

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS – UFSCar
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE – CCBS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GERONTOLOGIA – PPGGero

RAFAELA PERON

**NÍVEIS DE ADAM10 NO LÍQUIDO CEFALORRAQUIDIANO E SORO DE
INDIVÍDUOS COM DOENÇA DE ALZHEIMER**

SÃO CARLOS

2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS – UFSCar
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE – CCBS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GERONTOLOGIA – PPGGero

RAFAELA PERON

**NÍVEIS DE ADAM10 NO LÍQUIDO CEFALORRAQUIDIANO E SORO DE
INDIVÍDUOS COM DOENÇA DE ALZHEIMER**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Gerontologia do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Gerontologia, sob orientação da Prof^a. Dra. Márcia Regina Cominetti.

SÃO CARLOS

2018



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Gerontologia

Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Rafaela Peron Cardoso, realizada em 12/11/2018:

Prof. Dra. Márcia Regina Cominetti
UFSCar

Prof. Dr. Marcio Luiz Figueiredo Balthazar
UNICAMP

Profa. Dra. Sofia Cristina Iost Pavarini
UFSCar

A Deus por iluminar meu caminho e me dar forças para seguir sempre em frente.

AGRADECIMENTOS

A Deus, meu porto seguro e a Nossa Senhora, por iluminarem meu caminho e independente das dificuldades, me darem forças para seguir sempre em frente.

Ao meu marido, que esteve presente incentivando e apoiando a minha escolha.

Ao meu filho, que desde muito pequeno me acompanha em muitas das minhas atividades acadêmicas.

Aos meus queridos pais, pelos valores ensinados, base para a minha vida. À minha irmã, pela cumplicidade e amizade ao longo de minha vida.

À Universidade Federal de São Carlos, pela oportunidade de realizar o mestrado.

À minha querida orientadora, Profa. Dra. Márcia Regina Cominetti, por seu empenho e grande dedicação e ao longo desta jornada.

À querida Dra. Patrícia Manzine, que gentilmente me ensinou e me ajudou no decorrer dessa pesquisa.

A todos os queridos colegas do LABEN, em especial, Izabela, Liany, Angelina, Angélica e Ramon, pelo apoio e ajuda no decurso dessa pesquisa.

À equipe do Departamento de Neurologia da Unicamp, em especial, Thamires e Prof. Dr. Márcio Balthazar, pela colaboração e apoio na realização dessa pesquisa.

A todos os funcionários, docentes e alunos do Departamento de Gerontologia, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Departamento de Química e a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para este projeto se tornar realidade.

À turma de mestrado 2017, por todos os bons momentos que passamos juntos.

À banca, pela ilustre presença e avaliação do presente estudo.

Muito obrigada!

"A verdadeira jornada de descoberta não é procurar novas paisagens, mas olhar com novos olhos."

Marcel Proust

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS:

A Disintegrin And Metallopeptidase (ADAMs)
Ácido bicinconínico (BCA)
Alzheimer's Disease International (ADI)
Alzheimer's Disease and Related Disorders Association (ADRDA)
Amyloid beta (A β)
Associação Brasileira de Alzheimer (ABRAZ)
Atividades básicas de vida diária (AVDB)
Atividades de vida diária (AVDs)
Atividades instrumentais de vida diária (AVDI)
Clinical Dementia Rating (CDR)
Comprometimento cognitivo leve (CCL)
Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM)
Doença de Alzheimer (DA)
Emaranhados neurofibrilares (ENFs)
Enzimas convertases (PC 7)
Familial Alzheimer's Disease (FAD)
Fluorodesoxiglucoze (FDG)
Food and Drug Administration (FDA)
Late Onset Alzheimer's Disease (LOAD)
Líquido cefalorraquidiano (LCR)
Mini Exame do Estado Mental (MEEM)
Montreal Cognitive Assessment (MoCA)
National Institute of Neurological and Communicative Diseases and Stroke (NINCDS)
Organização Mundial da Saúde (OMS)
Proteína precursora amiloide (APP)
Reactive oxygen species (ROS)
Ressonância magnética (RM)
Retículo endoplasmático (RE)
Sistema nervoso central (SNC)
Sodium dodecyl sulfate-SDS, Polyacrylamide gel electrophoresis-PAGE (SDS-PAGE)

Sujeitos controle (CTR)

Tau fosforilada (p-tau)

Tau total (t-tau)

Tetraspaninas (Tspans)

Tomografia computadorizada por emissão de pósitrons (PET)

Transtorno neurocognitivo leve (TNCL)

Transtorno neurocognitivo leve do tipo amnésico (TNCLa)

Tris-buffered saline – Tween (TBST)

Unidade Arbitrárias (UA)

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Representação esquemática da hiperfosforilação da proteína Tau e formação dos emaranhados neurofibrilares | 5 |
| Figura 2. Representação esquemática do acúmulo de placas amiloides no cérebro | 6 |
| Figura 3. Clivagem da APP pelas α e β secretases | 8 |
| Figura 4. Estrutura multimodular da ADAM10 | 13 |
| Figura 5. Maturação e estrutura da ADAM10 inserida na membrana | 14 |
| Figura 6. Estrutura da ADAM10 | 17 |
| Figura 7. Membranas resultantes dos experimentos de western blotting e respectivo gráfico no LCR | 29 |
| Figura 8. Membranas resultantes dos experimentos de western blotting e respectivo gráfico no soro | 29 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1. Variáveis sociodemográficas e avaliações neuropsicológicas dos sujeitos ... | 27 |
| Tabela 2. Variáveis clínicas dos sujeitos. | 27 |

LISTA DE GRÁFICOS

| | |
|---|----|
| Gráfico 1: Atividade da ADAM10 no LCR | 32 |
| Gráfico 2: Atividade da ADAM10 no soro | 33 |

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| RESUMO | x |
| ABSTRACT | xi |
| 1. INTRODUÇÃO | 1 |
| 1.1 Demências e doença de Alzheimer | 1 |
| 1.2 Métodos diagnósticos para a doença de Alzheimer | 9 |
| 1.3 Biomarcadores para a doença de Alzheimer | 10 |
| 1.4 ADAMs | 12 |
| 1.5 Relevância do estudo | 16 |
| 2. OBJETIVO | 18 |
| 2.1 Objetivos específicos | 18 |
| 3. MATERIAIS E MÉTODOS | 19 |
| 3.1 Participantes | 20 |
| 3.2 Quantificação de proteínas totais | 21 |
| 3.3 Quantificação de ADAM10 – Western Blotting | 22 |
| 3.4 Ensaio de atividade | 24 |
| 4. RESULTADOS | 26 |
| 4.1 Dados sociodemográficos, avaliações neuropsicológicas e variáveis clínicas 26 | |
| 4.2 Quantificação de ADAM10 – Western Blotting | 28 |
| 4.3 Atividade de ADAM10 – ensaio de clivagem | 31 |
| 5. DISCUSSÃO | 34 |
| 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS | 40 |
| 7. REFERÊNCIAS | 41 |
| 8. APÊNDICE | 49 |

RESUMO

Foi estimado que em 2030 no mundo cerca de 65,7 milhões de pessoas estarão com demências, sendo a doença de Alzheimer (DA) a principal delas. No Brasil atualmente há cerca de 1,2 milhão de casos de DA. Em indivíduos com DA observam-se alterações do funcionamento cerebral e perda progressiva e global das funções cognitivas, as quais interferem nas atividades sociais e ocupacionais do indivíduo gerando transtornos não somente para as pessoas afetadas, mas para os familiares e sistemas de saúde. Atualmente o diagnóstico provável da DA é firmado pelo quadro clínico e pela exclusão de outras demências, gerando grandes conflitos diagnósticos. Diante disso é inerente a necessidade de um biomarcador de fácil acesso e que auxilie no diagnóstico preciso da DA. Pesquisadores têm apontado que a identificação da ADAM10 como biomarcador pode ser uma importante ferramenta para auxiliar no diagnóstico clínico de DA. A proposta da ADAM10 como biomarcador se dá por estar envolvida em diferentes processos fisiológicos e patológicos, incluindo a DA. Estudos apontam que os níveis plaquetários de ADAM10 são menores em pacientes com DA comparado a sujeitos saudáveis, entretanto são escassos estudos sobre a expressão e atividade dessa proteína no líquido cefalorraquidiano (LCR). Este estudo se baseou na hipótese de que os níveis de ADAM10 solúvel no LCR e soro estão aumentados na DA, comparados com sujeitos cognitivamente saudáveis. Avaliamos os níveis e a atividade da ADAM10 no LCR e soro de pacientes com demência da DA e transtorno neurocognitivo leve (TNCL). Os participantes foram submetidos a avaliações clínicas e neurológicas e posteriormente foram realizadas as coletas do LCR e soro. Os dados obtidos foram analisados e inseridos em um banco de dados para realização de análises estatísticas descritivas, considerando significância estatística de 5% ($p < 0,05$). Foi possível demonstrar que os níveis de ADAM10 solúvel estão elevados no LCR e soro sanguíneo de pacientes com DA. Ensaios enzimáticos demonstraram ausência da atividade da ADAM10 no soro e LCR, com presença atividade da ADAM10 em plaquetas. Esses resultados nos permitem concluir que os níveis aumentados de ADAM10 no LCR e soro correspondem à proteína inativa e fortalecem a proposta da ADAM10 como biomarcador para DA.

Palavras-chave: ADAM10, biomarcadores, doença de Alzheimer, LCR.

ABSTRACT

It has been estimated that by 2030 around 65.7 million people will be with dementia, with Alzheimer's disease (AD) being the main one. In Brazil, there are currently 1.2 million cases of AD. In individuals with AD, changes in brain functioning and progressive and global loss of cognitive functions are observed, which interfere with the individual's social and occupational activities, causing disorders not only for the affected individuals, but also for family members and health systems. Currently the probable diagnosis of AD is confirmed by the clinical picture and by the exclusion of other dementias, generating great diagnostic conflicts. In view of this, the need for a biomarker that is easy to access and that assists in the accurate diagnosis of AD is inherent. Researchers have pointed out that the identification of ADAM10 as a biomarker can be an important tool to aid in the clinical diagnosis of AD. The proposal of ADAM10 as a biomarker occurs because it is involved in different physiological and pathological processes, including AD. Studies indicate that ADAM10 platelet levels are lower in patients with AD compared to healthy subjects, however, there are few studies on the expression and activity of this protein in cerebrospinal fluid (CSF). This study was based on the hypothesis that levels of inactive ADAM10 in CSF and serum are increased in AD compared to cognitively healthy subjects. We evaluated levels and activity of ADAM10 in CSF and serum of patients with AD dementia and mild neurocognitive disorder (TNCL). The participants were submitted to clinical and neurological evaluations, and later CSF and serum samples were collected. The data obtained were analyzed in a database to perform descriptive statistical analyzes, considering statistical significance of 5% ($p < 0.05$). It was possible to demonstrate that levels of soluble ADAM10 are elevated in the CSF and blood serum of patients with AD. Enzyme assays demonstrated absence of ADAM10 activity in serum and CSF, with the presence of ADAM10 activity in platelets. These results allow us to conclude that increased levels of ADAM10 in CSF and serum correspond to the inactive protein and strengthen ADAM10 as a biomarker for AD.

Key words: ADAM10, biomarkers, Alzheimer's disease, CSF.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Demências e doença de Alzheimer

Um grande avanço da sociedade atual é o aumento da expectativa de vida. Isso provavelmente é resultado do avanço da tecnologia médica, maior acesso a serviços de saúde e melhores condições de vida em geral (CHAIMOWICZ, 2011). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) em quase todo o mundo, o contingente que mais cresce é o de pessoas com idade igual ou superior a 60 anos. As projeções da OMS apontam que o número de idosos alcance 1,2 bilhão em 2025, podendo chegar aos 2 bilhões em 2050, o que corresponderá a uma significativa parte da população mundial. Segundo o IBGE a população total projetada para o Brasil em 2018 é de 208,5 milhões, desse total 19,2 milhões são de indivíduos idosos, acima dos 60 anos. E estima-se que em 2060, um quarto da população brasileira (25,5%) deverá ter mais de 65 anos, representando cerca de 58,2 milhões de idosos.

No entanto, o envelhecimento pode ser entendido como um processo de redução gradual da reserva cognitiva com declínio das funções fisiológicas e maior probabilidade do surgimento de demências, sendo a idade um dos principais fatores de risco (JIANG et al., 2013). Foi estimado em 2010 que no mundo cerca de 35,6 milhões de pessoas viviam com demência, com números que devem quase dobrar a cada 20 anos, para 65,7 milhões em 2030 e 115,4 milhões em 2050 (XU et al., 2015).

O Brasil está se tornando um país envelhecido, perfil demográfico no qual as doenças crônicas ocupam um lugar de destaque (GOYANNA et al., 2017). Os distúrbios demenciais apresentam-se em evidência e crescente progressão no Brasil e estão entre as doenças que contribuem consideravelmente para a mortalidade da população brasileira (SCHMIDT *et al.*, 2011). A nível mundial o tipo mais comum e mais prevalente de

demência é a doença de Alzheimer (DA) representando 60% dos casos (WIMO et al., 2013). De acordo com a *Alzheimer's Disease International (ADI)*, o aumento da incidência da DA na população idosa é alto e os indivíduos que estarão na faixa etária de risco para DA, ou seja, acima de 65 anos de idade, representarão 22% da população mundial em 2050, com 80% desse percentual na Ásia, África e América Latina.

A DA representa cerca 60,3% dos casos das demências no Brasil com a incidência duplicada a cada cinco anos, após os 65 anos de idade (LOPES *et al.*, 2012). Segundo a Associação Brasileira de Alzheimer (ABRAZ), no Brasil atualmente há cerca de 1,2 milhão de casos de DA. Além disso, os serviços de saúde não acompanharam epidemiologicamente as mudanças das últimas décadas, resultando em um sistema de saúde sobrecarregado e deficitário (GOYANNA et al., 2017). Sendo que os custos com cuidados de saúde para esses doentes são bem altos, representando, por exemplo, para os Estados Unidos gastos anuais de 172 bilhões de dólares (REITZ & MAYEUX, 2014).

