimer's Disease. **International journal of molecular sciences**, v. 25, n. 6, p. 3090, 2024.
- WALLACH, D. The Tumor Necrosis Factor Family: Family Conventions and Private Idiosyncrasies. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 10, n. 10, p. a028431, 2018.
- WALSH, J. G.; MURUVE, D. A.; POWER, C. Inflammasomes in the CNS. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 15, n. 2, p. 84–97, 2014.
- WAN, Y.-W.; AL-OURAN, R.; MANGLEBURG, C. G.; et al. Meta-Analysis of the Alzheimer's Disease Human Brain Transcriptome and Functional Dissection in Mouse Models. **Cell reports**, v. 32, n. 2, p. 107908, 2020.
- WANG, M.; BECKMANN, N. D.; ROUSSOS, P.; et al. The Mount Sinai cohort of large-scale genomic, transcriptomic and proteomic data in Alzheimer's disease. **Scientific data**, v. 5, p. 180185, 2018.
- WIGHTMAN, D. P.; JANSEN, I. E.; SAVAGE, J. E.; et al. A genome-wide association study with 1,126,563 individuals identifies new risk loci for Alzheimer's disease. **Nature genetics**, v. 53, n. 9, p. 1276–1282, 2021.
- WILSON, D. M., 3rd; COOKSON, M. R.; VAN DEN BOSCH, L.; et al. Hallmarks of neurodegenerative diseases. **Cell**, v. 186, n. 4, p. 693–714, 2023.
- WONG, W. Economic burden of Alzheimer disease and managed care considerations. **The American journal of managed care**, v. 26, n. 8 Suppl, p. S177–S183, 2020.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION: WHO. Dementia. **World Health Organization: WHO**, 15. Mar. 2023. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dementia>>. Acesso em: 3/11/2024.
- WU, J.; CARLOCK, C.; SHIM, J.; MORENO-GONZALEZ, I.; GLASS, W. II; ROSS, A.; BARICHELLO, T.; QUEVEDO, J.; LOU, Y. Requirement of brain interleukin33 for aquaporin4 expression in astrocytes and glymphatic drainage of abnormal tau. **Molecular Psychiatry**, v. 26, n. 10, p. 5912–5924, 2021.
- WU, J. W.; HUSSAINI, S. A.; BASTILLE, I. M.; et al. Neuronal activity enhances tau propagation and tau pathology in vivo. **Nature neuroscience**, v. 19, n. 8, p. 1085–92, 2016.
- XIONG, Z.; THANGAVEL, R.; KEMPURAJ, D.; YANG, E.; ZAHEER, S.; ZAHEER, A. Alzheimer's disease: evidence for the expression of interleukin-33 and its receptor ST2 in the

brain. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 40, n. 2, p. 297–308, 2014.

XU, J.-J.; GUO, S.; XUE, R.; et al. Adalimumab ameliorates memory impairments and neuroinflammation in chronic cerebral hypoperfusion rats. **Aging**, v. 13, n. 10, p. 14001–14014, 2021.

YANG, C.; WU, X.; FENG, J.; WU, C.; CUI, X.; WANG, Z.; YANG, L. Clinical values of serum C5a in Alzheimer's disease patients with different dementia stages. **Neuroscience Letters**, v. 836, art. 137833, 2024.

YANG, H.-S.; TENG, L.; KANG, D.; et al. Cell-type-specific Alzheimer's disease polygenic risk scores are associated with distinct disease processes in Alzheimer's disease. **Nature Communications**, v. 14, n. 1, p. 1–13, 2023.

YARLAGADDA, A.; ALFSON, E.; CLAYTON, A. H. The blood brain barrier and the role of cytokines in neuropsychiatry. **Psychiatry (Edmont (Pa. : Township))**, v. 6, n. 11, p. 18–22, 2009.

YASUOKA, S.; KAWANOKUCHI, J.; PARAJULI, B.; et al. Production and functions of IL-33 in the central nervous system. **Brain research**, v. 1385, p. 8–17, 2011.

YU, Y.; LIU, J.; LI, S.-Q.; PENG, L.; YE, R. D. Serum amyloid a differentially activates microglia and astrocytes via the PI3K pathway. **Journal of Alzheimer's disease : JAD**, v. 38, n. 1, p. 133–44, 2014.

ZETTERBERG, H.; ANDREASEN, N.; BLENNOW, K. Increased cerebrospinal fluid levels of transforming growth factor-beta1 in Alzheimer's disease. **Neuroscience letters**, v. 367, n. 2, p. 194–6, 2004.

ZHANG, R.; MILLER, R. G.; MADISON, C.; et al. Systemic immune system alterations in early stages of Alzheimer's disease. **Journal of neuroimmunology**, v. 256, n. 1–2, p. 38–42, 2013.

ZHANG, Y.-J.; CHENG, Y.; TANG, H.-L.; et al. APOE ε4-associated downregulation of the IL-7/IL-7R pathway in effector memory T cells: Implications for Alzheimer's disease. **Alzheimer's & dementia : the journal of the Alzheimer's Association**, v. 20, n. 9, p. 6441–6455, 2024.

ZHAO, N.; QUICKSALL, Z.; ASMANN, Y. W.; REN, Y. Network approaches for omics studies of neurodegenerative diseases. **Frontiers in genetics**, v. 13, p. 984338, 2022.

ZHENG, C.; ZHOU, X.-W.; WANG, J.-Z. The dual roles of cytokines in Alzheimer's disease: update on interleukins, TNF-α, TGF-β and IFN-γ. **Translational Neurodegeneration**, v. 5, n. 1, p. 1–15, 2016.

ZIPP, F.; BITTNER, S.; SCHAFER, D. P. Cytokines as emerging regulators of central nervous

system synapses. **Immunity**, v. 56, n. 5, p. 914–925, 2023.

APÊNDICE A - PRIMEIRO RASCUNHO DO ARTIGO

Cytokine expression profile in human aged brain

Juliana Beker Godoy¹, Ricardo A. Vialle^{1,2,3}, Shinya Tasaki^{2,3}, Yanling Wang^{2,3}, Loren dos Santos¹, Roberto T Raittz¹, Vilas Menon⁴, Philip L. De Jager⁵, David A. Bennett^{2,3}, Dieval Guizelini¹, Katia de Paiva Lopes^{1,2,3}

¹Professional and Technological Education Sector, Federal University of Paraná, Curitiba, Brazil

²Rush Alzheimer's Disease Center, Rush University Medical Center, Chicago, Illinois, USA

³Department of Neurological Sciences, Rush University Medical Center, Chicago, Illinois, USA

⁴Columbia University Irving Medical Center, New York, NY, USA

⁵Department of Neurology, College of Physicians and Surgeons, Columbia University and the New York Presbyterian Hospital, New York, NY, USA

Alzheimer's disease (AD) is a complex neurodegenerative condition associated with chronic neuroinflammation. This study investigated the cytokine gene expression profile in cortical tissue samples from elderly individuals with AD to identify biomarkers and gain a deeper understanding of disease pathogenesis. Using high-depth RNA sequencing data, we identified a set of cytokines whose expression is significantly associated with different aspects of the AD phenotype, including cognitive decline, A β plaque deposition, and neurofibrillary tangles. Single-nucleus data analysis enabled the identification of specific cell types, such as microglia and astrocytes, that contribute significantly to the inflammatory response in AD. Furthermore, we observed a strong correlation between the expression of certain cytokines and genetic risk for the disease. Our findings suggest that cytokine-mediated neuroinflammation plays a crucial role in AD progression and that modulating the immune response may be a promising strategy for developing new therapies.

Key words: Alzheimer's disease; cytokines; neuroinflammation; single-nuclei RNA-seq; transcriptomic; biomarkers.

INTRODUCTION

Alzheimer's disease (AD) is the most prevalent cause of dementia, being one of the five most common causes of death worldwide. Even though it is expected to affect 150 million people in 2050, no treatment or diagnosis is available (REF). AD is a

neurodegenerative disorder marked by extracellular β -amyloid plaques and intracellular hyperphosphorylated tau tangles (Long & Holtzman, 2019). While it typically presents with memory loss, it can also impair speech, visuospatial skills, and executive functions (Knopman et al. 2021). Cognitive impairment in AD varies, with early signs often presenting as subjective decline despite normal tests. Mild cognitive impairment (MCI) represents the first symptomatic stage, with slight deficits in one or more cognitive domains but preserved daily functioning (Assaf and Tanielian 2018). Recent anti-amyloid antibody trials have challenged the idea that β -amyloid buildup is the sole cause of Alzheimer's disease. The findings suggest a more complex disease process involving various interacting factors, with amyloid pathology potentially acting as a necessary trigger, but insufficient to drive the full disease (Kepp et al. 2023; Selkoe and Hardy 2016). For many years, neuroinflammation was considered a secondary response to neuronal death. However, a great number of epidemiological, clinical, and experimental studies now widely recognize neuroinflammation as a central feature of Alzheimer's disease, highlighting its key role in the disease's pathological process (Heneka et al., 2015; Prins et al. 2022; Castro-Gomez et al., 2024). Genome-wide association studies (GWAS) have shown that over 51% of Alzheimer's disease risk genes are enriched in innate immune system pathways (Bellenguez et al. 2022). Additionally, rare AD risk variants have been identified in genes crucial for immune responses, particularly those involved in microglial activation and phagocytic functions (Ray et al. 2024; Bis et al. 2020; Wightman et al. 2021; WHO, 2006)

Building on the understanding that immune system pathways are crucial to AD risk (Raj et al. 2014), neuroinflammation has emerged as a central aspect of the disease's progression. Neuroinflammation is initiated by the activation of the brain's innate immune system in response to protein buildup, with cytokines acting as key mediators in this process (Sobue, Komine, and Yamanaka 2023). Produced by activated glial cells and neurons, these small signaling molecules include interleukins, chemokines, tumor necrosis factors, interferons, and growth factors. Under healthy conditions, cytokines are crucial to neurodevelopment and to regulate cognitive functions like synaptic neurotransmission, brain plasticity, learning, and memory retention (Bourgoignon & Cavanagh 2020; Zipp, Bittner, and Schafer 2023). On the other hand, cytokines promote inflammation through intercellular communication, accelerating AD progression (Chen et al. 2024). Previous studies have shown that elderly individuals with β -amyloid neuropathology and cognitive decline exhibit increased brain cytokine expression (Flores-Aguilar et al. 2021). Here, we extend these findings by leveraging data from two longitudinal cohorts, the Religious Orders Study and the

Rush Memory and Aging Project (ROS/MAP) (Bennett et al. 2018). We investigated cytokine expression in the cortical brain tissue of community-dwelling older adults and its role in AD and related disorders (ADRD). First, we examined the association of these genes with cognitive decline and common neuropathologies. Next, we explored cell-type-specific expression profiles using single-nucleus RNA sequencing (snRNASeq). Then, we evaluate the relationship between AD genetic risk and cytokine expression. Finally, we conducted CellChat analysis to understand the intercellular communication mediated by these inflammatory molecules.

RESULTS

Characteristics of the participants

Participants included in this manuscript were community-based older persons enrolled in two prospective studies of aging, the Religious Orders Study (ROS) and the Rush Memory and Aging Project (MAP), commonly referred to as ROSMAP. Both cohorts were approved by the Institutional Review Board of Rush University Medical Center (Chicago, IL). The participants are older adults (over 65 years old) who enroll without dementia and agree to longitudinal clinical evaluations and organ donation. To date, ROSMAP has enrolled over 3,000 participants.

The snRNASeq transcriptomics were profiled from postmortem DLPFC brain tissues of 424 individuals while bulk RNASeq from the DLPFC were available for 1,210 participants. The participants enrolled at a mean age of 80.8 (SD: 7.0) years and died at an average age of 89.5 (SD: 6.6), with a third being female (~70%). At death, 35% had no cognitive impairment, 25% had mild cognitive impairment (MCI), and the remaining 40% had dementia. At autopsy, 64% had a pathologic AD diagnosis. The characteristics were similar for individuals with snRNASeq data.

Cytokine expression was associated with AD phenotype in specific brain cell types.

Out of the 49 cytokines expressed in the cortex, 31 were significantly associated with AD traits. As shown in Figure 1, IL15 expression levels had the highest association with cognitive decline (Nomj $p = 9.79 \times 10^{-10}$; Fig. 1a). We then employed a logistic regression model to evaluate the relationship between IL-15 levels and cognitive decline, categorizing individuals based on their diagnosis at the time of death (Fig. 1b). We observed that higher IL-15 levels were significantly associated with faster cognitive decline in AD patients ($R =$

-0.1; $p < 0.03$). Beyond IL-15, our analysis revealed additional cytokines with significant associations to AD traits. THPO, TGFb1, SPP1, and IL-33 expression levels were associated with tau/amyloid burden, cognitive decline, and AD diagnosis (Fig. 1a; Supplementary Table 1). Higher levels of HGF were associated with AD diagnosis, dementia diagnosis, and cognitive decline, but specifically with tau burden (Fig. 1a; Supplementary Table 1). In contrast, IGF1 was exclusively linked to amyloid deposition and the same clinical outcomes (Fig. 1a; Supplementary Table 1).

To confirm our findings, we replicated the analysis on external bulk RNAseq datasets from the Mayo Clinic, comprising 597 samples from 355 individuals, and the MSBB, which included 1,282 samples from 316 individuals. In the Mayo RNAseq data, Thal and Braak stages were significantly associated with higher IL15, THPO, TGFB1, SPP1, and HGF levels in the temporal cortex (Supplementary Fig. 1a). These results were consistent with our findings from the ROSMAP cohorts. There were some differences, for example, no significant association was found between IL33 expression levels and covariates in Mayo data. In addition, IGF1 was not expressed. Turning to the MSBB dataset, IGF1 levels were associated with Braak and CDR while IL-33 levels were associated only with the Braak stage in the frontal lobe (Supplementary Fig. 1b).

At the cell type level, cytokines expressed by excitatory neurons (ext), inhibitory neurons (inh), microglia (mic), astrocytes (ast), oligodendrocytes (oli), and OPC cells (opc) showed significant associations in at least one AD trait (Fig. 1c; Supplementary Fig. 2a-e). No significant associations were found between inflammatory proteins expressed by endothelial cells (end) and AD phenotype. In microglia, IL-15 levels were strongly associated with the global pathological burden ($p < 0.001$; Fig. 1c). Interestingly, a significant association between IL-15 levels and amyloid accumulation was observed only in microglia ($p < 0.001$; Fig. 1c). The overexpression of IL-15 was positively correlated with higher protein deposition in AD patients ($R = 0.42$; $p < 0.001$; Fig. 1d). Both in bulk and snRNA-seq data, IL-15 levels were significantly upregulated in AD patients compared with MCI (bulk $p < 0.001$; sn $p = 0.03$) and NCI individuals (bulk $p < 0.001$; sn $p < 0.001$; Fig. 1e-f). No difference in the IL-15 levels was observed in MCI individuals compared with controls in bulk and microglia (Fig. 1e-f). The expression of pro-inflammatory cytokine IL-7 only occurs in the single-nuclei data and their levels were associated with tangle density and cognitive decline in microglia (Fig. 1c). Notably, astrocytes showed the highest number of phenotype-associated cytokines (Supplementary Fig. 2c). We observed that the expression of IL-33 in astrocytes had a strong association with tangles density, global AD burden, AD diagnosis, and cognitive decline,

consistent with bulk analysis ($p < 0.001$; Supplementary Fig. 2c). In oligodendrocytes, SPP1 levels were strongly associated with the same variables ($p < 0.001$; Supplementary Fig. 2d). In summary, these results demonstrate distinct neuroinflammation patterns across various brain cell types, with the varying neuropathologic associations suggesting that each cell type has unique relationship with AD.

The AD phenotype contributed only slightly to cytokine expression.

Next, we sought to investigate the extent to which cytokine expression was influenced by AD-related traits. (Fig. 2; Supplementary Fig. 3). With the bulk RNASeq data, we found that age at death was the strongest driver of variance in C3 levels, accounting for 3.29% of the total variance. Cognitive decline was the next strongest factor, explaining 2.89% of the variance in IL15 levels in bulk data (Fig. 2a). The APOE $\epsilon 4$ allele and global deposition of neurotoxic proteins had an 0.2%, 0.23% of influence, respectively (Fig. 2a). Meanwhile, in microglia, β -amyloid deposition (8.6%) and tangles density (6.76%) contributed most to the variance in IL-15 levels (Fig. 2b). In oligodendrocytes, cognitive decline (5.25%), tangles density (4.41%), and APOE $\epsilon 4$ allele (2.02%) explained part of the total variance in SPP1 levels (Fig. 2c). These results suggest that AD-related variables explained a small fraction of the variance in cytokine expression, with cognitive decline, tangles density, and amyloid deposition being the most significant contributors.

AD genetic risk is associated with cytokine brain expression.

To investigate the influence of genetic variants on cytokine expression in the cortex, we tested the association between cytokine levels and previously calculated polygenic risk scores for AD (AD-PRS) in all 424 individuals included in the single-nuclei dataset (Tasaki et al. 2019). First, we classified patients as high or low risk for developing AD based on the deciles of the AD-PRS distribution (Supplementary Fig. 4a). Next, we assessed the average cytokine levels across cell types for each AD risk category. No statistically significant differences in cytokine production were observed between high-risk and low-risk individuals (Supplementary Fig. 4b). Additionally, we tested the association between cytokine expression and AD-PRS using linear regression. The top five significant findings from the association analysis are presented in Figure 4. We observed that C5 (nom. $p = 0.01538$; t-value = -2.433369) and IL-33 (nom. $p = 0.01689$; t-value = -2.398712) levels in astrocytes and CCL28 (nom. $p = 0.01089$; t-value = -2.557579) levels in excitatory neurons were inversely associated with higher AD risk (Fig. 3a). Conversely, HGF levels in excitatory neurons (nom.

$p = 0.0212$; $t\text{-value} = 3.091827$) and SPP1 expression in microglia (nom. $p = 0.00992$; $t\text{-value} = 2.590563$) were positively associated with higher risk scores (Fig. 3a). Individuals with elevated AD risk scores were significantly associated with higher levels of microglia- and oligodendrocyte-derived cytokines (Fig. 3b). This association was confirmed by a permutation test, which showed that higher AD risk was related to elevated cytokine expression in both cell types (Fig. 3c). Even though the mean correlation between AD risk and inflammatory gene expression was higher in astrocytes and inhibitory neurons, it was not statistically significant (Fig. 3b). The distribution of permuted mean correlations supported this pattern, showing no significant differences from the measured mean estimates in other cell types (Fig. 3c).

We conducted gene set enrichment analysis (GSEA) to determine which cytokine families associated with AD-genetic risk are enriched in brain cell types (Fig. 3d). Cytokine genes were ranked by family, using T values from the regression analysis of cytokine expression and AD-PRS. Among all genes expressed by cell groups, the growth factor pathway was the most significantly enriched (nom. $p = 0.0008464299$; Fig. 3d). This pathway was also significantly enriched in astrocytes (nom. $p = 0.0218427323$) and oligodendrocytes (nom. $p = 0.0189478640$). Using linear and logistic regression models, we found that the average expression of the growth factor family was strongly associated with cognitive decline, amyloid/tau burden, and AD diagnosis (Supplementary Fig. 5e). Furthermore, the interleukine family showed significant enrichment in oligodendrocytes (P). In contrast, chemokine average expression was associated with inhibitory neurons (Fig. 3d). In inhibitory neurons, the interleukine family was associated with β -amyloid deposition (Supplementary Fig. 5c). Together, these results offer valuable insights into the genetic influence of AD risk on brain inflammatory gene expression, deepening our understanding of neuroinflammatory mechanisms involved with Alzheimer's dementia.

