



**PROGRAMA INTERINSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS - UFSCAR/UNESP**

Rodovia Washington Luiz, Km 235 – Caixa Postal 676

Fone/Fax: (016) 3351-8328 – email: ppgcf@ufscar.br
13565-905 – São Carlos, SP - Brasil

Izabela Pereira Vatanabe

ADAM10 COMO BIOMARCADORA DE TRANSTORNO NEUROCOGNITIVO LEVE

São Carlos – SP
Setembro 2020



**PROGRAMA INTERINSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS - UFSCAR/UNESP**

Rodovia Washington Luiz, Km 235 – Caixa Postal 676

Fone/Fax: (016) 3351-8328 – email: ppgcf@ufscar.br
13565-905 – São Carlos, SP - Brasil



ADAM10 COMO BIOMARCADORA DE TRANSTORNO NEUROCOGNITIVO LEVE

IZABELA PEREIRA VATANABE

Tese apresentada ao Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Associação Ampla UFSCar/UNESP, do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutora em Ciências Fisiológicas, área de concentração: Ciências Fisiológicas.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a MÁRCIA REGINA COMINETTI

**Coorientadora: Prof.^a Dr.^a PATRICIA REGINA MANZINE
MORALLES**

São Carlos – SP
Setembro 2020

Dedico este trabalho:

À Deus,

Meu suporte, guia e refúgio de
todos os momentos.

À minha família,

Meu maior
exemplo, apoio e segurança.

Ao meu noivo Matheus,

Meu grande companheiro de vida e amigo.

Aos meus pais, Mauro e Cleide e irmãs Dani e Bia,

Meu maior tesouro e exemplo,
obrigada por tanto amor, incentivo e
acolhimento. Vocês são maravilhosos

Aos idosos e seus familiares,

Por confiarem em mim, por todo carinho e por
tornarem possível a realização deste trabalho.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

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

Folha de Aprovação

Defesa de Tese de Doutorado da candidata Izabela Pereira Vatanabe, realizada em 28/09/2020.

Comissão Julgadora:

Profa. Dra. Márcia Regina Cominetti (UFSCar)

Profa. Dra. Anielle Cristhine de Medeiros Takahashi (UFSCar)

Prof. Dr. Paulo Caramelli (UFMG)

Profa. Dra. Sofia Cristina Iost Pavarini (UFSCar)

Profa. Dra. Angelica Miki Stein (UNICENTRO)

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas.

AGRADECIMENTOS

A Deus por ser a base da minha vida, consolo, recompensa, apoio e por me conceder saúde e condições de realizar sonhos lindos como este.

À minha amada família Mauro, Cleide, Danitiele e Beatriz, por me fortalecerem, apoiarem, incentivarem e me lembrarem diariamente que sempre estão ao meu lado e que meu maior tesouro está em casa.

Ao meu querido noivo Matheus por me acompanhar por todos estes anos com tanto amor e preocupação. Obrigada por entender e apoiar as minhas escolhas.

À minha querida orientadora Prof.^a Dr.^a Márcia Regina Cominetti por todos os ensinamentos e dedicação durante todos os momentos. Por acreditar na minha capacidade e me incentivar na busca de novos desafios e conquistas.

À minha querida coorientadora Dr.^a Patricia Regina Manzine Morales, por todos os ensinamentos, paciência e amizade de sempre. Obrigada pela linda parceria!

Ao Laboratório de Biologia do Envelhecimento (LABEN) e todas as amigas, pelos momentos de trabalho, companheirismo e amizade durante toda minha trajetória. Cada uma foi importante para o desenvolvimento deste trabalho e também para o meu crescimento profissional e pessoal.

À minha querida amiga Lia por dividir sua vida comigo durante alguns anos desta trajetória, por me aproximar de Deus e por todo carinho e amizade de sempre.

À minha querida amiga Kerstin por toda amizade, companheirismo e por ter tornado a realização de um sonho ainda mais especial.

Ao Prof. Dr. Marcos Hortes e sua aluna Daiene Moraes pela parceria imprescindível para execução deste estudo e todo apoio que me foi oferecido.

À minha querida amiga e colaboradora Marina Naves por me auxiliar em todo processo de coleta sanguínea dos idosos, sempre com tanta amizade, profissionalismo e carinho.

Aos idosos participantes e seus familiares, pela compreensão e apoio para a realização desta pesquisa.

À Prof.^a Dr.^a Marisa Silvana Zazzetta e toda equipe PPSUS pela gentileza de me emprestarem os equipamentos necessários para a realização das avaliações deste estudo.

À Prof.^a Dr.^a Elena Marcello da *Università Degli Studi di Milano* por todos ensinamentos, paciência e por ser um lindo e inesquecível exemplo pessoal e profissional para mim.

Ao Dep. de Gerontologia que fez parte de toda minha construção pessoal e profissional e à Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) que possibilitou tudo isto.

Muito obrigada!

*“Faça o melhor que puder. Seja o melhor que puder.
O resultado virá na mesma proporção de seu esforço”*

Mahatma Gandhi

Agradecimento à FAPESP, CAPES e CNPq

O presente trabalho foi realizado com apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processo nº 2016/06226-9 (DR) e nº 2019/19016-0 (BEPE), da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001 e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - Brasil (CNPq).

As opiniões, hipóteses e conclusões ou recomendações expressas neste material são de responsabilidade dos autores e não necessariamente refletem a visão da FAPESP, CAPES e CNPq.

RESUMO

O Transtorno Neurocognitivo Leve (TNCL), na ausência de demência, e associado à fragilidade física deu origem ao novo conceito de fragilidade cognitiva. Tal definição tem sido considerada como um subtipo de fragilidade que, juntamente com o processo de envelhecimento e sua interação com a fragilidade física, aceleram o ciclo de declínio funcional e resulta em má qualidade de vida e outros desfechos negativos em idosos. Além disso, estudos prévios têm sugerido que o TNCL pode representar uma condição que antecede a doença de Alzheimer (DA), tendo em vista a alta taxa de conversão para a mesma. Com base nisto, este estudo teve como objetivo geral avaliar se os níveis plaquetários e plasmáticos de ADAM10 poderiam atuar como biomarcadores das condições concomitantes de TNCL e fragilidade física, de modo a dar suporte ao novo construto de fragilidade cognitiva. O estudo foi realizado com uma população de idade superior ou igual a 60 anos que estavam na cobertura de um núcleo de saúde da família do município de São Carlos - SP, Brasil. Os participantes foram devidamente avaliados quanto aos quesitos cognição e fragilidade física. Posteriormente, amostras biológicas foram coletadas, analisadas e armazenadas em um biorrepositório. Os níveis de ADAM10 plaquetária e plasmática foram analisados através da técnica de *Western Blotting* em participantes com TNCL, em comparação com participantes sem a presença de alterações cognitivas, ambos com e sem a presença de fragilidade. Os resultados indicam que os níveis da ADAM10 estão reduzidos em plaquetas e aumentados em plasma de idosos com TNCL em comparação com os controles saudáveis, de forma independente da condição de fragilidade física. Dados os resultados obtidos, este estudo levantou a hipótese de que a forma plasmática e solúvel de ADAM10 estaria inativa, ao passo que a forma plaquetária, ancorada à membrana plasmática, estaria ativa. Assim, foi desenhado um novo objetivo para este estudo, que consistiu em avaliar se a atividade enzimática da ADAM10 é dependente de sua ancoragem à membrana plasmática. Para esse fim, durante o estágio no exterior, buscou-se desenvolver um protocolo de isolamento da membrana plasmática por fracionamento de células de neuroblastoma da linhagem SH-SY5Y, e testar a atividade enzimática da ADAM10 nas diferentes frações. Em decorrência do cenário pandêmico mundial o ensaio de atividade enzimática nas frações celulares não pôde ser concluído, contudo um estudo prévio (ainda não publicado), realizado por nosso grupo de pesquisa, comprovou que a ADAM10 encontrada no plasma é enzimaticamente inativa, ao passo que a forma plaquetária da proteína, mostrou-se ativa. Estes resultados demonstram que, de fato, os níveis reduzidos de ADAM10 ativa (60 kDa) estão relacionados a condição de TNCL, assim como o aumento dos níveis de ADAM10 inativa (50 kDa). Tomados em conjunto, os resultados demonstram que a ADAM10 não pode ser considerada como biomarcadora em condições de fragilidade cognitiva, mas que pode atuar de forma eficaz como biomarcadora de baixo custo, fácil acesso e pouco invasiva para o TNCL. Estes resultados devem contribuir para um melhor entendimento da biologia da molécula, bem como para implantação de ferramentas que atuem no diagnóstico de TNCL, de forma a auxiliar no planejamento mais adequado das equipes de saúde, com o objetivo de aprimorar a qualidade de vida dos idosos com esta condição, além de direcionar conduta terapêutica e prevenir agravos.

Palavras-chave: Idoso, envelhecimento, Transtorno Neurocognitivo Leve (TNCL), Fragilidade Cognitiva, biomarcadores, atividade, ADAM10

ABSTRACT

Mild cognitive impairment (MCI), in the absence of dementia, and associated with physical frailty gave rise to the new concept called cognitive frailty. This new concept has also been considered as a subtype of frailty. Moreover, along with the aging process and its interaction with physical frailty, it accelerates the cycle of functional decline and results in poor quality of life and other negative outcomes in older adults. Previous studies have suggested that MCI may represent a condition that predates Alzheimer's disease (AD), based on the high conversion rate for it. With that in mind, the principal aim of this study was to evaluate whether the platelet and plasma levels of ADAM10 could act as biomarkers of the concomitant conditions of MCI and physical frailty, in order to support the new construct of cognitive frailty. The study was carried out with a population aged over 60 years old who were in the coverage of a family health center in the city of São Carlos-SP, Brazil. The subjects were properly assessed for cognition and physical frailty. Subsequently, biological samples were collected, analyzed and stored in a biorepository. The levels of platelet and plasma ADAM10 were analyzed using the Western blot technique in subjects with MCI, compared to subjects without the presence of cognitive impairments, both with and without the presence of frailty. The results indicate that ADAM10 levels are reduced in platelets and increased in plasma of older adults with MCI when compared to healthy controls, regardless of the condition of physical frailty. Based on the results obtained, this study raised the hypothesis that the plasma and soluble form of ADAM10 would be inactive, whereas the platelet form, anchored to the cell plasma membrane, would be active. Thus, we also aimed to assess whether the enzymatic activity of ADAM10 is dependent on its anchoring to the plasma membrane through the evaluation of the enzymatic activity of ADAM10 after the isolation of different fractions of SH-SY5Y neuroblastoma cells. Due to the worldwide pandemic scenario, the enzyme activity assay in cell fractions could not be completed, however a previous study carried out by this research group proved that ADAM10 found in plasma is enzymatically inactive, whereas the platelet form of the protein, was shown to be active, confirming our hypothesis that the reduced levels of active ADAM10 (60 kDa) are related to the condition of MCI, as well as the increased levels of inactive ADAM10 (50 kDa). Taken together, the results demonstrate that ADAM10 cannot be considered as a biomarker in conditions of cognitive frailty, but can act effectively as a low-cost, easy-access and low-invasive biomarker molecule for MCI. These results contribute to a better understanding of the biology of the molecule, as well as for the implantation of tools that promote the diagnosis of MCI. Furthermore, the evidence may guide the health teams to a more adequate planning, with the purpose of improving the quality of life of the older adults affected by this condition, and to direct therapeutic strategies and the prevention of injuries.

keywords: Older people, aging, Mild Cognitive Impairment (MCI), cognitive frailty, biomarkers, activity, ADAM10.