Durante muitos anos, os pesquisadores nunca pararam investigar os mecanismos patogênicos, prevenção e terapias para DA pois a prevalência mundial está aumentando e atualmente não há cura para a doença. Por conta disso, a DA está atraindo cada vez mais atenção das pessoas para descobrir como evitar a sua ocorrência. Os fatores de risco para DA podem ser categorizados em dois tipos: fatores modificáveis e fatores não modificáveis. Os fatores modificáveis são, por exemplo, estilo de vida, ocupação, dieta e medicamentos. Os fatores não modificáveis referem-se principalmente a fundamentos genéticos, envelhecimento e prevalência do sexo feminino (JIANG et al., 2013). A DA é a forma mais comum de demência, sem meios de cura ou prevenção, mas podemos caracterizar formas da doença. DA pré-senil, não hereditária, forma mais comum da doença, geralmente ocorrendo após os 60 anos, sendo as causas desta forma mais complexas, envolvendo principalmente o avanço da idade e fatores ambientais e DA

familiar, de início precoce, ocorrendo antes dos 60 anos e possuindo forte componente genético, por transmissão hereditária autossômica dominante de mutações de genes específicos relacionados principalmente à proteína precursora amiloide (APP), seja de maneira direta ou indireta, representando de 1% a 6% de todos os casos de DA (BEKRIS *et al.*, 2010).

A DA é caracterizada por comprometimento progressivo da memória e outros domínios cognitivos, como por exemplo, raciocínio e linguagem (YU & TAN, 2015). Sendo assim, os indivíduos com DA apresentam declínio de memória e perda lenta e gradual das funções cognitivas. Os sintomas neuropsiquiátricos característicos da DA causam grande sofrimento para pessoas acometidas e seus cuidadores, e contribuem para a institucionalização precoce. Os sintomas neuropsiquiátricos estão entre os primeiros sinais e sintomas de distúrbios neurocognitivos e declínios cognitivos incipientes, sendo os mais comuns agitação, apatia, depressão, ansiedade e distúrbios do sono (LANCTÔT *et al.*, 2017). Portanto, a relevância dos sintomas neuropsiquiátricos tem tornado-se cada vez mais evidentes em indivíduos que desenvolvem demências (MASTERS; MORRIS; ROE, 2015). Além disso dados sugerem que uma perda de neurônios monoaminérgicos podem contribuir de alguma forma para a fisiopatologia da DA e podem explicar algumas de suas manifestações clínicas, particularmente sintomas neuropsiquiátricos (A. KÖHLER *et al.*, 2016).

Essas manifestações características da DA e de outras doenças neurodegenerativas decorrem de uma etapa clínica anterior designada de transtorno neurocognitivo leve (TNCL). O TNCL, atualizado pelo Manual de Diagnóstico de Classificação dos Transtornos Mentais V (*Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*, edição V - DSM-V) foi inicialmente classificado como comprometimento cognitivo leve (CCL) por PETERSEN *et al.*, em 1999. O TNCL é descrito como uma

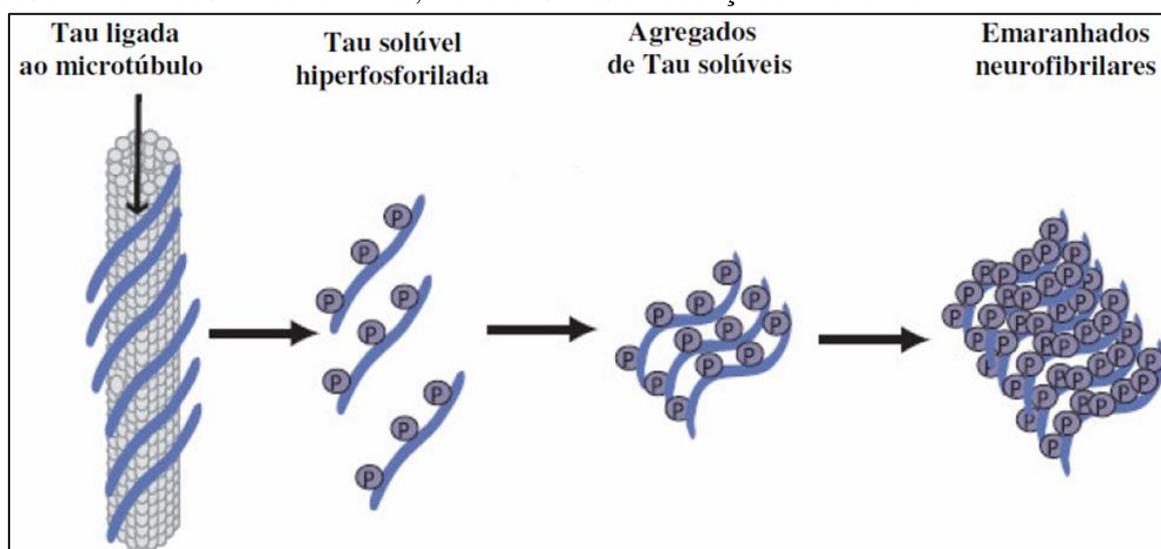
condição em que há a ocorrência de queixas de memória episódica ou de alterações em outros domínios da cognição pelo próprio paciente ou por parte de um informante, avaliado por meio de testes de rastreio e avaliação neuropsicológica. Contudo, no TNCL a funcionalidade do indivíduo é ainda preservada, ao contrário do que acontece nas demências.

A conversão de TNCL para um padrão específico de demência depende, em grande parte, do subtipo. Quando há comprometimento de memória episódica, nomeado transtorno neurocognitivo leve do tipo amnésico (TNCLa), há maior risco de conversão para DA, em comparação com indivíduos cognitivamente preservados. Em torno de 10 a 12% dos sujeitos com TNCLa têm risco elevado de progredir para demência no intervalo de um ano, especialmente para DA, enquanto que indivíduos sem TNCL apresentam uma taxa de conversão de 1 a 2% ao ano (PETERSEN *et al.*, 2001). Portanto, o subtipo amnésico do TNCL pode corresponder a uma fase sintomática pré-clínica da DA (ALBERT *et al.*, 2011).

As alterações cerebrais na DA incluem a atrofia cerebral inicial e predominantemente lobo mesial temporal e córtex associativo, grandes áreas com perdas neuronais e depósitos anormais de estruturas denominadas emaranhados neurofibrilares (ENFs) e placas senis. Os ENFs são formados a partir da proteína Tau que, quando hiperfosforilada, se dissocia dos microtúbulos. A Tau é de grande importância para a manutenção estrutural e funcional do citoesqueleto dos axônios (LICHTENTHALER, 2011). Na DA, o processo de hiperfosforilação e a dissociação da Tau dos microtúbulos compromete a estrutura do axônio e gera a morte neuronal (KUHN *et al.*, 2010) (figura 1). Há estudos relacionando os peptídeos *Amyloid beta* (A β) com a indução e aumento na geração de *reactive oxygen species* (ROS) na mitocôndria. Tal estresse oxidativo leva a defeitos morfológicos na mitocôndria, o que

poderia estar associado à hiperfosforilação da proteína Tau (MERKWIRTH *et al.*, 2012; KHAN & BLOOM, 2016). Relatos mais antigos de BRAAK e BRAAK em 1991, já descrevem que na DA há perda neuronal nas camadas piramidais do córtex cerebral e degenerações sinápticas intensas, tanto em nível hipocampal, quanto neocortical.

Figura 1. Representação esquemática da hiperfosforilação da proteína Tau e formação dos emaranhados neurofibrilares, característicos da doença de Alzheimer.

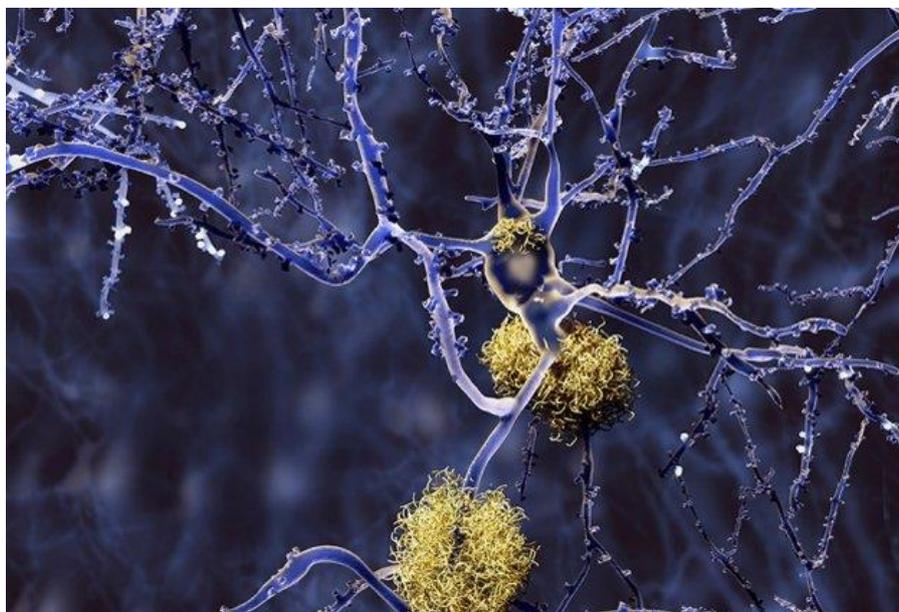


Extraído e adaptado de Golde, 2006.

Outro marco patológico da DA é a formação de placas senis. A hipótese da cascata amiloide e a formação de placas senis foi estabelecida pela primeira vez por Hardy em 1992, destacando o papel central dos peptídeos A β na patogênese da DA. Os A β são formados a partir de clivagens consecutivas da proteína precursora amiloide (APP) pela via das β -secretases. Os A β são peptídeos hidrofóbicos com cerca de 38 a 43 aminoácidos, que tendem a agregar-se como oligômeros. As β -secretases clivam a APP em diferentes regiões, originando fragmentos de A β de diferentes tamanhos, geralmente entre 40 e 42 aminoácidos (A β 1-40 e A β 1-42). Ambos são capazes de se agregar, porém o A β 1-42 é considerado mais hidrofóbico, com maior potencial de agregação e formação das placas senis insolúveis (SOREGHAN *et al.*, 1994). Portanto, o peptídeo A β 42 é insolúvel e

deposições excessivas no cérebro geram as placas senis, que em grandes concentrações são tóxicas e prejudiciais para o funcionamento cerebral, causando danos cerebrais e precipitando a DA (LICHTENTHALER, 2011) (figura 2). A estrutura do A β pode arranjar-se de diferentes formas, gerando uma variedade de espécies oligoméricas (GU *et al.*, 2013). Os oligômeros de A β podem desencadear uma série de alterações patológicas associadas à DA, incluindo a formação dos próprios ENFs, disfunção sináptica e morte neuronal (WANG *et al.*, 2016).

Figura 2. Representação esquemática do acúmulo de placas amiloides (em amarelo) no cérebro, características da doença de Alzheimer



Extraído de Hayden, 2016.

A APP é um membro de uma família de proteínas que inclui as proteínas semelhantes a precursores amiloides em mamíferos (APLP1 e APLP2) (O'BRIEN & WONG, 2011). A APP é produzida em grandes quantidades nos neurônios e é metabolizada muito rapidamente (LEE *et al.* 2008). A APP pode participar da modulação do crescimento celular, motilidade, crescimento de neurônios e sobrevivência celular, funções que podem ser reproduzidas pelo ectodomínio solúvel, liberado após sua clivagem

(O'BRIEN & WONG, 2011). Apesar disso, a função fisiológica precisa da APP ainda não é completamente conhecida, na maioria dos estudos, o aumento da expressão da APP mostra um efeito positivo na saúde e crescimento das células. Em um estudo este efeito positivo é demonstrado em camundongos transgênicos que aumentaram a expressão da APP e tiveram seus neurônios ampliados (OH *et al.*, 2009).

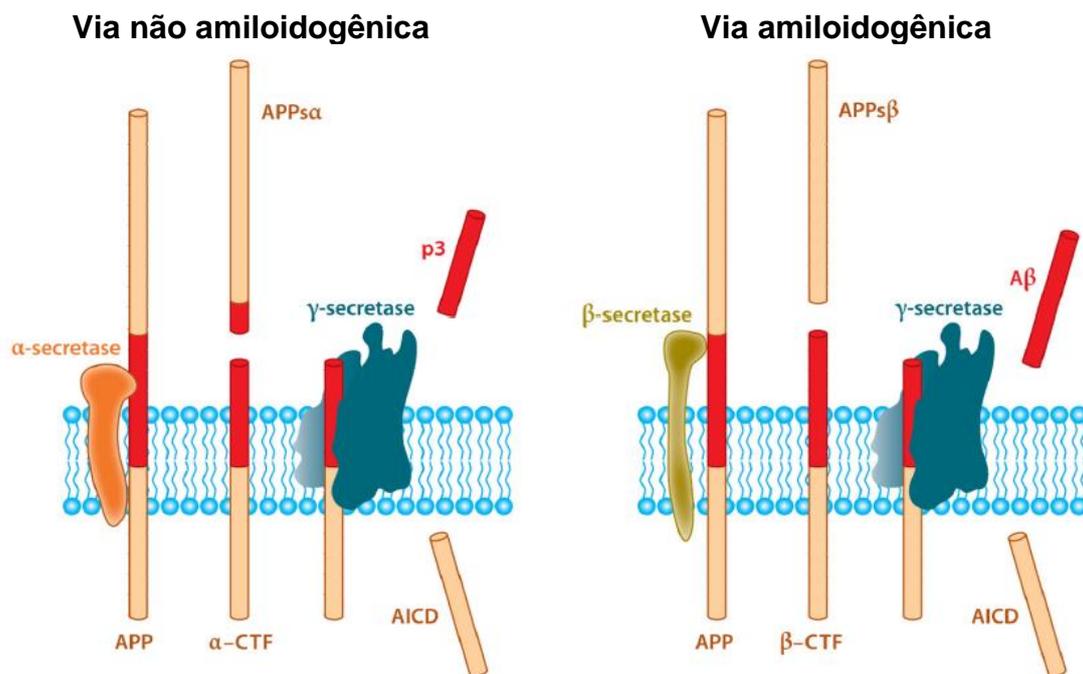
Existem vias alternativas para a proteólise da APP, algumas das quais levam à geração do peptídeo A β e outras não (O'BRIEN & WONG, 2011). Portanto, a APP pode ser clivada por duas vias distintas envolvendo α ou β -secretases (EVIN *et al.*, 2003). Na via não amiloidogênica, na qual as principais proteínas atuantes são as α -secretases, a APP é clivada entre os aminoácidos Lys16 e Leu17 aproximadamente na metade da região do A β , deste modo, liberando o fragmento sAPP α , uma estrutura com funções neuroprotetoras e retendo o resíduo C83 na membrana. A clivagem seguinte do C83 por γ -secretases libera o p3, que é supostamente benéfico e não é encontrado nas placas amiloides. Portanto, o aumento da clivagem da APP pelas α -secretases e a produção do fragmento sAPP α e p3, reduz a produção do A β (MORISHIMA-KAWASHIMA e IHARA, 2002).