Cell Communication in AD

To explore how cytokine expression mediates intercellular communication in AD-vulnerable cell communities, we performed CellChat analysis on specific cell populations. In microglia, we identified 10 significant ligand-receptor pairs categorized into three significant signaling pathway networks: SPP1, TGF β , and Complement. Previous studies have shown that the microglial subpopulations mic.3, mic.12, and mic.13 are linked to pathological AD, while mic.15 is associated with an inflammatory and stress-related profile (Green et al. 2024; Lopes et al., 2024). In the CellChat-inferred SPP1 signaling network, we

observed that mic.13 was the dominant source of SPP1 ligands, followed by mic.15 (Fig. 4a-b). The SPP1 signaling network in microglia was primarily mediated by paracrine signaling; however, mic.13 and mic.15 demonstrated significant autocrine signaling (Fig. 4a). Moreover, CellChat identified the SPP1-(ITGAV+ITGB1) ligand-receptor pair as the key mediator of microglial communication network, with SPP1-(ITGAV+ITGB5) and SPP1-(ITGA9+ITGB1) contributing as well (Fig. 4c-d). Further analysis showed that mic.15 may play a pivotal role in the SPP1 signaling pathway, orchestrating and influencing the communication network among microglial subpopulations in the aged human brain. In the inferred TGF β signaling network, mic.12 had an average involvement in cell-cell communication while mic.13 emerged as a major contributor. We noted that mic.13 exhibits high target promiscuity, making it one of the major targets within this network (Supplementary Fig. 6a-d). By contrast, network centrality analysis showed that mic.12 and mic.13 acted mostly as influencers in the inferred Complement signaling network mediated by C3 levels and ITGAX-ITGB2 receptors (Supplementary Fig. 6e-h).

METHODS

Study cohorts: participants and clinical-neuropathological evaluations

Data were obtained from two longitudinal clinical-pathologic cohort studies focused on risk factors for cognitive decline and Alzheimer's disease (AD). The Religious Order Study (ROS) and the Rush Memory and Aging Project (MAP), collectively called ROSMAP, were launched in 1994 and 1997. At enrollment, all participants were dementia-free and consented to detailed annual cognitive and clinical assessments. They signed the Anatomic Gift Act for brain donation and provided informed and repository consent. The Institutional Review Board at Rush University Medical Center approved both studies (Bennett et al., 2018). The expression data were obtained from the dorsolateral prefrontal cortex (DLPFC), and we selected seven AD-related quantitative traits for the association analysis described below.

Cognitive decline and cognitive resilience. ROSMAP participants completed a series of 21 cognitive performance tests each year, administered by blinded examiners unaware of their earlier performance. The rate of global cognitive decline indicates the individual change in cognition over time and is calculated by averaging the standardized scores from 17 tests. This rate was derived from a linear mixed effects model, treating global cognition as the longitudinal outcome and adjusting for age at baseline, sex, and years of education (Wilson et al. 2015). To calculate cognitive resilience variable, linear mixed-effects models consider the

same demographic variables and pathological factors, like amyloid and tau burden (De Jager et al. 2012).

Tau and amyloid pathological burden. To quantify β -amyloid and abnormally tau deposition density, brain autopsies were conducted by a board-certified neuropathologist blinded to age and clinical data. The brains were removed, weighed, and fixed in 4% paraformaldehyde for neuropathological evaluation. Tissue samples were collected from eight distinct brain regions: the angular gyrus, anterior cingulate, calcarine cortex, entorhinal cortex, hippocampus, inferior temporal cortex, midfrontal gyrus, and superior frontal cortex. Immunohistochemical staining with A β and tau antibodies on 20-micron sections, combined with image analysis and stereology, was employed to assess the neuropathological burden (Kapasi et al. 2023). A square root transformation was applied to the data for analysis. For unbiased assessments, examiners were blinded to clinical data during all evaluations. Global AD pathology burden quantifies Alzheimer's pathology by aggregating counts of neuritic plaques, diffuse plaques, and neurofibrillary tangles through microscopic examination of silver-stained slides from five regions: midfrontal cortex, midtemporal cortex, inferior parietal cortex, entorhinal cortex, and hippocampus (Bennett et al. 2003).

AD and dementia diagnosis. A clinical diagnosis of cognitive status is made by a neurologist with expertise in dementia and a clinician who reviews all clinical data available, both remaining blinded to patient demographic information. A detailed assessment of available clinical data was performed to determine the most likely clinical diagnosis at the time of death, ensuring that the reviewers did not have access to post-mortem data (Schneider et al. 2007; Bennett et al., 2006). Diagnoses of dementia and clinical Alzheimer's dementia follow the criteria set by the National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke and the Alzheimer's Disease and Related Disorders Association (NINCDS/ADRDA). Mild cognitive impairment (MCI) is diagnosed when cognitive impairment is present but does not meet the criteria for dementia. Individuals without dementia or MCI are classified as having no cognitive impairment (NCI) (Bennett et al. 2006; Bennett et al., 2002).

Cytokine gene list

To investigate whether abnormal deposition of pathological proteins and cognitive decline were linked with neuroinflammation, brain cytokine production was assessed using a panel of 147 genes. A curated list of 147 cytokine genes was generated based on supplementary data from two key studies. These studies provided a comprehensive view of

cytokine regulation and immune responses, mapping transcriptional control networks and detailing cell-type-specific cytokine activity at single-cell resolution (Cui et al. 2023; Santoso et al. 2020). This list was used as the basis for subsequent analysis of cytokine gene expression in this study. After filtering bulk and single-nuclei data to include only cytokine genes, we evaluate their association with AD phenotype through linear or logistic regressions. Since, age, sex, and years of education are important sources of variability, we adjusted our statistical model to account for them.

Bulk RNA-seq Data: Collection and Analysis

Whole tissue expression data was obtained from frozen samples of the DLPFC region. RNA was extracted using the Chemagic RNA Tissue Kit (Perkin Elmer, CMG-1212), and subsequently concentrated using the Zymo RNA Clean & Concentrator Kit (R1080). RNA quality was assessed by calculating the RQN (or RIN) score using a Fragment Analyzer (Agilent, DNF-471). To determine the RNA concentration, a Qubit broad-range RNA assay (Invitrogen, Q10211) was used. A total of 500 ng of RNA was used for RNA-Seq library preparation, and rRNA was depleted using RiboGold (Illumina, 20020599). The Zephyr G3 NGS workstation (Perkin Elmer) was used to generate TruSeq stranded libraries (Illumina, 20020599) with custom dual indexes. These libraries were then normalized and sequenced on a NovaSeq 6000 (Illumina) at 40–50 million reads, 2×150 bp paired-end. The RNA-Seq data processing utilized three parallel pipelines: a quality control (QC) pipeline, a gene/transcript quantification pipeline, and a 3'-UTR quantification pipeline. First, paired-end RNA-Seq reads were aligned to the human reference genome using STAR v2.6, with genome and transcriptome annotations from GENCODE (Release 27 GRCh38). To QC, Picard tools were employed to evaluate data quality from the aligned files. Finally, to the quantification pipeline, transcript-level raw counts were generated using Kallisto v0.46, which were subsequently aggregated to the gene level for further analysis. Samples with fewer than 5 million mapped reads were excluded from the study. A total of 17,294 genes were expressed in over 50% of the samples with at least 10 counts per sample and they were included in the normalization analysis. Conditional quantile normalization (CQN) was applied to adjust for sequence bias due to guanine-cytosine content and gene length. The normalized gene count matrix was then log₂-transformed into counts per million (CPM) and further processed using quantile normalization with the voom function from the limma R package. A linear regression model was used to adjust for technical confounders, including post-mortem interval, sequencing batch, RNA quality number (RQN), total spliced reads, and additional metrics

from Picard and Kallisto. Additionally, 3' UTR isoform lengths were calculated using QAPA, and genes with missing or uniform UTR lengths across samples were filtered out. The UTR length data were log2-transformed and adjusted for confounders as described above.

Single-Nuclei RNA-seq Data: Methodology and Analysis Pipeline

Nuclei isolation was originally conducted in 479 brain specimens using available frozen pathological material from the DLPFC, processed via dounce homogenization and centrifugation (Green et al. 2024). Single nuclei profile was performed on pooled sample batches to boost library throughput and reduce batch effects and costs. Each library construction batch included eight participants, resulting in 60 batches. Even though samples were randomly assigned, they were balanced by clinical and pathological diagnoses as well as sex. In each batch, the nuclei suspension from eight donors was combined. Single-nucleus RNA-Seq libraries were prepared using the 10x Genomics 3 Gene Expression kit (v3 chemistry) following the manufacturer's protocol. After sequencing, 127 pooled libraries were created. Alignment, noise removal, demultiplexing, normalization, and classification were performed. Low-quality nuclei and doublets were removed using cell-type-specific thresholds. The preprocessing and quality control (QC) steps were extensively described previously (Green et al. 2024). In brief, approximately 1.64 million high-quality nuclei profiles were retained from 465 individuals. ElasticNet-regularized logistic regression was performed to annotate cells, resulting in eight major cell types. We chose seven cell types to conduct our analysis: astrocytes (ast), excitatory neurons (ext), inhibitory neurons (inh), microglia (mic), oligodendrocytes (oli), and oligodendrocyte precursor cells (OPCs), and endothelial cells (end). In each cell type, the expression profile of marker genes was identified and categorized using the Seurat FindAllMarkers function. The sub-clustering analysis resulted in 96 subpopulations. After preprocessing and QC analyses, 424 participants were retained for the expression analysis (Lopes et al. 2024; Fujita et al. 2024).

Replication cohorts

For replication analysis, we selected two external RNA-seq datasets: the Mayo Clinic and the Mount Sinai Brain Bank (MSBB). The Mayo Clinic dataset includes transcriptomic data from the temporal cortex of 597 samples representing 355 unique individuals. The MSBB dataset contains RNA-seq data from 1,282 samples from the frontal lobe across 316 unique individuals. Both datasets were filtered to include only targeted cytokine genes, and association analyses were performed with the available AD traits. In the Mayo Clinic data, we

tested for associations with diagnosis, Braak stage, and Thal score. In the MSBB data, the selected variables were CERAD score, Braak stage, Clinical Dementia Rating (CDR), and neuritic plaque density.

Statistical methods

To evaluate the association between cytokine expression and AD traits, we used a linear regression model for continuous outcomes and logistic regression for categorical ones. Both models were adjusted for age at measurement, sex, and years of education to control for potential confounders. We conducted Pearson's and Spearman's correlation analyses to examine variable relationships. The differential expression of inflammatory mediators in individuals diagnosed with AD, MCI, and controls was assessed using two-tailed Student's t-tests for two-group comparisons. Data were presented in boxplots, with the median indicated by a horizontal line and whiskers representing the 25th and 75th percentiles. To identify and quantify sources of biological variation in cytokine expression, we applied the `variancePartition` function in R. This package applies linear mixed models to quantify the influence of biological and technical factors on gene expression, revealing patterns of variation across datasets (Hoffman & Schadt 2016). To evaluate the contribution of AD-genetic risk on cytokine expression, we stratified into deciles the polygenic risk scores (PRS) previously calculated (Tasaki et al. 2019) for all the 424 individuals in the single nuclei RNA-seq data. The individuals stratified into the first decile were categorized as low-risk to develop AD and individuals into the last decile was classified as high-risk individuals to develop AD. Using Spearman correlation, we assessed the relationship between AD-PRS and the average cytokine expression in each cell cluster. To assess the statistical significance of the associations, we employed a permutation method. The cytokine data were permuted 1,000 times, with the correlation calculated for each permuted dataset. We then applied the Student's t-test to compare the measured distribution with the permuted distribution for each cell type, correcting p values using the Benjamini–Hochberg method. To identify which cytokine families were enriched in the aged brain, we first calculated the mean expression for each annotated family. We then performed gene set enrichment analysis (GSEA) using the cytokine families list as the gene set. The cytokine genes were ranked based on t-values derived from the correlation analysis.

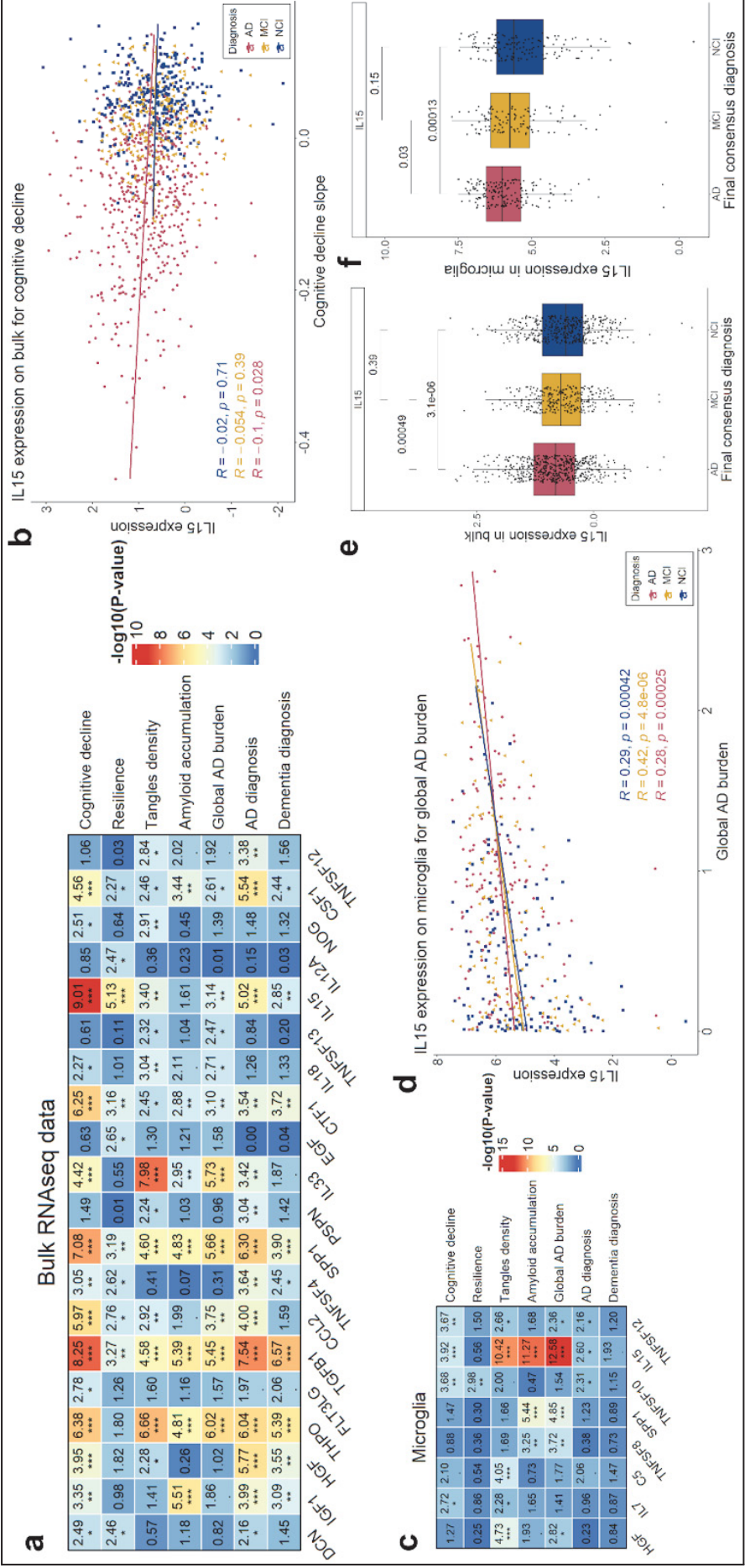


Fig 1: Association analysis between brain inflammatory protein expression and AD phenotype variables. **a)** Heatmap illustrating the significant associations between cytokine expression levels and AD phenotypes, represented by $-\log_{10}(p\text{-values})$ (** FDR < 0.01, * FDR < 0.05). Linear and/or logistic regressions were performed to explore the relationships between cytokine expression and phenotypic data, including cognitive decline, amyloid deposition, tangle density, global AD pathology burden, and clinical diagnosis. All models were adjusted for age, sex, and education to control for potential confounding factors. In the bulk data, 20 cytokines were associated with phenotypic data. **b)** Scatter plot showing the association of IL15 expression in the bulk data with global AD burden. Participants were categorized based on their clinical diagnosis (AD, MCI, or NCI), with each dot color-coded accordingly. **c)** Heatmap of significant associations between cytokine expression levels in microglia from the DLPFC region (columns) and phenotypic data (rows). Colors represent the $-\log_{10}$ of the p-value, ranging from highest (red) to lowest (blue). **d)** Scatter plot illustrating the association between IL-15 expression in microglia and cognitive decline. Participants were categorized by clinical diagnosis (AD, MCI, or NCI), with each dot

color-coded to reflect their group. **e)** Differential expression level of the IL15 in bulk data for individuals diagnosed with Alzheimer's disease (AD; red), mild cognitive impairment (MCI; yellow), and no cognitive impairment (NCI; blue). Data are presented in boxplots, with the median indicated by a horizontal line. Nominal p-values were shown at the top and calculated using one-sided t-tests. **f)** Differential IL-15 expression in microglia across AD (red), MCI (yellow), and NC (blue). Data are shown in boxplots with medians as horizontal lines. Nominal p-values, calculated using one-sided t-tests, are displayed at the top.