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1

Figura 1. Representação esquemática da hiperfosforilação da proteína Tau e formação dos emaranhados neurofibrilares, característicos da doença de Alzheimer.....	3
Figura 2. Representação esquemática do acúmulo de placas amiloides (em amarelo) no cérebro, características da doença de Alzheimer	4
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	5
Figura 4. Modelo Esquemático dos domínios encontrados nas proteínas da família ADAM.....	6
Figura 5. Estrutura multimodular da ADAM10.....	8
Figura 6. Evolução temporal possível para o TNCL (modelo clínico-experimental)	9
Figura 7. Algoritmo diagnóstico para os subtipos de TNCL	10
Figura 8. O ciclo da fragilidade física, fragilidade cognitiva e comprometimento cognitivo	13
Figura 9. Tríade da Fragilidade.....	17
Figura 10. Classificação dos idosos quanto ao fenótipo de fragilidade e TNCL.....	30
Figura 11. Ensaios de <i>Western Blotting</i> e quantificação da proteína ADAM10 em plaquetas nos grupos.....	38
Figura 12. Ensaios de <i>Western Blotting</i> e quantificação da proteína ADAM10 em plasma nos grupos.....	39

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 2

- Figura 13.** Hipótese do estudo - Estrutura da ADAM10 na forma ativa ancorada à membrana de neurônios e plaquetas e na forma solúvel no LCR, plasma e soro 50
- Figura 14.** Diagrama esquemático do protocolo para o fracionamento de células cultivadas (Protocolo 1)..... 58
- Figura 15.** Diagrama esquemático do protocolo para o fracionamento de células cultivadas (Protocolo 2)..... 60
- Figura 16.** Estrutura multimodular da ADAM10 e suas diferentes formas 63
- Figura 17.** Imagem da membrana referente ao experimento de Western Blotting, mostrando a efetividade do fracionamento celular e pureza do isolamento das organelas nas frações obtidas com o protocolo 1 em células de neuroblastoma humano (SH-SY5Y). 65
- Figura 18.** Imagem da membrana referente ao experimento de Western Blotting, mostrando a efetividade do fracionamento celular e pureza do isolamento das organelas nas frações obtidas com o protocolo 2 em células de neuroblastoma humano (SHSY5Y)..... 66

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1

Tabela 1. Critérios de inclusão dos participantes da pesquisa	23
Tabela 2. Critérios de exclusão dos participantes da pesquisa.	24
Tabela 3. Valores referenciais do nível de atividade física em dispêndio calórico (kcal) por sexo.	25
Tabela 4. Valores referenciais da velocidade de caminhada de acordo com altura e sexo.	25
Tabela 5. Valores referenciais da força de preensão manual de acordo com o índice de massa corporal (IMC) e sexo	26
Tabela 6. Dados de caracterização socioeconômicos gerais dos participantes em cada grupo de estudo	33
Tabela 7. Desempenho dos participantes no IPAQ, Critérios de fragilidade de Fried, CDR e ACE-R	36

LISTA DE ABREVIATURAS

ADAMs - *A Disintegrin And Metallopeptidase*

ABVD – Atividade Básica de Vida Diária

ACE-R - *Addenbrooke's Cognitive Examination-Revised*

AP2 - Proteína Adaptadora de Clatrina

APP – Proteína Precursora do Amilóide

A β – β -amilóide

BACE - Enzima clivadora do sítio β da APP

BEPE – Bolsa Estágio de Pesquisa no Exterior

CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

CCL – Comprometimento Cognitivo Leve

CDR - *Clinical Dementia Rating*

DA – Doença de Alzheimer

DSM-IV – Manual diagnóstico e estatístico de doenças mentais

EROS - Espécies Reativas de Oxigênio

HDL-C - (*High Density Lipoprotein*)

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

LABEN – Laboratório de Biologia do Envelhecimento

LPN - Laboratório de Farmacologia de Neurodegeneração

MCI– *Mild Cognitive Impairment*

ONU - Organização das Nações Unidas

PS - *Phosphatidylserine*

SAP97 - Proteína 97 Associada à Sinapse

SDS-PAGE – *Sodium dodecyl sulfate polyacrilamide gel electrophoresis* SNC – Sistema nervoso

TNF- α - fator de necrose tumoral- α

UFSCar – Universidade Federal de São Carlos USE – Unidade Saúde Escola

UNIMI - *Università Degli Studi di Milano*

SUMÁRIO

CAPÍTULO I - ADAM10 COMO BIOMARCADORA DE TRANSTORNO NEUROCOGNITIVO LEVE

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Envelhecimento populacional e demência	1
1.2 Fisiopatologia da Doença de Alzheimer	2
1.3 ADAM10	5
1.4 Transtorno Neurocognitivo Leve -TNCL	8
1.4.1 Fragilidade física	10
1.4.2 Fragilidade Cognitiva	14
1.5 Biomarcadores	15
1.5.1 Biomarcadores de fragilidade física	16
1.5.2 Biomarcadores de fragilidade cognitiva	18
1.6 ADAM10 em plaquetas e plasma	19
2. OBJETIVOS	21
2.1 Objetivo Geral	21
3. MATERIAIS E MÉTODOS	22
3.1 Estudo e Amostra	23
3.1.1 Aspectos éticos	23
3.1.2 Critérios de inclusão e exclusão	23
3.2 Avaliação da fragilidade	24
3.2.1 Critérios de avaliação de fragilidade de Fried	24
3.3 Avaliação da cognição	26
3.3.1 Addenbrooke's Cognitive Examination- revised (ACE-R)	26
3.3.2 Clínica Dementia Rating (CDR)	27
3.3.3 Diagnóstico Psiquiátrico	27
3.4 Desenho geral do estudo	28
3.4.1 Divisão dos grupos experimentais	29
3.5 Coleta de sangue e Western Blotting	30
3.6 Forma de análise dos resultados	32
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
4.1 Dados de caracterização socioeconômica	33
4.2 Níveis plaquetários e plasmáticos de ADAM10	37

CAPÍTULO II – INFLUÊNCIA DA LOCALIZAÇÃO CELULAR DA ADAM10 EM SUA ATIVIDADE

APRESENTAÇÃO.....	47
1. INTRODUÇÃO	49
2. OBJETIVOS	53
2.1 Objetivo Geral.....	53
3. MATERIAIS E MÉTODOS	55
3.1 Cultura celular de Neuroblastoma Humano (SH-SY5Y).....	56
3.2 Fracionamento celular	56
3.2.1 Protocolo 1	56
3.2.2 Protocolo 2	58
3.3 Quantificação de proteínas.....	59
3.4 Ensaio de <i>Western Blotting</i>	60
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	62
4.1. ADAM10 em plasma e plaquetas.....	63
5. CONCLUSÃO	70
REFERÊNCIAS	72
APÊNDICES – Artigos publicados durante o período	90
ANEXOS.....	95
Anexo 1– Termo de consentimento livre e esclarecido	96
Anexo 2– Critérios de Avaliação de Fragilidade de Fried	98
Anexo 3 – Questionário Internacional de Atividade Física – IPAQ	100
Anexo 4 – Classificação do nível de atividade Física- IPAQ.....	102
Anexo 5– Addenbrooke’s Cognitive Examination- revised (ACE-R)	103
Anexo 6 – Guia de Instruções para aplicação do ACE-R.....	109
Anexo 7– Instrumento <i>Clinical Dementia Rating</i> (CDR).....	114
Anexo 8 – Imagens integras das membranas referentes aos experimentos de <i>Western Blotting</i> em plaquetas feitos durante todo o período do estudo Imagens.	115
Anexo 9 – integras das membranas referentes aos experimentos de <i>Western Blotting</i> em plasma feitos durante todo o período do estudo.....	125

APRESENTAÇÃO

APRESENTAÇÃO

Este trabalho foi estruturado na forma de capítulos para uma melhor explanação do seu conteúdo.

O **capítulo I** é composto por uma fundamentação teórica sobre a temática, seguida pelos objetivos (geral e específicos), metodologia, resultados/discussão e conclusão do estudo desenvolvido no país, referente ao tema “ADAM10 como biomarcadora de transtorno neurocognitivo leve”.

O **capítulo II** apresenta uma fundamentação teórica, justificativa, objetivos (geral e específicos), metodologia, resultados/discussão e conclusão do trabalho desenvolvido durante o estágio de pesquisa no exterior (BEPE), realizado no Laboratório de Farmacologia de Neurodegeneração (LPN) da *Università Degli Studi di Milano* (UNIMI) – Itália. Este estudo é intitulado “Influência da localização celular da ADAM10 em sua atividade”.

Ao final do trabalho, no item “Apêndice” constarão os artigos publicados durante o período de realização deste estudo. No item “Anexos” serão apresentadas todas as imagens referentes aos ensaios de *Western Blotting* na íntegra, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) utilizado e cópia dos instrumentos de rastreio cognitivo e físico aplicados.

CAPÍTULO I - ADAMI0 COMO BIOMARCADORA DE TRANSTORNO NEUROCOGNITIVO

LEVE

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 Envelhecimento populacional e demência

O mundo está envelhecendo de forma acelerada e sem precedentes, o que fez a Organização das Nações Unidas (ONU) denominar o período entre os anos de 1975 e 2025 como a “Era do Envelhecimento” (ONU, 2019; Matos & Vieira, 2014). Este processo se deve pelo progressivo declínio nas taxas de mortalidade e fecundidade, associado ao aumento da expectativa de vida da população. Todos estes fatores trazem à tona preocupações novas, principalmente relacionadas a como oferecer melhor assistência à saúde de idosos, e até mesmo como conferir melhor qualidade aos anos vividos (IBGE, 2011).

As estatísticas revelam que a expectativa de vida mais que dobrou no intervalo de apenas um século, passando de 30 anos em 1900 para 73 anos em 2000 (IBGE, 2011). Além disso, no ano de 2012 havia aproximadamente 810 milhões de idosos em todo o mundo, enquanto em 2050 as projeções indicam que este número deverá ultrapassar os 2 bilhões, representando um quinto da população mundial (WHO, 2012). Nesse cenário, pela primeira vez na história humana, o número de idosos no mundo será maior do que o de crianças e jovens de até 14 anos (WHO, 2012).

Países menos desenvolvidos, incluindo o Brasil, enfrentarão o processo de envelhecimento de maneira mais acelerada ao longo de um curto período de tempo, em comparação com locais mais desenvolvidos (United Nations, 2013). Especificamente no Brasil, atualmente, 33% da população é constituída por maiores de 40 anos e 11% por idosos (IBGE, 2011). Considerando apenas o município de São Carlos, local onde o presente estudo foi desenvolvido, os maiores de 60 anos já representam 16,8% da população (SEADE, 2020). Dadas as situações econômicas dos países em desenvolvimento, muitos destes idosos vivem em condições de vulnerabilidade e contexto de pobreza com dificuldades de acesso aos serviços sociais e de saúde (Beales & Tulloch, 2013).

Estudos apontam para uma grande prevalência de problemas de saúde, sociais e psicológicos na população idosa. Neste sentido, há a necessidade de promoção de estratégias sistemáticas de detecção precoce de problemas de saúde, a fim de evitar agravos e situações limitantes maiores (Beales & Tulloch, 2013). Dentre as enfermidades de maior prevalência na população idosa, destacam-se as demências, sendo estas uma das principais causas de declínio na qualidade de vida dos idosos e seus familiares (Ballard et al., 2011).

A demência é uma síndrome clínica caracterizada por declínio progressivo em dois ou mais domínios cognitivos, incluindo memória, linguagem, função executiva, habilidade visuoespacial, personalidade e comportamento, de modo suficientemente importante para interferir nas atividades sociais e ocupacionais do indivíduo (Weller & Budson, 2018).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), em 2012 mais de 35 milhões de pessoas no mundo apresentavam algum grau de demência, e este número poderá triplicar até 2050, atingindo mais de 115 milhões de pessoas. Além disso, no ano de 2010 a síndrome gerou um custo mundial estimado em 604 bilhões de dólares (WHO, 2012). Estes dados demonstram o enorme impacto que esta doença promove na sociedade, podendo ser considerada um dos principais tópicos abordados no tema envelhecimento.

1.2 Fisiopatologia da Doença de Alzheimer

Dentre as principais demências que atingem a população idosa, a doença de Alzheimer (DA) é o tipo mais comum (Seetlani et al., 2016), sendo o distúrbio neurodegenerativo que mais afeta a população idosa (Brummer et al., 2019), atingindo cerca de 75 milhões de pessoas em todo o mundo. O impacto econômico e de saúde da doença é enorme, desta forma identificar novos biomarcadores diagnósticos e intervenções terapêuticas se tornou uma importante meta para a ciência em muitos países (Shi et al., 2018).

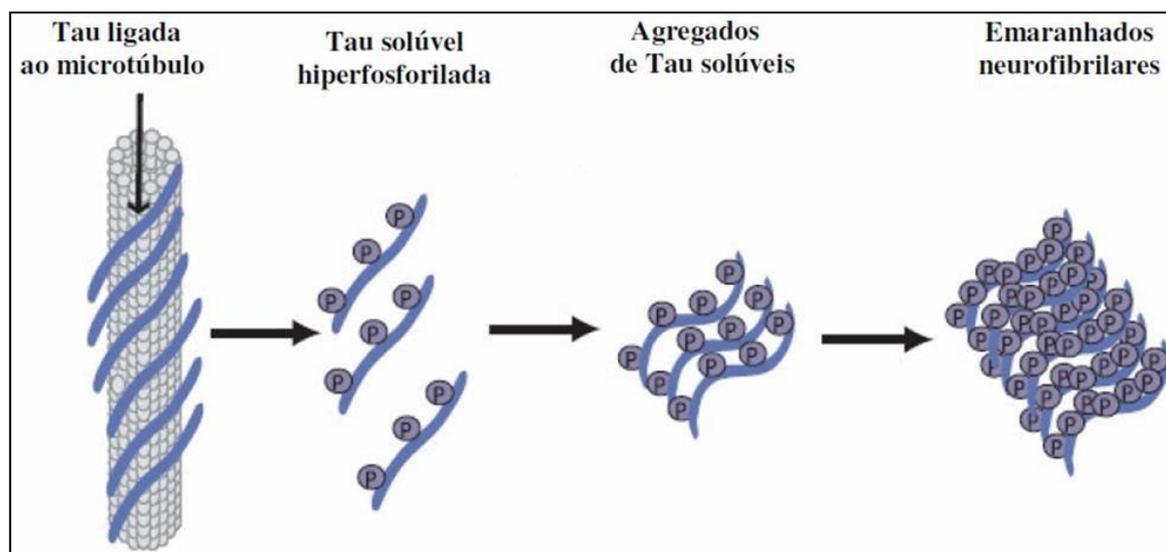
A DA consiste em um distúrbio neurodegenerativo progressivo e incurável, caracterizado por deterioração das funções cognitivas, incluindo a memória, prejuízo das atividades de vida diária e sintomas comportamentais e psicológicos (Ballard et al., 2011). As características patológicas da DA incluem atrofia cortical predominantemente no lobo temporal medial, perdas neuronais e depósitos fibrilares anormais intra e extracelulares, denominados emaranhados neurofibrilares e placas senis, respectivamente (Serrano-Pozo et al., 2011; Jorissen et al., 2010).