Por outro lado, na via amiloidogênica as β -secretases clivam a APP na região N-terminal do A β , produzindo uma forma solúvel da APP (sAPP β) que é liberada para o meio extracelular e parece ter uma função pró-apoptótica (NIKOLAEV, 2009) e um fragmento C-terminal ligado a membrana (CTF ou C99). A subsequente clivagem da C99 por γ -secretases no domínio C-terminal do A β libera o A β 40 e A β 42 (EVIN *et al.*, 2003; COLE & VASSAR, 2007).

O peptídeo A β é, portanto, composto de 39-43 aminoácidos, com massa molecular de aproximadamente 4kDa e é liberado após clivagens da APP pelas vias β e

γ -secretases (EVIN *et al.*, 2003). Contudo, a rota predominante de processamento da APP em sujeitos cognitivamente saudáveis consiste de clivagens sucessivas por α e γ -secretases (LICHTENTHALER, 2011). Sendo assim, as vias α e β -secretases competem pela clivagem da APP (figura 3).

Figura 3. Clivagem da APP pelas α e γ -secretases (via não amiloidogênica), formando o peptídeo p3 e pelas β e γ -secretases (via amiloidogênica) com formação do peptídeo A β .



Extraído e modificado de O'BRIEN & WONG, 2011.

1.2 Métodos diagnósticos para a doença de Alzheimer

Atualmente o diagnóstico provável da DA é firmado pelo quadro clínico e pela exclusão de outras demências, e é realizado principalmente por baterias neuropsicológicas, exames clínicos e de imagem. As baterias neuropsicológicas são compostas de diferentes testes, os quais visam realizar o rastreio de demências. Entre eles estão a escala de avaliação clínica da demência (*Clinical Dementia Rating - CDR*), Mini-Exame do Estado Mental (MEEM), *Montreal Cognitive Assessment (MoCA)*, Inventário Neuropsiquiátrico (NPI), entre outros. Tais métodos podem gerar questões ambíguas e conflitos diagnósticos, especialmente para a realização do diagnóstico diferencial entre demências, uma vez que os sintomas que os indivíduos apesentam em quadros demenciais podem ser semelhantes.

O diagnóstico definitivo de DA só pode ser feito mediante a análise histopatológica do tecido cerebral *post-mortem*. Métodos diagnósticos de imagem combinados ou não com compostos que se ligam diretamente ao A β como o florbetapir (18F) (Amyvid®) também são importantes. O Amyvid® recebeu a aprovação em 2012 da US *Food and Drug Administration* (FDA) como agente de diagnóstico para detectar placas amiloides em pacientes e vem sendo utilizado na clínica, ainda que muito timidamente, embora tal aprovação não seja especificamente estendida ao uso de florbetapir como um único teste de diagnóstico definitivo para a demência da DA (BEACH *et al.*, 2014). Todas estas ferramentas são de grande importância na clínica, contudo, os exames disponíveis atualmente, sejam eles por imagem ou utilizando compostos que se ligam às placas amiloides, são extremamente caros, por isso a necessidade de biomarcadores diagnósticos que possam ser coletados e medidos de forma mais simples e barata (SHI *et al.*, 2018).

1.3 Biomarcadores para a doença de Alzheimer

Em 1984 foi publicado um relatório pelo *National Institute of Neurological and Communicative Diseases and Stroke* (NINCDS) e pela *Alzheimer's Disease and Related Disorders Association* (ADRDA), o intuito desse relatório foi estabelecer critérios e descrever o diagnóstico clínico da DA. O grupo abordou questões de história médica, clínica, exame, testes neuropsicológicos e avaliações laboratoriais (McKHANN *et al.*, 1984). Os critérios desse relatório foram usados por mais de 27 anos. Contudo, após todos esses anos esses critérios exigiram revisão e o Instituto Nacional de Envelhecimento juntamente com a Associação de Alzheimer realizaram uma revisão dos critérios adotados em 1984 para a DA (JACK *et al.*, 2011). Foram incluídos resultados de ressonância magnética (RM), tomografia computadorizada por emissão de pósitrons (PET) e exames do líquido cefalorraquidiano (LCR), também foi incorporado o uso de biomarcadores para tomada de decisões no diagnóstico de demência da DA (DUBOIS *et al.*, 2007).

Apesar disso, os biomarcadores para a DA foram incluídos, para fins de pesquisa, como critérios de diagnóstico para a doença somente em 2011 (McKHANN *et al.*, 2011) e tornaram-se um componente essencial da pesquisa da doença de Alzheimer, pois podem fornecer medidas relevantes da fisiopatologia em pessoas vivas. Sendo assim, os biomarcadores tornaram-se cada vez mais importante para entender a biologia da DA (JACK *et al.*, 2016). Biomarcadores ou marcadores biológicos são entidades que podem ser medidas experimentalmente e que indicam a ocorrência de uma determinada função normal ou patológica de um organismo. A identificação de biomarcadores auxilia na prescrição de fármacos que poderão ser administrados muito cedo no curso da doença, auxiliando no reforço diagnóstico e precisão da medicação que poderá ser administrada antes do início do processo de neurodegeneração (BLENNOW *et al.*, 2010). Os

biomarcadores estabelecidos no LCR para DA são a proteína Tau total, Tau fosforilada e o peptídeo A β 42 (SHAW *et al.*, 2009). Alguns estudos examinaram como os marcadores biológicos do LCR podem ser úteis na previsão da DA e encontraram uma redução nos níveis de A β 1-42 no LCR em idosos com DA, comparado com idosos cognitivamente saudáveis (SKOOG *et al.*, 2003; GUSTAFSON *et al.*, 2006).

Os principais biomarcadores usado na pesquisa DA podem ser divididos em três categorias binárias, com base na fisiopatologia de cada medida, denominados sistema de classificação A/T/N. "A" Biomarcadores de deposição de A β (alta concentração de A β no LCR e alta retenção de ligantes amiloides no PET); "T" Biomarcadores da patologia tau (emaranhados neurofibrilares, valores elevados Tau fosforilada (p-tau) no LCR e tau fosforilada no PET) e "N" Biomarcadores da neurodegeneração tipo DA ou lesão neuronal (são tau total do LCR (t-tau), hipometabolismo de fluorodesoxiglucose (FDG – PET) e atrofia em regiões características da DA na RM (BESSON *et al.*, 2015; KLUNK *et al.*, 2004). O sistema de classificação A/T /N está relacionado a classificação de biomarcadores, para critério diagnóstico (JACK *et al.*, 2016).

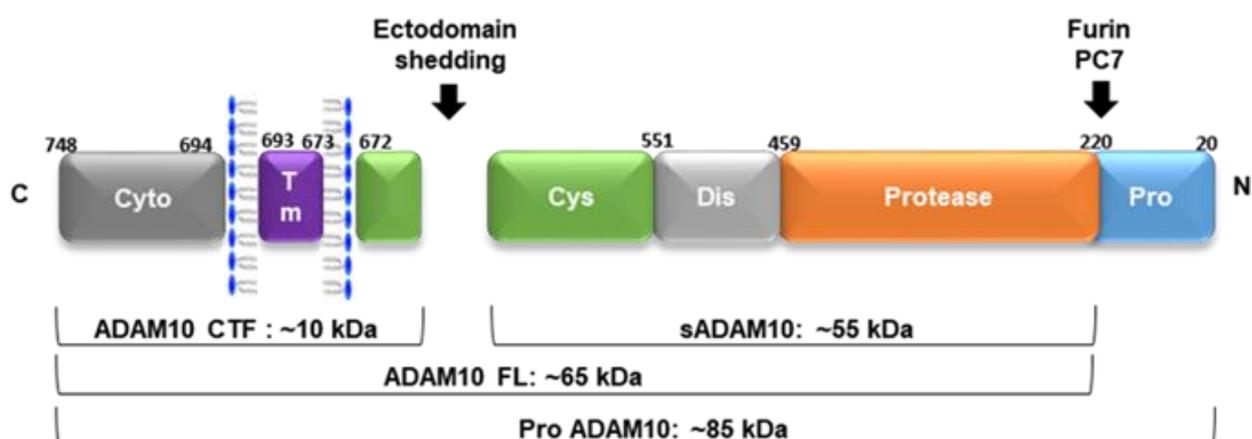
1.4 ADAMs

As ADAMs (*A Disintegrin And Metallopeptidase*) são membros da superfamília das proteases dependentes de zinco (HOOPER & TURNER, 2002). Dentre as ADAMs, a ADAM10 está envolvida em diferentes processos fisiológicos e patológicos, como DA, câncer, desenvolvimento embrionário, entre outros (LICHTENTHALER, 2011). A ADAM10 é uma proteína de membrana de aproximadamente 750 aminoácidos e além da APP, pode clivar mais de 30 diferentes tipos de proteína de membrana, como a Notch, betacellulin, klotho e N-caderina (JORISSEN *et al.*, 2010). Além de ser a principal α -secretase a ADAM10 também atua como uma protease essencial para outras proteínas transmembrana, liberando mais de 90 proteínas de membrana no sistema nervoso central (SNC). Grande parte delas é essencial para o SNC (KUHN *et al.*, 2016) como por exemplo os substratos Neuroligina-1 e N-caderina que possuem funções neuronais e sinápticas (KLINGENER *et al.*, 2014).

A protease ADAM10 se torna ativa durante a passagem pelo complexo de Golgi e após a remoção do pró-domínio por furinas e por enzimas convertases (PC 7). A ADAM10 produzida no retículo endoplasmático (RE) possui uma sequência de reconhecimento para PC7 e furina entre o domínio de metaloprotease e o pró-domínio, e o processamento proteolítico deste local transforma a ADAM10 em uma forma proteoliticamente ativa (LICHTENTHALER, 2011). Contudo, não podemos afirmar que a ADAM10 está completamente inativa no estágio inicial de sua endocitose, quando ainda não foi degradada (SAFTINH & LICHTENTHALER, 2015) (figuras 4 e 5). O domínio metaloprotease da ADAM10 contém um grupo de aminoácidos (HEXXHXXGXXH) que possui capacidade de ligação com zinco. Os domínios da ADAM10 são compostos por várias ligações dissulfídicas estabilizantes (JANES *et al.*, 2005). Sendo o domínio transmembrana essencial para a atividade proteolítica da ADAM10. Em contraste, o

domínio intracelular da ADAM10 inibe a clivagem através da retenção da proteína no RE através uma região rica em arginina (MARETZKY *et al.*, 2015). No domínio intracelular, há a presença de uma região de homologia de Src3 (SH3), muito importante para o tráfego intracelular da ADAM10. Experimentos de mutagênese nesta região SH3 levaram a uma distribuição desordenada da ADAM10 na superfície celular. Várias proteínas que reconhecem o domínio SH3 podem se ligar à ADAM10, incluindo as tirosinas quinases, sendo que todas essas proteínas desempenham papéis importantes na regulação dos níveis e atividade da ADAM10 (EBSSEN *et al.*, 2014).

Figura 4. Estrutura multimodular da ADAM10. Fragmento C-terminal, sADAM10: forma solúvel e inativa, ADAM10 FL: forma ativa completa, Pró-ADAM10: proteína inativa com a presença do pró-domínio que mantém esta proteína inativa mesmo na forma ancorada à membrana.

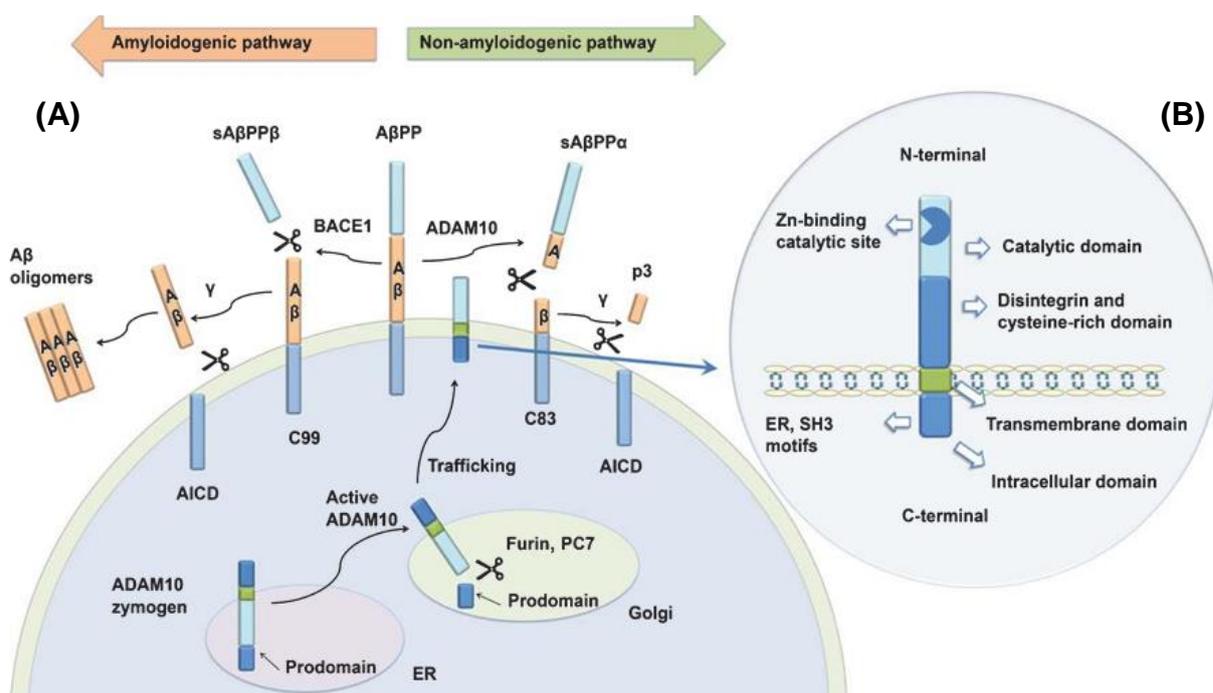


Extraído e modificado de PERON *et al.*, 2018.