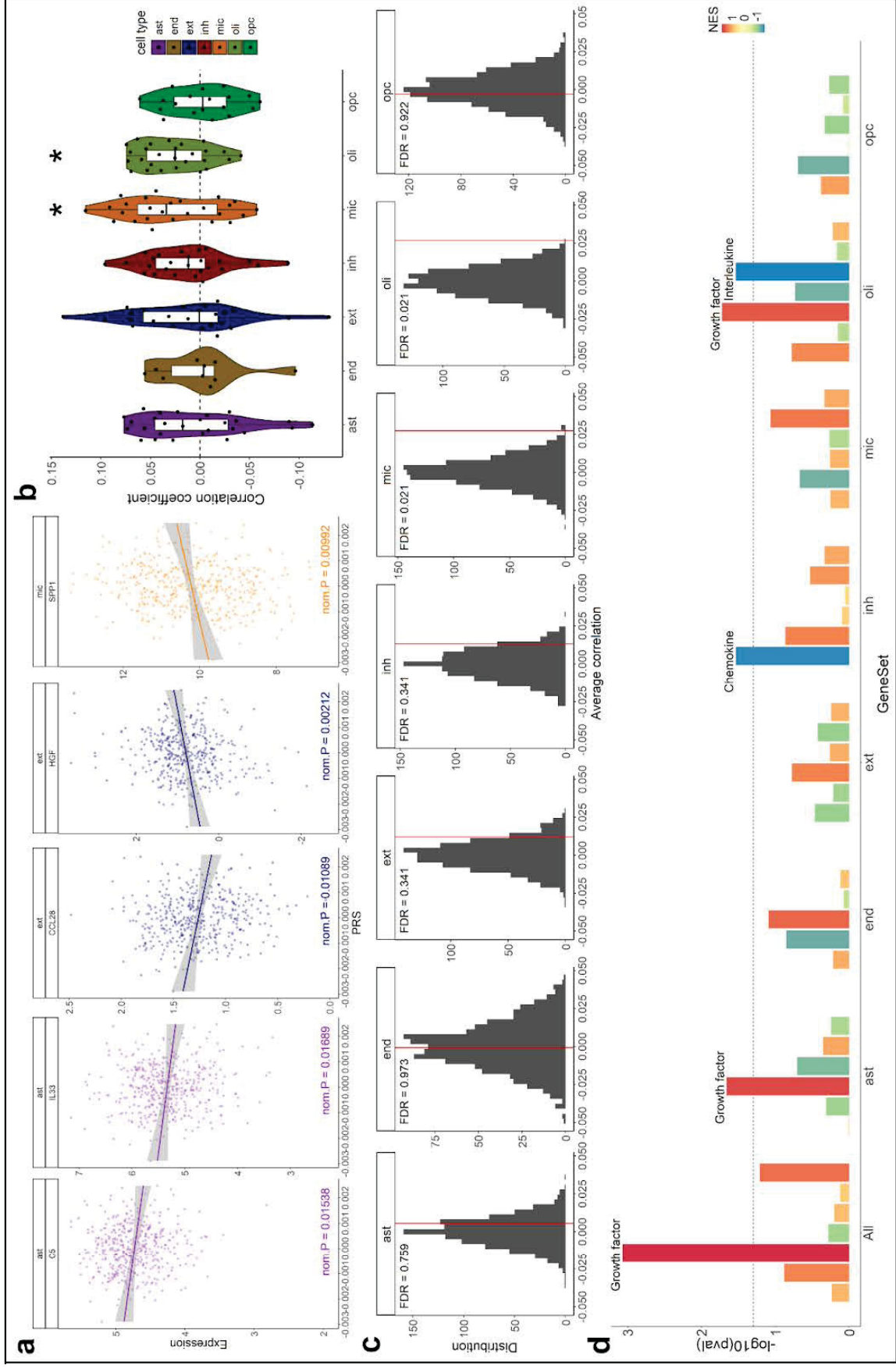


Fig. 3: Cytokine production in distinct cell types was associated with the genetic risk score for Alzheimer's disease. **a)** Scatter plot showing the correlation of the five cytokines with the most significant nominal p-values and the AD genetic risk score. **b)** Distribution of Spearman correlation coefficients between cell-type-specific cytokine expression and genetic risk score for Alzheimer's disease in 424 individuals. Significant differences in mean correlation between cell-type-specific cytokines are indicated (* $p < 0.05$). Center lines represent medians, box limits show the 25th and 75th percentiles (calculated in R), whiskers extend 1.5 times the interquartile range, and outliers are shown as dots beyond the whiskers. The violin plots are color-coded by cell type **c)** Distribution of mean correlations between AD-PRS and cytokine expression across cell types for 1,000 permutations, with the measured estimate indicated by a red arrow. Cytokine production in microglia and oligodendrocytes showed a significant association with AD-PRS. **d)** Bar plot of significantly enriched cytokine families associated with AD-genetic risk in each cell cluster from single-nuclei data. The y-axis shows the log10-converted adjusted p-values and the x-axis represents cell types. Different cytokine families are distinguished by color.

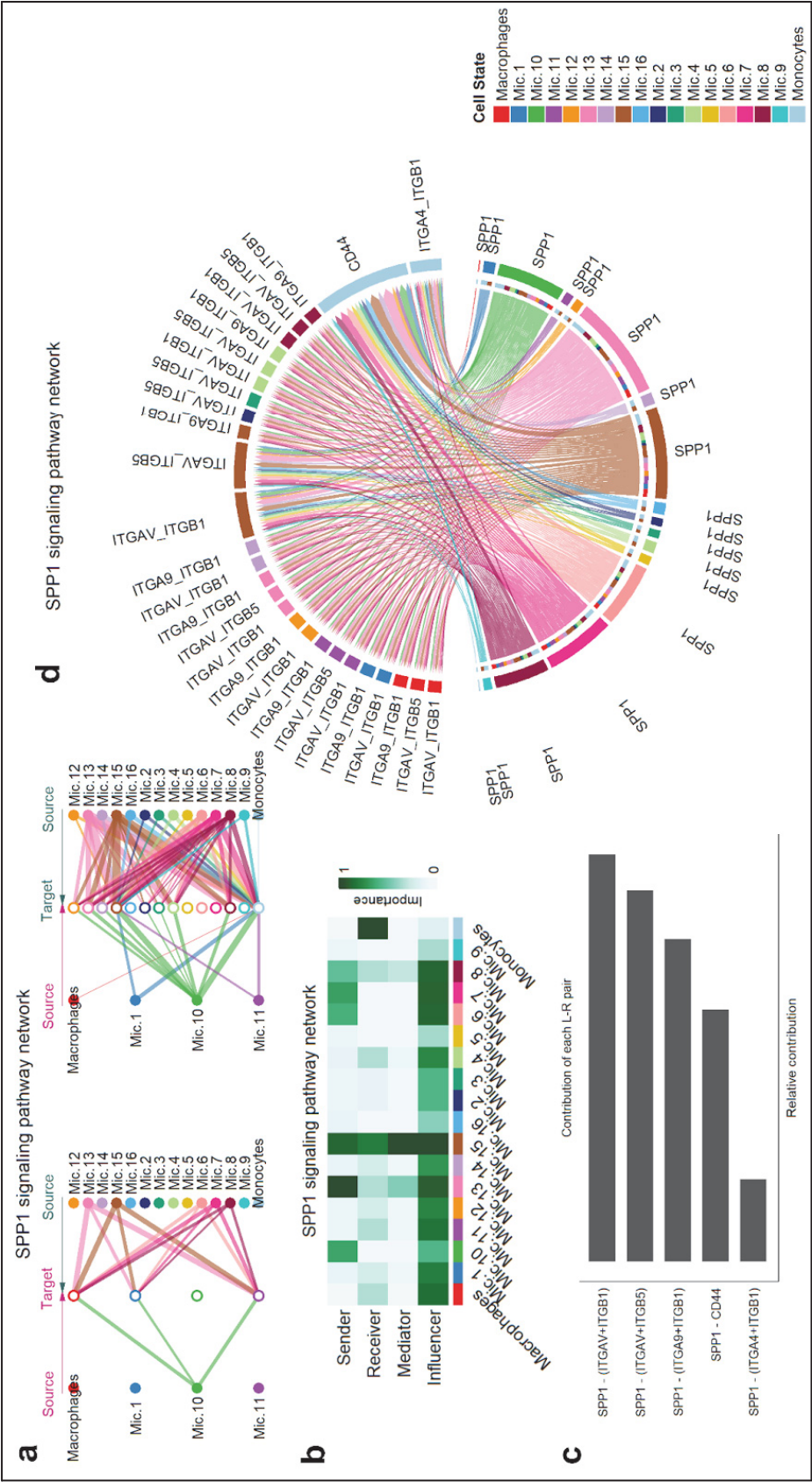
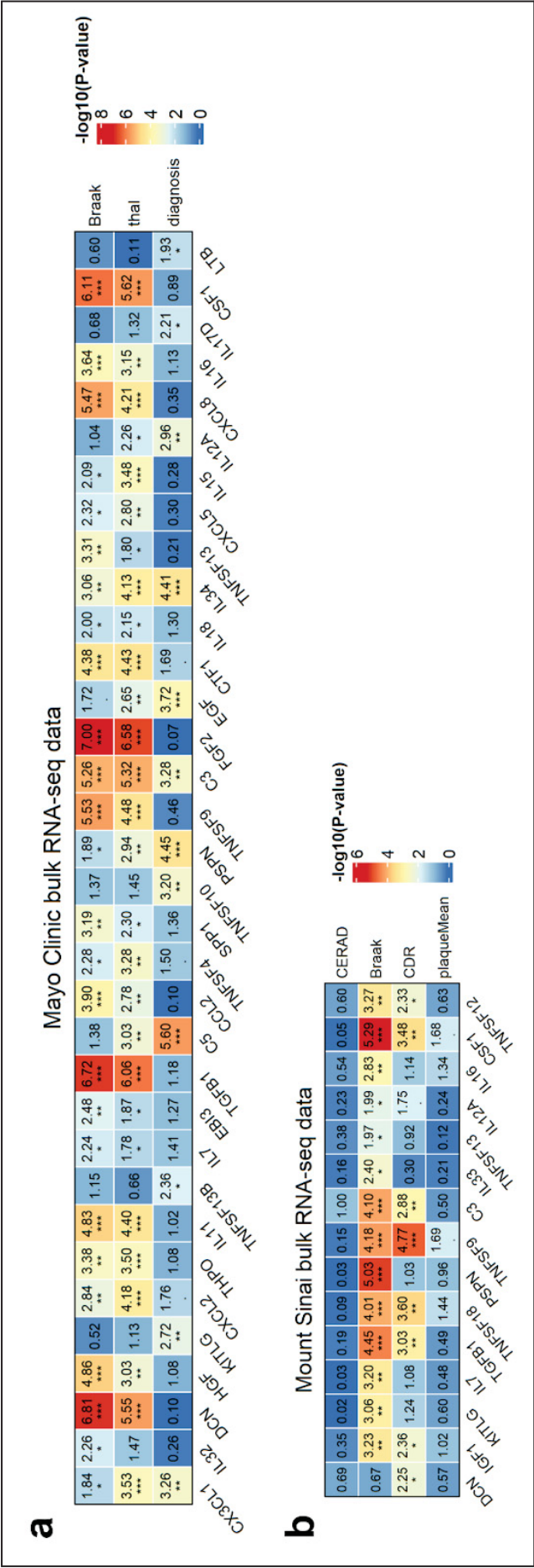
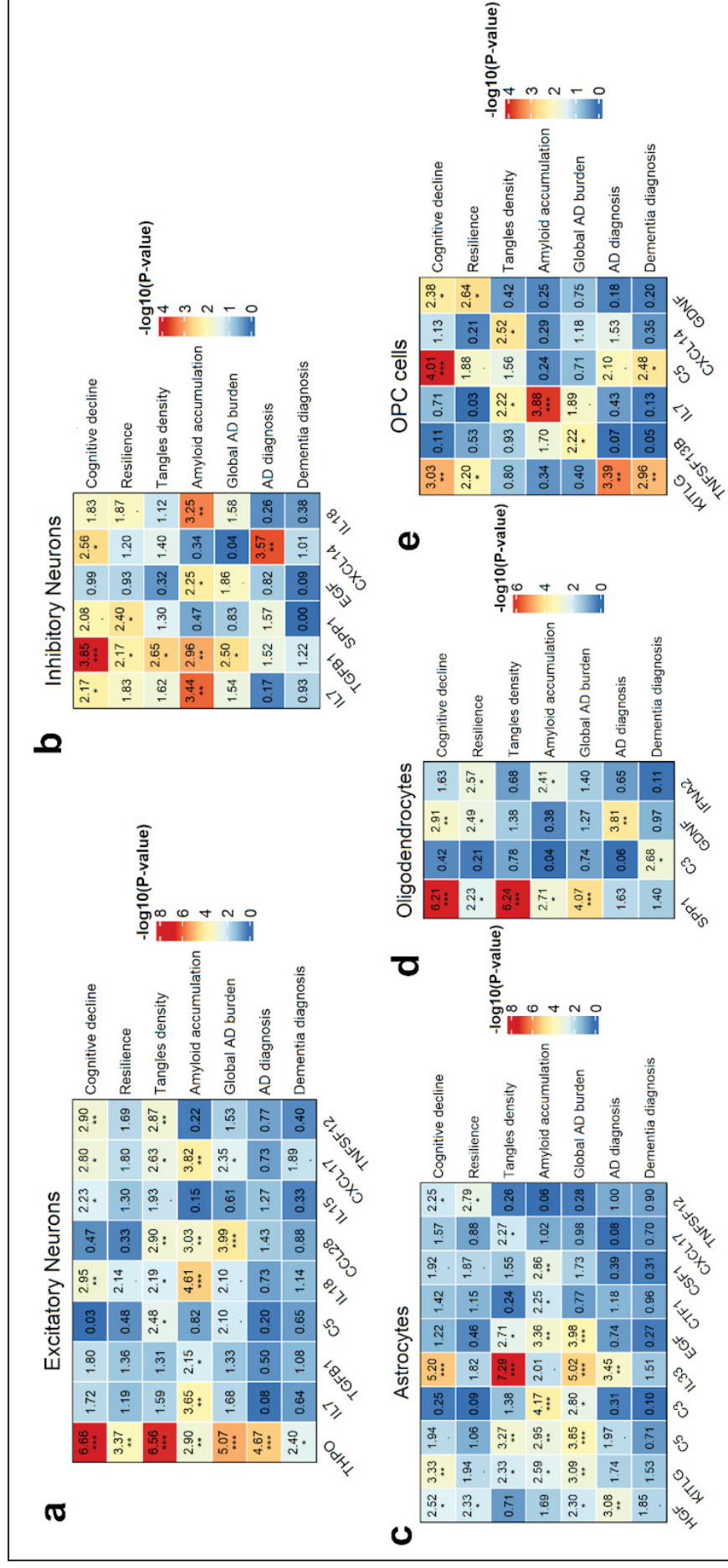
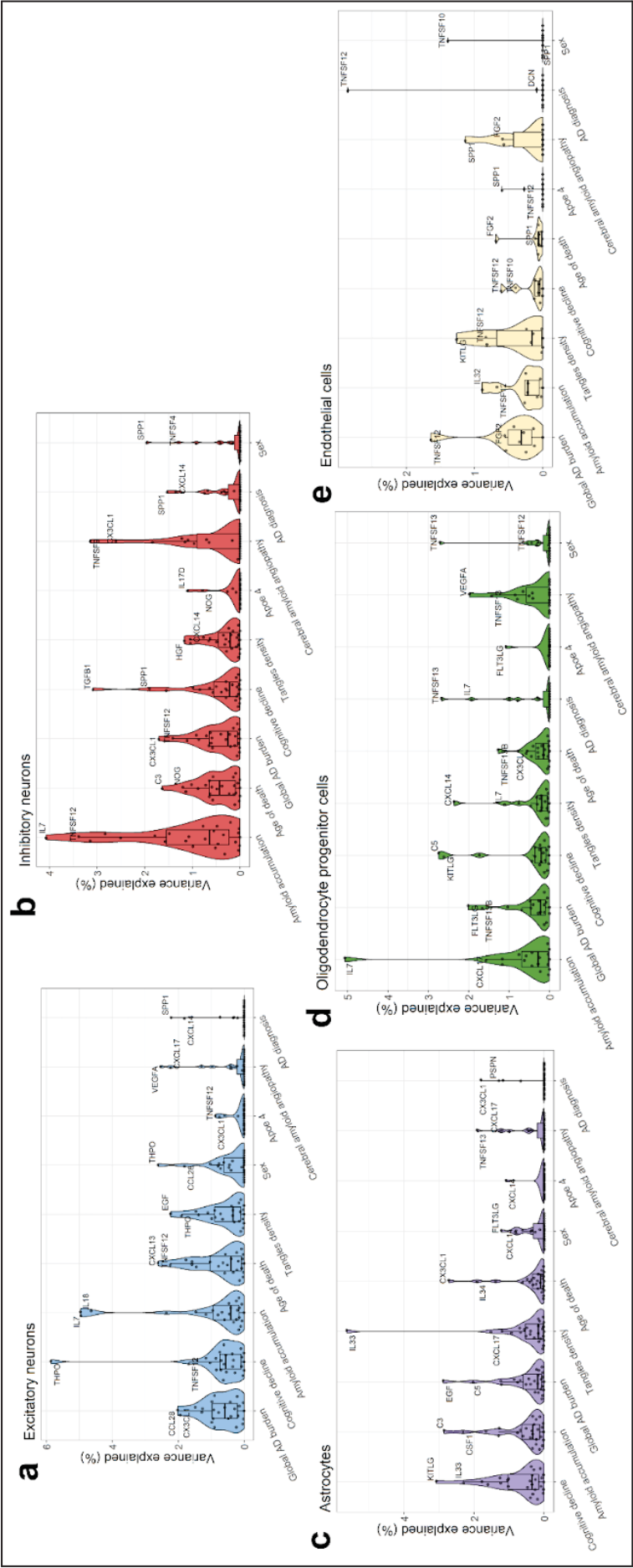


Fig. 4: The cell-cell interactions among microglial subpopulations in the SPP1 signaling network. **(a)** Hierarchical plot showing interactions between microglial subpopulations in the inferred SPP1 signaling network. Solid circles indicate sources, while open circles indicate targets within the network. Intercellular interactions are represented by lines, with colors corresponding to the source. The width of the edges reflects the communication probability. **(b)** Heatmap shows the relative importance of each microglial cluster in the SPP1 signaling network, based on the computed four network centrality measures: sender, receiver, mediator, and influencer. **(c)** Relative contribution of each ligand-receptor pair to the inferred signaling network. **(d)** Chord diagram showing significant interactions among microglial subpopulations within the SPP1 signaling network. Inner bar colors represent the target cells, while outer bars correspond to the color-coded microglial sources.