Os emaranhados neurofibrilares são formados a partir da proteína Tau em dissociação aos microtúbulos (Forlenza, 2005; Lichtenthaler, 2011). Até o momento as causas deste processo ainda não são bem esclarecidas, mas evidências experimentais indicam que a excitação de receptores colinérgicos muscarínicos levariam à ativação de uma proteína quinase C, que conduziria à inativação da proteína quinase GSK-3 que, por sua vez, desencadearia o processo de fosforilação da proteína Tau (Martelli, 2014). A proteína Tau é essencial para a manutenção estrutural e funcional dos microtúbulos neuronais (Falcon et al., 2018). Na DA, a Tau sofre o processo da hiperfosforilação (Chen et al., 2017) e se desacopla dos microtúbulos, provocando a desmontagem/colapso neuronal, dando origem aos emaranhados neurofibrilares intracelulares (figura 1). A destruição neuronal progressiva leva, por sua vez, à escassez e desequilíbrio entre vários neurotransmissores (por exemplo, acetilcolina, dopamina, serotonina) e à deficiências cognitivas importantes (Yiannopoulou & Papageorgiou, 2020).

Na DA, concomitante ao acúmulo de emaranhados neurofibrilares, ocorre também a deposição excessiva do peptídeo β -amiloide ($A\beta$) insolúvel no cérebro, dando origem as placas senis ou amiloides. Alguns estudos indicam que o acúmulo de $A\beta$ também pode ser um evento

ativador da hiperfosforilação da proteína Tau, por meio da indução e aumento na geração de Espécies Reativas de Oxigênio (EROS) na mitocôndria, produzindo defeitos em sua morfologia que poderiam estar associados a este processo, porém, como já supracitado, estes mecanismos ainda são pouco esclarecidos na literatura até o momento (Annamalai, 2015; Khan & Bloom, 2016; Merkwirth et al., 2012).

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).



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 ação consecutiva das enzimas β - e γ -secretases. A APP é produzida em grandes quantidades nos neurônios e é metabolizada muito rapidamente (Lee et al., 2008). Apesar da função fisiológica precisa da APP ainda não ser completamente conhecida, sabe-se que o aumento de sua expressão apresenta um efeito positivo na saúde e crescimento celular (O'Brien & Wong, 2011). O estudo de Oh e colaboradores (2009) mostrou este efeito positivo em camundongos transgênicos quando observou que o aumento da expressão da APP resultou em crescimento no tamanho neuronal (OH et al., 2009). A APP é sintetizada no retículo endoplasmático (ER), transportada para o complexo de Golgi, onde completa a sua maturação e, finalmente, é conduzida para a membrana plasmática. Quando madura, na membrana plasmática, ela é clivada pela ação sucessiva da α , β e γ -secretases através de duas vias distintas (amiloidogênica e não amiloidogênica) (Chen et al., 2017b).

Na via amiloidogênica, a APP é clivada sequencialmente por β -secretases, como a enzima de clivagem do sítio β da APP (BACE-1). Esta clivagem ocorre na região N-terminal da APP e

resulta na liberação de sAPP β no espaço extracelular, que parece ter uma função pró-apoptótica, além disso, este processo culmina na produção de um fragmento C-terminal ligado a membrana (CTF ou C99) (Kim et al., 2018). A subsequente clivagem da C99 pela ação de γ -secretases na região C-terminal da APP provoca a liberação do A β (A β 1-40 e A β 1-42). Esses peptídeos A β , por sua vez, se acumulam e subsequentemente se agregam no cérebro, dando origem às placas senis, responsáveis por causar danos neuronais e desencadear os principais sintomas da DA (figura 2). Vale ressaltar que o A β 42 é tipo mais hidrofóbico, apresentando maior potencial de agregação, portanto, é a forma mais amiloidogênica (La Ferla et al., 2007). Ainda, vale destacar que a estrutura do A β pode arranjar-se de diferentes formas, gerando uma variedade de espécies oligoméricas (Gu, Liu, & Guo, 2013). Já foi demonstrado que os oligômeros de A β também são tóxicos e podem desencadear uma série de alterações patológicas associadas à DA, incluindo a formação dos próprios emaranhados neurofibrilares, disfunção sináptica e morte neuronal (Marcello et al., 2019b)

Figura 2. Representação esquemática do acúmulo de placas amiloides (em amarelo) no cérebro, características da doença de Alzheimer. Extraído de Hayden (2016).

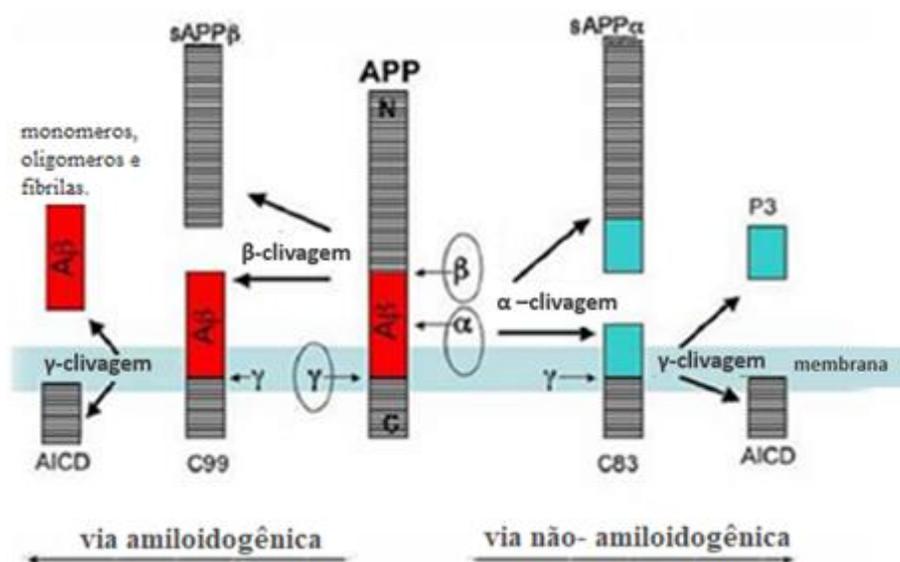


Na via não amiloidogênica, a APP é clivada pela α -secretase ADAM10 (*A Disintegrin And Metalloprotease*), entre os aminoácidos Lys16 e Leu17 no meio da região do A β , liberando um ectodomínio N-terminal (sAPP α) com funções neurotrópica e neuroprotetora. O fragmento C-terminal (C83), resultante deste processo, é retido na membrana e subsequentemente clivado pela ação de uma γ -secretase, que por sua vez dará origem a um pequeno fragmento denominado de p3. Esta fração é supostamente benéfica e não encontrada nas placas amiloides. Desta forma, clivagem da APP pela α -secretase ADAM10 na região A β desencadeia não só a produção de fragmentos benéficos (sAPP α e p3), como também impede a formação do peptídeo A β , funcionando

perfeitamente como uma via protetora contra o desenvolvimento da DA (LaFerla et al., 2007). Embora ambas as vias (amiloidogênica e não amiloidogênica) estejam presentes em indivíduos saudáveis, os pacientes com DA exibem uma predominância da via amiloidogênica e, portanto, produzem A β em excesso, enquanto que a rota predominante de processamento da APP em indivíduos saudáveis consiste de clivagens sucessivas por α e γ -secretases (Lichtenthaler, 2011). As α e β -secretases competem pela clivagem da APP (figura 3).

Uma importante questão que envolve o tema é que mesmo após a presença de sintomas e da identificação dos dois principais marcros neuropatológicos da condição (presença de emaranhados neurofibrilares e placas senis), o diagnóstico definitivo da DA não pode ser dado. Esta confirmação só pode ser obtida posteriormente a morte do indivíduo afetado (*post-mortem*) (Perl et al., 2010). Em vida, o diagnóstico da doença não envolve certeza, sendo dependente da caracterização do quadro clínico sintomatológico, exames de neuroimagem e exclusão de outras causas de demência (Martelli, 2014). Desta forma, a identificação de moléculas que possam ser usadas pra o reconhecimento periférico e facilitado da condição, torna-se um grande atrativo para a ciência mundial, já que atualmente os biomarcadores são vistos como grandes potencias, podendo ser utilizados para diagnóstico de algumas condições do ponto de vista biológico e clínico.

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 Cole & Vassar (2007).

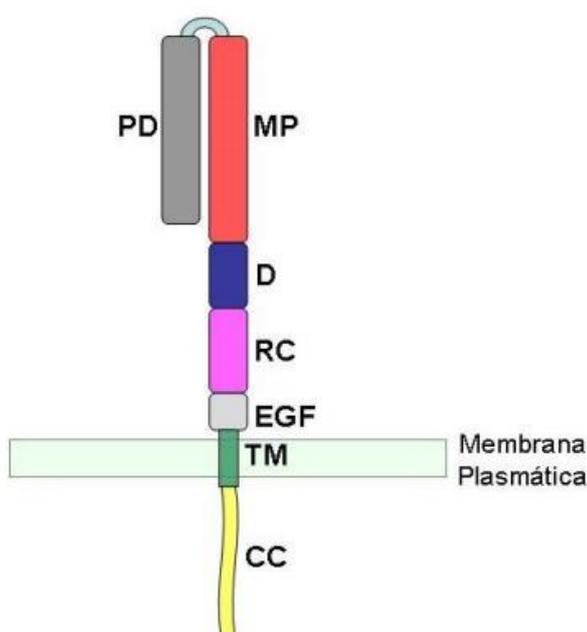


1.3 ADAM10

As proteínas expressas na membrana celular são de grande relevância para os processos celulares, tais como comunicação, sinalização e transmissão de sinais. Dois caminhos celulares estão envolvidos nesta regulação, sendo um através da endocitose, removendo estas proteínas da

membrana celular, e o outro através da clivagem, por meio de proteases localizadas na membrana ou no espaço extracelular. Estas proteases são capazes de liberar seus domínios extracelulares e abolir ou alterar suas funções na superfície da célula (Saftig & Lichtenthaler, 2015). No segundo contexto citado, insere-se a atividade das ADAMs, que pertencem a uma família de proteases dependentes de zinco. Sua estrutura é composta por 6 domínios, a saber: pró-domínio, metaloprotease, desintegrina, rico em cisteína, semelhante a fator de crescimento epidermal (EGF-like), transmembrana e a cauda citoplasmática (Seals & Courtneidge, 2003) (figura 4).

Figura 4. Modelo Esquemático dos domínios encontrados nas proteínas da família ADAM. De N-terminal para C-terminal: **MP:** domínio metaloprotease; **D:** domínio desintegrina; **RC:** domínio rico em cisteína; **EGD:** domínio semelhante a fator de crescimento epidermal; **TM:** região transmembrana; **CC:** cauda citoplasmática. Adaptado de White (2003).



Entre os 21 tipos de ADAMs identificados no genoma humano, a ADAM10 possui destaque por sua função catalítica de α -secretase relacionada à proteção contra DA (Padovani et al., 2001). A ADAM10 é uma proteína de membrana do tipo I com aproximadamente 750 aminoácidos, que é expressa e está localizada na membrana plasmática de algumas células, vesículas de Golgi, retículo endoplasmático (RE), plaquetas e principalmente em precursores neurais simpatoadrenais e olfativos (Fahrenholz et al., 2010).

A ADAM10 é uma metaloprotease, sendo assim possui um domínio específico com capacidade de ligação ao zinco, essencial para sua atividade. Além disso, possui o domínio citoplasmático que parece exercer função essencial para a atividade proteolítica da mesma (Maretzky et al., 2015). Evidências apontam que o domínio intracelular, possui uma região de homologia de Src3 (SH3), muito importante para o tráfego intracelular e atividade da protease

(Ebsen et al., 2014). A ADAM10 é sintetizada no retículo endoplasmático, como uma forma precursora inativa. Sua forma completa está ligada a um pró-domínio. A ativação da ADAM10 ocorre quando a proteína é transportada para o complexo de Golgi, onde por meio da ação das enzimas convertases PC7 e furinas, tem seu pró-domínio removido. Isto é possível pois a forma completa da ADAM10 possui uma sequência de reconhecimento para estas enzimas, entre o domínio de metaloprotease e o pró-domínio (Lichtenthaler, 2011) (figura 5).

De uma forma geral a ADAM10 é uma importante protease de membrana e está envolvida em muitos processos fisiológicos e patológicos, como desenvolvimento embrionário, adesão celular, transdução de sinais, atividade do sistema imunológico, câncer e DA (Lichtenthaler, 2011). Além disso, como descrito anteriormente, a ADAM10 é a principal α -secretase fisiológica dos neurônios e sua atividade em relação à APP gera fragmentos que protegem o cérebro da deposição de A β , desde o início da cascata patogênica. Desta forma, o papel central da ADAM10 no processamento de APP tornou a protease um alvo interessante para propostas de terapias para DA e estudos de biomarcadores (Kristina Endres & Deller, 2017; Manzine et al., 2020).

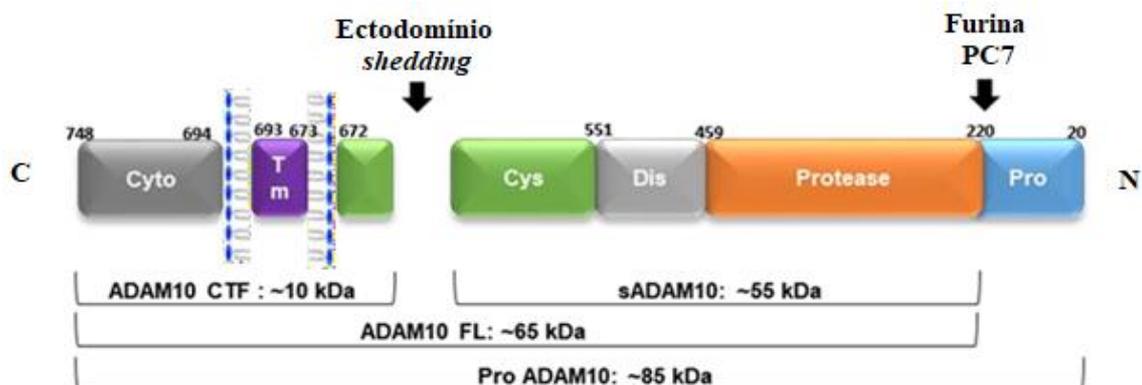
A ADAM10 é abundante na superfície celular e está presente constitutivamente em níveis altos na maioria dos tipos de células (Ebsen et al., 2013). Evidências científicas apontam que o domínio transmembrana da protease apresenta função crucial em sua atividade, modulando principalmente sua atuação como *shedase* em alguns substratos, como no fator de crescimento epidermal (EGFR) (Sahin et al., 2004).