A clivagem mediada por ADAM10 é rigidamente regulada nos níveis transcricional, traducional e pós-traducional (PERON *et al.*, 2018). Contudo, ainda não estão completamente claros todos os mecanismos de controle celular da clivagem mediada por ADAM10 (VICENT, 2016), mas possivelmente o tráfego intracelular é uma das vias mais importantes para esta regulação.

Estratégias para aumentar a atividade das α -secretases podem ser consideradas abordagens terapêuticas para pacientes com DA (FAHRENHOLZ, 2010). Portanto, a modulação positiva da expressão da ADAM10 pode ser considerada como uma ferramenta de intervenção terapêutica, uma vez que isso é possível por meio de diferentes tipos de compostos ou vias de regulação (PERON *et al.*, 2018).

Figura 5. Maturação e estrutura da ADAM10 inserida na membrana. **(A)** A ADAM10 é produzida como um zimogênio no retículo endoplasmático (RE) e amadurece como protease ativa após a remoção de seu pró-domínio por furinas ou PC7 durante a passagem pelo complexo de Golgi. As duas vias de clivagem da APP, via amiloidogênica e via não amiloidogênica são mostradas. A via amiloidogênica é mediada por β (BACE1) e γ -secretases, levando à produção de $A\beta$. A via não amiloidogênica é mediada por α (ADAM10) e γ -secretases, gerando $sAPP\alpha$ e peptídeo p3. **(B)** A ADAM10 possui uma região transmembrana e uma região intracelular (C-terminal), além da região extracelular, que é formada pelos domínios catalítico, metaloprotease, desintegrina e uma região rica em cisteína (N-terminal).



Extraído e modificado de Xiang-Zhen *et al.*, 2017.

Estudos anteriores de outros grupos (COLCIAGHI *et al.*, 2002; TANG *et al.*, 2006), bem como os desenvolvidos pelo nosso próprio grupo de pesquisa (MANZINE *et al.*, 2013) demonstraram que os níveis da ADAM10 estão diminuídos em plaquetas de pacientes com DA e essa redução foi relacionada ao avanço da doença. Entretanto, a

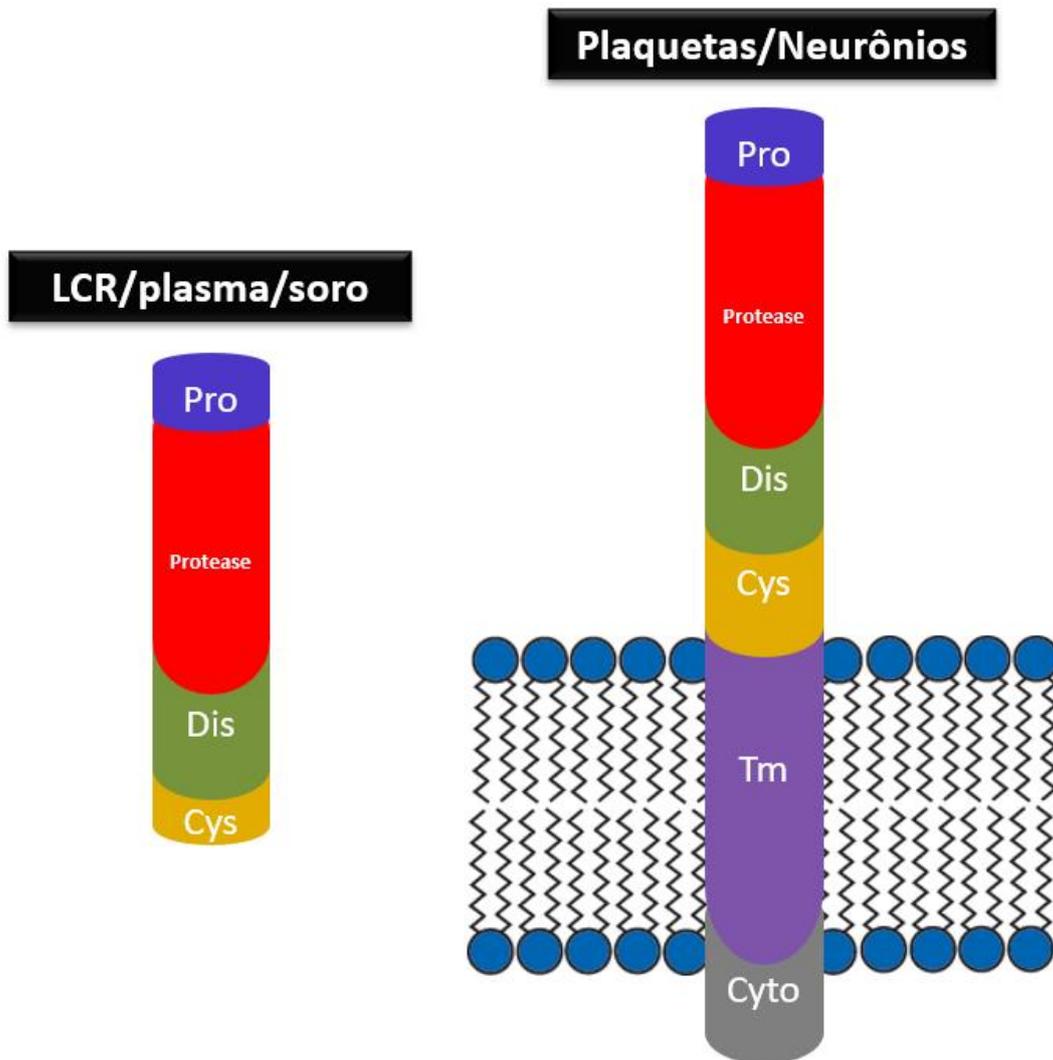
expressão do gene para ADAM10 nas plaquetas dos pacientes com DA não apresentou diferenças significativas em relação ao grupo de comprometimento cognitivo leve ou controles normais (MANZINE *et al.*, 2015). De todo modo, pesquisadores têm apontado que a identificação da ADAM10 como um biomarcador pode ser usado como importante ferramenta para auxiliar no diagnóstico clínico de DA (MANZINE *et al.*, 2014). Além disso, foi demonstrado que os níveis plaquetários de ADAM10 estão aumentados no envelhecimento cognitivamente saudável, o que reforça ainda mais o papel desta proteína como ferramenta para estudo da DA (SCHUCK *et al.*, 2016).

1.5 Relevância do estudo

Conforme SHI *et al.*, 2018 há grande necessidade de biomarcadores diagnósticos que possam ser coletados e medidos de forma simples e barata. Pensando nisso e diante do amplo número de indivíduos acometidos com a doença de Alzheimer, do grande conflito e da dificuldade no diagnóstico preciso da DA é necessário um biomarcador de fácil acesso com simples processamento e análise. Nesse estudo destacamos o soro sanguíneo como possível biomarcador para DA pois comparado a análise da ADAM10 em plaquetas é mais simples e rápida a análise laboratorial.

Este trabalho teve como hipótese que a ADAM10 estaria ativa quando ancorada à membrana de neurônios e plaquetas, mas inativa e solúvel no LCR, plasma e soro sanguíneo (figura 6). Adicionalmente, hipotetizamos que os níveis de ADAM10 inativa estariam maiores em pessoas com DA, comparado com pessoas sem a doença. Para validar tal hipótese, os níveis e a atividade da ADAM10 no LCR e soro sanguíneo de pacientes com TNCL e DA foram avaliados, comparando-se com os níveis e atividades da ADAM10 de pessoas cognitivamente saudáveis. Desta forma, o desenvolvimento deste projeto pretendeu colaborar com estudos anteriores relacionados a biomarcadores para a DA, bem como para o reforço diagnóstico e melhor entendimento da fisiologia desta doença e da própria ADAM10.

Figura 6. Estrutura da ADAM10 na forma ativa ancorada à membrana de neurônios e plaquetas e na forma inativa e solúvel no LCR, plasma e soro sanguíneo.



2. OBJETIVO

Este estudo teve como objetivo avaliar o nível e a atividade da ADAM10 em amostras de LCR e soro sanguíneo de indivíduos com doença de Alzheimer e TNCL e comparar estes achados com os obtidos em sujeitos controle, sem alteração cognitiva.

2.1 Objetivos específicos

- Examinar e comparar os níveis da proteína ADAM10 no LCR e soro sanguíneo de indivíduos com TNCL amnésico (TNCLa) e doença de Alzheimer (DA) com sujeitos controle (CTR), sem alteração cognitiva.
- Avaliar e comparar os níveis da atividade da ADAM10 em amostras de LCR e soro de indivíduos com TNCLa, DA e CTR e comparar a atividade da ADAM10 com amostras de plaquetas e ADAM10 recombinante humana.
- Análise dos dados sociodemográficos (idade, escolaridade) e avaliações neuropsicológicas dos participantes (MEEM e CDR).
- Análise das variáveis clínicas (peptídeo A β , t-tau e p-tau).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Todas as etapas deste trabalho obedeceram às diretrizes da resolução CNS 466/12 que trata sobre Ética na Pesquisa com seres humanos. O parecer substanciado do centro de pesquisa parceiro desse estudo, departamento de Neurologia da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), sob coordenação do Professor Dr. Márcio Luiz Figueredo Balthazar, foi registrado e a pesquisa foi aprovada pelo comitê de ética no CEP da UNICAMP sob o número de protocolo 188.021.

Trata-se de um estudo experimental de pesquisa quantitativa. Foi desenvolvido no município de São Carlos em parceria com o departamento de Neurologia da UNICAMP, sob responsabilidade do Professor Dr. Márcio Luiz Figueredo Balthazar.

3.1 Participantes

A coleta de dados teve início no início do ano de 2017, as amostras dos materiais biológicos, resultando em variáveis clínicas foram coletadas e analisadas, alimentando o banco de dados do departamento de Neurologia da UNICAMP. As coletas de LCR e sangue foram realizadas por um médico especialista respeitando todas as normas éticas previamente citadas nesse estudo e de acordo com as diretrizes da instituição.

Participaram dessa pesquisa 24 pessoas, das quais foram coletadas amostras de LCR e sangue. As primeiras análises realizadas no Laboratório de Biologia do Envelhecimento (LABEN), no departamento de Gerontologia da UFSCar, as amostras de LCR foram concluídas sob a condição duplo cego. Nas seguintes análises de LCR e soro, realizadas também para os fins desse estudo, os participantes foram divididos em grupos, denominados grupos TNCLa, DA e CTR. Foram extraídos dados sociodemográficos (idade, escolaridade) e avaliações neuropsicológicas dos participantes. As avaliações neuropsicológicas utilizadas foram o MEEM, instrumento de rastreio utilizado na detecção de perdas cognitivas e o CDR, escala que mensura a gravidade da demência.

3.2 Quantificação de proteínas totais

Para a quantificação de proteínas totais do LCR e soro foi utilizado o método de ensaio proteico *Pierce* BCA, que é um método baseado no ácido bicinconínico (BCA) para a detecção colorimétrica e quantificação total de proteínas.

3.3 Quantificação de ADAM10 – Western Blotting

Após determinada a concentração de proteínas totais de cada amostra, foi realizada a quantificação específica dos níveis da ADAM10 utilizando a técnica de análise SDS-PAGE (Gel de eletroforese de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio) seguida de *western blotting*. Um volume específico de cada amostra de LCR e soro, correspondendo a 4µg de proteína foi reservado e adicionado um tampão de amostra [Tris-HCl 0,125M pH 6,8, SDS 4% (w/v), glicerol 20% (v/v), β-mercaptoetanol 0,1M e azul de bromofenol 0,2% (w/v)]. As amostras foram aquecidas em banho seco a 100°C por 5 minutos. Após esse processo de desnaturação das proteínas as amostras foram aplicadas em gel de poliacrilamida 10% (BIO RAD). O padrão de massa molecular (*Precision Plus Protein Standards* – BIO RAD) foi utilizado em todos os géis. A corrida de eletroforese foi realizada durante 90 minutos a 120 V (Mini-PROTEAN® *Tetra Vertical Electrophoresis* – BIO RAD).