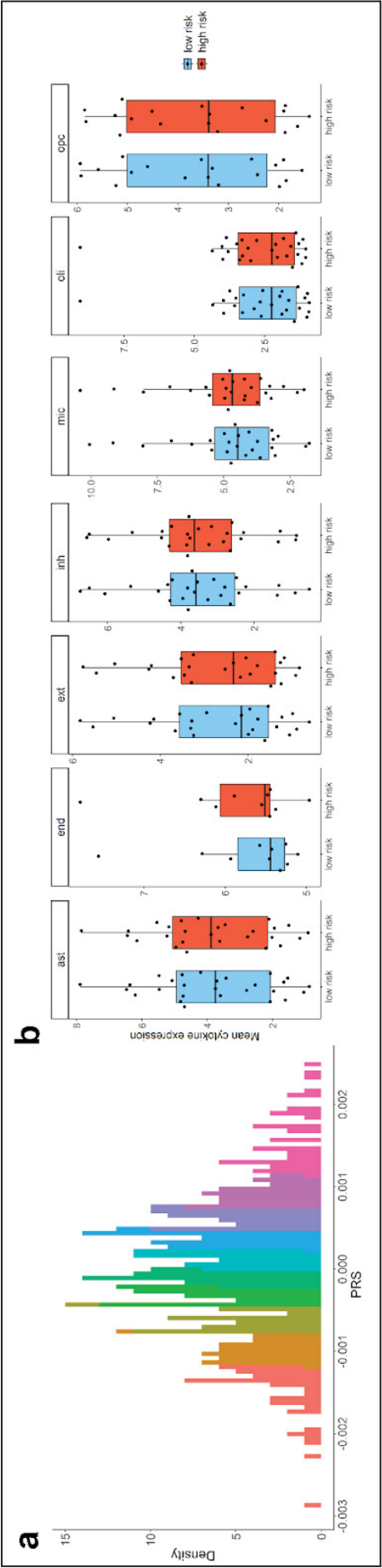




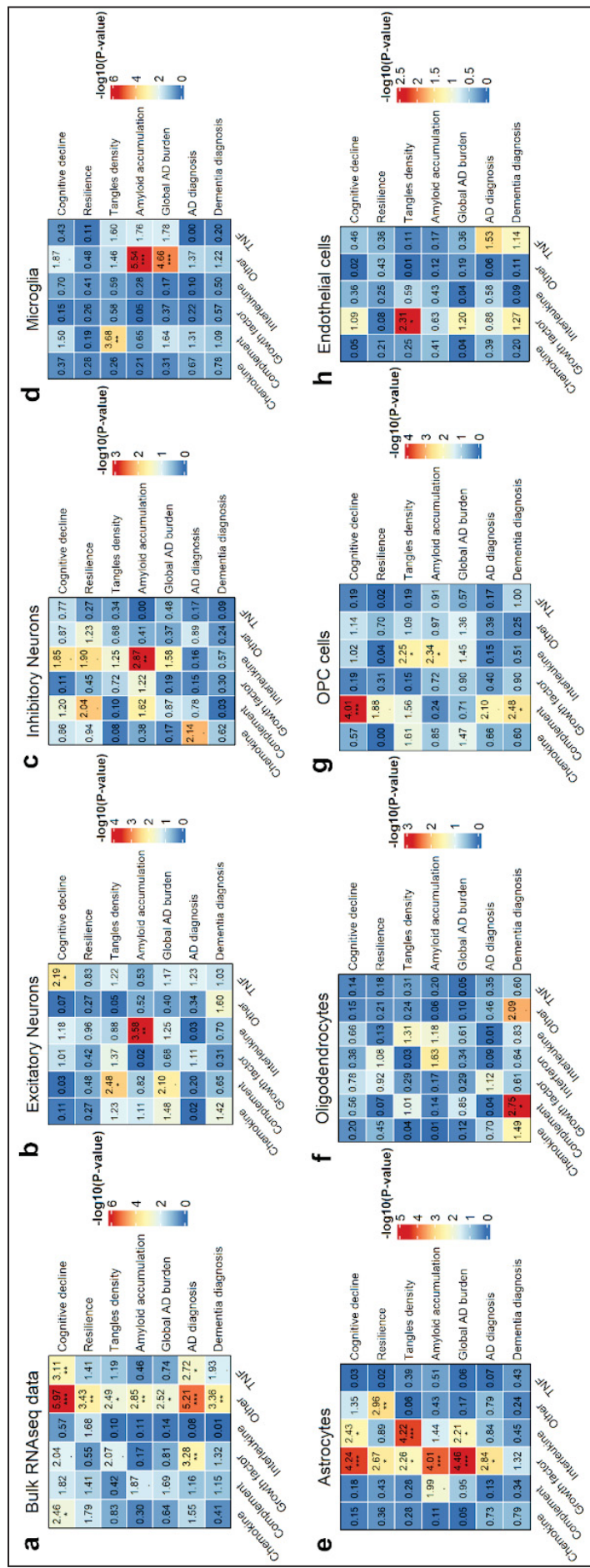
Supplementary Fig. 2: Association analysis between cytokine expression and AD phenotype variables in the cell groups. Heatmaps showing significant associations between cytokine expression levels and AD phenotypes across five distinct cell types: **(a)** excitatory neurons, **(b)** inhibitory neurons, **(c)** astrocytes, **(d)** oligodendrocytes, and **(e)** oligodendrocytes progenitor cells (OPC cells). Linear and/or logistic regressions were conducted to examine relationships between cytokine expression in the DLPFC region (columns) and phenotypic data (rows). All models were adjusted for age, sex, and education to account for confounding factors. Numbers and colors represent the $-\log_{10}$ of the p-value (*** FDR < 0.001, ** FDR < 0.01, * FDR < 0.05, . FDR = 0.1), ranging from highest (red) to lowest (blue).



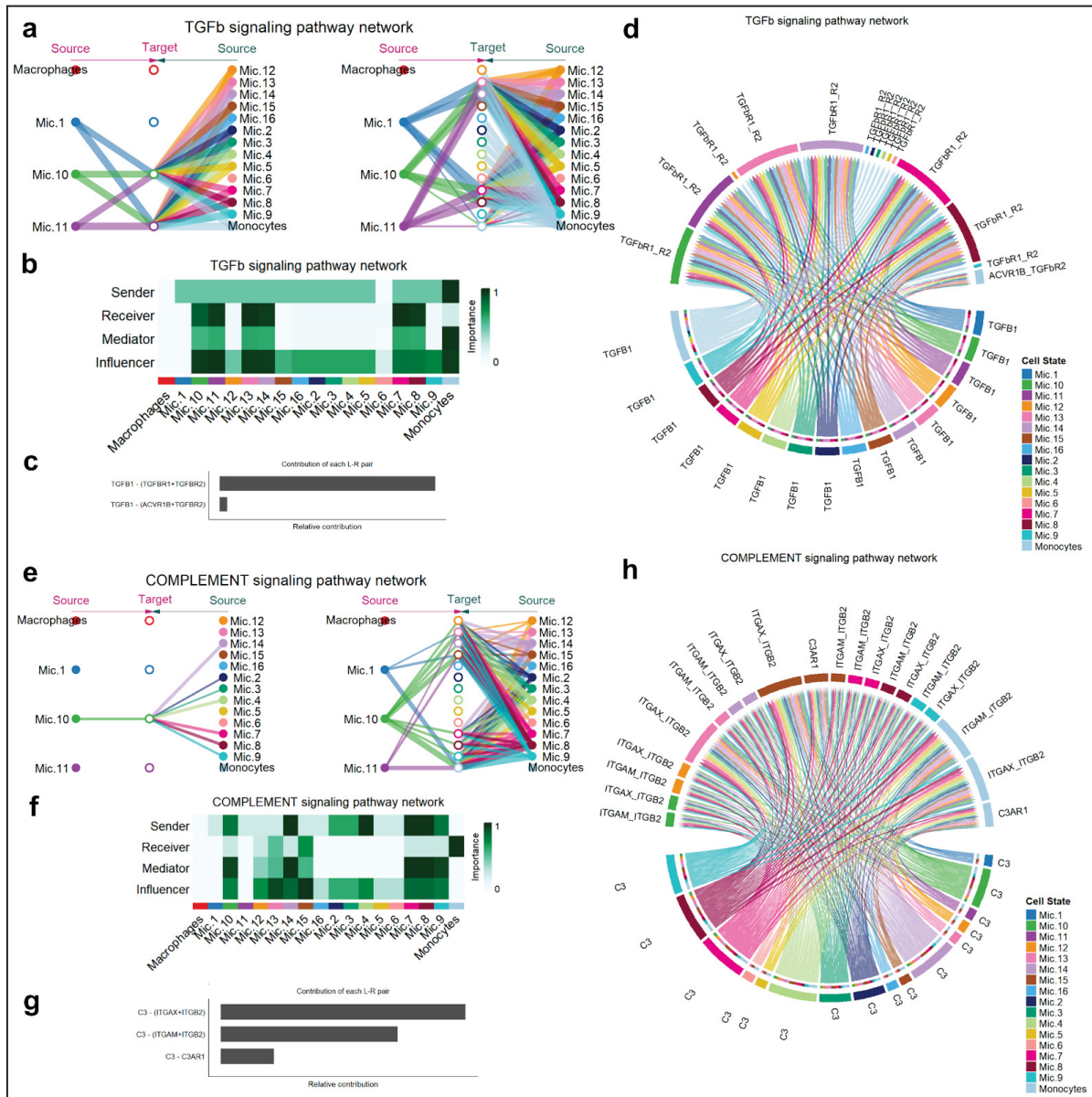
Supplementary Fig. 3: Contribution of AD traits to cytokine expression variation in specific cell types. Variance partition analysis using AD phenotypic data to assess the percentage of explained variance in cytokine expression for (a) excitatory neurons, (b) inhibitory neurons, (c) astrocytes, (d) oligodendrocytes progenitor cells (OPC cells), and (e) endothelial cells. The y-axis represents the percentage of variance explained, while the x-axis shows the variance factors, with medians indicated by horizontal lines in the box plots.



Supplementary Fig. 3: a) Density plot with PRS deciles distribution applied to 424 participants in the single nuclei data. **b)** Mean cytokine expression in each cell type compared with low and high-risk scores for AD. Box plots show the median, with the box spanning the first to third quartiles and whiskers extending 1.5 times the interquartile range. Dots represent the mean expression of each cytokine gene.



Supplementary Fig. 5: Association analysis between average cytokine family expression and AD phenotype variables in cell clusters. Heatmaps show significant associations between the average expression of cytokine families and AD phenotypic data in bulk data and across seven cell types in the single-nuclei dataset. Linear and/or logistic regressions were used to analyze the relationships between average cytokine family expression (columns) and phenotypic data (rows). Colors represent the $-\log_{10}$ of the p-value (** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$, . $P = 0.1$), ranging from highest (red) to lowest (blue).



Supplementary Fig. 6: The cell-cell interactions among microglial subpopulations in the TGFb and Complement signaling network. **a)** Hierarchical plot showing interactions between microglial subpopulations in the inferred TGFb signaling network. Solid circles indicate sources, while open circles indicate targets within the network. Intercellular interactions are represented by lines and colors corresponding to the source. The width of the edges reflects the communication probability. **b)** The heatmap shows the relative importance of each microglial cluster in the TGFb signaling network based on the four computed network centrality measures: sender, receiver, mediator, and influencer. **c)** Relative contribution of each ligand-receptor pair to the inferred TGFb signaling network. **d)** Chord diagram showing significant interactions among microglial subpopulations within the TGFb signaling network. Inner bar colors represent the target cells, while outer bars correspond to the color-coded microglial sources. **e)** The CellChat-inferred Complement signaling network. **f)** Computed network centrality analysis showing the relative importance of microglial subpopulations in the complement signaling network. **g)** Relative contribution of each C3 ligand-receptor pair. **h)** Significant microglial interactions in the inferred complement signaling network.

REFERENCES

- “Alzheimer Disease: An Update on Pathobiology and Treatment Strategies.” 2019. *Cell* 179 (2): 312–39.
- Assaf, Georges, and Maria Tanielian. 2018. “Mild Cognitive Impairment in Primary Care: A Clinical Review.” *Postgraduate Medical Journal* 94 (1117): 647–52.
- Bellenguez, C., F. Küçükali, I. E. Jansen, L. Klei, S. Moreno-Grau, N. Amin, A. C. Naj, et al. 2022. “New Insights into the Genetic Etiology of Alzheimer’s Disease and Related Dementias.” *Nature Genetics* 54 (4). <https://doi.org/10.1038/s41588-022-01024-z>.
- Bennett, D. A., J. A. Schneider, Y. Tang, S. E. Arnold, and R. S. Wilson. 2006. “The Effect of Social Networks on the Relation between Alzheimer’s Disease Pathology and Level of Cognitive Function in Old People: A Longitudinal Cohort Study.” *Lancet Neurology* 5 (5). [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(06\)70417-3](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(06)70417-3).
- Bennett, David A., Aron S. Buchman, Patricia A. Boyle, Lisa L. Barnes, Robert S. Wilson, and Julie A. Schneider. 2018. “Religious Orders Study and Rush Memory and Aging Project.” *Journal of Alzheimer’s Disease: JAD* 64 (s1): S161–89.
- Bennett, David A., Julie A. Schneider, Neelum T. Aggarwal, Zoe Arvanitakis, Raj C. Shah, Jeremiah F. Kelly, Jacob H. Fox, et al. 2006. “Decision Rules Guiding the Clinical Diagnosis of Alzheimer’s Disease in Two Community-Based Cohort Studies Compared to Standard Practice in a Clinic-Based Cohort Study.” *Neuroepidemiology* 27 (3): 169–76.
- Bennett, D. A., R. S. Wilson, J. A. Schneider, D. A. Evans, N. T. Aggarwal, S. E. Arnold, E. J. Cochran, E. Berry-Kravis, and J. L. Bienias. 2003. “Apolipoprotein E epsilon4 Allele, AD Pathology, and the Clinical Expression of Alzheimer’s Disease.” *Neurology* 60 (2). <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000042478.08543.f7>.
- Bennett, D. A., R. S. Wilson, J. A. Schneider, D. A. Evans, L. A. Beckett, N. T. Aggarwal, L. L. Barnes, J. H. Fox, and J. Bach. 2002. “Natural History of Mild Cognitive Impairment in Older Persons.” *Neurology* 59 (2): 198–205.
- Bis, Joshua C., Xueqiu Jian, Brian W. Kunkle, Yuning Chen, Kara L. Hamilton-Nelson, William S. Bush, William J. Salerno, et al. 2020. “Whole Exome Sequencing Study Identifies Novel Rare and Common Alzheimer’s-Associated Variants Involved in Immune Response and Transcriptional Regulation.” *Molecular Psychiatry* 25 (8): 1859–75.
- Bourgognon, Julie-Myrtille, and Jonathan Cavanagh. 2020. “The Role of Cytokines in Modulating Learning and Memory and Brain Plasticity.” *Brain and Neuroscience Advances*, December. <https://doi.org/10.1177/2398212820979802>.
- Chen, Zilin, Yekkuni L. Balachandran, Wai Po Chong, and Kannie W. Y. Chan. 2024. “Roles of Cytokines in Alzheimer’s Disease.” *International Journal of Molecular Sciences* 25 (11). <https://doi.org/10.3390/ijms25115803>.
- Cui, Ang, Teddy Huang, Shuqiang Li, Aileen Ma, Jorge L. Pérez, Chris Sander, Derin B. Keskin, Catherine J. Wu, Ernest Fraenkel, and Nir Hacohen. 2023. “Dictionary of Immune Responses to Cytokines at Single-Cell Resolution.” *Nature* 625 (7994): 377–84.

De Jager, Philip L., Joshua M. Shulman, Lori B. Chibnik, Brendan T. Keenan, Towfique Raj, Robert S. Wilson, Lei Yu, et al. 2012. "A Genome-Wide Scan for Common Variants Affecting the Rate of Age-Related Cognitive Decline." *Neurobiology of Aging* 33 (5): 1017.e1–15.

Flores-Aguilar, L., M. F. Iulita, C. Orciani, N. Tanna, J. Yang, D. A. Bennett, and A. C. Cuello. 2021. "Cognitive and Brain Cytokine Profile of Non-Demented Individuals with Cerebral Amyloid-Beta Deposition." *Journal of Neuroinflammation* 18 (1). <https://doi.org/10.1186/s12974-021-02169-0>.

Fujita, Masashi, Zongmei Gao, Lu Zeng, Cristin McCabe, Charles C. White, Bernard Ng, Gilad Sahar Green, et al. 2024. "Cell Subtype-Specific Effects of Genetic Variation in the Alzheimer's Disease Brain." *Nature Genetics* 56 (4): 605–14.

Green, Gilad Sahar, Masashi Fujita, Hyun-Sik Yang, Mariko Taga, Anael Cain, Cristin McCabe, Natacha Comandante-Lou, et al. 2024. "Cellular Communities Reveal Trajectories of Brain Ageing and Alzheimer's Disease." *Nature* 633 (8030): 634–45.

Hoffman, Gabriel E., and Eric E. Schadt. 2016. "variancePartition: Interpreting Drivers of Variation in Complex Gene Expression Studies." *BMC Bioinformatics* 17 (1): 1–13.

"Innate Immune Activation in Neurodegenerative Diseases." 2024. *Immunity* 57 (4): 790–814.

Kapasi, Alifiya, Jennifer Poirier, Ahmad Hedayat, Ashley Scherlek, Srabani Mondal, Tiffany Wu, John Gibbons, et al. 2023. "High-Throughput Digital Quantification of Alzheimer Disease Pathology and Associated Infrastructure in Large Autopsy Studies." *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 82 (12): 976–86.

Kepp, Kasper P., Nikolaos K. Robakis, Poul F. Høilund-Carsen, Stefano L. Sensi, and Bryce Vissel. 2023. "The Amyloid Cascade Hypothesis: An Updated Critical Review." *Brain: A Journal of Neurology* 146 (10): 3969–90.

Knopman, David S., Helene Amieva, Ronald C. Petersen, Gäel Chételat, David M. Holtzman, Bradley T. Hyman, Ralph A. Nixon, and David T. Jones. 2021. "Alzheimer Disease." *Nature Reviews Disease Primers* 7 (1): 1–21.

Lopes, Katia de Paiva, Lei Yu, Xianli Shen, Yiguo Qiu, Shinya Tasaki, Artemis Iatrou, Michal Schnaider Beeri, et al. 2024. "Associations of Cortical SPP1 and ITGAX with Cognition and Common Neuropathologies in Older Adults." *Alzheimer's & Dementia: The Journal of the Alzheimer's Association* 20 (1): 525–37.

"Neuroinflammation in Alzheimer's Disease." 2015. *Lancet Neurology* 14 (4): 388–405.

"Neurological Disorders: Public Health Challenges." 2006a. World Health Organization. May 1, 2006. <https://www.who.int/publications/i/item/9789241563369>.

———. 2006b. World Health Organization. May 1, 2006. <https://www.who.int/publications/i/item/9789241563369>.

Prins, Samantha, Marieke L. de Kam, Charlotte E. Teunissen, and Geert Jan Groeneveld. 2022. "Inflammatory Plasma Biomarkers in Subjects with Preclinical Alzheimer's Disease." *Alzheimer's Research & Therapy* 14 (1): 1–9.

Raj, Towfique, Katie Rothamel, Sara Mostafavi, Chun Ye, Mark N. Lee, Joseph M. Replogle, Ting Feng, et al. 2014. "Polarization of the Effects of Autoimmune and Neurodegenerative Risk Alleles in Leukocytes." *Science*, May. <https://doi.org/10.1126/science.1249547>.

Ray, Nicholas R., Brian W. Kunkle, Kara Hamilton-Nelson, Jiji T. Kurup, Farid Rajabli, Min Qiao, Badri N. Vardarajan, et al. 2024. "Extended Genome-Wide Association Study Employing the African Genome Resources Panel Identifies Novel Susceptibility Loci for Alzheimer's Disease in Individuals of African Ancestry." *Alzheimer's & Dementia: The Journal of the Alzheimer's Association* 20 (8): 5247–61.

Santoso, Clarissa S., Zhaorong Li, Sneha Lal, Samson Yuan, Kok Ann Gan, Luis M. Agosto, Xing Liu, et al. 2020. "Comprehensive Mapping of the Human Cytokine Gene Regulatory Network." *Nucleic Acids Research* 48 (21): 12055–73.

Schneider, Julie A., Zoe Arvanitakis, Woojeong Bang, and David A. Bennett. 2007. "Mixed Brain Pathologies Account for Most Dementia Cases in Community-Dwelling Older Persons." *Neurology* 69 (24): 2197–2204.

Selkoe, Dennis J., and John Hardy. 2016. "The Amyloid Hypothesis of Alzheimer's Disease at 25 Years." *EMBO Molecular Medicine*, March. <https://doi.org/10.15252/emmm.201606210>.

Sobue, Akira, Okiru Komine, and Koji Yamanaka. 2023. "Neuroinflammation in Alzheimer's Disease: microglial Signature and Their Relevance to Disease." *Inflammation and Regeneration* 43 (1): 1–6.

Tasaki, Shinya, Chris Gaiteri, Vladislav A. Petyuk, Katherine D. Blizinsky, Philip L. De Jager, Aron S. Buchman, and David A. Bennett. 2019. "Genetic Risk for Alzheimer's Dementia Predicts Motor Deficits through Multi-Omic Systems in Older Adults." *Translational Psychiatry* 9 (1): 1–11.