Marcello e colaboradores (2007) demonstraram que a ativação do receptor de N-metil-D-aspartato (NMDA), em condições fisiológicas, induz o tráfego de ADAM10, através da associação com a Proteína 97 Associada à Sinapse (SAP97), em direção às membranas pós-sinápticas e permite a clivagem da APP em cultura de células primárias de hipocampo de rato. Estes resultados apresentam indícios de que a localização membranar da ADAM10 esteja associada positivamente a clivagem não amiloidogênica da APP (Marcello et al., 2007). Além disso, estudos recentes apontam para um importante papel das tetraspaninas (TSP), uma família de proteínas transmembrana no tráfego, maturação e na atividade da ADAM10 como *shedase*. Foi demonstrado que esta protease possui seis TSP parceiras que podem regular, positiva ou negativamente, sua função na membrana (Dornier et al., 2012; Haining et al., 2012; Jouannet et al., 2016; Prox et al., 2012).

As atividades de muitas ADAMs são bem descritas na literatura, no entanto a identificação de isoformas na família, não descritas anteriormente, representa uma característica muito comum destas proteases. Estudos correlatos exemplificam que a ADAM12 e a ADAM28 apresentaram diversas variantes truncadas, com um alto grau de similaridade estrutural, porém sem domínio

transmembrana, ou seja, isoformas com potenciais de atividade diversos (Gilpin et al., 1998, Haidl et al., 2002; Hernández et al., 2010).

Figura 5. Estrutura multimodular da ADAM10. Extraído e modificado de Peron e colaboradores (2018).

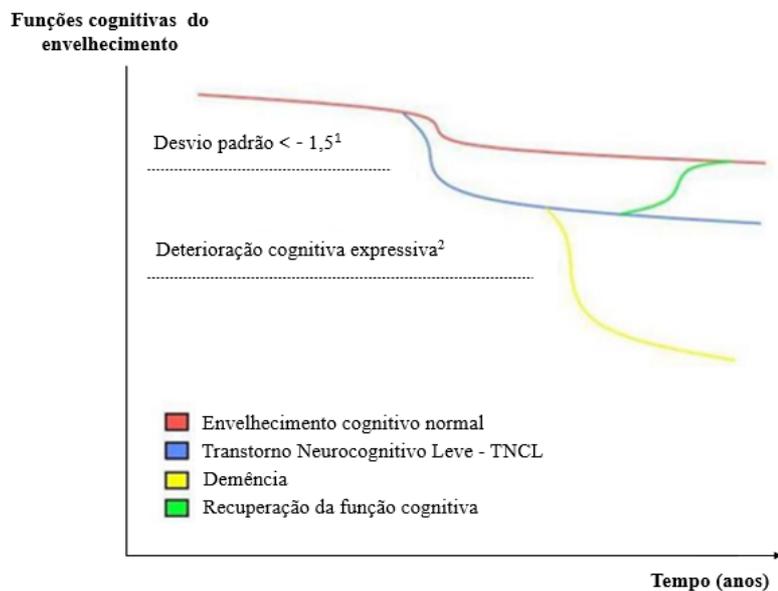


1.4 Transtorno Neurocognitivo Leve - TNCL

Em 2013, a Associação de Psiquiatria Americana publicou um novo Manual de Diagnóstico e Classificação dos Transtornos Mentais (DSM) com mudanças significativas no tópico sobre demência e transtornos cognitivos. O DSM-5 alterou a nomenclatura consensual de demência e Comprometimento Cognitivo Leve (CCL) para Transtorno Neurocognitivo Maior (TNM) e Transtorno Neurocognitivo Leve (TNCL), respectivamente (Petersen et al., 2014). Optamos, portanto, por utilizar esta denominação mais atual nesta tese.

Em 2001, Petersen e colaboradores indicaram a detecção precoce de demência por meio do diagnóstico de TNCL (Petersen et al., 2001). Este fato justifica-se, pois o TNCL é frequentemente considerado um estado de transição, entre o envelhecimento normal e os estágios iniciais da demência, principalmente a DA (Petersen et al., 2014; Petersen et al., 2001). Em 2014, Arahamian & Forlenza evidenciaram tal acontecimento através de um gráfico (figura 6), em que se pode observar a relevância desta condição para o desenvolvimento demencial.

Figura 6. Evolução temporal possível para o TNCL (modelo clínico-experimental); ¹Desvio-padrão inferior da cognição para uma população com mesmo perfil sociodemográfico; ²Deterioração importante ocasionando perda funcional substancial adaptado de Aprahamian et al. (2014) p.246.



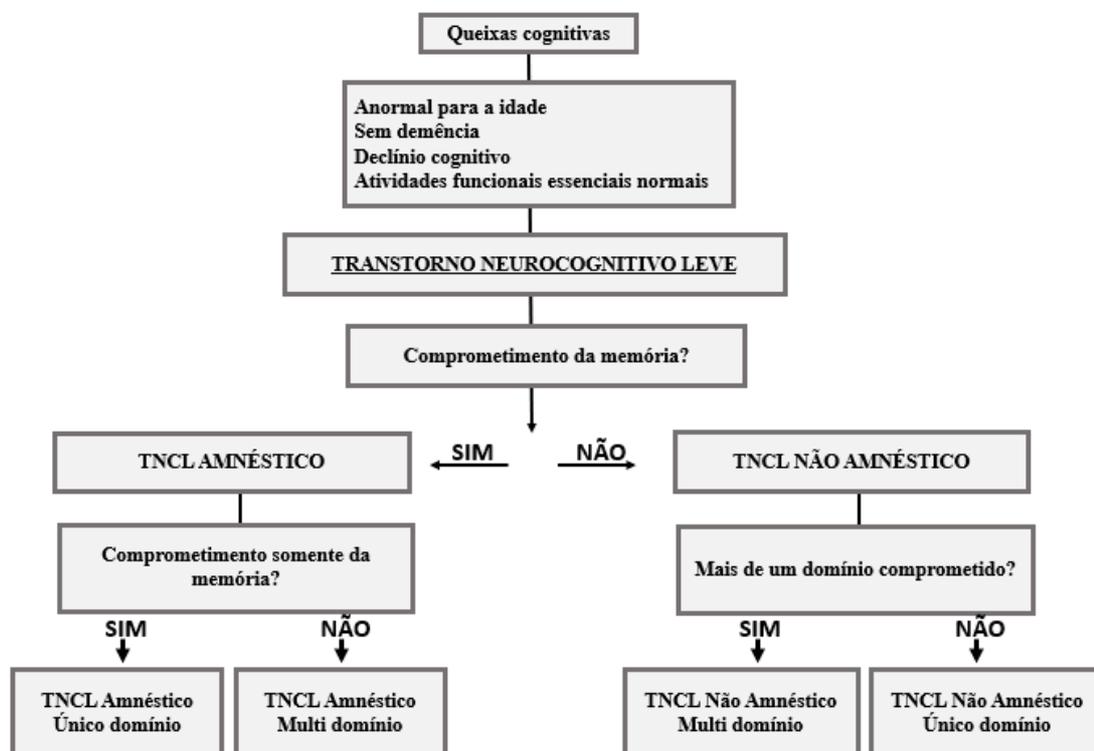
Mesmo não sendo um fator considerado determinante o TNCL representa um estágio transicional entre envelhecimento normal e demencial, correspondendo ao quadro em que se observa algum grau de perda cognitiva, quando comparado com a cognição em indivíduos saudáveis da mesma faixa etária, mas sem características de demência, desta forma, estes participantes devem apresentar capacidade de realizar suas atividades de vida diária sem ou com prejuízos mínimos (Cheng, Chen, & Chiu, 2017; Kelley & Petersen, 2007; Petersen & Morris, 2005).

Alguns estudos têm sugerido que o TNCL pode representar preditor para DA, tendo em vista a taxa de conversão para a doença, em torno de 10 à 16% ao ano, contrastando com a de indivíduos cognitivamente normais, que varia de 1 à 2 % ao ano (Petersen & Morris, 2005; Ward, 2013). Entretanto, para o diagnóstico de demência, as perdas cognitivas devem ser suficientemente altas de forma a interferir na capacidade de executar as atividades de vida diária, levando, em estágios mais avançados, à perda da autonomia e da independência.

O TNCL é classificado em dois subtipos principais: amnésico e não-amnésico (Petersen & Morris, 2005; Dugger et al., 2015; Winblad et al., 2004) (figura 7). O subtipo amnésico inclui indivíduos com comprometimento da memória, especialmente a episódica, abaixo do que se é esperado para a idade (TNCL amnésico único domínio). O comprometimento da memória pode ser acompanhado por menores déficits cognitivos em outros domínios, como linguagem, funções executivas, ou habilidades visuoespaciais. Neste caso, o TNCL é chamado de amnésico múltiplos domínios (Petersen & Morris, 2005). No TNCL não-amnésico a memória está preservada e como

no anterior, pode haver apenas um ou múltiplos domínios comprometidos, sendo denominado TNCL não-amnésico único domínio e TNCL não-amnésico múltiplos domínios, respectivamente (Winblad et al., 2004).

Figura 7. Algoritmo diagnóstico para os subtipos de TNCL. Adaptado de Petersen & Morris (2005).



Situações neuropatológicas comumente precedentes à DA, como o TNCL (taxa de conversão de 10 a 15% ao ano), são constantemente relacionadas aos diferentes fenótipos de fragilidade (Panza et al., 2019). Estudos prévios indicam forte relação entre estas condições ao afirmar que a síndrome de fragilidade aumenta o risco de desenvolvimento de comprometimento cognitivo, do mesmo modo, indivíduos acometidos por comprometimentos cognitivos também demonstram maiores chances de desenvolver fragilidade física (Boyle et al., 2010; Han & Kim, 2014).

1.4.1 Fragilidade física

A fragilidade é um evento relativamente comum no processo de envelhecimento, caracterizado por queda da resistência fisiológica a estressores, levando à redução da capacidade de retorno à homeostase e risco aumentado de eventos negativos relacionados à saúde, incluindo hospitalização e morte (Fried et al., 2001; Morley et al., 2013; Panza et al., 2019).

Mais de 40 definições operacionais de fragilidade foram propostas, porém três abordagens principais são comumente usadas (Panza et al., 2019):

1. Fenotípica

Esta abordagem baseia-se na noção de um fenótipo de fragilidade física e biológica e pressupõe um estado de balanço energético negativo, sarcopenia, diminuição da força muscular e baixa tolerância ao esforço. Esta abordagem define fragilidade em três níveis: robusto/não frágil, pré-frágil e frágil (Fried et al., 2001).

2. Acúmulo de déficits

Esta definição incorpora vários fatores que vão desde estados de doença (diabetes mellitus, doença de Parkinson e outras), deficiências (por exemplo, dependência no banho ou no curativo), sintomas (alterações no sono e humor, queixas de memória e outros) e sinais (tremor, diminuição da circulação periférica, pulsos e outros), até valores laboratoriais anormais (ureia, creatinina, cálcio e outros). Nesta abordagem os déficits são listados e depois divididos pelo número total de critérios analisados, produzindo assim um índice de fragilidade (Mitnitski et al., 2001).

3. Modelo biopsicossocial

A terceira abordagem da fragilidade baseia-se no modelo biopsicossocial, que mescla os domínios físico e psicossocial e amplia o construto da fragilidade em direção às ciências sociais (Rockwood et al., 2005; Teo et al., 2019).

Sob o olhar do fenótipo físico, a fragilidade é considerada “primária” ou “pré-clínica” quando o estado não está associado diretamente a uma doença específica ou quando não há um quadro de incapacidade importante. Por outro lado, de acordo com o modelo que vincula a fragilidade ao acúmulo de déficits, a fragilidade é considerada “secundária” ou “clínica” quando associada a comorbidades conhecidas, como demência, doença cardiovascular evidente e/ou outras incapacidades (Panza et al., 2018).

A clássica, pioneira e mais utilizada é a definição de fragilidade fenotípica de Fried et al. (2001; 1999), que determina a fragilidade como o estado de vulnerabilidade fisiológica relacionado com a idade, resultante da redução da reserva homeostática e da diminuição da capacidade do organismo para suportar eventos estressantes. Segundo Fried e grandes estudiosos da área, a fragilidade é multifatorial e dinâmica e aferi-la implica em levantar um conjunto de sintomas e sinais específicos (Fried & Walston, 2003; Rockwood & Mitnitski, 2006). Desta forma, para o acompanhamento clínico dos idosos frágeis, ou em processo de fragilidade, é necessário avaliar três mudanças relacionadas à idade que são: alterações neuromusculares, como sarcopenia, desregulação do sistema neuroendócrino e disfunção do sistema imunológico (Duarte, 2009; Fried & Tangen, 2001).