Após a eletroforese as proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose (Sigma) com auxílio do sistema de transferência Mini Trans-Blot Cell (BIO RAD). A transferência das proteínas para as membranas foi confirmada com a coloração das mesmas em solução de *Ponceau* [Ponceau 0,5% (m/v) em ácido acético 0,1% (v/v)]. A coloração com *Ponceau* revelou a presença de uma banda de aproximadamente 66kDa, a qual corresponde à proteína albumina, abundante no soro e presente no LCR, a qual foi utilizada como normalizadora (controle endógeno) na quantificação das amostras. Posteriormente, as membranas foram incubadas em solução de bloqueio (Blocker 3% - BIO RAD) em plataforma oscilante por uma hora em temperatura ambiente. Em seguida, as membranas foram incubadas *overnight* com anticorpo primário anti-ADAM10 (*ProScience*, utilizado na diluição 2µg/ml) diluído em solução de bloqueio. Após três lavagens com Tris-buffered saline – Tween 0,2% [TBST, Tris 250 mM, cloreto de sódio

1,4M, cloreto de potássio 50 mM, Tween 20, água destilada] as membranas foram incubadas por 2h em temperatura ambiente com anticorpo secundário Goat Anti-Rabbit - HRP 97051 (Abcam, utilizado na diluição 1µg/ml) diluído em solução de bloqueio. Finalmente, após mais 3 lavagens com TBST as membranas foram reveladas por detecção colorimétrica com Opti-4CN *Substrate Kit* (BIO RAD) e as bandas reveladas no aparelho *ChemiDoc™ MP Imaging System* (BIO RAD). A quantificação das bandas foi feita usando o *software ChemiDoc™ MP Imaging System* (BIO RAD).

3.4 Ensaio de atividade

Esse ensaio foi realizado no leitor de fluorescência, Fluorímetro *Sinergy HI*, com utilização do peptídeo fluorogênico (*Fluorogenic Peptide Substrate III*- ES003 R&D Systems). Para o ensaio de atividade da ADAM10 foram utilizadas 24 amostras de LCR e as amostras do soro correspondentes (dos mesmos participantes), 2 amostras de plaquetas de participantes com DA e 2 amostras de plaquetas de participantes jovens, utilizadas como controles. Todas as amostras foram analisadas em duplicata com volume final de 50µl por poço, em placa escura de 96 poços (*Greiner Bio-One, Frickenhausen, Germany*). Foram utilizadas 20 µg de proteínas totais de cada amostra de LCR e soro, as quais foram adicionadas aos poços da placa, juntamente com tampão de reação [20 mM Tris-HCl, 2,5 µM ZnCl₂, pH 8.0] e peptídeo fluorogênico [10µM]. Foram também adicionadas na placa amostras de controle negativo (branco), contendo somente o tampão de reação e o peptídeo fluorogênico e de controles positivos, com ADAM10 recombinante humana (Cat. No. 936-AD-020 R&D Systems), juntamente com tampão de reação e peptídeo fluorogênico, realizadas de acordo com protocolo do fabricante. Para checar a especificidade do sinal obtido, amostras com plaquetas foram analisadas na presença de 10 µM do inibidor GI254023X (Cat. No. 3995, R&D Systems) na reação com pré-incubação de 5 min a 37°C no escuro antes da adição do peptídeo fluorogênico.

O aumento da intensidade da fluorescência nas amostras foi determinado pelo leitor de fluorescência, com excitação de 320nm e emissão de 405nm a cada 2 min por 60 min, em temperatura de 37°C durante as medidas, com agitação duplo orbital antes de cada ciclo de medida. Para análises comparativas, os valores obtidos foram utilizados subtraídos do branco (tampão sem proteína).

A curva de calibração da ADAM10 recombinante [25ng/mL, 12,5ng/mL, 6,25ng/mL, 3,12ng/mL, 1,56ng/mL, 0,78ng/mL, 0,39ng/mL, 0ng/mL] foi realizada

considerando 0-150 minutos (medida a cada 30 minutos). Os valores das amostras com e sem inibidor de ADAM10 foram inseridos na linha de equação da ADAM10 recombinante, no tempo de 60 minutos e subtraídos por um branco (tampão sem proteína). A subtração desses dados gerou valores específicos para atividade da ADAM10 em concentrações determinadas em ng/mL.

4. RESULTADOS

4.1 Dados sociodemográficos, avaliações neuropsicológicas e variáveis clínicas

As análises e os resultados dos dados sociodemográficos, avaliações neuropsicológicas e variáveis clínicas foram obtidos pelo grupo de pesquisa do centro de neurologia da UNICAMP, com o qual colaboramos neste estudo.

Os resultados dos dados sociodemográficos mostram que a idade dos indivíduos variou de 57 a 69 anos no grupo controle (CTR), de 65 a 81 anos no grupo com transtorno neurocognitivo leve (TNCLa) e de 59 a 81 anos no grupo com doença de Alzheimer (DA), apresentando significância estatística entre os grupos TNCLa e DA quando comparados com o controle.

A variação do tempo de escolaridade foi de 4 a 18 anos de estudo no grupo CTR, 2 a 15 anos de estudo no grupo TNCLa e de 4 a 15 anos de estudo no grupo DA, não apresentando significância estatística. Na pontuação do MEEM a variação do grupo CTR foi de 23 a 30 pontos, TNCLa de 24 a 30 pontos e do grupo DA de 8 a 24 pontos, apresentando significância estatística o grupo DA quando comparados com o controle saudável, conforme o esperado. Com relação a escala CDR, a pontuação foi de 0 no grupo CTR, 0,5 no grupo TNCLa e variou de 0,5 a 2 no grupo DA (tabela 1).

Os resultados referentes aos dados clínicos mostram que a média dos grupos para os níveis de proteína tau total (t-tau) no LCR foi 80,3pg/mL para o grupo CTR, 103,3pg/mL para o grupo TNCLa e 139,8pg/mL para o grupo DA, não apresentando os grupos TNCLa e DA significância estatística quando comparados com o controle. A média dos grupos para os níveis de proteína tau fosforilada (p-tau) no LCR foi 35pg/mL para o grupo CTR, 38pg/mL para o grupo TNCLa e 58,8pg/mL para o grupo DA, não apresentando os grupos TNCLa e DA diferenças estatísticas significantes quando comparados com o controle. A média dos níveis de peptídeo A β no LCR foi 541,7pg/mL

para o grupo CTR, 530,3pg/mL para TNCLa e 304,8pg/mL para DA, também não apresentando significância estatística entre os grupos TNCLa e DA quando comparados com o controle saudável (tabela 2). A ausência de significância estatística com relação a tais dados pode ser explicada pelo baixo número de sujeitos em cada grupo amostral.

Tabela 1. Variáveis sociodemográficas e avaliações neuropsicológicas dos sujeitos dos grupos controle (CTR), transtorno neurocognitivo leve do tipo amnésico (TNCLa) e doença de Alzheimer (DA).

| Variável | CTR | TNCLa | DA |
|--|--------------|---------------------------|---------------------------|
| Casos (n/%) | 8/33,3 | 7/29,2 | 9/37,5 |
| Idade, média (intervalo)* | 63,7 (57-69) | 71,1 (65-81) ^a | 72,9 (59-81) ^a |
| Escolaridade, média (intervalo) | 10,2 (4-18) | 7,4 (2-15) | 6,5 (4-15) |
| MEEM, média (intervalo)** | 28,3 (23-30) | 27 (24-30) | 17,4 (8-24) ^a |

Composição dos grupos: CTR 100% mulheres; TNCLa 71,4% mulheres; DA 77,7% mulheres. CDR, MEEM, Mini exame do estado mental. Teste de Kruskal-Wallis e teste Mann-Whitney seguido do teste ANOVA One-way, realizados no programa *Graph Pad Prism 5.2*. ^ap<0,05. ^bp<0,0001. **Idade:** CTR≠TNCLa, CTR≠DA. **MEEM:** CTR≠DA

Tabela 2. Variáveis clínicas dos sujeitos dos grupos controle (CTR), transtorno neurocognitivo leve do tipo amnésico (TNCLa) e doença de Alzheimer (DA).

| Variável (pg/mL) | CTR | TNCLa | DA |
|--------------------------|-------------|-------------|-------------|
| t-tau, média ± DP | 80,3±38,4 | 103,3±32,8 | 139,8±81,5 |
| p-tau, média ± DP | 35±16,6 | 38±9,7 | 58,8±33,7 |
| Aβ, média ± DP | 541,7±302,2 | 530,3±365,2 | 304,8±118,9 |

Resultados da análise e quantificação do LCR para: t-tau (proteína tau total); p-tau (proteína tau fosforilada); Aβ (peptídeo Aβ). Teste Mann-Whitney seguido do teste ANOVA One-way, realizados no programa *Graph Pad Prism 5.2*.

4.2 Quantificação de ADAM10 – Western Blotting

A quantificação da ADAM10 nas membranas após revelação nos ensaios de *western blotting* foi realizada para determinar seus níveis, tanto no LCR, quanto no soro dos pacientes com DA, TNCLa e controles cognitivamente saudáveis. A quantificação da albumina foi realizada e os valores obtidos foram utilizados como controle endógeno, de forma que os gráficos foram construídos utilizando a razão dos níveis de ADAM10/albumina (apêndice 1). As medidas representam a intensidade das bandas em volume e os resultados são apresentados como Unidade Arbitrária (UA), sendo que quanto maior a quantidade da protease ADAM10, maior a intensidade da banda. As figuras 7 e 8 apresentam os resultados obtidos com amostras de LCR e soro, respectivamente.

Para ambas as amostras de LCR e soro, não houve diferenças significativas entre os níveis da ADAM10 entre os grupos CTR e TNCLa. Entretanto, comparando o grupo CTR com o grupo DA, foram encontradas diferenças significativas entre os níveis de ADAM10.

Figura 7. Membranas resultantes dos experimentos de *western blotting* e respectivo gráfico com a quantificação das bandas correspondentes à ADAM10 no LCR. **(A)** Membranas contendo as amostras de LCR dos sujeitos controle (CTR), com transtorno neurocognitivo leve amnésico (TNCLa) e doença de Alzheimer (DA). Os números correspondem aos indivíduos de cada grupo. As bandas apresentadas correspondem à ADAM10 com massa molecular de ~50 kDa. **(B)** Comparação dos níveis da ADAM10 obtidos nos grupos CTR, TNCLa e DA. O grupo TNCLa não apresentou diferença estatística significativa quanto aos níveis de ADAM10 no LCR, quando comparado ao controle. O grupo DA apresentou diferença quando comparado ao controle (** $p < 0.001$), Teste *ANOVA One-way*, seguido do teste *Mann-Whitney* realizados no programa Graph Pad Prism 5.2.

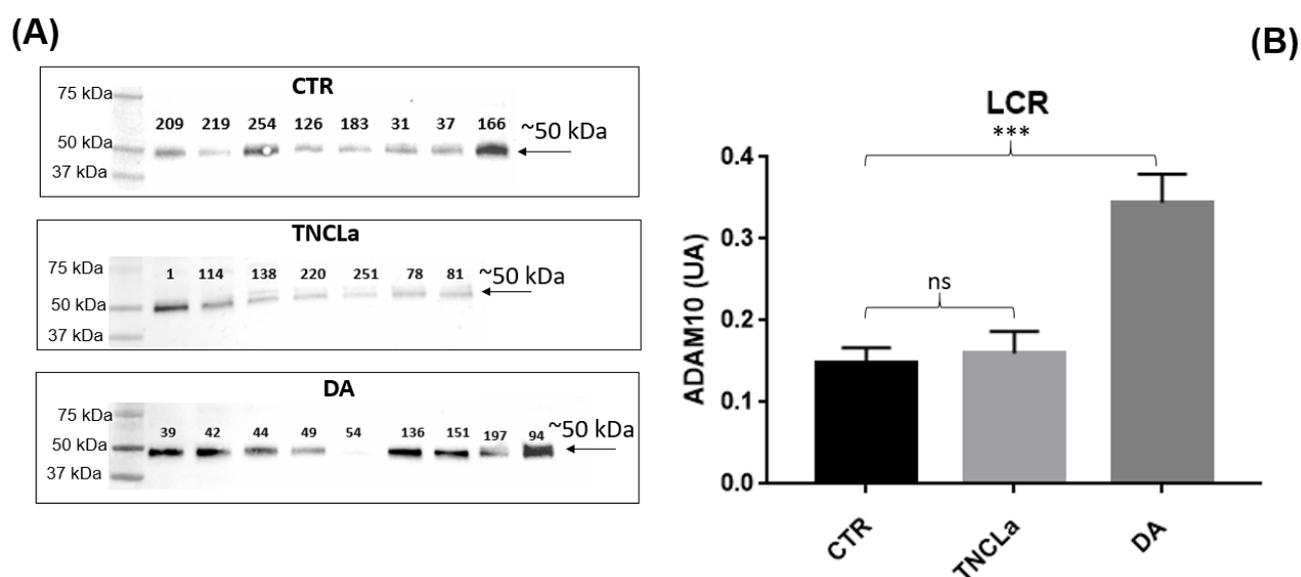
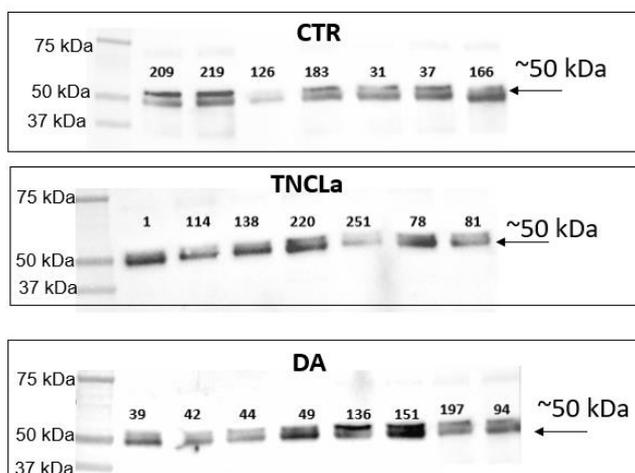
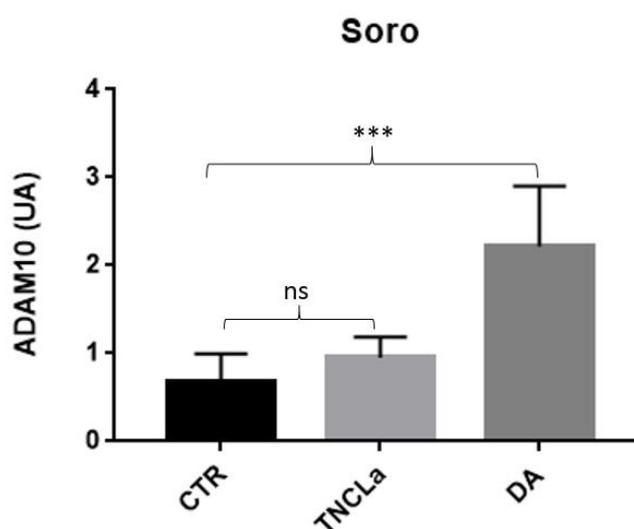


Figura 8. Membranas resultantes dos experimentos de *western blotting* e respectivo gráfico com a quantificação das bandas correspondentes à ADAM10 no soro. **(A)** Membranas contendo as amostras de soro dos sujeitos controle (CTR), com transtorno neurocognitivo leve amnésico (TNCLa) e doença de Alzheimer (DA). Os números correspondem aos indivíduos de cada grupo. As bandas apresentadas correspondem à ADAM10 com massa molecular de ~50 kDa. **(B)** Comparação dos níveis da ADAM10 obtidos nos grupos CTR, TNCLa e DA. O grupo TNCLa não apresentou diferença estatística significativa quanto aos níveis de ADAM10 no soro, quando comparado ao controle. O grupo DA apresentou diferença quando comparado ao controle (***) $p < 0.001$). Teste *ANOVA One-way*, seguido do teste *Mann-Whitney* realizados no programa Graph Pad Prism 5.2.