Wightman, Douglas P., Iris E. Jansen, Jeanne E. Savage, Alexey A. Shadrin, Shahram Bahrami, Dominic Holland, Arvid Rongve, et al. 2021. "A Genome-Wide Association Study with 1,126,563 Individuals Identifies New Risk Loci for Alzheimer's Disease." *Nature Genetics* 53 (9): 1276–82.

Wilson, Robert S., Patricia A. Boyle, Lei Yu, Lisa L. Barnes, Joel Sytsma, Aron S. Buchman, David A. Bennett, and Julie A. Schneider. 2015. "Temporal Course and Pathologic Basis of Unawareness of Memory Loss in Dementia." *Neurology* 85 (11): 984–91.

Zipp, Frauke, Stefan Bittner, and Dorothy P. Schafer. 2023. "Cytokines as Emerging Regulators of Central Nervous System Synapses." *Immunity* 56 (5): 914–25.

APÊNDICE B - LISTA DE CITOCINAS

Símbolo	ENSEMBL	Família
<i>CCL1</i>	ENSG00000108702	Quimiocina
<i>CCL11</i>	ENSG00000172156	Quimiocina
<i>CCL13</i>	ENSG00000181374	Quimiocina
<i>CCL14</i>	ENSG00000276409	Quimiocina
<i>CCL15</i>	ENSG00000275718	Quimiocina
<i>CCL18</i>	ENSG00000275385	Quimiocina
<i>CCL19</i>	ENSG00000172724	Quimiocina
<i>CCL2</i>	ENSG00000108691	Quimiocina
<i>CCL20</i>	ENSG00000115009	Quimiocina
<i>CCL21</i>	ENSG00000137077	Quimiocina
<i>CCL22</i>	ENSG00000102962	Quimiocina
<i>CCL23</i>	ENSG00000274736	Quimiocina
<i>CCL24</i>	ENSG00000106178	Quimiocina
<i>CCL25</i>	ENSG00000131142	Quimiocina
<i>CCL26</i>	ENSG00000006606	Quimiocina
<i>CCL27</i>	ENSG00000213927	Quimiocina
<i>CCL28</i>	ENSG00000151882	Quimiocina
<i>CCL3</i>	ENSG00000277632	Quimiocina
<i>CCL3L1</i>	ENSG00000277796	Quimiocina
<i>CCL4</i>	ENSG00000275302	Quimiocina
<i>CCL4L2</i>	ENSG00000276070	Quimiocina
<i>CCL5</i>	ENSG00000271503	Quimiocina
<i>CCL7</i>	ENSG00000108688	Quimiocina
<i>CCL8</i>	ENSG00000108700	Quimiocina
<i>CSF1</i>	ENSG00000184371	Fator de crescimento
<i>CSF2</i>	ENSG00000164400	Interleucina
<i>CX3CL1</i>	ENSG00000006210	Quimiocina
<i>CXCL10</i>	ENSG00000169245	Quimiocina
<i>CXCL11</i>	ENSG00000169248	Quimiocina
<i>CXCL13</i>	ENSG00000156234	Quimiocina
<i>CXCL14</i>	ENSG00000145824	Quimiocina
<i>CXCL17</i>	ENSG00000189377	Quimiocina
<i>CXCL2</i>	ENSG00000081041	Quimiocina

<i>CXCL3</i>	ENSG00000163734	Quimiocina
<i>CXCL5</i>	ENSG00000163735	Quimiocina
<i>CXCL8</i>	ENSG00000169429	Quimiocina
<i>CXCL9</i>	ENSG00000138755	Quimiocina
<i>IFNA1</i>	ENSG00000197919	Interferon
<i>IFNA10</i>	ENSG00000186803	Interferon
<i>IFNA13</i>	ENSG00000233816	Interferon
<i>IFNA14</i>	ENSG00000228083	Interferon
<i>IFNA16</i>	ENSG00000147885	Interferon
<i>IFNA17</i>	ENSG00000234829	Interferon
<i>IFNA2</i>	ENSG00000188379	Interferon
<i>IFNA21</i>	ENSG00000137080	Interferon
<i>IFNA4</i>	ENSG00000236637	Interferon
<i>IFNA5</i>	ENSG00000147873	Interferon
<i>IFNA6</i>	ENSG00000120235	Interferon
<i>IFNA7</i>	ENSG00000214042	Interferon
<i>IFNA8</i>	ENSG00000120242	Interferon
<i>IFNB1</i>	ENSG00000171855	Interferon
<i>IFNG</i>	ENSG00000111537	Interferon
<i>IFNK</i>	ENSG00000147896	Interferon
<i>IFNL1</i>	ENSG00000182393	Interferon
<i>IFNL3</i>	ENSG00000197110	Interferon
<i>IFNL4</i>	ENSG00000272395	Interferon
<i>IL10</i>	ENSG00000136634	Interleucina
<i>IL12A</i>	ENSG00000168811	Interleucina
<i>IL12B</i>	ENSG00000113302	Interleucina
<i>IL15</i>	ENSG00000164136	Interleucina
<i>IL16</i>	ENSG00000172349	Quimiocina
<i>IL17A</i>	ENSG00000112115	Interleucina
<i>IL17B</i>	ENSG00000127743	Interleucina
<i>IL17F</i>	ENSG00000112116	Interleucina
<i>IL18</i>	ENSG00000150782	Interleucina
<i>IL1A</i>	ENSG00000115008	Interleucina
<i>IL1B</i>	ENSG00000125538	Interleucina
<i>IL1RN</i>	ENSG00000136689	Interleucina
<i>IL2</i>	ENSG00000109471	Interleucina
<i>IL20</i>	ENSG00000162891	Interleucina

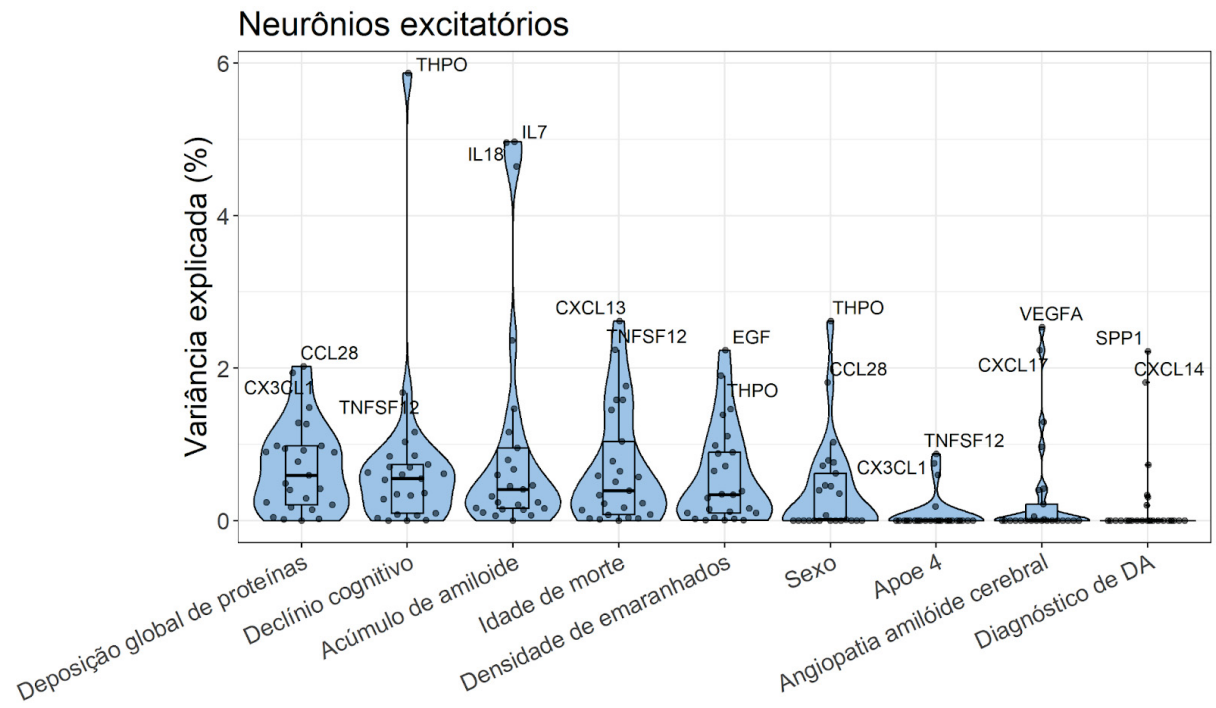
<i>IL21</i>	ENSG00000138684	Interleucina
<i>IL22</i>	ENSG00000127318	Interleucina
<i>IL23A</i>	ENSG00000110944	Interleucina
<i>IL25</i>	ENSG00000166090	Interleucina
<i>IL26</i>	ENSG00000111536	Interleucina
<i>IL27</i>	ENSG00000197272	Interleucina
<i>IL3</i>	ENSG00000164399	Interleucina
<i>IL31</i>	ENSG00000204671	Interleucina
<i>IL32</i>	ENSG00000008517	Interleucina
<i>IL33</i>	ENSG00000137033	Interleucina
<i>IL34</i>	ENSG00000157368	Fator de crescimento
<i>IL36A</i>	ENSG00000136694	Interleucina
<i>IL36B</i>	ENSG00000136696	Interleucina
<i>IL36G</i>	ENSG00000136688	Interleucina
<i>IL37</i>	ENSG00000125571	Interleucina
<i>IL5</i>	ENSG00000113525	Interleucina
<i>IL6</i>	ENSG00000136244	Interleucina
<i>IL7</i>	ENSG00000104432	Interleucina
<i>IL9</i>	ENSG00000145839	Interleucina
<i>KITLG</i>	ENSG00000049130	Fator de crescimento
<i>LTA</i>	ENSG00000226979	TNF
<i>LTB</i>	ENSG00000227507	TNF
<i>OSM</i>	ENSG00000099985	Interleucina
<i>PF4V1</i>	ENSG00000109272	Quimiocina
<i>PPBP</i>	ENSG00000163736	Quimiocina
<i>TNF</i>	ENSG00000232810	TNF
<i>TNFSF10</i>	ENSG00000121858	TNF
<i>TNFSF12</i>	ENSG00000239697	TNF
<i>TNFSF13</i>	ENSG00000161955	TNF
<i>TNFSF13B</i>	ENSG00000102524	TNF
<i>TNFSF14</i>	ENSG00000125735	TNF
<i>TNFSF15</i>	ENSG00000181634	TNF
<i>TNFSF18</i>	ENSG00000120337	TNF
<i>TNFSF4</i>	ENSG00000117586	TNF
<i>TNFSF8</i>	ENSG00000106952	TNF
<i>TNFSF9</i>	ENSG00000125657	TNF
<i>XCL1</i>	ENSG00000143184	Quimiocina

<i>XCL2</i>	ENSG00000143185	Quimiocina
<i>IL36RN</i>	ENSG00000136695	Interleucina
<i>IL4</i>	ENSG00000113520	Interleucina
<i>IL13</i>	ENSG00000169194	Interleucina
<i>TSLP</i>	ENSG00000145777	Interleucina
<i>IL11</i>	ENSG00000095752	Interleucina
<i>EBI3</i>	ENSG00000105246	Interleucina
<i>LIF</i>	ENSG00000128342	Interleucina
<i>CTF1</i>	ENSG00000150281	Interleucina
<i>CTF2P</i>	ENSG00000230447	Interleucina
<i>IL19</i>	ENSG00000142224	Interleucina
<i>IL24</i>	ENSG00000162892	Interleucina
<i>IL17C</i>	ENSG00000124391	Interleucina
<i>IL17D</i>	ENSG00000172458	Interleucina
<i>IFNE</i>	ENSG00000184995	Interferon
<i>IFNL2</i>	ENSG00000183709	Interferon
<i>CD40LG</i>	ENSG00000102245	TNF
<i>FASLG</i>	ENSG00000117560	TNF
<i>CD70</i>	ENSG00000125726	TNF
<i>TNFSF11</i>	ENSG00000120659	TNF
<i>C3</i>	ENSG00000125730	Complemento
<i>C5</i>	ENSG00000106804	Complemento
<i>FLT3LG</i>	ENSG00000090554	Fator de crescimento
<i>CSF3</i>	ENSG00000108342	Fator de crescimento
<i>EGF</i>	ENSG00000138798	Fator de crescimento
<i>VEGFA</i>	ENSG00000112715	Fator de crescimento
<i>FGF2</i>	ENSG00000138685	Fator de crescimento
<i>HGF</i>	ENSG00000019991	Fator de crescimento
<i>IGF1</i>	ENSG00000017427	Fator de crescimento
<i>TGFB1</i>	ENSG00000105329	Outro
<i>GDNF</i>	ENSG00000168621	Outro
<i>PSPN</i>	ENSG00000125650	Outro
<i>PRL</i>	ENSG00000172179	Outro
<i>LEP</i>	ENSG00000174697	Outro
<i>ADIPOQ</i>	ENSG00000181092	Outro
<i>RETN</i>	ENSG00000104918	Outro
<i>NOG</i>	ENSG00000183691	Outro

<i>DCN</i>	ENSG00000011465	Outro
<i>THPO</i>	ENSG00000090534	Outro
<i>SPPI</i>	ENSG00000118785	Outro

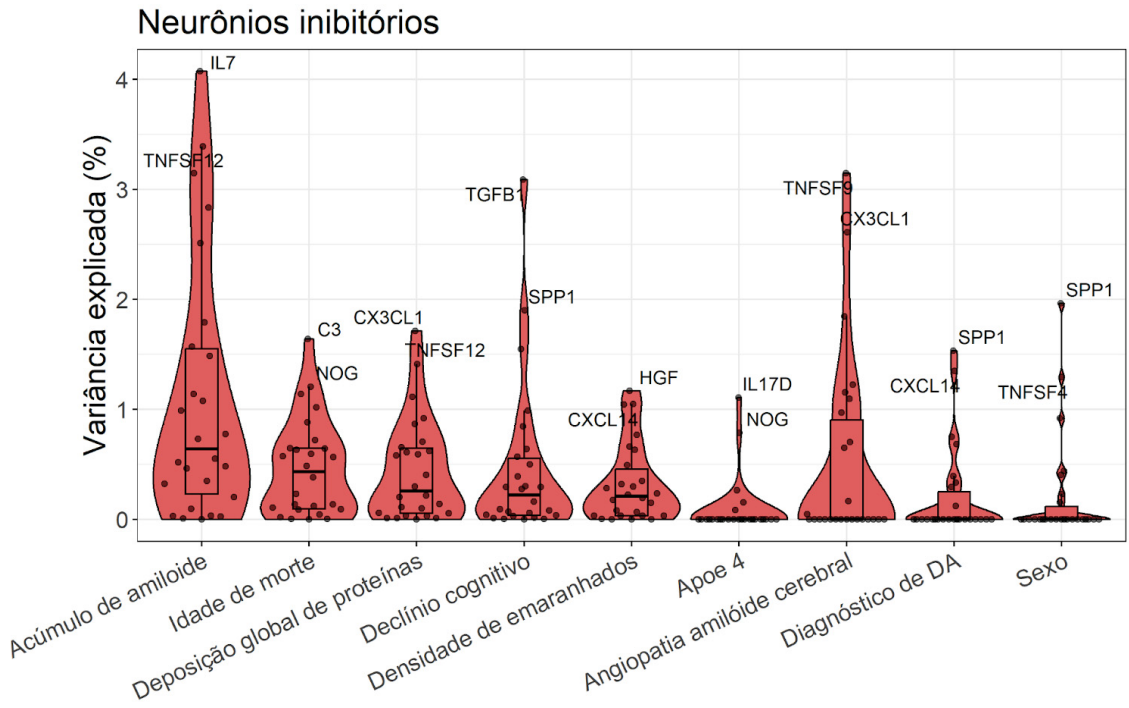
FONTE: a Autora (2025)

**APÊNDICE C - VARIAÇÃO PERCENTUAL DE CITOCINAS NOS NEURÔNIOS
EXCITATÓRIOS EXPLICADA PELO FENÓTIPO**



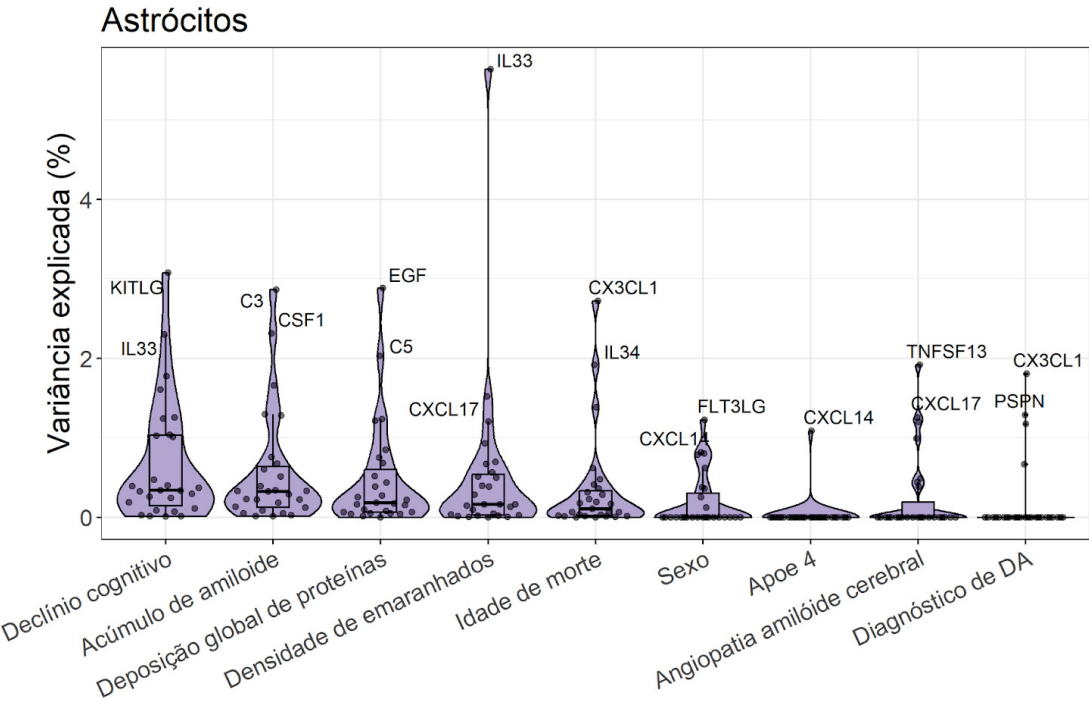
FONTE: a Autora (2025)