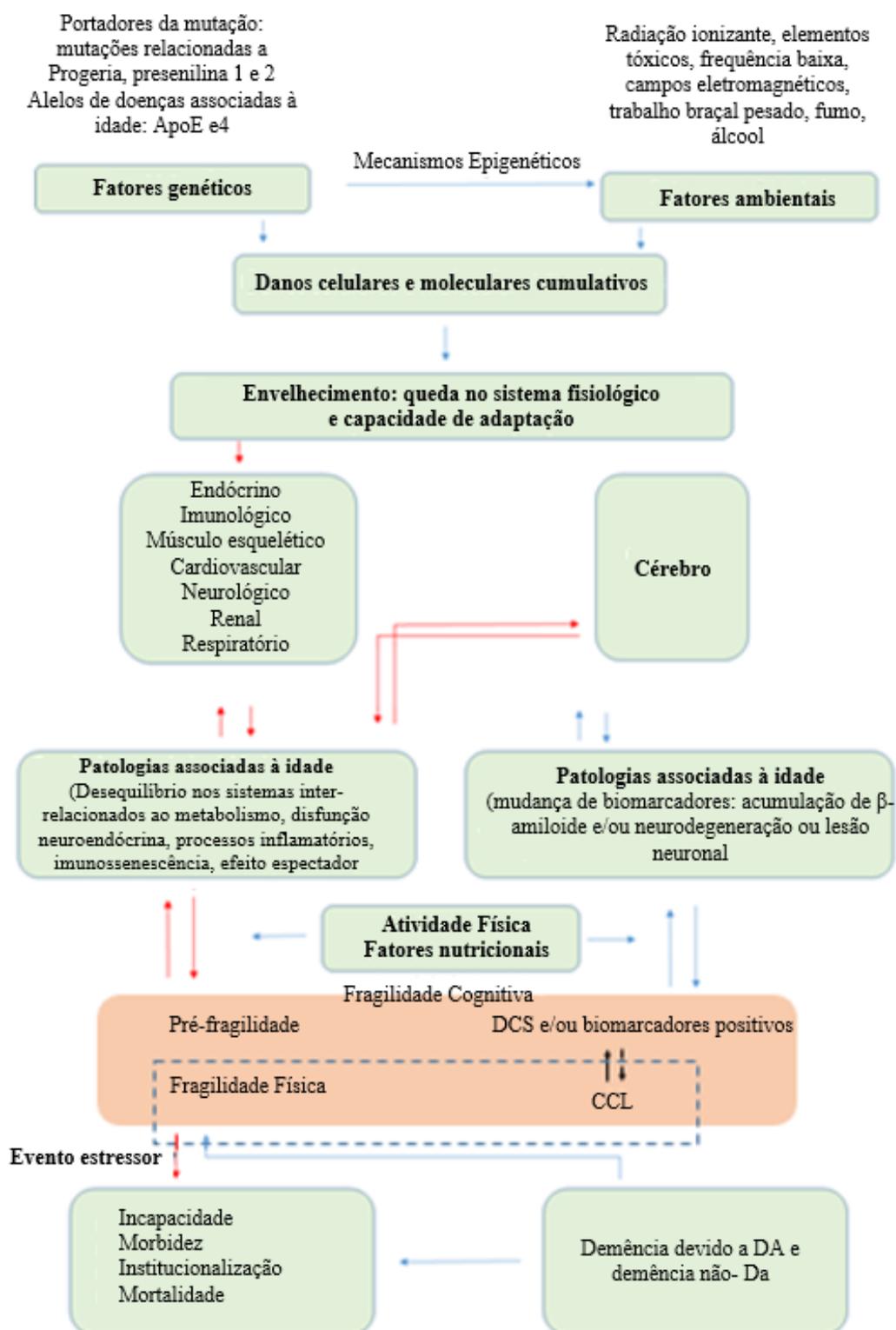
Até o momento não há um padrão ouro para a detecção da fragilidade física, pois muitos estudos usam instrumentos variados para identificar a condição, porém a confiabilidade e a validação destes materiais devem ser priorizadas (Pel-Littel, 2009). O instrumento mais utilizado mundialmente para a medida da fragilidade física foi o estabelecido por Fried et al. (2001). Os componentes do fenótipo de fragilidade proposto por esses autores foram identificados com base em cinco fatores: (1) Perda de peso não intencional, (2) Fadiga, (3) Baixa atividade física, (4) Redução da velocidade de caminhada e (5) Redução da força de preensão manual. Com base nos resultados destes componentes, os participantes podem ser considerados não-frágeis ou robustos (nenhuma alteração nos cinco fatores), pré-frágeis (alteração em até dois fatores) ou frágeis (alteração em três ou mais fatores) (Fried et al., 2001).

Idosos classificados como frágeis apresentam maior susceptibilidade à hospitalização, quedas, incapacidades e mortalidade (Rockwood & Mitnitski, 2007), além de maior propensão para desenvolver hipertensão arterial (Vetrano et al., 2018), depressão (Soysal et al., 2017) e declínio cognitivo (Canevelli et al., 2015). Apesar de tantos impactos, a condição é considerada tratável e em alguns casos reversível (Lozano-Montoya et al., 2017), sendo assim mudanças nutricionais (Moraes et al., 2018) e atividade física praticada regularmente são consideradas intervenções efetivas contra a fragilidade física (Losa-Reyna et al., 2019).

Devido à associação com estas diversas variáveis, o conceito de fragilidade no decorrer do tempo evoluiu de um olhar exclusivamente físico para uma abordagem também cognitiva (Rockwood & Mitnitski, 2007). É importante destacar que a fragilidade cognitiva nasce justamente desta necessidade de ampliação do conceito e em decorrência disso, alguns estudos têm se esforçado para explicar a intrínseca relação existente entre as condições de fragilidade física e cognição (Qingwei. et al., 2015) (figura 8). Contribuindo com estes achados, Buchman et al. (2014) afirmaram em um estudo longitudinal que a fragilidade física e as mudanças na função cognitiva poderiam, em parte, compartilhar uma mesma base patológica. Além disso, estudos epidemiológicos confirmam a estreita relação entre estas variáveis (Armstrong et al., 2010; Jacobs et al., 2011) e afirmam que idosos frágeis apresentam pior desempenho cognitivo (Robertson & Kenny, Neri et al., 2013; 2013), quando comparados a idosos saudáveis.

Até o momento, a relação causal entre fragilidade física e comprometimento cognitivo ainda não foi totalmente esclarecida (Halil et al., 2015), mas com base no que foi apresentado nota-se que o reconhecimento precoce destas condições representa um alvo promissor, considerando a conexão encontrada entre elas e a possibilidade de prevenção agravos.

Figura 8. O ciclo da fragilidade física, fragilidade cognitiva e comprometimento cognitivo. A deficiência física causada pela fragilidade cognitiva está representada pelas setas vermelhas, componentes de fragilidade cognitiva propostos são descritos na caixa alaranjada e componentes prévios de fragilidade cognitiva são apresentados na linha pontilhada em azul. Extraído e modificado de Qingwei. et al. (2015).



1.4.2 Fragilidade Cognitiva

Embora o fenótipo da fragilidade física seja um tema amplamente explorado entre os estudiosos do envelhecimento, apenas nos últimos anos o termo “fragilidade cognitiva” surgiu na literatura. Em 2001, ele foi usado pela primeira vez por Paganini-Hill e colaboradores em um estudo que envolvia fatores de proteção e risco para a DA em idosos (Paganini-Hill, 2001). Em 2004, o termo foi utilizado para indicar uma condição, ainda não muito esclarecida, em que idosos passavam a apresentar comprometimento cognitivo a partir de declínios mais intensos decorrentes do avanço da idade e também para referir-se a distúrbios cognitivos que ocorriam em associação com outras condições médicas (Chouliara & Miller, 2004). Em 2006, o termo foi usado como rótulo clínico para indicar um estado particular de vulnerabilidade cognitiva no TNCL, e em outras entidades clínicas semelhantes, com subsequente aumento da progressão para demência (Panza et al., 2006). No entanto, somente em 2013 um consenso internacional sobre a definição de fragilidade cognitiva foi alcançado.

A Academia Internacional de Nutrição e Envelhecimento (IANA) e a Associação Internacional de Gerontologia e Geriatria (IAGG) se reuniram em 16 de abril de 2013, em Toulouse, França, e forneceram a primeira definição da condição chamada de fragilidade cognitiva em idosos (Kelaiditi et al., 2013; Qingwei. et al., 2015). Esta condição é considerada uma síndrome clínica heterogênea definida como presença simultânea de fragilidade física e comprometimento cognitivo, sem diagnóstico de DA ou de outras demências. Sua concepção foi motivada pela tentativa de delinear uma entidade na qual o comprometimento do funcionamento cognitivo não é sustentado principalmente por doenças neurológicas e/ou neurodegeneração, mas fundamentalmente impulsionado por um declínio no domínio físico individual. Assim, a lógica subjacente para a criação desse novo construto foi a necessidade de melhorar a discriminação clínica de idosos que passam por situações muito heterogêneas ao longo do envelhecimento e então fornecer medidas preventivas e/ou terapêuticas mais específicas (Canevelli & Cesari, 2017).

Na tentativa de refinar a definição e os possíveis mecanismos de fragilidade cognitiva, foram propostos dois subtipos para esse construto clínico: fragilidade cognitiva “potencialmente reversível” e fragilidade cognitiva “reversível” (Kelaiditi et al., 2013). Ambos os subtipos envolvem dois pilares, o físico e o cognitivo. Com relação aos fatores físicos, ambas as classificações envolvem o diagnóstico de pré-fragilidade ou fragilidade física, geralmente definidas por um ou dois, e três ou mais, das cinco características clássicas propostas por Fried, respectivamente (Fried et al., 2001). Com relação ao construto cognitivo, a fragilidade cognitiva potencialmente reversível é caracterizada por pontuação 0,5 no *Clinical Dementia Rating* (CDR), indicando possível TNCL, enquanto o subtipo reversível é caracterizado por declínio cognitivo subjetivo (SCD)/pré-TNCL, com CDR pontuando zero (Jessen et al., 2014). Com base nesta

classificação é importante destacar que o presente estudo trabalhou somente com a fragilidade cognitiva potencialmente reversível e considerou nesta categoria apenas aqueles que pontuaram 1 ou mais no instrumento de avaliação de fragilidade de Fried (pré-frágil e frágil) e 0.5 no CDR.

Além disso, o painel de especialistas da IANA-IAGG sugeriu que ambas as condições devem certificar ausência de demência. Desta forma, todos os indivíduos devidamente identificados como pré-frágeis e frágeis fisicamente, seguindo protocolos validados, pontuando 0,5 no CDR, devem realizar também uma avaliação cognitiva abrangente. A intenção envolve explorar o desempenho da memória e outras funções cognitivas, em particular as funções executivas, através de testes de avaliação cognitiva amplamente validados, como por exemplo o *Montreal Cognitive Assessment* (MoCA) e o Mini-Exame do Estado Mental (MEEM) (Jessen et al., 2014). Esta etapa deve auxiliar no descarte da presença de qualquer quadro demencial (Kelaiditi et al., 2013). No entanto, vale ressaltar que as medidas ideais ou a combinação de estratégias para detectar com precisão a fragilidade cognitiva no cenário clínico ainda não foram padronizadas (Jessen et al., 2014).

Por apresentar-se como um quadro de comprometimento cognitivo relacionado ou até advindo de causas físicas e com grande potencial de reversibilidade, a fragilidade cognitiva mostra-se atualmente como um importante alvo de intervenção secundária em estágios precoces ao desenvolvimento demencial (Panza et al., 2017). Além disso, alguns estudos têm mostrado que o TNCL indicou valores significativos na predição de desfechos adversos, tais como conversão para demências, dependência, hospitalização e morte em idosos frágeis, fortalecendo ainda mais a justificativa para identificação desta condição (Avila-Funes et al., 2009).

Por hora, o conceito de fragilidade cognitiva ainda não está devidamente amadurecido e, neste sentido, este estudo pode contribuir para o fortalecimento do construto teórico a respeito do tema.

1.5 Biomarcadores

Os biomarcadores são indicativos de processos biológicos muito utilizados para a descoberta e monitoramento de quadros patológicos, bem como para a avaliação de resposta farmacológica e acompanhamento de intervenções (Strimbu & Tavel, 2010). Os biomarcadores fornecem informações sobre o período de início do processo patogênico, estágio em que se encontra e resposta do organismo ao tratamento empregado (Califf, 2018). Desta forma, os biomarcadores são de grande importância, não apenas para a detecção precoce de doenças, mas também para controle e monitoramento de seu curso (Lesko & Atkinson, 2001).

É importante destacar que a identificação de marcadores periféricos e, portanto, menos invasivos, torna a ferramenta uma estratégia ideal para auxiliar no diagnóstico de diversas de

patologias, representando um método seguro, rápido e de baixo custo (Blennow & Zetterberg, 2018). Há muitos anos, o nosso grupo de pesquisa vem se dedicando ao estudo de biomarcadores periféricos para idosos com DA, estudando principalmente a ADAM10 devido ao seu papel central no processamento de APP. Nossos resultados demonstraram que pacientes com DA apresentam níveis de ADAM10 plaquetários diminuídos quando comparado com idosos cognitivamente saudáveis (Manzine et al., 2013a; 2015; 2013b), corroborando com os resultados obtidos por outros pesquisadores (Colciaghi et al., 2002; Di Luca, 2000). Estes estudos resultaram em publicações que vêm consolidando o papel desta proteína como um marcador para a DA. Seguindo esta linha de estudo e com base em nossos achados prévios, o presente trabalho visou ampliar os conhecimentos acerca do uso da ADAM10 como molécula biomarcadora e estender os achados encontrados para uma condição possivelmente precedente ao quadro de DA, com a presença concomitante de fragilidade física, em uma tentativa de validar a ADAM10 como uma biomarcadora do recente construto de fragilidade cognitiva.