(A)**(B)**

4.3 Atividade de ADAM10 – ensaio de clivagem

Nesse experimento foi avaliada a atividade da ADAM10. O controle positivo foi formado pela ADAM10 recombinante humana, na concentração de 25ng/mL (gráfico 1, linha marrom). Amostras de plaquetas de pacientes jovens também foram utilizadas neste experimento e mostraram-se positivas para atividade da ADAM10 (linha laranja). Para comprovar que a ADAM10 é a protease que realmente apresentou atividade nas amostras de plaquetas, foi utilizado um inibidor de ADAM10 (linha preta) nas amostras de plaqueta, mostrando que a atividade majoritária corresponde a ADAM10 e não outras proteases que eventualmente estariam presentes na amostra, uma vez que o substrato fluorogênico pode ser clivado por outras proteases.

A atividade proteolítica da ADAM10 foi significativamente maior nas plaquetas (e para a ADAM10 recombinante) quando comparado às amostras de LCR, tanto para os sujeitos cognitivamente saudáveis (linha azul), TNCLa (linha vermelha) e DA (linha verde). Contudo, entre estas amostras, diferentemente do observado para os níveis de ADAM10 através dos experimentos de *western blotting*, não houve diferença significativa. Os mesmos experimentos foram realizados com amostras de soro e o mesmo padrão de resultados se repetiu (gráfico 2).

Gráfico 1: Atividade da ADAM10 no LCR. Análise da atividade de ADAM10 ao longo do tempo entre os grupos controle (CTR, linha azul), transtorno neurocognitivo leve do tipo amnésico (TNCLa, linha vermelha) e doença de Alzheimer (DA, linha verde) no LCR. Controles utilizando amostras de plaquetas (linha laranja) e ADAM10 recombinante (linha marrom), além da utilização de um inibidor específico para ADAM10 (linha preta) representados no gráfico. Os grupos CTR, TNCLa e DA apresentaram diferença estatística significativa quando comparados às plaquetas (***) $p < 0.001$). Teste ANOVA *One-way*, seguido do teste *Kruskal-Wallis*, realizados no programa Graph Pad Prism 5.2.

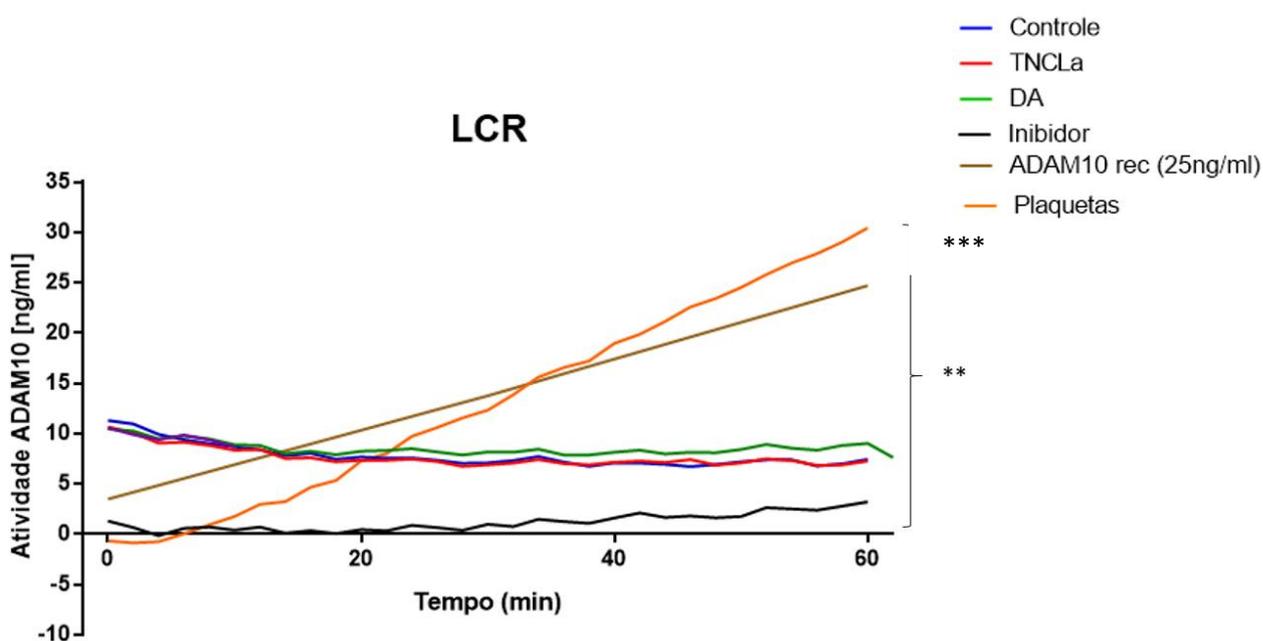
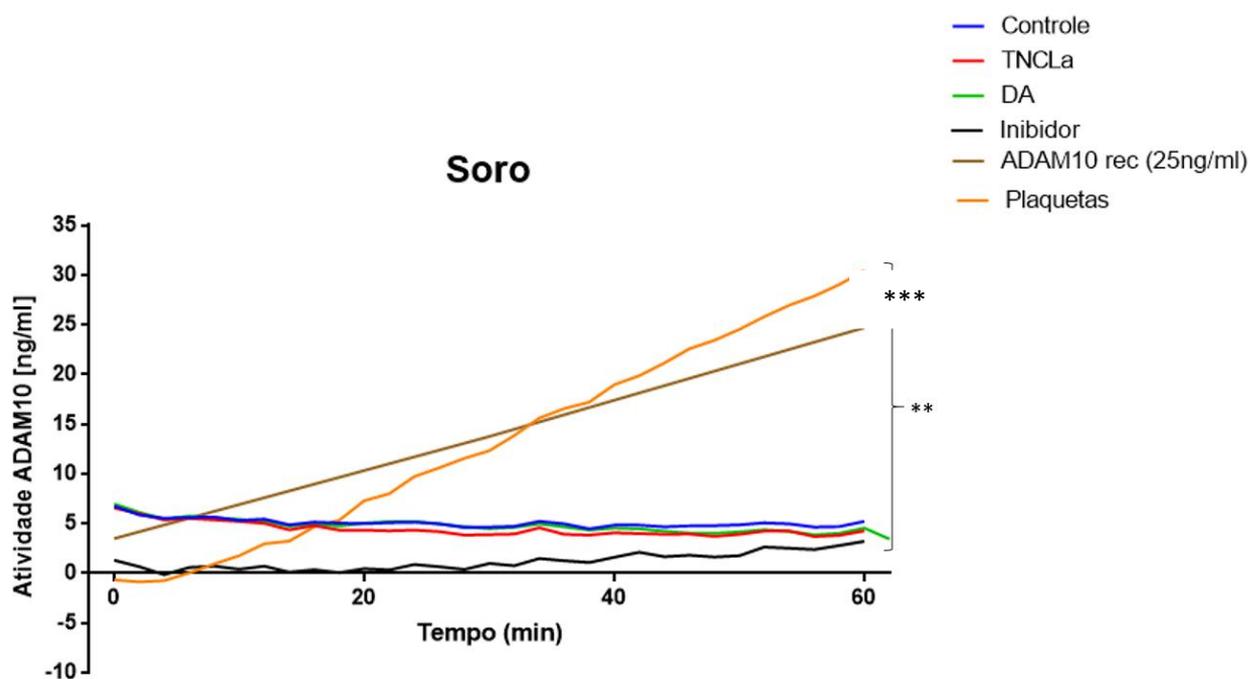


Gráfico 2: Atividade da ADAM10 no soro. Análise da atividade de ADAM10 ao longo do tempo entre os grupos controle (CTR, linha azul), transtorno neurocognitivo leve do tipo amnésico (TNCLa, linha vermelha) e doença de Alzheimer (DA, linha verde) no soro. Controles utilizando amostras de plaquetas (linha laranja) e ADAM10 recombinante (linha marrom), além da utilização de um inibidor específico para ADAM10 (linha preta) representados no gráfico. Os grupos CTR, TNCLa e DA apresentaram diferença estatística significativa quando comparados às plaquetas (***) $p < 0.001$). Teste ANOVA *One-way*, seguido do teste *Kruskal-Wallis*, realizados no programa Graph Pad Prism 5.2.



5. DISCUSSÃO

Nesse estudo avaliamos os níveis e a atividade da ADAM10 em amostras LCR e soro sanguíneo de indivíduos com doença de Alzheimer (DA) e transtorno neurocognitivo leve do tipo amnésico (TNCLa) e comparamos estes achados com os obtidos em sujeitos sem alteração cognitiva. Assumimos que a ADAM10 está inativa por conta dos resultados obtidos nos ensaios de atividade. Não houve diferenças entre os níveis de ADAM10 inativa entre sujeitos com TNCLa quando comparados com os controles cognitivamente saudáveis, como observado nos experimentos de *western blotting*. Contudo, os indivíduos com DA apresentaram maiores níveis da protease ADAM10 inativa quando comparados ao grupo controle.

Já foi demonstrado na literatura que os níveis da ADAM10 em plaquetas estão aumentados no envelhecimento saudável (SCHUCK *et al.*, 2016) e reduzidas em indivíduos com DA (MANZINE *et al.*, 2013 e COLCIAGHI *et al.*, 2002), indicando que esta protease desempenha um importante papel, aumentando a resiliência aos processos neurodegenerativos. Contudo, estudos do nosso laboratório também demonstraram que a expressão do gene ADAM10 nas plaquetas não mostrou diferenças significativas entre os grupos com DA, transtorno neurocognitivo leve e os controles cognitivamente saudáveis (MANZINE *et al.*, 2015).

Recentemente, Sogorb-Esteve *et al.* (2018) analisaram os níveis de ADAM10 no LCR pela técnica de SDS-PAGE, porém, utilizando ultracentrifugação diferencial em gradiente de sacarose, bem como imunoprecipitação. Diferentemente do nosso processo, pois nós analisamos diretamente as amostras de LCR, sem tratamento adicional. Os autores observaram que a ADAM10 está presente no LCR humano como várias espécies, com diferentes massas moleculares. Os autores também encontraram que as formas que

classificaram como maduras e ativas de ADAM10 estão diminuídas no LCR de indivíduos com DA, enquanto que a concentração de ADAM10 que chamaram de imatura (pró-ADAM10 de ~80 kDa) estava inalterada (SOGORB-ESTEVE *et al.*, 2018). Estes resultados corroboram parcialmente com nossos achados, visto que em nosso estudo observamos a ADAM10 na forma solúvel e inativa com valores aumentados na DA, quando comparado com os controles cognitivamente saudáveis, pelos resultados obtidos nos ensaios de *western blotting*.

Outra diferença entre os estudos foi a utilização de diferentes tipos de anticorpos. Enquanto os autores utilizaram anticorpos anti-N-terminal policlonais de coelho (ab39153, Abcam) e anti-C-terminal monoclonais de coelho (ab124695, Abcam), nós utilizamos o anticorpo anti-C-terminal policlonal de coelho (*ProScience*), o que pode ajudar a explicar as diferenças entre os dois estudos. Neste sentido e visando uma futura aplicação prática do uso da ADAM10 como biomarcadora para DA é importante buscar uma padronização metodológica e adotar práticas, reagentes e materiais específicos para condutas laboratoriais, de modo a não haver conflito metodológico ou disparidade de resultados. De fato, a necessidade de uma padronização dos ensaios relacionados a biomarcadores para a DA vem sendo enfatizado na literatura nos últimos tempos (McKHANN *et al.*, 2011).

Com relação a atividade da ADAM10, observamos que esta protease se apresentou inativa em amostras de LCR e soro sanguíneo, enquanto que em amostras de plaquetas, a ADAM10 mostrou-se ativa. Os grupos CTR, TNCLa e DA, em amostras de LCR e soro, apresentaram diferença estatística significativa quando comparados as plaquetas. Esses resultados fortalecem nossa hipótese de que a ADAM10 se encontraria na forma inativa no LCR, soro e plasma sanguíneo e ativa nos neurônios e em plaquetas.

Outros estudos estão em andamento em nosso grupo, utilizando células de neuroblastoma, de forma a definitivamente comprovar estes resultados.

Corroborando com nossa hipótese, diferentes autores mostraram que a ADAM10 é sintetizada em uma forma inativa, e é então posteriormente clivada durante o seu transporte ao longo da via secretora, possibilitando atividade enzimática na membrana plasmática (ANDERS *et al.*, 2001; LAMMICH *et al.*, 1999). Também foi demonstrado que a ADAM10 se liga à proteína SAP97 e essa interação direta comanda o recrutamento de ADAM10 para membrana sináptica, bem como sua atividade. Este mecanismo representa uma nova via de ativação da clivagem fisiológica da ADAM10 nas sinapses neuronais (MARCELLO *et al.*, 2017) e pode ajudar a explicar a presença de atividade da proteína apenas quando a mesma se encontra ancorada à membrana, seja neuronal ou plaquetária.