APÊNDICE D - VARIAÇÃO PERCENTUAL DE CITOCINAS NOS NEURÔNIOS INIBITÓRIOS EXPLICADA PELO FENÓTIPO



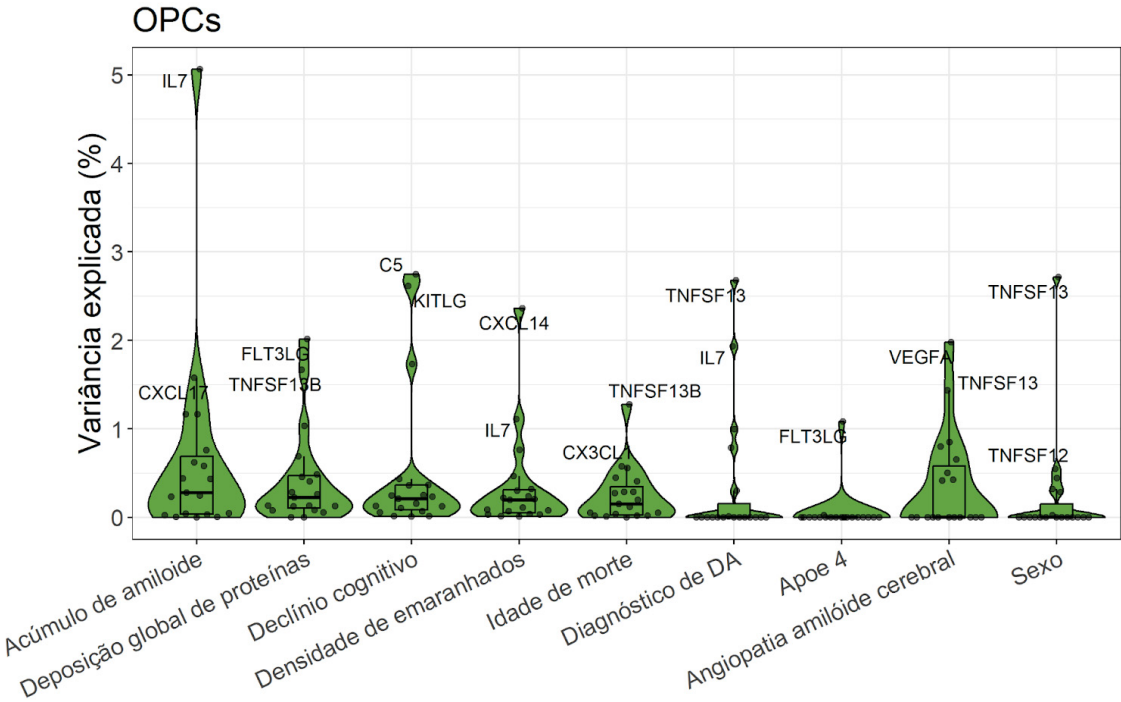
FONTE: a Autora (2025)

**APÊNDICE E - VARIAÇÃO PERCENTUAL DE CITOCINAS NOS ASTRÓCITOS
EXPLICADA PELO FENÓTIPO**



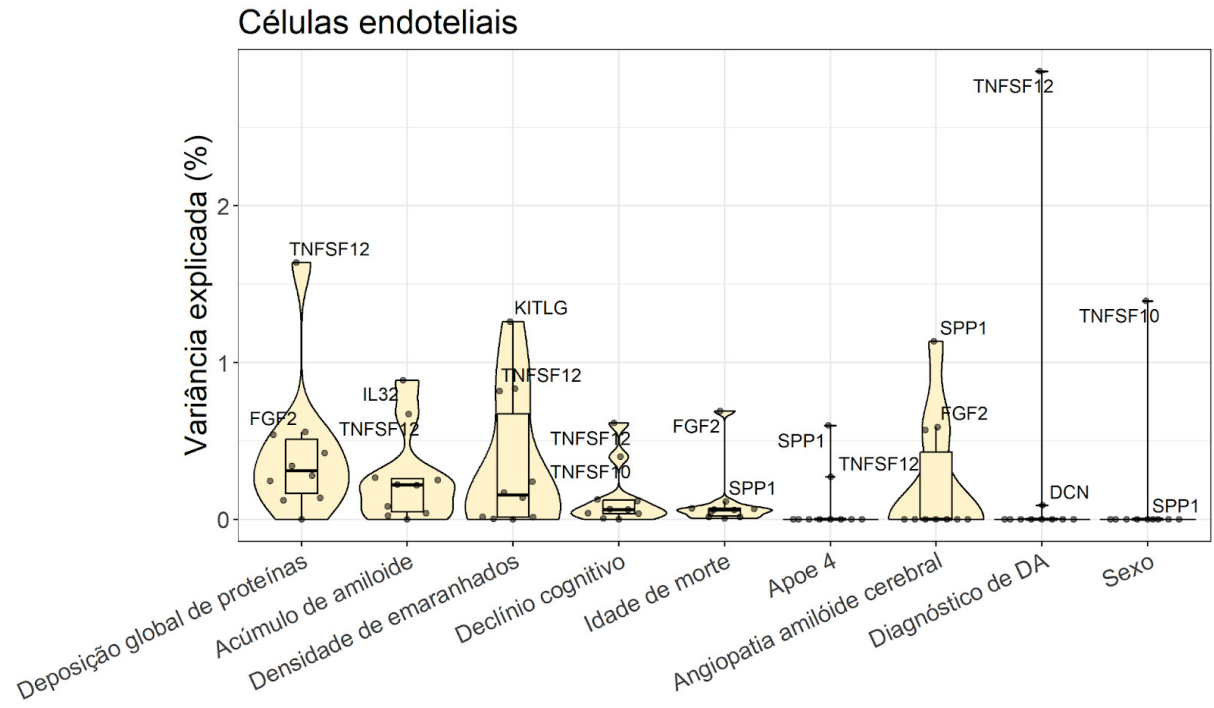
FONTE: a Autora (2025)

APÊNDICE F -VARIAÇÃO PERCENTUAL DE CITOCINAS NOS OPCs
EXPLICADA PELO FENÓTIPO



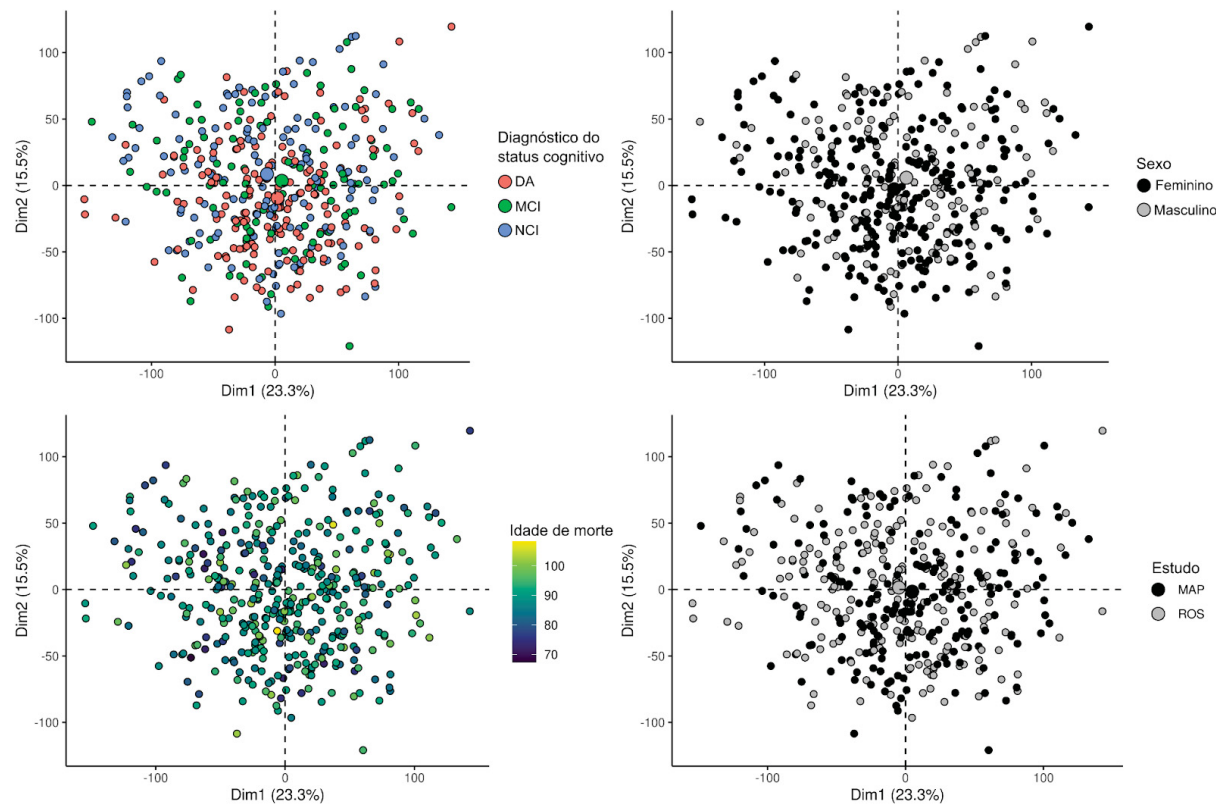
FONTE: a Autora (2025)

**APÊNDICE G - VARIAÇÃO PERCENTUAL DE CITOCINAS NAS CÉLULAS
ENDOTELIAIS EXPLICADA PELO FENÓTIPO**



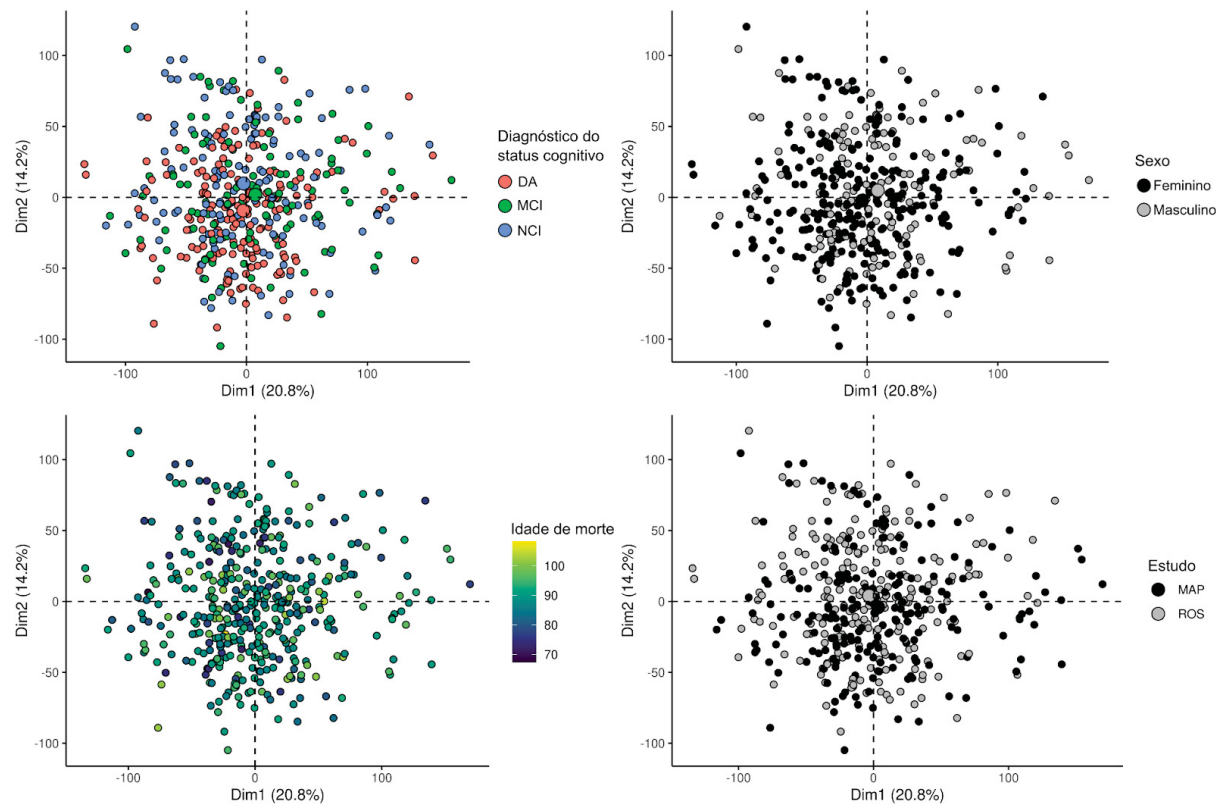
FONTE: a Autora (2025)

APÊNDICE H - PC1 E PC2 DOS NEURÔNIOS EXCITATÓRIOS APÓS
AJUSTE PELAS VARIÁVEIS TÉCNICAS



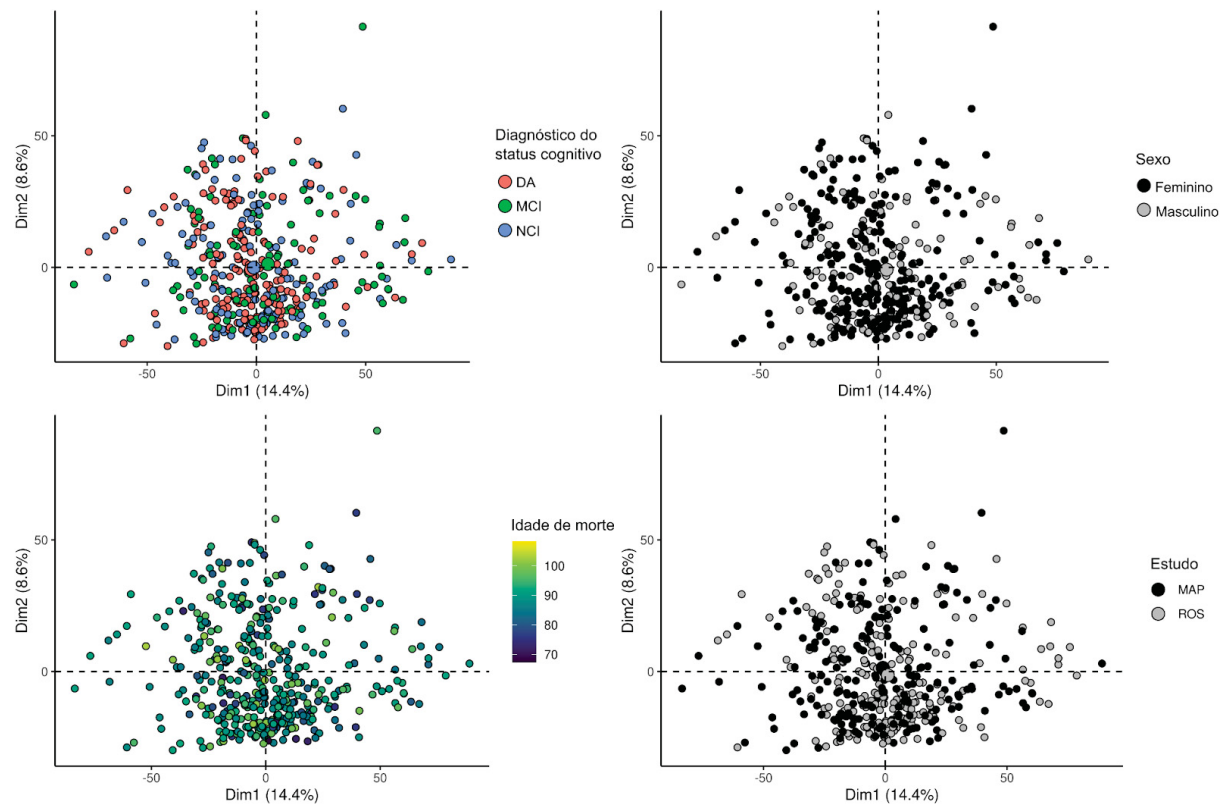
FONTE: a Autora (2025)

APÊNDICE I - PC1 E PC2 DOS NEURÔNIOS INIBITÓRIOS APÓS AJUSTE
PELAS VARIÁVEIS TÉCNICAS



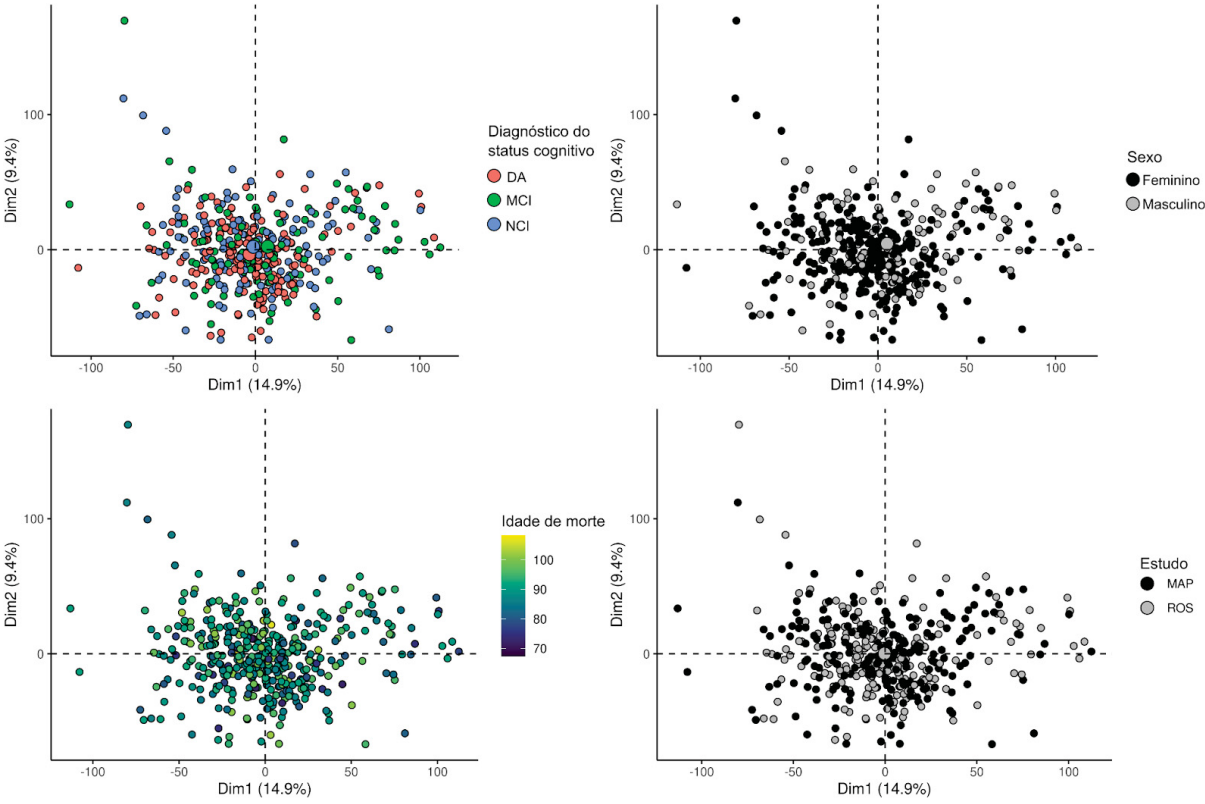
FONTE: a Autora (2025)