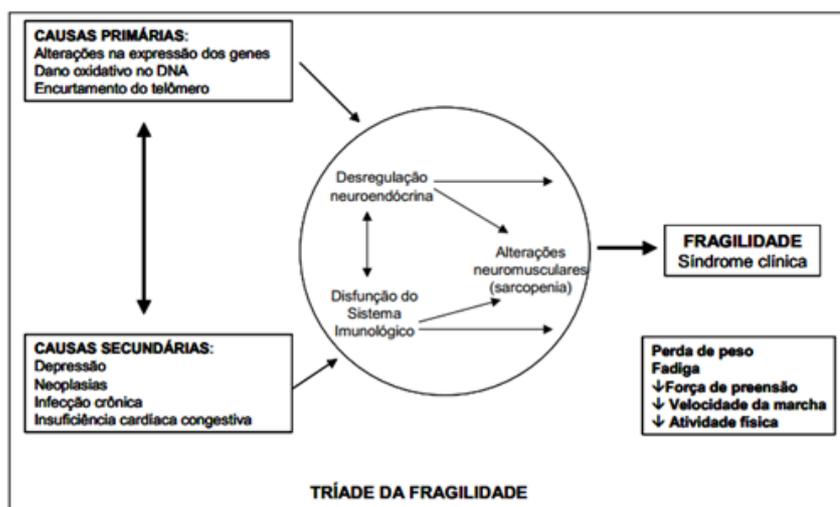
1.5.1 Biomarcadores de fragilidade física

Para Fried e colaboradores (2003) a associação entre os mecanismos primários relativos à idade e os secundários relacionados às doenças poderiam estar associados ao início da síndrome clínica da fragilidade, sendo três as principais alterações relacionadas a esse processo, “tríade da fragilidade” (Figura 9):

- ✓ Alterações neuromusculares (principalmente sarcopenia);
- ✓ Desregulação do sistema neuroendócrino;
- ✓ Disfunção do sistema imunológico.

Além desta tríade, diversas alterações fisiológicas podem surgir relacionadas ao processo de fragilidade. Dentre elas, a diminuição da massa muscular esquelética, que por sua vez gera a redução na captação máxima de oxigênio (VO_2 máximo), da força e tolerância aos exercícios e do gasto energético; distúrbios na termorregulação e aumento na resistência à insulina. Todas essas modificações podem, em parte, ser detectadas através da avaliação de biomarcadores (Lourenço, 2008; Saedi, 2019).

Figura 9. Tríade da Fragilidade. Extraída de Fried & Walston (2003) e modificada/ adaptada por Teixeira et al. (2012).



Neste sentido, algumas moléculas que apresentam sua expressão alterada na síndrome da fragilidade poderiam, portanto, ser consideradas possíveis biomarcadoras deste processo. Porém ainda há muita controvérsia na literatura quanto a validade e aplicação desses biomarcadores para o diagnóstico da fragilidade (Calvani et al., 2015) especialmente pelo fato de que idosos apresentam várias condições inerentes do processo de envelhecimento, como por exemplo, comorbidades e um estado inflamatório crônico de grau leve, conhecido como “*inflammaging*” (Ferruci & Fabbri, 2018).

Assim, os biomarcadores de fragilidade podem estar alterados em decorrência da disfunção imunológica, característica do *inflammaging*, mas presente também na síndrome de fragilidade. Na literatura está descrita a redução dos níveis de interleucina 2, das imunoglobulinas G e A, e da resposta mitogênica, além do aumento na quantidade de células de memória imunológica e de interleucinas 6 e 1 β (Fried & Walston, 2003).

Marcadores endócrinos alterados na síndrome de fragilidade surgem em decorrência da desregulação neuroendócrina, frequente na síndrome de fragilidade, na qual se observa redução dos níveis de hormônio do crescimento, do estrogênio e da testosterona, além do aumento do tônus simpático e a desregulação do cortisol (Fried & Walston, 2003). Outros biomarcadores, tais como, radicais livres, antioxidantes, macro e micronutrientes e Proteína C Reativa (PCR), também estão descritos como presentes na fragilidade e são associados ao desenvolvimento de incapacidades e à elevação da mortalidade (Ferrucci et al., 2004).

Um corpo recente e crescente de evidências epidemiológicas sugeriu que a fragilidade pode aumentar o risco de declínio cognitivo futuro e, vice-versa, que o comprometimento cognitivo pode aumentar o risco de fragilidade, sugerindo que as condições de cognição e fragilidade podem interagir no avanço do envelhecimento (Panza et al., 2018; Malmstrom & Morley, 2013; Robertson

et al., 2013). Estes estudos apoiaram e fortaleceram o tema fragilidade cognitiva como um importante alvo científico.

1.5.2 Biomarcadores de fragilidade cognitiva

Não foram encontrados estudos que avaliaram biomarcadores periféricos para fragilidade cognitiva. No entanto, pesquisas correlatas identificaram moléculas potencialmente marcadoras nas condições de fragilidade física e TNCL, isoladamente.

Um estudo recente, ao apontar a relação entre cognição e fragilidade, indicou a necessidade crucial de se inserir critérios de fragilidade na avaliação cognitiva (Inglés et al., 2016). Contudo, uma das características mais importantes do construto de fragilidade é o que se refere à individualidade de condições, o que significa que nem todos os indivíduos são frágeis na mesma maneira, isto inclui, portanto, uma série de variáveis físicas, psicossociais e cognitivas à esta análise (Panza et al., 2015; Malmstrom & Morley, 2013; Qingwei. et al., 2015). Desta forma, componentes clínicos associados a indicativos laboratoriais, como análise de biomarcadores, apresentam grande potencial para somar e reforçar esta detecção de uma forma mais simples. Além disso, a identificação antecipada da fragilidade torna possível a indicação de condutas mais específicas, a fim de reparar ou prevenir maiores efeitos adversos oriundos desta síndrome em idosos (Inglés et al., 2016).

Neste sentido, o estudo de Inglés et al., 2016, com idosos em condições diferentes de fragilidade física (não-frágil e pré-frágil, frágil) observou que a mesma está relacionada com o estresse oxidativo e que este fenômeno é evidenciado através de biomarcadores como peroxidação lipídica (determinada por malondialdeído - MDA e carbonilação de proteínas -PCs).

Curiosamente, o estresse oxidativo tem sido associado a menores níveis de fatores neurotróficos, entre eles o Fator Neurotrófico Derivados do Cérebro (BDNF), cuja função está relacionada com a sobrevivência e processos de proliferação neuronal (Inglés et al., 2016). O BDNF é um biomarcador de alterações cognitivas, capaz de proteger o cérebro contra o estresse oxidativo, aumentando a expressão das enzimas antioxidantes, entre outros fatores de defesa importantes. O trabalho de Inglés *et al.* (2016), traz que a diminuição dos níveis de BDNF está associada com disfunção cognitiva, DA, depressão e epilepsia. Estes autores avaliaram os níveis de BDNF no plasma de 77 participantes não-frágeis, 73 pré-frágeis e 76 indivíduos frágeis, de forma longitudinal. O estudo demonstrou que nos indivíduos frágeis os níveis plasmáticos de BDNF eram significativamente menores em pessoas frágeis quando comparados com os indivíduos não-frágeis. Além disso, Coelho e colaboradores (2012) encontraram resultados semelhantes entre mulheres não-frágeis e pré-frágeis, sugerindo que os níveis de BDNF podem estar relacionados à fragilidade.

Sendo assim, dois marcadores (sirtuína 1 e cistatina C) foram medidos no plasma sanguíneo e associados ao comprometimento cognitivo e à fragilidade, separadamente. As concentrações de sirtuína 1 apresentaram-se reduzidas com o avançar da idade, mas o declínio mostrou-se ainda mais significativo nos indivíduos com comprometimento cognitivo e fragilidade em comparação com indivíduos saudáveis pareados por idade (Kumar et al., 2013). Por sua vez, a diminuição da cistatina C sérica foi associada também a um maior risco de comprometimento cognitivo e declínio da velocidade da marcha (Liu et al., 2014).

Alguns marcadores nutricionais (vitamina D, albumina total e selênio) combinados com marcadores endócrinos e imunológicos também foram quantificados e sugerem alterações no sistema imunológico celular com significativa relação com o declínio cognitivo e físico (Baylis et al., 2013; Heringa et al., 2014; Kobrosly et al., 2012).

Estudos anteriores de outros grupos (Colciaghi & Borroni, 2002; Tang & Rosenberg, 2006), bem como os desenvolvidos pelo nosso próprio grupo de pesquisa (Manzine et al., 2013b) demonstraram que os níveis da ADAM10 estão diminuídos em plaquetas de pacientes com DA e essa redução foi relacionada ao avanço da doença. Desta forma, a identificação da ADAM10 como um biomarcador tem se mostrado uma 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 pode sugerir que a necessidade desta proteína para um envelhecimento cognitivo saudável, reforçando ainda mais o papel desta proteína como ferramenta para estudo (Schuck et al., 2016).

Diante destas evidências e somado ao fato de que até o momento a ciência não encontrou a cura para a DA (Yiannopoulou & Papageorgiou, 2020), é particularmente interessante pensar na possibilidade de se utilizar a ADAM10 para identificar fatores de risco potencialmente reversíveis relacionados aos quadros pré-demenciais. Desta forma, o reconhecimento da ADAM10 como um biomarcador sanguíneo, de fácil acesso, para a identificação da fragilidade cognitiva se apresenta como uma ideia extremamente atraente. Assim sendo, o presente estudo teve como objetivo avaliar se a ADAM10 poderia ser considerada um biomarcador de fragilidade cognitiva e com isso abrir uma janela de oportunidade para intervenções preventivas e cuidados mais assertivos no tratamento, reversão ou manutenção da condição de saúde e independência dos idosos acometidos, diminuindo o risco de incapacidade física e cognitiva.

1. 6 ADAM10 em plaquetas e plasma

Sabe-se que as ADAMs são α -secretases envolvidas na clivagem da APP e no presente estudo optamos por analisar os níveis de ADAM10 em plaquetas, pois entre os tecidos periféricos estes fragmentos celulares apresentam os maiores níveis da expressão da APP (cerca de 95%) (Evin, 2003). A adequação do uso de plaquetas para investigar ADAM10 como molécula biomarcadora

para cognição está nas múltiplas semelhanças entre elas e as células neuronais. As plaquetas alojam e liberam neurotransmissores, carregam transportadores e receptores apropriados, normalmente expressos por células neuronais. Depois do cérebro, são a segunda fonte de APP, sendo capazes de produzir todos os seus fragmentos encontrados nos neurônios: a forma secretada e solúvel da APP (sAPP α e sAPP β); o fragmento amiloidogênico C99 e sua molécula correspondente C83, produzida pela clivagem via β -secretase; e o peptídeo A β (Colciaghi & Borroni, 2002). Isto indica que as plaquetas possuem atividades das α , β e γ -secretases e que assim como os neurônios, podem processar a APP pelos dois caminhos celulares conhecidos o amiloidogênico (envolvendo β e γ secretases) e o não-amiloidogênico (envolvendo α e γ secretases).

Contudo, estudos anteriores, realizados pelo nosso grupo de pesquisa, identificaram que a porção plasmática do sangue também consiste em um meio bastante viável a ser utilizado na identificação de ADAM10 na DA. Sua utilização justifica-se, pois, seu comportamento com relação aos níveis de ADAM10 se deu de forma muito semelhante ao líquido cefalorraquidiano (LCR), no entanto apresenta uma larga vantagem com relação ao custo do procedimento e facilidade em sua coleta, quando comparado às plaquetas. Além disso, o isolamento plaquetário permite que a porção plasmática também seja coletada, podendo ser armazenada para estudos posteriores, procedimento este que foi realizado neste trabalho. Deste modo, este estudo teve condições de ampliar suas análises da ADAM10 explorando uma nova fração sanguínea.

O desenvolvimento desta etapa adicional teve como intenção complementar os resultados já apresentados e verificar se a ADAM10 plasmática poderia ser atribuída como biomarcadora das condições concomitantes de TNCL e fragilidade física. Esta resposta pretende contribuir para o fortalecimento do construto de fragilidade cognitiva e representaria uma alternativa vantajosa, uma vez que a obtenção de plasma requer menos etapas em comparação às plaquetas, tornando a detecção ainda mais econômica, rápida e fácil.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

- Investigar se os níveis plaquetários e plasmáticos da ADAM10 podem ser utilizados como biomarcadores de condições concomitantes de TNCL e fragilidade física.

MATERIAIS E MÉTODOS

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Estudo e Amostra

Trata-se de um estudo observacional, do tipo transversal baseado nos pressupostos da pesquisa quantitativa (Matla et al., 2010). A população base para a amostra de participantes deste estudo foi composta por indivíduos com idade superior ou igual a 60 anos que estão na cobertura de um núcleo de saúde da família do município de São Carlos. Todos os moradores da área enquadrados nos critérios de inclusão da pesquisa (tabelas 1 e 2) e que concordaram em participar do estudo foram avaliados quanto à ausência e a presença de TNCL e classificados como frágeis ou não-frágeis, quanto aos critérios estabelecidos por Fried et al. (2001). Todos os idosos do presente estudo foram selecionados de um projeto em andamento que tem como objetivo avaliar os idosos que estão na cobertura de um núcleo de saúde da família do município de São Carlos (“Cognição social e comparação dos critérios de demência do DSM-IV e DSM-5 entre idosos atendidos na atenção básica” - processo FAPESP 2015/16412-1). Neste estudo, os 61 participantes foram entrevistados por um médico psiquiatra que realizou os exames clínicos cuidadosos para o diagnóstico clínico de TNCL após a adequada exclusão de diversos transtornos psiquiátricos que pudessem confundir a classificação.