Além da SAP97, outras proteínas mostraram-se parceiras da ADAM10. Entre elas estão as tetraspaninas (Tspans). A função de interação das Tspans com a ADAM10 ocorre por mecanismos de regulação de seu tráfego intracelular, mobilidade lateral e agrupamento na superfície celular (CHARRIN *et al.*, 2014; HEMLER, 2014). Algumas Tspans foram descritas como parceiras da ADAM10, controlando seu tráfego intracelular e posicionamento na membrana plasmática, demonstrando que a interação dessa secretase com outras proteínas é um mecanismo chave responsável por sua regulação (DORNIER *et al.*, 2012; ZHOU *et al.*, 2014). Especificamente a TspanC8 regula a saída da ADAM10 do retículo endoplasmático e a transporta para a membrana plasmática, com consequente remoção do pró-domínio inibitório, promovendo a sua maturação (HAINING *et al.*, 2012; DORNIER *et al.*, 2012). A presença de proteínas parceiras da ADAM10, portanto, pode também explicar por que a atividade desta proteína somente ocorreria quando a mesma está ancorada à membrana. Não menos importante, esse estudo demonstrou, que a

atividade da ADAM10 está ausente no LCR e soro sanguíneo, porém presente em plaquetas, o que confirma uma das hipóteses deste estudo, de que a ADAM10 precisaria estar ancorada à membrana para manter sua atividade biológica de protease. Contudo, devido ao baixo número amostral deste trabalho, estudos posteriores aos nossos são necessários para definitivamente confirmar essa hipótese. Tais estudos devem utilizar, além de um maior número de sujeitos, também amostras de células nervosas em cultura, de preferência com separação das membranas para avaliação específica da atividade neste compartimento celular. Isto poderia ser feito por centrifugação diferencial das amostras, de modo a analisar especificamente esta fração celular.

Com relação as características sociodemográficas dos sujeitos, observamos que na variável idade, houve significância estatística entre os grupos DA quando comparados com o controle. Estes resultados são esperados, pois sabe-se que o principal fator de risco para a DA é o avançar da idade (WANG & DING, 2008).

Na pontuação do MEEM houve diferença estatística significativa para o grupo DA, quando comparados com os sujeitos cognitivamente saudáveis. A nota no MEEM determina escores médios, levando em consideração o nível de escolaridade do indivíduo. As notas de corte do MEEM são: 20 pontos para indivíduos analfabetos, 25 pontos para 1 a 4 anos de estudo, 26,5 pontos para 5 a 8 anos de estudo, 28 pontos para 9 a 11 anos e para indivíduos com escolaridade superior a 11 anos, 29 pontos (BRUCKI *et al.*, 2003). Isso está de acordo com nossos resultados, já que os indivíduos diagnosticados com DA foram os que obtiveram menor pontuação nesse instrumento de rastreio, tendo sido obtido uma média de 17,4 pontos no MEEM para o grupo DA que possuía uma média de escolaridade de 6,5 anos de estudo.

Os resultados da escala CDR foram maiores no grupo DA, quando comparados com o grupo formado por sujeitos cognitivamente saudáveis. A CDR, utilizada no

diagnóstico de demências, classifica o indivíduo em classes (CDR 0 – sem alteração cognitiva, CDR 0,5 – alteração cognitiva questionável, CDR 1 – demência leve e CDR 2 – demência moderada) (MAIA *et al.*, 2006). Sendo assim, quanto maior a gravidade do quadro demencial, maior a pontuação no CDR. Os resultados que obtivemos eram esperados, pois os indivíduos classificados com demência foram os que obtiveram maior pontuação na CDR.

Considerando a composição de acordo com o gênero, esse estudo foi composto em sua maior parte por voluntárias mulheres (CTR 100% mulheres; TNCLa 71,4% mulheres; DA 77,7% mulheres) e sendo pequeno o conjunto de dados que analisamos, não foi possível vincular nossos achados para fazer afirmações e relacioná-las aos gêneros. Em outra análise de pequena coorte também não foi observado diferença estatística da ADAM10 nas plaquetas entre homens e mulheres (SCHUCK *et al.*, 2016).

Indivíduos com DA têm um aumento no LCR dos níveis de t-tau e p-tau, apresentando menores níveis de A β 1-42 (BLENNOW *et al.*, 2010), quando comparado com controles cognitivamente saudáveis. O aumento dos níveis de p-tau no LCR sugere sua liberação dos microtúbulos após danos em neurônios (SHAW *et al.*, 2009). Reduções na concentração de A β 1-42 no LCR são consideradas assinaturas patológicas para o diagnóstico da DA, assim como o aumento dos níveis de t-tau e p-tau no LCR de pacientes com DA (FORLENZA *et al.*, 2015).

Forlenza e colaboradores (2015) determinaram os valores de corte para biomarcadores líquóricos em uma amostra de idosos brasileiros com DA e encontraram para A β 42: <416,0 pg/ml [com sensibilidade (SE) de 83% e especificidade (ES) de 70% para o diagnóstico preciso], t-tau: >76,7pg/mL (SE: 82%, ES: 67%) e p-tau: >36,1 pg/mL (SE: 83%, ES: 49%). Os resultados obtidos em nosso estudo estão de acordo, portanto,

com a literatura, pois os indivíduos classificados no grupo DA apresentaram níveis líquóricos de A β : 304,8pg/mL, t-tau: 139,8pg/mL e p-tau: 58,8pg/mL. Apesar dos resultados dos níveis de t-tau, p-tau e A β nas amostras de LCR atenderem aos critérios de biomarcadores líquidos estabelecidos para DA, não apresentaram diferença estatística significativa para os grupos TNCLa e DA quando comparado com o controle. Uma possível explicação para este resultado seria o pequeno número de sujeitos e considerável desvio padrão obtido para cada grupo, sendo interessante uma análise com maior número de sujeitos para minimizar esse desvio e corroborar com nossos achados.

O diagnóstico diferencial da DA ainda é um desafio devido à sobreposição de características com outros tipos de demência. Considerando isso, a busca por biomarcadores em doenças neurodegenerativas como a DA é de extrema importância para definir e diagnosticar claramente o início da doença. Os biomarcadores para o diagnóstico diferencial da DA podem melhorar o valor diagnóstico e garantir um tratamento adequado aos pacientes. Com isso a relevância desse estudo se dá pelo aprimoramento do conhecimento sobre biomarcadores, especificamente a ADAM10, que podem contribuir para a precisão diagnóstica e a prescrição de fármacos no tratamento da doença (BLENNOW *et al.*, 2010).

Os resultados encontrados nesse trabalho, assim como estudos anteriores, evidenciam a relevância e o grande potencial da ADAM10 como possível candidata a biomarcadora para a DA, auxiliando no incremento da literatura e no desenvolvimento de marcadores precisos e acessíveis à população, para o diagnóstico da doença de Alzheimer.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Houve algumas limitações nesse trabalho, apresentadas aqui para que possam ser aprimoradas nos próximos estudos. O número de indivíduos analisados foi relativamente baixo, totalizando 24 indivíduos, o que representa sem dúvida um viés importante do estudo. Além disso, apesar de terem sido medidos os níveis dos biomarcadores clássicos (A β , t-tau e p-tau), não encontramos diferença significativa do A β nos grupos TNCLa e DA quando comparados com o controle, provavelmente também por conta do pequeno número de amostras. Trabalhos futuros provavelmente ganhariam força e qualidade se apenas fossem incluídos pacientes com evidência de fisiopatologia da DA, com níveis significativamente alterados de A β , t-tau e p-tau entre doentes e controles saudáveis, assim com maior número amostral.

Não foram excluídos desta pesquisa pacientes em uso de qualquer tipo de medicação, seja para o tratamento da doença, seja outro tipo de medicação que pudesse afetar os níveis e a expressão da ADAM10, o que também pode ser considerado um viés do estudo, visto que a literatura e estudos do nosso laboratório mostram que alguns medicamentos, assim como diversos princípios ativos, influenciam neste sentido (BIANCO et al., 2016; PERON et al., 2018). Não obstante, o desenvolvimento deste projeto possibilitou o incremento da literatura relacionada aos biomarcadores líqüóricos e sanguíneos para a DA, bem como contribuiu para um melhor entendimento da regulação da protease ADAM10. Novos estudos, contudo, são necessários para o melhor entendimento dos mecanismos que regulam a atividade desta protease.

7. REFERÊNCIAS

- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE ALZHEIMER; Disponível em <www.abraz.org.br>. Acesso em: 26 junho 2018.
- ALZHEIMER'S DISEASE INTERNATIONAL; Disponível em <www.adi2018.org>. Acesso em: 02 julho 2018.
- ALBERT, M. S. et al. The diagnosis of mild cognitive impairment due to Alzheimer's disease: Recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. **Alzheimer's and Dementia**, v. 7, n. 3, p. 270–279, 2011.
- ANDERS, A. et al. Regulation of the α -secretase ADAM10 by its prodomain and proprotein convertases. **The FASEB Journal**, v. 15, n. 10, p. 1837–1839, 2001.
- A. KÖHLER, C. et al. Neuropsychiatric Disturbances in Mild Cognitive Impairment (MCI): A Systematic Review of Population-Based Studies. **Current Alzheimer Research**, v. 13, n. 10, p. 1066–1082, 2016.
- BEACH, T. G. et al. Theoretical impact of florbetapir (18F) amyloid imaging on diagnosis of Alzheimer dementia and detection of preclinical cortical amyloid. **Journal of Neuropathology and Experimental Neurology**, v. 73, n. 10, p. 948–953, 2014.
- BEKRIS, L.M. et al. Genetics of Alzheimer Disease. **Journal of Geriatric Psychiatry and Neurology**. v. 23, n.4, p. 213–227, 2010.
- BESSON, F. L. et al. Cognitive and Brain Profiles Associated with Current Neuroimaging Biomarkers of Preclinical Alzheimer's Disease. **Journal of Neuroscience**, v. 35, n. 29, p. 10402–10411, 2015.
- BIANCO, O. A. F. M. et al. Serotonergic antidepressants positively affect platelet ADAM10 expression in patients with Alzheimer's disease. **International Psychogeriatrics**, v. 28, n. 6, p. 939–944, 2016.
- BLENNOW, K. et al. Cerebrospinal fluid and plasma biomarkers in Alzheimer disease. **Nature Reviews Neurology**, v. 6, n. 3, p. 131–144, 2010.

- BRAAK, H.; BRAAK, E. Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. **Acta Neuropathologica**, v. 82, n. 4, p. 239–259, 1991.
- BRUCKI, S. M. D. et al. Sugestões para o uso do mini-exame do estado mental no Brasil. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 61, n. 3 B, p. 777–781, 2003.
- BUERGER, K. et al. CSF phosphorylated tau protein correlates with neocortical neurofibrillary pathology in Alzheimer's disease. **Brain**, v. 129, n. 11, p. 3035–3041, 2006.
- CHAIMOWICZ F. Envelhecimento e Saúde no Brasil. In: Freitas EV, Py L, organizadores. **Tratado de geriatria e gerontologia**. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan; 2011. p. 74-98.
- CHARRIN, S. et al. Tetraspanins at a glance. **Journal of Cell Science**, v. 127, n. 17, p. 3641–3648, 2014.
- COLCIAGHI, F. et al. [alpha]-Secretase ADAM10 as well as [alpha]APPs is reduced in platelets and CSF of Alzheimer disease patients. **Molecular medicine (Cambridge, Mass.)**, v. 8, n. 2, p. 67–74, 2002.
- COLE, S. L.; VASSAR, R. The Alzheimer's disease β -secretase enzyme, BACE1. **Molecular Neurodegeneration**, v. 2, n. 1, p. 1–25, 2007.
- DORNIER, E. et al. Tspanc8 tetraspanins regulate ADAM10/Kuzbanian trafficking and promote Notch activation in flies and mammals. **Journal of Cell Biology**, v. 199, n. 3, p. 481–496, 2012.
- DUBOIS, B. et al. Research criteria for the diagnosis of Alzheimer's disease: revising the NINCDS-ADRDA criteria. **Lancet Neurology**, v. 6, n. 8, p. 734–746, 2007.
- EBSEN, H. et al. Identification of SH3 domain proteins interacting with the cytoplasmic tail of the α Disintegrin and Metalloprotease 10 (ADAM10). **PLoS ONE**, v. 9, n. 7, 2014.
- EVIN, G. Proteolytic Processing of the Alzheimer's Disease Amyloid Precursor Protein in Brain and Platelets. **Journal of Neuroscience Research**, v. 74, n. 3, p. 386–392, 2003.

- FAHRENHOLZ, F. The close link between retinoid signalling and the α -secretase ADAM10 and its potential for treating Alzheimer's disease (Commentary on Jarvis et al.). **European Journal of Neuroscience**, v. 32, n. 8, p. 1245–1245, 2010.
- FORLENZA, O. V. et al. Cerebrospinal fluid biomarkers in Alzheimer's disease: Diagnostic accuracy and prediction of dementia. **Alzheimer's and Dementia: Diagnosis, Assessment and Disease Monitoring**, v. 1, n. 4, p. 455–463, 2015.
- GOYANNA, N. F. et al. Idosos com doença de alzheimer: como vivem e percebem a atenção na estratégia saúde da família Elderly with alzheimer's disease: how they live and notice the attention in the health strategy of the family. **Revista de Pesquisa: Cuidado é Fundamental Online**, v. 9, n. 2, p. 379, 2017.
- GU, L.; LIU, C.; GUO, Z. Structural insights into A β 42 oligomers using site-directed spin labeling. **Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 26, p. 18673–18683, 2013.
- GUSTAFSON, D. R. et al. Cerebrospinal fluid β -amyloid1-42 concentration may predict cognitive decline in older women. **Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry**, v. 78, n. 5, p. 461–464, 2006.
- HAINING, E. J. et al. The TspanC8 subgroup of tetraspanins interacts with a disintegrin and metalloprotease 10 (ADAM10) and regulates its maturation and cell surface expression. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 47, p. 39753–39765, 2012.
- HEMLER, M. E. Tetraspanin proteins promote multiple cancer stages. **Nature Reviews Cancer**, v. 14, n. 1, p. 49–60, 2014.
- HOOPER, N.; TURNER, A. The search for α -secretase and its potential as a therapeutic approach to Alzheimer's disease. **Current medicinal chemistry**, v. 9, n. 11, p. 1107–1119, 2002.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA ESTATÍSTICA; Disponível em <www.agenciadenoticias.ibge.gov.br> Acesso em: 18 novembro 2018.
- JACK, C. R. et al. A new classification system for AD, independent of cognition A / T / N: An unbiased descriptive classification scheme for Alzheimer disease biomarkers. **Neurology**, v. 0, n. July, p. 1–10, 2016.