APÊNDICE J - PC1 E PC2 DA MICROGLIA APÓS AJUSTE PELAS
VARIÁVEIS TÉCNICAS



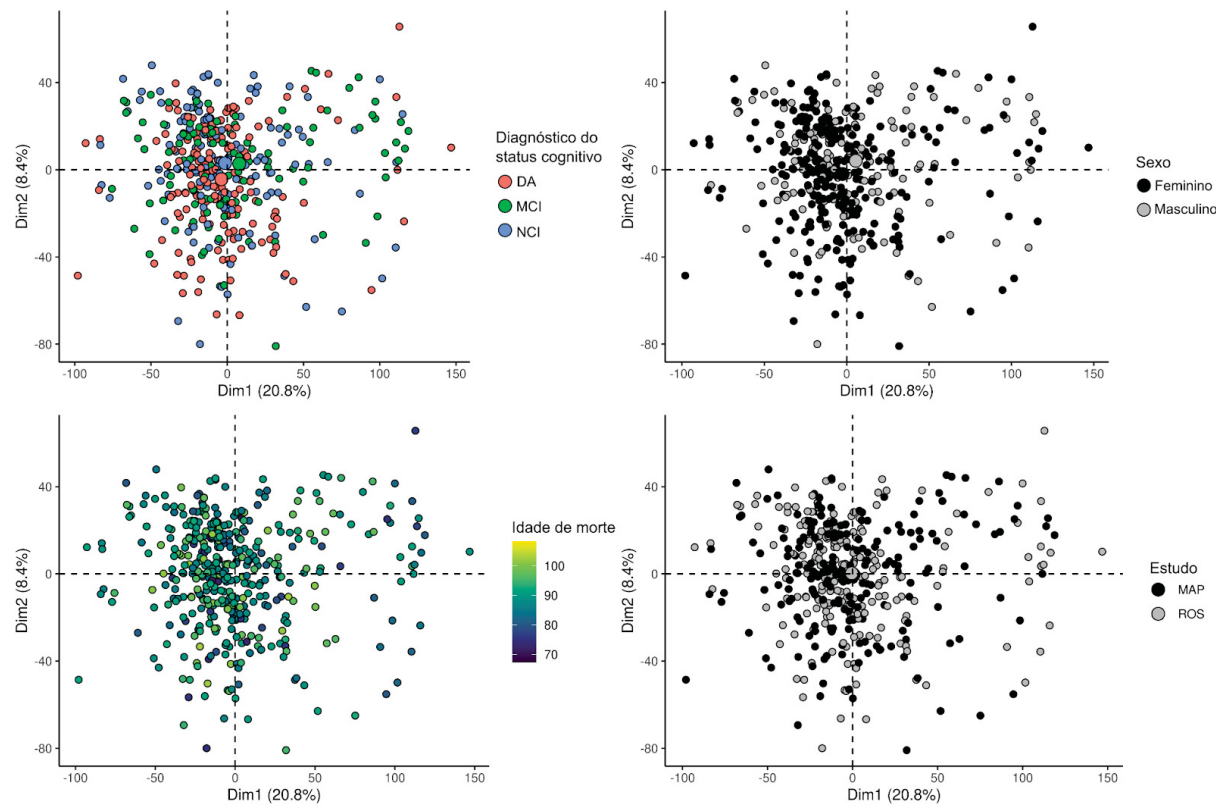
FONTE: a Autora (2025)

**APÊNDICE K - PC1 E PC2 DOS ASTRÓCITOS APÓS AJUSTE PELAS VARIÁVEIS
TÉCNICAS**



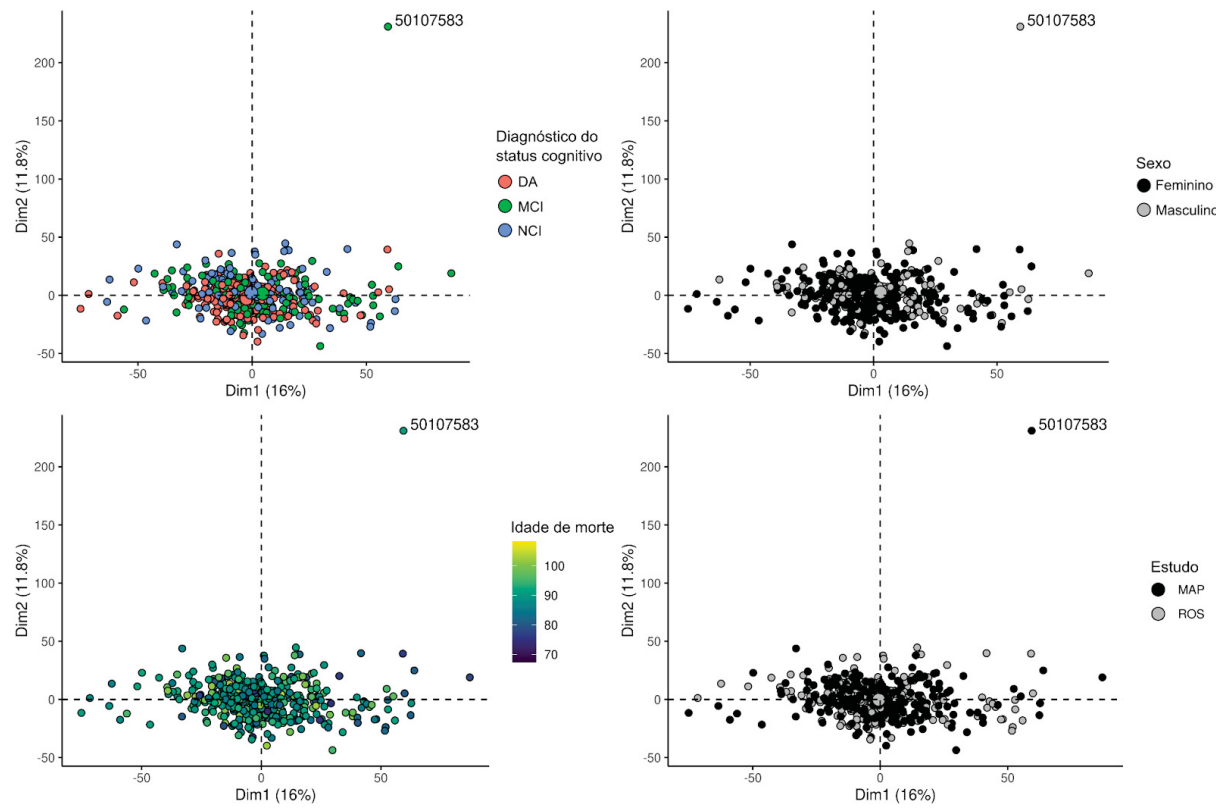
FONTE: a Autora (2025)

APÊNDICE L - PC1 E PC2 DOS OLIGODENDRÓCITOS APÓS AJUSTE PELAS
VARIÁVEIS TÉCNICAS



FONTE: a Autora (2025)

APÊNDICE M - PC1 E PC2 DAS OPCs APÓS AJUSTE PELAS VARIÁVEIS
TÉCNICAS



FONTE: a Autora (2025)

Legenda: o *outlier* destacado nos gráficos foi removido para as análises subsequentes.

APÊNDICE N - COMPONENTES PRINCIPAIS DA ANÁLISE DO BULK RNA-SEQ

Análise de Componentes Principais - Bulk RNA-seq										
	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5	PC6	PC7	PC8	PC9	PC10
<i>CX3CL1</i>	-0,153	0,175	0,014	-0,220	0,095	-0,146	0,317	-0,024	0,115	-0,005
<i>IL32</i>	0,158	0,120	0,129	-0,172	0,035	-0,207	0,178	-0,200	-0,093	0,266
<i>DCN</i>	0,180	-0,077	-0,081	0,068	0,072	-0,332	0,058	-0,121	0,130	-0,140
<i>IGF1</i>	-0,188	0,082	0,023	-0,039	0,400	-0,052	-0,126	-0,009	-0,080	0,135
<i>HGF</i>	0,220	0,077	0,147	-0,172	0,040	-0,009	-0,172	0,099	0,008	-0,279
<i>KITLG</i>	-0,148	0,156	0,007	-0,207	0,260	0,065	-0,138	-0,221	0,053	-0,018
<i>CXCL2</i>	0,179	0,089	0,233	0,043	0,001	-0,070	0,094	-0,109	0,361	0,183
<i>THPO</i>	-0,150	-0,084	0,211	-0,030	0,228	0,110	0,207	0,037	0,085	-0,136
<i>FLT3LG</i>	0,147	-0,023	-0,073	-0,029	-0,140	-0,150	0,003	0,138	-0,155	-0,304
<i>IL11</i>	-0,094	0,068	0,026	-0,082	-0,073	-0,052	-0,205	-0,242	0,080	0,154
<i>TNFSF13B</i>	0,080	0,165	-0,044	0,055	0,261	0,090	-0,008	-0,168	-0,277	0,042
<i>EBI3</i>	0,226	0,119	-0,112	0,023	0,161	0,212	0,033	0,049	0,076	0,111
<i>TGFB1</i>	0,278	0,059	-0,145	0,024	0,000	0,021	-0,125	0,067	0,123	-0,008
<i>C5</i>	0,054	-0,372	0,082	0,166	-0,044	-0,035	0,029	0,008	0,064	0,022
<i>CCL2</i>	0,192	0,234	0,274	0,048	-0,011	-0,056	-0,120	-0,029	-0,011	-0,092
<i>VEGFA</i>	0,087	0,111	0,101	-0,292	0,022	0,030	-0,086	0,320	-0,113	-0,077
<i>TNFSF4</i>	0,013	-0,139	0,040	-0,187	0,001	0,300	0,104	-0,207	-0,121	0,223
<i>SPPI</i>	0,218	0,219	-0,031	0,162	-0,083	0,021	-0,041	0,200	-0,055	-0,011
<i>TNFSF10</i>	0,058	-0,065	-0,201	0,064	0,217	-0,400	0,253	-0,087	-0,225	-0,083
<i>IL1B</i>	0,170	0,199	0,226	0,021	0,142	0,076	0,074	0,025	0,039	0,136
<i>PSPN</i>	0,041	0,127	-0,222	-0,380	-0,272	0,074	0,076	-0,030	0,040	0,002

	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5	PC6	PC7	PC8	PC9	PC10
<i>TNFSF9</i>	-0,108	0,180	0,184	0,118	-0,079	0,053	-0,231	0,030	-0,111	0,113
<i>C3</i>	0,232	0,097	-0,157	0,211	0,271	0,135	-0,004	0,013	0,010	0,021
<i>IL33</i>	0,136	-0,244	0,225	-0,045	0,239	0,135	0,096	-0,032	-0,209	-0,062
<i>FGF2</i>	0,273	-0,141	0,150	-0,162	-0,038	0,117	-0,042	-0,005	-0,047	-0,079
<i>EGF</i>	0,003	0,083	0,043	0,014	-0,129	0,233	-0,071	-0,449	-0,217	-0,261
<i>CXCL14</i>	0,019	-0,126	0,127	-0,332	0,314	-0,174	-0,206	0,209	0,020	-0,049
<i>CTF1</i>	0,105	-0,206	0,013	0,049	0,007	-0,057	-0,372	0,050	0,085	0,015
<i>IL18</i>	0,181	0,025	-0,323	0,139	0,211	0,142	-0,042	0,008	0,086	-0,033
<i>CCL28</i>	-0,095	0,005	0,151	0,174	0,008	0,089	-0,040	-0,173	0,052	-0,353
<i>IL34</i>	-0,099	0,207	-0,060	-0,281	-0,048	0,072	0,195	0,155	-0,002	-0,206
<i>TNFSF13</i>	0,195	-0,280	0,070	-0,149	0,088	0,135	0,047	0,032	0,028	0,090
<i>CXCL5</i>	0,100	0,033	0,178	-0,018	0,006	0,081	0,036	-0,313	0,043	-0,313
<i>IL15</i>	0,119	0,094	-0,031	0,134	-0,017	-0,302	0,028	-0,217	-0,062	-0,020
<i>GDNF</i>	0,055	0,029	0,113	0,124	-0,233	0,133	0,108	0,125	-0,370	0,301
<i>IL12A</i>	0,074	0,015	0,198	0,003	-0,018	-0,258	0,109	0,050	-0,400	0,059
<i>CXCL8</i>	0,194	0,142	0,194	-0,021	-0,064	-0,102	0,013	-0,086	0,310	0,205
<i>IL16</i>	0,162	0,116	-0,337	-0,067	0,129	0,175	0,078	-0,037	-0,098	0,021
<i>IL17D</i>	0,113	-0,372	-0,016	-0,083	0,003	0,055	0,059	-0,105	-0,033	0,079
<i>NOG</i>	-0,050	-0,015	-0,135	-0,163	0,022	-0,175	-0,499	-0,166	-0,197	0,151
<i>CSF1</i>	0,277	0,041	0,004	-0,111	-0,165	-0,049	-0,022	-0,042	-0,120	-0,061
<i>TNFSF12</i>	0,128	-0,145	-0,198	-0,264	-0,151	-0,066	0,018	-0,217	0,108	0,060
Desvio padrão	2,883	2,001	1,619	1,540	1,400	1,300	1,224	1,193	1,117	1,060

	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5	PC6	PC7	PC8	PC9	PC10
Variância (%)	19,79	9,53	6,23	5,64	4,66	4,02	3,56	3,38	2,97	2,67
Variância acumulada	19,79	29,32	35,56	41,21	45,87	49,90	53,46	56,85	59,82	62,50

FONTE: a Autora (2025)

APÊNDICE O - COMPONENTES PRINCIPAIS DOS NEURÔNIOS EXCITATÓRIOS

Análise de Componentes Principais - Neurônios Excitatórios										
	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5	PC6	PC7	PC8	PC9	PC10
<i>CX3CL1</i>	0,152	0,383	-0,030	0,139	-0,056	-0,018	0,086	-0,040	0,130	0,090
<i>HGF</i>	0,206	-0,039	0,319	-0,109	-0,027	0,060	0,154	-0,029	-0,312	-0,540
<i>KITLG</i>	0,050	-0,053	-0,238	0,148	-0,229	-0,604	-0,069	0,281	-0,082	0,217
<i>THPO</i>	-0,222	0,114	-0,175	-0,139	0,291	-0,224	-0,150	-0,088	-0,155	0,218
<i>TNFSF13B</i>	0,202	-0,292	-0,090	0,122	-0,269	0,149	-0,046	-0,048	-0,075	0,173
<i>IL7</i>	-0,338	0,145	0,154	0,014	-0,292	-0,011	0,091	0,081	0,024	0,002
<i>TGFB1</i>	-0,335	0,127	0,199	-0,107	-0,212	0,110	-0,009	0,118	0,089	0,042
<i>C5</i>	-0,226	-0,103	0,107	0,087	0,328	-0,259	-0,263	0,081	-0,214	-0,261
<i>VEGFA</i>	0,159	0,225	-0,204	-0,160	-0,156	-0,007	0,149	0,209	-0,474	-0,261
<i>TNFSF4</i>	0,049	-0,343	0,099	0,128	-0,219	0,115	-0,153	0,012	-0,092	0,144
<i>SPP1</i>	0,250	0,096	0,345	-0,195	-0,055	-0,258	-0,132	0,026	0,058	0,098
<i>PSPN</i>	0,227	0,303	-0,028	0,193	-0,173	0,122	-0,075	-0,086	0,041	0,016
<i>TNFSF9</i>	0,138	0,272	-0,052	0,139	0,086	0,108	0,045	0,526	-0,337	0,216
<i>FGF2</i>	0,232	-0,008	0,388	-0,199	-0,115	-0,152	-0,094	0,070	-0,049	0,118
<i>EGF</i>	-0,060	-0,188	0,251	0,123	0,104	0,039	0,438	-0,035	-0,321	0,428
<i>CXCL14</i>	0,256	0,077	0,332	-0,205	0,006	-0,206	-0,178	-0,081	0,108	0,162
<i>IL18</i>	-0,343	0,191	0,135	-0,054	-0,216	-0,091	0,075	0,066	-0,030	-0,058
<i>CCL28</i>	-0,070	0,100	0,244	0,012	0,350	0,430	-0,312	0,175	-0,146	0,238
<i>CXCL13</i>	0,063	-0,210	-0,056	-0,205	0,016	0,143	-0,097	0,670	0,401	-0,132
<i>IL34</i>	0,050	0,136	-0,215	-0,472	0,023	0,144	0,247	-0,024	0,133	0,187

	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5	PC6	PC7	PC8	PC9	PC10
<i>IL15</i>	0,042	-0,165	0,178	0,093	0,192	-0,118	0,602	0,163	0,209	0,007
<i>IL16</i>	-0,015	-0,234	-0,097	-0,164	-0,359	0,208	-0,137	-0,050	-0,219	0,082
<i>IL17D</i>	0,037	0,008	-0,157	-0,534	0,099	-0,008	0,058	-0,132	-0,126	0,121
<i>CXCL17</i>	-0,314	0,186	0,189	-0,035	-0,254	0,036	0,011	0,018	0,013	0,055
<i>TNFSF12</i>	0,222	0,303	0,009	0,264	0,039	0,117	-0,019	-0,095	0,134	-0,009
Desvio padrão	2,327	2,010	1,622	1,483	1,320	1,105	1,047	0,944	0,906	0,817
Variância (%)	21,66	16,16	10,52	8,80	6,97	4,88	4,38	3,56	3,28	2,66
Variância acumulada	21,66	37,83	48,35	57,16	64,13	69,01	73,39	76,96	80,24	82,91

FONTE: a Autora (2025)

APÊNDICE P - COMPONENTES PRINCIPAIS DOS NEURÔNIOS INIBITÓRIOS

Análise de Componentes Principais - Neurônios Inibitórios										
	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5	PC6	PC7	PC8	PC9	PC10
<i>CX3CL1</i>	0,121	-0,395	0,002	-0,173	0,073	-0,083	0,079	-0,055	-0,031	0,164
<i>DCN</i>	0,220	-0,015	-0,198	-0,217	0,109	0,147	0,209	0,441	-0,224	0,152
<i>IGF1</i>	0,048	-0,229	-0,364	0,100	-0,181	0,291	-0,186	0,002	0,089	0,036
<i>HGF</i>	-0,107	0,077	-0,106	-0,544	-0,106	-0,066	-0,306	0,132	-0,019	-0,097
<i>KITLG</i>	-0,234	-0,099	-0,278	-0,106	-0,233	0,317	-0,148	-0,018	0,171	-0,011
<i>TNFSF13B</i>	-0,301	0,195	-0,022	-0,198	0,220	0,132	0,180	-0,146	-0,118	-0,120
<i>IL7</i>	0,383	0,030	0,194	-0,131	-0,059	0,239	0,043	-0,182	0,058	0,015
<i>TGFB1</i>	0,381	0,026	0,238	-0,020	-0,048	0,178	0,019	-0,142	0,028	0,115
<i>C5</i>	-0,014	0,191	-0,170	0,257	-0,182	0,001	0,235	0,315	0,424	0,075
<i>VEGFA</i>	-0,021	-0,290	-0,124	-0,266	0,137	0,049	-0,118	-0,319	0,147	-0,050
<i>TNFSF4</i>	-0,140	0,243	-0,033	-0,017	0,001	0,213	0,256	-0,115	-0,094	0,198
<i>SPPI</i>	-0,233	-0,231	0,380	-0,002	-0,156	0,110	0,041	0,017	-0,074	0,040
<i>PSPN</i>	-0,085	-0,264	-0,031	0,008	0,219	-0,025	0,343	0,022	0,140	-0,260
<i>TNFSF9</i>	0,089	-0,266	-0,032	-0,109	-0,065	-0,303	0,145	-0,080	-0,336	-0,231
<i>C3</i>	-0,228	-0,134	0,418	0,066	-0,153	0,142	-0,015	0,078	-0,032	0,087
<i>FGF2</i>	-0,269	-0,138	0,205	-0,009	-0,134	0,320	0,115	0,122	-0,112	0,138
<i>EGF</i>	0,254	0,010	-0,124	-0,039	0,054	0,247	-0,134	0,382	-0,395	-0,003
<i>CXCL14</i>	0,118	-0,189	-0,254	0,409	0,083	0,025	0,183	-0,199	-0,116	0,157
<i>IL18</i>	0,374	-0,028	0,216	-0,076	-0,098	0,229	-0,046	-0,132	0,157	0,039
<i>CXCL13</i>	-0,062	0,190	0,011	-0,080	-0,177	-0,366	-0,074	-0,096	-0,220	0,614
<i>IL34</i>	-0,003	-0,068	0,070	0,254	0,489	-0,037	-0,329	-0,016	-0,031	0,171