3.1.1 Aspectos éticos

A todos os participantes foi entregue o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (anexo 6), fornecendo-lhes informações sobre as justificativas, objetivos, procedimentos, riscos e benefícios do estudo ao qual foram convidados a participar. Somente foram aceitos no estudo aqueles participantes que assinaram devidamente o TCLE. O projeto foi avaliado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da UFSCar - parecer n. 1.524.578 e receberam o Certificado de Apresentação para Apreciação Ética (CAAE) n. 78602515.5.0000.5504.

3.1.2 Critérios de inclusão e exclusão

Critérios de inclusão

Tabela 1. Critérios de inclusão dos participantes da pesquisa.

Critérios de Inclusão
• Idade igual ou superior a 60 anos;
• Ser cadastrado no núcleo de saúde da família do município de São Carlos;
• Ser moradores na área de abrangência
• Apresentar capacidade de compreensão e comunicação verbal;
• Aceitar participar do estudo, com a assinatura do termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Critérios de exclusão

Tabela 2. Critérios de exclusão dos participantes da pesquisa.

Critérios de Exclusão
<ul style="list-style-type: none">• Idosos que apresentem alguma comorbidade clínica grave ou sequelas que impeçam a realização dos testes (déficits motores graves, auditivos ou afasia) clinicamente significativos e sem correção ou que estejam acamados;
<ul style="list-style-type: none">• Usuários de cadeira de rodas;
<ul style="list-style-type: none">• Idosos com doenças em estágio terminal, ou seja, em fase final e irreversível de uma doença crônica, que conduz a uma total debilidade que impossibilite as avaliações;
<ul style="list-style-type: none">• Uso de medicação que pode interferir nas funções plaquetárias, tais como drogas antiplaquetárias, anticoagulantes, corticosteroides, sedativos, hipnóticos, anticonvulsivantes, e outros fármacos que possam diminuir a produção das plaquetas na medula óssea ou induzir destruição imunológica das plaquetas (Drachman, 2004);
<ul style="list-style-type: none">• Diagnóstico de demência;
<ul style="list-style-type: none">• Doenças cerebrovasculares significativas participando como etiologia da demência;
<ul style="list-style-type: none">• Doenças sistêmicas clinicamente significativas ou não compensadas, que impeçam os testes incluindo: DIA, HAS, Hipotireoidismo, Câncer, Doenças Hepáticas, Doenças Renais, Doenças Cardíacas e Doenças Pulmonares;
<ul style="list-style-type: none">• Doenças que levam à diminuição da produção das plaquetas na medula óssea (aplasia, fibrose ou infiltração de medula), doenças que cursam com aumento do baço (esplenomegalia), com sequestro e destruição das plaquetas e doenças que aumentam a destruição plaquetária, pela presença de vasos anormais, próteses vasculares e trombos (trombocitopênica trombótica púrpura, vasculites, síndrome hemolítico-urêmica, coagulação intravascular disseminada e próteses cardíacas) (Drachman, 2004).

3.2 Avaliação da fragilidade

3.2.1 Critérios de avaliação de fragilidade de Fried

Neste estudo foi realizada a avaliação da fragilidade física dos voluntários através do fenótipo de fragilidade de Fried (anexo 1). Este modelo foi originalmente operacionalizado usando o banco de dados mundialmente validado *Cardiovascular Health Study (CHS)* (Fried et al., 2001).

De acordo com o instrumento foram avaliados cinco componentes mensuráveis objetivamente:

1. Perda de peso não intencional: Foi utilizada uma pergunta subjetiva (“No último ano, O Sr (a) perdeu mais que 4,5 kg de peso não intencional?”). Se sim, pontuava-se neste componente.

2. Fadiga: As perguntas avaliadas foram: (a) “Com que frequência, na última semana, o Sr (a) sentiu que tudo que fez exigiu um grande esforço?”; (b) “Com que frequência, na última

semana, o (a) Sr (a) sentiu que não conseguia levar adiante as suas coisas?” As respostas para ambas as questões eram: 0= raramente ou nenhum tempo (< 1 dia), 1= algum ou parte do tempo (1-2 dias), 2= uma parte moderada do tempo (3-4 dias), ou 3= todo tempo. Idosos que responderam “2” ou “3” em pelo menos uma das perguntas foram categorizados como sim para fadiga relatada.

3. **Baixa atividade física:** Foi avaliada pela versão curta do *International Physical Activity Questionnaire (IPAQ)* (anexo 2), o qual descreve atividade como caminhada, cortar a grama, varrer, jardinagem, corrida, ciclismo, dança, aeróbica, boliche, golfe, squash e natação. Com este instrumento obtêm-se por meio do relato destas atividades o dispêndio calórico semanal em calorias (kcal) (Tabela 3). Para a criação da variável baixa atividade física, estratificou-se por sexo e identificou-se o menor quartil como ponto de corte.

Tabela 3. Valores referenciais do nível de atividade física em dispêndio calórico (kcal) por sexo. Cardiovascular Health Study (CHS), 2001.

Dispêndio calórico semanal (Kcal)	
Homens	383,0
Mulheres	270,0

Fonte: FRIED *et al.* (2001)

4. **Redução da velocidade de caminhada:** Foi realizado o teste da caminhada de 4,5 metros. A velocidade da caminhada foi estratificada por sexo e altura. Para cada estrato identificou-se os valores mais altos da velocidade de caminhada (Tabela 4).

Tabela 4. Valores referenciais da velocidade de caminhada de acordo com altura e sexo. Cardiovascular Health Study (CHS), 2001.

Homens	
Altura (m)	Velocidade de caminhada (s)
Altura ≤ 1,73	≥ 7,0
Altura > 1,73	≥ 6,0
Mulheres	
Altura (m)	Velocidade de caminhada (s)
Altura ≤ 1,59	≥ 7,0
Altura > 1,59	≥ 6,0

Fonte: FRIED *et al.* (2001)

5. **Redução da força de prensão manual:** A força de prensão manual foi medida por dinamômetro e estratificada por sexo e índice de massa corporal (IMC) (Tabela 5).

Tabela 5. Valores referenciais da força de preensão manual de acordo com o índice de massa corporal (IMC) e sexo *Cardiovascular Health Study (CHS)*, 2001.

Homens	
Quadril de IMC (Kg/m²)	Força de preensão manual (kg)
≤ 24,0	≤ 29,0
24,1 – 26,0	≤ 30,0
26,1 – 28,0	≤ 30,0
> 28,0	≤ 32,0
Mulheres	
Quadril de IMC (Kg/m²)	Força de preensão manual (kg)
≤ 23,0	≤ 17,0
23,1 – 26,0	≤ 17,3
26,1 – 29,0	≤ 18,0
> 29,0	≤ 21,0

Fonte: FRIED *et al.* (2001)

Os idosos que apresentaram três ou mais componentes do fenótipo foram considerados “frágeis”, aqueles com um ou dois componentes “pré-frágeis” e os que não apresentaram nenhum dos componentes citados foram considerados como “robustos” ou “não-frágeis” (seguindo os valores de referência estabelecidos por Fried *et al.*, 2001).

3.3 Avaliação da cognição

3.3.1 *Addenbrooke’s Cognitive Examination- revised (ACE-R)*

Para a avaliação cognitiva o presente estudo utilizou o ACE-R (anexo 3). A primeira versão do instrumento *Addenbrooke’s Cognitive Examination (ACE)* foi desenvolvida por pesquisadores da Unidade de Neurologia Cognitiva da Universidade de Cambridge, no Reino Unido, em 2000 (Mathuranath, 2000). Em 2006, Mioshi *et al.* publicaram uma nova versão do ACE, o *Addenbrooke’s Cognitive Examination-Revised* ou ACE-R, no entanto em 2007 Carvalho & Caramelli traduziram e adaptaram o instrumento para uso na população brasileira (Carvalho & Caramelli, 2007).

O ACE-R consiste em uma bateria de avaliação cognitiva breve. Trata-se de um instrumento com elevada sensibilidade e especificidade para detectar demência em estágio leve. Segundo estudos prévios, para a nota 88/100, a sensibilidade encontrada foi de 93%, e a especificidade, 71%, além disso, a eficácia demonstrada pelo instrumento foi quase três vezes maior do que a atingida pelo MEEM, para a mesma amostra (Carvalho & Caramelli, 2007). Este instrumento avalia seis domínios cognitivos em conjunto e oferece notas parciais para cada um deles, tais como: atenção, orientação, memória, fluência verbal, linguagem e habilidades visuoespaciais, sendo a pontuação máxima distribuída entre os itens. A pontuação máxima é de 100 pontos, sendo distribuídos da seguinte forma: orientação e atenção (18), memória (26), fluência

verbal (14), linguagem (26) e habilidade visual-espacial (16). Os pontos referentes aos seis domínios podem ser calculados separadamente, e a soma de todos equivale ao escore total. Entre este total, estão inseridos os 30 pontos relativos ao MEEM, que também podem ser calculados separadamente.

A primeira versão da bateria mostrou-se útil na diferenciação entre a DA e a demência frontotemporal (DFT). Em outros países a versão mais atual, segundo Carvalho & Caramelli (2007), provou ser um instrumento de boa acurácia com propriedades diagnósticas satisfatórias para a avaliação cognitiva, capaz de discriminar pacientes com DA leve de indivíduos controles, além de avaliar com eficiência vários domínios cognitivos comumente afetados em estágios iniciais da doença.

3.3.2 Clinical Dementia Rating (CDR)

O CDR foi desenvolvido por Hughes et al., (1982) na Universidade de Washington e adaptado por Morris et al. (1993). O instrumento foi devidamente validado no Brasil demonstrando alta sensibilidade e a especificidade para diagnosticar graus de demência, 91,2% e 100%, respectivamente (Montaño & Ramos, 2005). Trata-se de uma escala global que permite classificar a prevalência dos diversos graus de demência, além de identificar casos questionáveis da condição. O instrumento conta com uma entrevista semi-estruturada, que pode ser respondida pelo idoso ou informante, que avalia o nível de funcionamento cognitivo e de atividades diárias atuais em comparação às habilidades prévias do participante. Esse instrumento está dividido em seis categorias sendo elas: memória, orientação, julgamento e solução de problemas, assuntos da comunidade, lar e passatempos e cuidados pessoais (anexo 5). As categorias são avaliadas de forma independente e cada categoria pode ser graduada em cinco níveis de comprometimento: 0 (nenhuma alteração); 0,5 (questionável); 1 (demência leve); 2 (demência moderada); e 3 (demência grave). A classificação final do CDR é obtida pela análise dessas destas categorias, seguindo um conjunto de regras elaboradas e validadas por Morris (Morris, 1993). No presente estudo só foram incluídos no grupo TNCL os indivíduos que apresentaram pontuação 0,5 no CDR, seguindo os critérios já estabelecidos para a condição de fragilidade cognitiva.

3.3.3 Diagnóstico Psiquiátrico

Este estudo contou com o auxílio de um médico psiquiatra Prof. Dr. Marcos Hortes Chagas, que auxiliou na identificação dos indivíduos saudáveis e com TNCL. O parecer do especialista clínico somou-se às avaliações realizadas, com a utilização de instrumentos de rastreio já validados no Brasil, selecionando os indivíduos aptos para participarem do presente estudo. Foi

observado esta necessidade, pois condições que envolvem demências e TNCL devem incluir uma avaliação mais específica e detalhada a respeito de cada caso, com diagnóstico diferencial, a fim de evitar possíveis vieses, como a existência de quadros demenciais complexos, situações psiquiátricas e outras condições clínicas que possam confundir a classificação do TNCL. Além disso, a participação deste profissional contribuiu enormemente para seleção e exclusão de voluntários acometidos por situações neurológicas, transtornos neuropsiquiátricos diversos e efeitos colaterais de medicações, contribuindo assim de maneira definitiva com o estudo. Vale ressaltar que os casos de TNCL não foram subdivididos em amnésico, não-amnésico, único ou múltiplos domínios.

3.4 Desenho geral do estudo

Os voluntários foram avaliados clinicamente, passaram por uma entrevista domiciliar com duração de aproximadamente 40 minutos para a aplicação dos instrumentos de rastreio e visita domiciliar para coleta de sangue. No momento da visita também foram coletados os dados sociodemográficos dos voluntários.

Primeiramente todos os indivíduos foram avaliados pelo médico psiquiatra parceiro deste estudo. Neste momento os pacientes foram diagnosticados de acordo com suas condições cognitivas. A partir desta primeira avaliação foram considerados para avaliação domiciliar somente participantes saudáveis e aqueles diagnosticados com TNCL através do parecer médico.

Todas as entrevistas domiciliares foram realizadas pela pesquisadora responsável deste estudo. Na primeira visita domiciliar os participantes foram submetidos a avaliação objetiva da fragilidade física segundo os critérios propostos por Fried et al., (2001). Esta etapa contou com a análise dos cinco componentes mensuráveis já descritos no item 3.2 da metodologia e no anexo 1. Esta avaliação permitiu a distribuição dos participantes em pré-frágeis (um ou dois pontos), frágeis (três ou mais pontos) e não-frágeis (zero pontos).