- JACK, C. R. et al. Introduction to the recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. **Alzheimer's and Dementia**, v. 7, n. 3, p. 257–262, 2011.
- JANES, P. W. et al. Adam meets Eph: An ADAM substrate recognition module acts as a molecular switch for ephrin cleavage in trans. **Cell**, v. 123, n. 2, p. 291–304, 2005.
- JECKEL-NETO EA, CUNHA GL. Teorias biológicas do envelhecimento. In: Freitas EV, Py L, Neri A L, Cançado FAX, Gorzoni ML, Doll J, organizadores. **Tratado de geriatria e gerontologia**. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan; 2006. p. 13-22.
- JIANG T. et al. Epidemiology and etiology of Alzheimer's disease: from genetic to non-genetic factors. **Current Alzheimer Research**, v.10, n. 8, p. 852-67, 2013.
- JORISSEN, E. et al. The Disintegrin/Metalloproteinase ADAM10 Is Essential for the Establishment of the Brain Cortex. **Journal of Neuroscience**, v. 30, n. 14, p. 4833–4844, 2010.
- KHAN, S. S.; BLOOM, G. S. Tau: The Center of a Signaling Nexus in Alzheimer's Disease. **Frontiers in Neuroscience**, v. 10, n. FEB, p. 1–5, 2016.
- KLINGENER, M. et al. N-Cadherin Promotes Recruitment and Migration of Neural Progenitor Cells from the SVZ Neural Stem Cell Niche into Demyelinated Lesions. **Journal of Neuroscience**, v. 34, n. 29, p. 9590–9606, 2014.
- KLUNK, W. E. et al. Imaging Brain Amyloid in Alzheimer's Disease with Pittsburgh Compound-B. **Annals of Neurology**, v. 55, n. 3, p. 306–319, 2004.
- KUHN, P. H. et al. ADAM10 is the physiologically relevant, constitutive α -secretase of the amyloid precursor protein in primary neurons. **EMBO Journal**, v. 29, n. 17, p. 3020–3032, 2010.
- KUHN, P. H. et al. Systematic substrate identification indicates a central role for the metalloprotease ADAM10 in axon targeting and synapse function. **eLife**, v. 5, n. JANUARY2016, p. 1–29, 2016.
- LAMMICH, S. et al. Constitutive and regulated alpha-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by a disintegrin metalloprotease. **Proceedings of the**

National Academy of Sciences of the United States of America, v. 96, n. 7, p. 3922–3927, 1999.

LANCTÔT, K. L. et al. Neuropsychiatric signs and symptoms of Alzheimer's disease: New treatment paradigms. **Alzheimer's and Dementia: Translational Research and Clinical Interventions**, v. 3, n. 3, p. 440–449, 2017.

LEE, J. et al. Adaptor protein sorting nexin 17 regulates amyloid precursor protein trafficking and processing in the early endosomes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 17, p. 11501–11508, 2008.

LICHTENTHALER, S. F. Alpha-secretase in Alzheimer's disease: Molecular identity, regulation and therapeutic potential. **Journal of Neurochemistry**, v. 116, n. 1, p. 10–21, 2011.

LOPES, M. A. et al. High prevalence of dementia in a community-based survey of older people from Brazil: Association with intellectual activity rather than education. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 32, n. 2, p. 307–316, 2012.

MAIA, A. L. G. et al. Aplicação da versão brasileira da Escala de Avaliação Clínica da Demência (Clinical Dementia Rating–CDR) em amostras de pacientes com demência. **Arq Neuropsiquiatria**, v. 64, n. 2–B, p. 485–489, 2006.

MANZINE, P. R. et al. ADAM10 as a biomarker for Alzheimer's disease: A study with Brazilian elderly. **Dementia and Geriatric Cognitive Disorders**, v. 35, n. 1–2, p. 58–66, 2013.

MANZINE, P. R. et al. ADAM10 gene expression in the blood cells of Alzheimer's disease patients and mild cognitive impairment subjects. **Biomarkers**, v. 20, n. 3, p. 196–201, 2015.

MANZINE, P. R. et al. Platelet alpha disintegrin and metalloproteinase 10 expression correlates with clock drawing test scores in Alzheimer's disease. **International Journal of Geriatric Psychiatry**, v. 29, n. 4, p. 414–420, 2014.

MARCELLO, E. et al. ADAM10 as a therapeutic target for brain diseases: from developmental disorders to Alzheimer's disease. **Expert opinion on therapeutic targets**, v. 21, n. 11, p. 1017–1026, 2017.

- MARETZKY, T. et al. The cytoplasmic domain of a disintegrin and metalloproteinase 10 (ADAM10) regulates its constitutive activity but is dispensable for stimulated ADAM10-dependent shedding. **Journal of Biological Chemistry**, v. 290, n. 12, p. 7416–7425, 2015.
- MASTERS, M. C.; MORRIS, J. C.; ROE, C. M. “Noncognitive” symptoms of early Alzheimer disease : A longitudinal analysis. **Neurology**, v. 84, n. 6, p. 617–622, 2015.
- MCKHANN, G. et al. Clinical diagnosis of Alzheimer’s disease: Report of the NINCDS-ADRDA Work Group* under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer’s Disease. **Neurology**, v. 34, n. 7, p. 939–939, 1984.
- MCKHANN, G. et al. The diagnosis of dementia due to Alzheimer’s disease: Recommendations from the National Institute on Aging- Alzheimer’s Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer’s disease. **Alzheimers Dementia**, v. 7, n. 3, p. 263–269, 2011.
- MERKWIRTH, C. et al. Loss of Prohibitin Membrane Scaffolds Impairs Mitochondrial Architecture and Leads to Tau Hyperphosphorylation and Neurodegeneration. **PLoS Genetics**, v. 8, n. 11, 2012.
- MORISHIMA-KAWASHIMA, M.; IHARA, Y. Alzheimer’s disease: β -Amyloid protein and tau. **Journal of Neuroscience Research**, v. 70, n. 3, p. 392–401, 2002.
- NIKOLAEV, A. et al. APP binds DR6 to trigger axon pruning and neuron death via distinct caspases. **Nature**, v. 457, n. 7232, p. 981–989, 2009.
- O’BRIEN, R. J. et al. Amyloid Precursor Protein Processing and Alzheimer’s Disease. **Annu Rev Neurosci**. v. 34, p.185–204, 2011.
- OH, E. S. et al. Amyloid precursor protein increases cortical neuron size in transgenic mice. **Statistica**, v. 30, n. 8, p. 1238–1244, 2009.
- PERON, R. et al. Alpha-secretase ADAM10 regulation: Insights into Alzheimer’s disease treatment. **Pharmaceuticals**, v. 11, n. 1, p. 1–19, 2018.
- PETERSEN RC et al. Mild cognitive impairment: Clinical characterization and outcome. **Archives of Neurology**, v. 56, n. 3, p. 303–308, 1999.

- PETERSEN, R. et al. Current Concepts in Mild Cognitive Impairment. **Arch Neurol**, v. 58, 2001.
- REITZ, C.; MAYEUX, R. Alzheimer disease: Epidemiology, diagnostic criteria, risk factors and biomarkers. **Biochemical Pharmacology**, v. 88, n. 4, p. 640–651, 2014.
- SAFTIG, P.; LICHTENTHALER, S. F. The alpha secretase ADAM10: A metalloprotease with multiple functions in the brain. **Progress in Neurobiology**, v. 135, p. 1–20, 2015.
- SCHMIDT, M. I. et al. Chronic non-communicable diseases in Brazil: Burden and current challenges. **The Lancet**, v. 377, n. 9781, p. 1949–1961, 2011.
- SCHUCK, F. et al. Increase of α -Secretase ADAM10 in Platelets Along Cognitively Healthy Aging. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 50, n. 3, p. 817–826, 2016.
- SHAW, L. M. et al. Cerebrospinal fluid biomarker signature in Alzheimer's disease neuroimaging initiative subjects. **Annals of Neurology**, v. 65, n. 4, p. 403–413, 2009.
- SHI, L. et al. A Decade of Blood Biomarkers for Alzheimer's Disease Research: An Evolving Field, Improving Study Designs, and the Challenge of Replication. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 62, n. 3, p. 1181–1198, 2018.
- SKOOG, I. et al. Cerebrospinal fluid beta-amyloid 42 is reduced before the onset of sporadic dementia: A population-based study in 85-year-olds. **Dementia and Geriatric Cognitive Disorders**, v. 15, n. 3, p. 169–176, 2003.
- SOGORB-ESTEVE, A. et al. Levels of ADAM10 are reduced in Alzheimer's disease CSF. **Journal of Neuroinflammation**, v. 15, n. 1, p. 1–9, 2018.
- SOREGHAN, B.; KOSMOSKI, J.; GLABE, C. Surfactant properties of Alzheimer's A β peptides and the mechanism of amyloid aggregation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 46, p. 28551–28554, 1994.
- TANG, K. et al. Platelet amyloid precursor protein processing: a bio-marker for Alzheimer's disease. **J. Neurol. Sci.** v. 240, p. 53–58, 2006.
- VINCENT, B. Regulation of the α -secretase ADAM10 at transcriptional, translational and post-translational levels. **Brain Research Bulletin**, v. 126, p. 154–169, 2016.

- WANG, X.-P.; DING, H.-L. Alzheimer's disease: epidemiology, genetics, and beyond. **Neuroscience Bulletin**, v. 24, n. 2, p. 105–109, 2008.
- WANG, Z.-X. et al. The Essential Role of Soluble A β Oligomers in Alzheimer's Disease. **Molecular Neurobiology**, v. 53, n. 3, p. 1905–1924, 2016.
- WIMO, A. et al. The worldwide economic impact of dementia 2010. **Alzheimer's and Dementia**, v. 9, n. 1, p. 1–11, 2013.
- YU, J.-T.; TAN, L. Lifestyle changes might prevent Alzheimer's disease. **Annals of translational medicine**, v. 3, n. 15, p. 222, 2015.
- XU, W. et al. Meta-analysis of modifiable risk factors for Alzheimer's disease. **Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry**, v. 86, n. 12, p. 1299–1306, 2015.
- ZHOU, J. et al. Downregulation of Notch modulators, tetraspanin 5 and 10, inhibits osteoclastogenesis in vitro. **Calcified Tissue International**, v. 95, n. 3, p. 209–217, 2014.

10. APÊNDICE

Apêndice 1: Tabela com os valores da ADAM10 para LCR e soro, obtidas em pixels (UA) no aparelho *ChemiDoc™ MP Imaging System* (BIO RAD) e analisados por meio dos *softwares* Microsoft Office Excel 2010 e *GraphPad Prism 5.2*. Os números representam os respectivos sujeitos, discriminados por grupo e sua numeração. As intensidades dos pixels obtidas nas amostras de LCR e soro para ADAM10 e albumina sérica humana estão representadas.

| Indivíduos | LCR | | SORO | |
|------------|--------|----------|--------|----------|
| | ADAM10 | ALBUMINA | ADAM10 | ALBUMINA |
| CTR 209 | 1.161 | 5.257 | 1.731 | 30.820 |
| CTR 219 | 632 | 8.074 | 1.981 | 35.900 |
| CTR 254 | 2.043 | 11.644 | ----- | ----- |
| CTR 126 | 875 | 8.165 | 1.285 | 11.271 |
| CTR 183 | 776 | 7.681 | 528 | 35.508 |
| CTR 31 | 1.138 | 8.550 | 2.303 | 31.548 |
| CTR 37 | 1.147 | 8.359 | 1.834 | 27.165 |
| CTR 166 | 3.194 | 14.097 | 2.249 | 23.520 |
| TNCLa 1 | 5.705 | 21.429 | 3.574 | 52.205 |
| TNCLa 114 | 3.644 | 14.115 | 4.178 | 38.364 |
| TNCLa 138 | 2.314 | 17.083 | 6.693 | 48.326 |
| TNCLa 220 | 2.122 | 19.725 | 4.601 | 53.310 |
| TNCLa 251 | 1.650 | 15.095 | 2.899 | 28.907 |
| TNCLa 78 | 2.590 | 23.138 | 4.714 | 63.144 |
| TNCLa 81 | 2.348 | 18.055 | 4.570 | 51.492 |
| DA L. 39 | 6283 | 15.326 | 5.148 | 22.151 |
| DA L. 42 | 6835 | 24.508 | 4.226 | 25.659 |
| DA L. 44 | 5122 | 15.415 | 3.889 | 27.379 |
| DA L. 49 | 3836 | 9.651 | 7.957 | 28.268 |
| DA L. 54 | 752 | 8.442 | ----- | ----- |
| DA L. 136 | 9059 | 22.698 | 8.154 | 32.037 |
| DA L. 151 | 6797 | 16.213 | 11.628 | 33.993 |
| DA M. 197 | 3154 | 8.179 | 5.142 | 31.334 |
| DA M. 94 | 6247 | 16.216 | 6.043 | 31.871 |