	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5	PC6	PC7	PC8	PC9	PC10
<i>IL15</i>	-0,048	0,057	-0,101	0,309	-0,318	0,137	-0,101	-0,224	-0,517	-0,306
<i>IL16</i>	-0,139	0,163	-0,014	-0,074	0,475	0,345	0,104	-0,108	-0,132	0,096
<i>IL17D</i>	-0,078	-0,122	0,175	0,218	0,204	0,020	-0,462	0,294	0,023	-0,066
<i>NOG</i>	-0,136	-0,225	-0,249	-0,023	-0,025	0,083	-0,129	-0,193	0,020	0,393
<i>TNFSF12</i>	-0,057	-0,391	0,044	-0,019	-0,034	-0,079	0,243	0,263	-0,060	0,146
Desvio padrão	2,086	1,876	1,545	1,312	1,243	1,161	1,114	1,037	0,941	0,904
Variância (%)	16,74	13,54	9,18	6,61	5,93	5,18	4,77	4,13	3,40	3,14
Variância acumulada	16,74	30,28	39,46	46,08	52,01	57,20	61,97	66,10	69,50	72,65

FONTE: a Autora (2025)

APÊNDICE Q - COMPONENTES PRINCIPAIS DA MICROGLIA

Análise de Componentes Principais - Microglia										
	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5	PC6	PC7	PC8	PC9	PC10
<i>CX3CL1</i>	-0,339	0,288	-0,016	0,070	-0,013	0,056	-0,040	0,041	0,007	0,062
<i>IGF1</i>	0,225	0,235	-0,231	0,154	0,057	0,169	-0,118	0,090	-0,092	0,085
<i>HGF</i>	0,210	0,113	0,018	0,127	-0,442	0,012	-0,282	-0,191	-0,132	-0,019
<i>KITLG</i>	-0,301	0,249	0,056	0,069	0,061	0,041	-0,012	-0,027	-0,054	-0,126
<i>FLT3LG</i>	0,026	0,006	-0,012	-0,134	0,021	0,599	0,481	-0,026	0,417	0,265
<i>TNFSF13B</i>	0,043	-0,085	0,385	0,200	0,140	0,233	-0,379	0,010	0,171	0,030
<i>IL7</i>	0,100	0,055	-0,122	-0,172	0,378	-0,005	-0,063	-0,750	-0,136	-0,039
<i>EBI3</i>	-0,128	-0,261	-0,103	0,195	-0,091	-0,225	-0,009	-0,200	0,541	-0,023
<i>TGFB1</i>	-0,028	-0,132	-0,320	0,014	-0,366	-0,330	0,245	0,016	0,084	-0,164
<i>C5</i>	0,162	0,140	0,301	0,183	-0,063	0,048	0,162	0,107	0,019	-0,396
<i>TNFSF8</i>	0,132	0,059	0,091	-0,069	-0,570	0,258	-0,057	-0,316	0,129	-0,016
<i>VEGFA</i>	-0,162	-0,192	0,193	-0,328	0,065	-0,102	-0,217	0,035	0,096	0,161
<i>IL1A</i>	-0,107	-0,241	-0,240	-0,067	-0,083	0,348	-0,179	-0,113	-0,066	-0,361
<i>SPPI</i>	-0,205	-0,314	0,208	-0,060	-0,091	0,088	-0,002	0,016	-0,037	-0,055
<i>TNFSF10</i>	0,060	-0,081	-0,206	0,489	0,142	0,160	-0,156	-0,020	0,008	0,147
<i>IL1B</i>	-0,200	-0,361	-0,097	-0,024	0,036	0,111	-0,232	-0,026	0,000	-0,146
<i>C3</i>	0,063	-0,189	-0,312	0,334	0,034	0,190	-0,030	0,229	-0,085	0,017
<i>FGF2</i>	-0,176	0,206	-0,170	0,053	0,036	0,034	-0,223	-0,054	0,312	-0,211
<i>CXCL14</i>	-0,345	0,255	0,036	0,045	-0,013	0,061	-0,040	-0,057	0,033	0,002
<i>IL18</i>	0,162	0,058	0,163	0,338	0,199	-0,159	0,270	-0,233	0,157	-0,304
<i>IL34</i>	-0,271	0,176	-0,045	-0,000	-0,071	0,032	-0,051	0,150	-0,033	-0,213

	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5	PC6	PC7	PC8	PC9	PC10
<i>TNFSF13</i>	-0,219	-0,252	0,127	0,252	0,125	-0,063	0,168	-0,061	0,000	-0,024
<i>IL15</i>	-0,048	-0,140	0,411	0,153	-0,108	0,144	0,101	-0,054	-0,274	-0,140
<i>IL16</i>	0,261	0,092	0,168	-0,024	0,027	-0,181	-0,335	0,159	0,422	0,048
<i>IL17D</i>	-0,304	0,261	0,002	0,084	-0,056	0,010	0,011	-0,091	0,108	0,005
<i>TNFSF12</i>	-0,195	-0,030	0,094	0,325	-0,212	-0,153	0,015	-0,217	-0,147	0,556
Desvio padrão	2,000	1,966	1,523	1,361	1,175	1,084	1,053	0,956	0,923	0,901
Variância (%)	15,38	14,87	8,92	7,12	5,31	4,51	4,26	3,51	3,27	3,12
Variância acumulada	15,38	30,25	39,17	46,30	51,61	56,13	60,39	63,91	67,18	70,31

FONTE: a Autora (2025)

APÊNDICE R - COMPONENTES PRINCIPAIS DOS ASTRÓCITOS

Análise de Componentes Principais - Astrócitos										
	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5	PC6	PC7	PC8	PC9	PC10
<i>CX3CL1</i>	0,230	-0,253	0,137	-0,258	0,189	-0,018	-0,062	0,184	-0,195	0,017
<i>DCN</i>	0,125	-0,011	0,050	-0,071	0,072	0,025	0,690	0,348	0,337	-0,178
<i>HGF</i>	0,182	0,335	0,066	-0,138	-0,220	-0,249	0,070	-0,058	-0,033	-0,078
<i>KITLG</i>	0,178	0,068	-0,341	0,031	0,248	-0,164	0,093	0,068	0,286	0,176
<i>FLT3LG</i>	-0,022	0,238	0,202	0,066	0,050	0,344	0,223	0,027	-0,444	0,201
<i>TNFSF13B</i>	0,230	0,194	-0,086	0,207	0,098	-0,209	-0,108	0,319	-0,068	-0,055
<i>IL7</i>	-0,358	-0,000	-0,049	-0,217	0,041	-0,255	0,150	-0,068	0,119	0,060
<i>TGFB1</i>	-0,213	0,176	0,285	-0,083	0,283	-0,047	0,038	-0,098	0,094	-0,032
<i>C5</i>	-0,292	-0,199	-0,132	0,089	-0,153	0,009	0,136	0,193	-0,318	-0,015
<i>VEGFA</i>	0,133	0,138	0,254	0,111	-0,208	-0,023	-0,244	0,300	0,285	0,016
<i>TNFSF4</i>	-0,029	-0,017	-0,151	0,312	0,173	-0,274	-0,106	0,204	-0,324	-0,613
<i>SPPI</i>	0,221	-0,244	0,162	-0,332	0,088	-0,027	-0,070	0,151	-0,102	-0,051
<i>PSPN</i>	0,242	-0,201	0,020	-0,091	0,034	-0,207	-0,023	0,032	0,091	0,049
<i>C3</i>	0,004	0,220	-0,029	-0,381	0,017	0,208	0,125	0,165	-0,226	-0,121
<i>IL33</i>	-0,151	0,047	-0,118	-0,120	-0,376	-0,246	0,087	0,395	-0,165	0,365
<i>FGF2</i>	0,097	0,159	-0,168	-0,282	-0,386	-0,273	-0,102	-0,094	-0,050	-0,056
<i>EGF</i>	0,133	0,211	-0,298	-0,194	0,252	0,135	0,024	-0,112	-0,071	-0,121
<i>CXCL14</i>	0,090	0,124	0,360	0,206	-0,178	0,198	0,053	0,169	0,149	-0,109
<i>CTF1</i>	0,147	0,218	0,130	0,154	0,125	-0,307	0,290	-0,097	-0,289	0,198
<i>IL18</i>	-0,231	0,031	0,322	-0,080	0,187	-0,180	-0,117	0,259	-0,002	-0,051
<i>IL34</i>	0,190	-0,328	0,125	-0,226	0,086	0,024	-0,124	0,095	-0,128	0,119

	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5	PC6	PC7	PC8	PC9	PC10
<i>TNFSF13</i>	0,088	-0,235	0,184	0,123	-0,339	-0,069	0,218	-0,212	-0,075	-0,236
<i>IL15</i>	-0,116	-0,047	-0,237	-0,235	-0,168	0,229	0,111	0,109	0,091	-0,359
<i>IL17D</i>	0,121	-0,238	-0,242	0,276	0,093	0,035	0,200	0,103	-0,037	0,263
<i>CSF1</i>	0,329	0,235	0,039	-0,093	0,020	-0,026	0,036	-0,182	-0,084	-0,060
<i>CXCL17</i>	-0,307	-0,014	0,162	-0,122	0,211	-0,323	0,099	-0,079	0,041	-0,039
<i>TNFSF12</i>	0,144	-0,272	0,143	0,025	-0,096	-0,185	0,255	-0,319	-0,055	-0,094
Desvio padrão	2,046	1,814	1,614	1,523	1,474	1,051	1,036	1,002	0,973	0,891
Variância (%)	15,50	12,18	9,64	8,59	8,04	4,09	3,97	3,71	3,50	2,94
Variância acumulada	15,50	27,69	37,34	45,93	53,98	58,07	62,04	65,76	69,27	72,21

FONTE: a Autora (2025)

APÊNDICE S - COMPONENTES PRINCIPAIS DOS OLIGODENDRÓCITOS

Análise de Componentes Principais - Oligodendrócitos										
	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5	PC6	PC7	PC8	PC9	PC10
<i>CX3CL1</i>	-0,324	-0,003	0,043	-0,074	0,023	-0,008	-0,010	0,075	0,012	-0,021
<i>DCN</i>	-0,249	-0,055	-0,005	0,042	0,016	-0,085	0,064	-0,095	0,109	0,089
<i>IGF1</i>	-0,215	-0,117	0,114	0,118	-0,002	0,171	-0,096	0,214	0,150	-0,269
<i>HGF</i>	-0,215	-0,076	-0,030	0,254	-0,066	-0,004	-0,141	-0,389	0,138	-0,075
<i>KITLG</i>	-0,322	-0,023	0,069	-0,043	-0,036	-0,032	0,044	0,061	0,028	-0,055
<i>TNFSF13B</i>	-0,124	0,237	-0,175	0,377	-0,091	0,290	-0,003	0,046	-0,210	-0,065
<i>IL7</i>	0,094	-0,459	0,029	-0,061	-0,069	0,027	-0,060	-0,079	0,249	0,008
<i>TGFB1</i>	0,069	-0,439	-0,157	0,015	-0,228	-0,097	-0,064	-0,088	-0,105	-0,077
<i>C5</i>	0,082	0,106	0,374	0,133	-0,026	-0,479	-0,136	-0,063	-0,010	-0,043
<i>VEGFA</i>	-0,301	-0,008	0,030	-0,107	-0,044	0,029	0,003	-0,058	-0,011	-0,032
<i>TNFSF4</i>	0,064	0,124	0,132	0,172	-0,331	-0,093	0,681	-0,153	0,129	-0,428
<i>SPPI</i>	-0,017	0,389	-0,184	-0,329	-0,130	0,146	-0,129	0,094	0,087	-0,055
<i>PSPN</i>	-0,184	0,037	0,033	-0,217	-0,145	-0,070	0,288	0,312	-0,327	0,278
<i>TNFSF9</i>	0,008	0,036	-0,196	-0,503	-0,440	-0,123	-0,247	-0,254	-0,206	-0,324
<i>C3</i>	-0,202	-0,089	0,013	-0,022	0,228	-0,089	-0,191	-0,138	0,178	0,069
<i>FGF2</i>	-0,235	0,064	-0,090	0,150	-0,173	0,044	-0,201	-0,267	-0,002	-0,024
<i>CXCL14</i>	-0,317	-0,023	0,058	-0,012	-0,030	-0,014	0,000	0,023	0,036	-0,041
<i>IL18</i>	-0,015	-0,310	-0,168	0,132	-0,121	0,440	-0,012	0,286	-0,003	-0,230
<i>IL34</i>	-0,292	-0,031	0,087	-0,093	0,088	-0,112	0,062	0,002	-0,009	0,023
<i>TNFSF13</i>	-0,252	-0,082	0,081	-0,090	-0,086	-0,080	0,118	0,164	0,069	-0,019
<i>GDNF</i>	-0,007	0,134	0,158	0,407	-0,394	-0,228	-0,401	0,336	-0,164	0,009

	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5	PC6	PC7	PC8	PC9	PC10
<i>IL17D</i>	-0,171	0,080	-0,308	0,208	-0,072	-0,014	0,198	-0,362	-0,135	0,326
<i>CSF1</i>	0,014	0,060	-0,362	0,017	-0,352	-0,206	0,039	0,253	0,640	0,327
<i>IFNA2</i>	0,071	0,012	0,348	-0,041	-0,332	0,433	-0,037	-0,212	-0,045	0,463
<i>CXCL17</i>	0,017	-0,428	0,085	0,004	-0,208	-0,141	0,121	0,046	-0,261	0,200
<i>IFNA13</i>	0,033	0,090	0,498	-0,136	-0,184	0,250	-0,032	-0,089	0,297	0,003
<i>TNFSF12</i>	-0,301	-0,021	0,104	-0,111	-0,007	0,030	-0,002	0,076	-0,061	-0,011
Desvio padrão	2,875	1,631	1,355	1,132	1,104	1,085	0,990	0,950	0,920	0,890
Variância (%)	30,62	9,85	6,79	4,74	4,51	4,35	3,62	3,34	3,13	2,93
Variância acumulada	30,62	40,47	47,27	52,01	56,53	60,89	64,51	67,86	70,99	73,93

FONTE: a Autora (2025)

APÊNDICE T - COMPONENTES PRINCIPAIS DOS OPCs

Análise de Componentes Principais - OPCs										
	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5	PC6	PC7	PC8	PC9	PC10
<i>CX3CL1</i>	-0,016	-0,538	-0,100	0,074	-0,115	-0,312	0,177	-0,009	-0,043	-0,184
<i>KITLG</i>	0,008	-0,284	0,080	-0,493	0,154	-0,079	0,242	-0,056	0,067	0,514
<i>FLT3LG</i>	-0,067	-0,005	-0,104	-0,286	0,145	0,514	0,430	0,338	-0,378	-0,190
<i>TNFSF13B</i>	0,328	0,138	-0,228	-0,008	0,247	-0,090	-0,024	0,023	-0,102	-0,161
<i>IL7</i>	-0,453	0,118	-0,156	-0,061	0,138	-0,064	-0,117	0,141	0,060	0,089
<i>TGFB1</i>	-0,373	0,164	-0,161	-0,146	0,047	-0,095	-0,107	0,066	0,143	-0,127
<i>C5</i>	0,221	0,039	0,259	0,184	0,369	0,134	0,102	0,328	0,105	0,181
<i>VEGFA</i>	0,024	0,121	-0,382	0,173	-0,525	0,178	0,018	0,085	-0,115	0,198
<i>SPPI</i>	0,003	-0,491	-0,127	-0,188	-0,194	-0,178	-0,122	0,240	-0,241	0,089
<i>FGF2</i>	0,352	0,084	-0,307	-0,068	-0,066	-0,070	-0,190	0,187	0,202	0,079
<i>CXCL14</i>	-0,102	-0,174	-0,159	-0,379	-0,090	0,492	-0,324	-0,168	0,385	-0,102
<i>IL18</i>	-0,359	0,020	-0,231	0,219	0,142	-0,240	0,112	0,019	-0,059	0,215
<i>IL34</i>	-0,063	-0,277	-0,094	0,209	0,329	0,209	-0,244	-0,470	-0,402	-0,188
<i>TNFSF13</i>	0,099	-0,288	-0,139	0,300	0,289	0,231	-0,284	0,101	0,170	0,405
<i>GDNF</i>	0,147	0,058	-0,504	0,110	0,031	0,086	0,114	0,032	-0,178	0,136
<i>IL17D</i>	0,139	0,108	-0,270	-0,098	0,102	-0,048	0,454	-0,570	0,219	0,119
<i>CSF1</i>	0,211	-0,008	-0,268	-0,259	0,319	-0,308	-0,136	0,175	0,110	-0,366
<i>CXCL17</i>	-0,361	0,035	-0,192	0,062	0,261	-0,017	0,072	0,119	0,090	0,017
<i>TNFSF12</i>	-0,045	-0,315	-0,060	0,351	-0,064	0,150	0,370	0,141	0,501	-0,328
Desvio padrão	1,666	1,363	1,289	1,125	1,078	1,040	1,032	0,996	0,944	0,923

	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5	PC6	PC7	PC8	PC9	PC10
Variância (%)	14,61	9,77	8,74	6,65	6,11	5,68	5,60	5,22	4,68	4,48
Variância acumulada	14,61	24,38	33,12	39,78	45,89	51,58	57,19	62,41	67,10	71,59

FONTE: a Autora (2025)

APÊNDICE U - COMPONENTES PRINCIPAIS DAS CÉLULAS ENDOTELIAIS

Análise de Componentes Principais - Células endoteliais										
	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5	PC6	PC7	PC8	PC9	PC10
<i>CX3CL1</i>	0,283	0,506	0,101	0,236	-0,214	-0,192	-0,417	0,292	-0,506	0,016
<i>IL32</i>	0,303	0,307	-0,016	0,511	-0,360	0,242	0,186	-0,427	0,370	-0,103
<i>DCN</i>	0,468	-0,364	-0,217	0,121	0,007	-0,236	-0,267	0,046	0,263	0,623
<i>KITLG</i>	0,279	-0,038	-0,353	0,265	0,680	0,119	-0,200	0,021	0,002	-0,458
<i>TGFB1</i>	0,247	0,320	-0,437	-0,195	0,000	-0,174	0,640	0,403	0,051	0,043
<i>SPP1</i>	-0,236	0,121	0,331	0,374	0,283	-0,716	0,156	0,003	0,252	-0,024
<i>TNFSF10</i>	0,375	-0,058	0,551	-0,221	-0,033	0,141	-0,074	0,459	0,436	-0,277
<i>FGF2</i>	0,044	0,444	-0,149	-0,573	0,056	-0,253	-0,359	-0,391	0,311	-0,068
<i>IL15</i>	0,338	0,174	0,436	-0,143	0,460	0,173	0,289	-0,326	-0,292	0,359
<i>TNFSF12</i>	0,396	-0,410	0,039	-0,150	-0,258	-0,423	0,170	-0,313	-0,315	-0,424
Desvio padrão	1,262	1,153	1,105	1,051	1,005	0,947	0,919	0,838	0,819	0,790
Variância (%)	15,93	13,30	12,21	11,047	10,10	8,97	8,45	7,02	6,71	6,24
Variância acumulada	15,93	29,23	41,44	52,496	62,60	71,57	80,02	87,04	93,75	100,00

FONTE: a Autora (2025)