De acordo com a definição de fragilidade cognitiva, são considerados nesta condição indivíduos em condição de pré-fragilidade e fragilidade física com TNCL. Em decorrência disto, e também por conta do baixo número de indivíduos pré-frágeis com grande homogeneidade nos valores de ADAM10 (quando comparado ao grupo fragilidade), os participantes pré-frágeis foram considerados parte do grupo Fragilidade. Os idosos também foram avaliados com o CDR, sendo considerados para o estudo apenas aqueles com pontuação 0 (sem alterações - grupo saudável/controlado) e 0,5 (demência questionável - grupo TNCL).

Após esta etapa, os indivíduos foram avaliados de acordo com o ACE-R. Segundo o mesmo, todos os voluntários que apresentaram pontuação maior que 1,5 à 2,0 desvios padrões abaixo da nota de corte média esperada para a escolaridade (baseado nos estudos de César et al.,

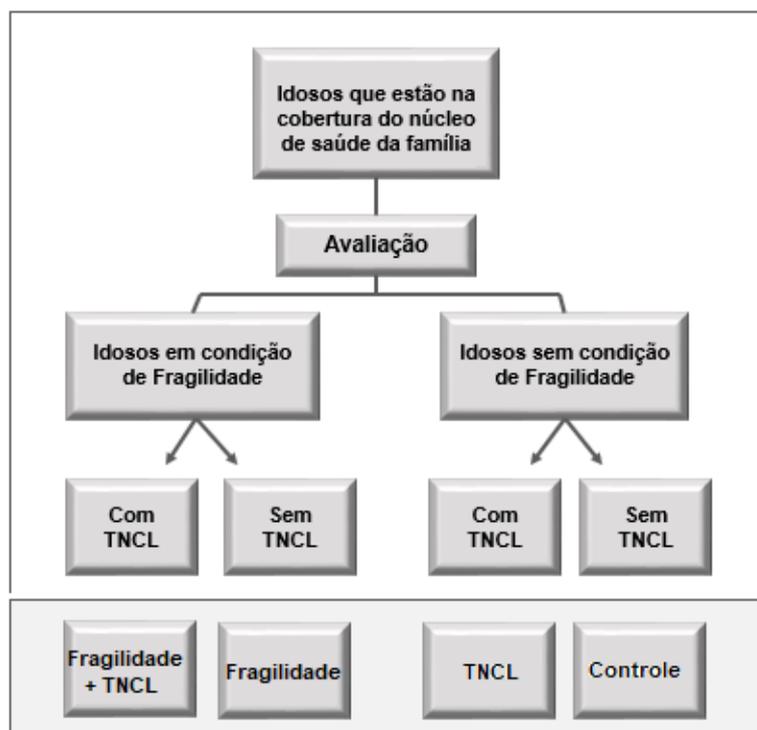
2017; Schinka et al., 2010) foram desconsiderados do estudo por indícios de demência. Enfim, somou-se a esta classificação somente os idosos que pontuaram 0,5 no CDR e que também foram devidamente diagnosticados com TNCL. Assim, ao final, a avaliação cognitiva permitiu a distribuição dos participantes em TNCL [diagnóstico clínico de TNCL + CDR 0,5 (pontos) + livre de demência (de acordo com o ACER-R e diagnóstico clínico)] e saudáveis [sem indícios de declínio cognitivo pelo parecer clínico, CDR 0 (pontos) + livre de demência (de acordo com o ACER-R e diagnóstico clínico)] César et al., 2017; Schinka et al., 2010.

O diagnóstico do médico psiquiatra foi baseado também nos critérios do Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais 5ª edição (DSM-5). Esta avaliação foi utilizada para auxiliar a classificação de TNCL e excluir os idosos com transtornos mentais ou outras possíveis patologias psiquiátricas e neurológicas que pudessem confundir as avaliações cognitivas. Posteriormente, foi realizada a coleta domiciliar do material biológico (sangue) de todos os idosos incluídos no estudo, e a mensuração dos níveis de ADAM10 foi realizada através da técnica de *Western Blotting*.

3.4.1 Divisão dos grupos experimentais

Após a avaliação segundo o fenótipo de fragilidade de Fried, os idosos foram classificados em dois grupos experimentais, frágeis e não-frágeis. A partir disto, como mencionado acima, o parecer clínico (psiquiátrico) a respeito de cada idoso, foi cruzado com as informações obtidas pelos mesmos no ACE-R e CDR. Por meio destas análises, os idosos foram classificados em 4 sub-grupos experimentais, totalizando 61 participantes (Controle, n=23; Fragilidade, n=08; TNCL, n=11; Fragilidade + TNCL, n=19), conforme ilustrado na figura 10. Vale ressaltar que este estudo trabalhou com uma amostra de conveniência e todos os participantes tiveram seus níveis plaquetários de ADAM10 avaliados. Os níveis plasmáticos da protease foram avaliados em 32 participantes deste total, selecionados aleatoriamente (Controle n=6; Fragilidade, n= 10; TNCL, n= 08; Fragilidade + TNCL, n= 08).

Figura 10. Classificação dos idosos quanto ao fenótipo de fragilidade e TNCL. Um total de 61 participantes foram divididos em 4 sub-grupos experimentais (Controle, n=23; Fragilidade, n=08; TNCL, n=11; Fragilidade + TNCL, n=19).



3.5 Coleta de sangue e *Western Blotting*

A coleta de material biológico (sangue) foi realizada em tubos contendo citrato de sódio (3,8%) e glicose (136 mM). O sangue foi centrifugado a 1.200 rpm por 10 minutos, obtendo-se assim o plasma rico em plaquetas (PRP). Em seguida as plaquetas foram obtidas por nova centrifugação a 2.400 rpm por 10 minutos. As plaquetas foram lisadas em tampão RIA (NaCl 200mM, EDTA 10 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, NP40 0,5%, SDS 0,1% e inibidores de protease (Sigma Fast). Para análise plasmática, a fração restante, correspondendo ao plasma pobre em plaquetas (PPP) foi diluída 10x antes do uso. Todas as amostras foram mantidas à -80°C até o momento dos experimentos.

Para a quantificação de proteínas totais do material a ser analisado foi utilizado o método de ensaio proteico Pierce BCA, baseado no ácido bicinônico (BCA) para a detecção colorimétrica e quantificação total de proteínas. O conteúdo proteico das amostras (30 µg) foi aplicado em gel de poliácridamida de 4-20% (Laemmli, 1970) e transferido para membranas de nitrocelulose. A membrana foi bloqueada com solução de bloqueio (Casein Blocker – Bio-rad) por 3 horas e em seguida, após lavagens com TBST (Solução Salina Tris Tamponada), incubada com anticorpo primário anti-ADAM10 (*Prosci* 2051 rabbit, 1:1000 ou *Abcam* 39153 1:1000) *overnight* (12h) em solução de bloqueio, seguido por lavagens em TBST e então incubadas com anticorpo

secundário (*Abcam 97051 anti-rabbit*, 1:2000) conjugado com HRP, por uma hora. A revelação das bandas proteicas foi realizada em leitor de quimioluminescência – fotodocumentador (*Chemidoc – BioRad*). A proteína β -actina (45 kDa) foi utilizada como controle endógeno em plaquetas. Já na análise plasmática, o controle endógeno utilizado foi a albumina, pois a β -actina não está presente no plasma e nenhum outro controle endógeno foi padronizado para este tipo de amostra. A coloração com *Ponceau* revelou a presença de bandas com aproximadamente 66 kDa que correspondem à proteína albumina, abundante neste material. As bandas foram reveladas no aparelho *ChemiDoc™ MP Imaging System (BioRad)*. A quantificação das mesmas foi feita usando o *software ChemiDoc™ MP Imaging System (BioRad)*. Após a revelação, as bandas marcadas foram quantificadas com auxílio do *software ImageLab (BioRad)*. Foram quantificadas e analisadas as formas da ADAM10 com massas moleculares de 60 kDa e 50 kDa, que correspondem às formas plaquetária e plasmática da protease, respectivamente, através de análise cega das membranas.

Além deste controle endógeno, foi preparado um *pool* de amostras de plaquetas de jovens saudáveis, seguindo o mesmo protocolo do preparo e concentração proteica utilizada para as amostras dos participantes idosos. Em cada gel foi aplicada esta amostra padrão, chamada de controle jovem (Cj), para corrigir variações analíticas entre os experimentos. A média das densitometrias das amostras foi dividida pela média da densitometria do Cj em cada gel. O critério básico de padrão interno é que o seu nível permaneça inalterado durante o experimento, independentemente de como é processado, ou dos tecidos e tipos celulares usados. Foi escolhido também usar o Cj além do controle endógeno usualmente utilizado, pois um estudo recente mostrou que padrões com β -actina podem apresentar algumas pequenas e possíveis inconsistências de resultados (Eaton et al., 2013). Em nosso laboratório, o uso de um Cj a partir de amostras de jovens saudáveis tem-se mostrado consistente e ainda mais confiável para a correta determinação dos níveis de ADAM10, quando utilizado juntamente com a β -actina ou albumina.

3.6 Forma de análise dos resultados

Os dados coletados foram tabulados utilizando o *software* Microsoft Excel. Neste *software* foi feita a razão dos valores brutos pelos controles endógenos β -actina ou albumina e também pelo controle jovem. A normalidade dos dados foi investigada com auxílio do teste de Kolmogorov-Smirnov e teste de Shapiro Wilk. A análise estatística dos dados foi realizada por meio de comparação utilizando o *software GraphPad Prism 5*, através dos testes estatísticos de ANOVA *One-way* e *Mann-Whitney* para dados paramétricos, *Kruskal-Wallis* para dados não-paramétricos, e Chi-Square para dados categóricos. O nível de significância adotado para os testes estatísticos foi de $p < 0,005$. Os dados foram apresentados sob a forma de gráficos e tabelas utilizando o mesmo

software. Os indivíduos que apresentaram valores atípicos, com grande afastamento dos demais (*outliers*), foram excluídos, após identificação pelo *software*. O mesmo identifica valores que se distanciam mais de 1,5 vezes da faixa interquartil da mediana.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Dados de caracterização socioeconômica

A tabela 6 apresenta os dados da caracterização socioeconômica da amostra do estudo dividida nos quatro grupos de interesse (Controle, n=23; Fragilidade, n=08; TNCL, n=11; Fragilidade + TNCL, n=19).

Tabela 6. Dados de caracterização socioeconômica geral dos participantes em cada grupo de estudo.

	Controle (N=23)	Fragilidade (N=8)	TNCL (N=11)	Fragilidade + TNCL (N=19)	Total (N=61)	P
Sexo (n; %)						
Feminino	13 (56,5%)	7 (87,5%)	8 (72,7%)	13 (68,4%)	41 (67,2%)	0,41
Masculino	10 (43,5%)	1 (12,5%)	3 (27,3%)	6 (31,6%)	20 (32,8%)	
Faixa etária (n; %)						
60-69 anos	14 (60,9%)	3 (37,5%)	3 (27,3%)	7 (36,8%)	27 (44,3%)	0,16
70-79 anos	7 (30,4%)	2 (25,0%)	7 (63,6%)	7 (36,8%)	23 (37,7%)	
80 anos ou mais	2 (8,7%)	3 (37,5%)	1 (9,1%)	5 (26,4%)	9 (14,8%)	
Grau de Escolaridade (n; %)						
Nenhum	8 (34,8%)	2 (25,0%)	2 (18,2%)	7 (36,8%)	19 (31,1%)	0,93
Fundamental Incompleto	11 (47,8%)	4 (50,0%)	7 (63,6%)	8 (42,1%)	30 (49,2%)	
Fundamental Completo – Pós-Graduação	4 (17,3%)	2 (25,0%)	2 (18,1%)	4 (21,0%)	12 (19,7%)	
Aposentado (n; %)						
Sim	16 (69,6%)	5 (62,5%)	9 (81,8%)	12 (63,2%)	42 (68,9%)	0,72
Não	7 (30,4%)	3 (37,5%)	2 (18,2%)	7 (36,8%)	19 (31,1%)	
Estado Civil (n; %)						
Solteiro	2 (8,7%)	0 (0,0%)	2 (18,2%)	2 (10,5%)	6 (9,8%)	0,63
Casado / União estável	15 (65,2%)	6 (75,0%)	8 (72,7%)	10 (52,6%)	39 (63,9%)	
Divorciado / Viúvo - Outros	6 (26,0%)	2 (25,0%)	1 (9,1%)	7 (36,8%)	16 (26,3%)	
Renda do Idoso (n; %)						
De ½ a 1 salário mínimo	3 (13,0%)	1 (12,5%)	1 (9,1%)	3 (15,8%)	8 (13,1%)	0,29
De 1 a 2 salários mínimos	6 (26,1%)	5 (62,5%)	8 (72,7%)	10 (52,6%)	29 (47,5%)	
De 2 a 3 salários mínimos ou mais	9 (39,1%)	0 (0,0%)	1 (9,1%)	2 (10,5%)	12 (19,6%)	
Não aceitou declarar	5 (21,7%)	2 (25%)	1 (9,1%)	4 (21,0%)	12 (19,6%)	
Etnia (n; %)						
Branco	19 (82,6%)	7 (87,5%)	5 (45,5%)	10 (52,6%)	41 (67,2%)	<0,05**
Preto e Pardos	4 (17,4%)	1 (12,5%)	6 (54,5%)	9 (47,3,8%)	20 (32,8%)	

As variáveis categóricas foram analisadas com o teste estatístico qui-quadrado. TNCL: Transtorno Neurocognitivo Leve; #p<0,05, “Controle” vs. “TNCL”; *p<0,05, “Controle” vs. “Fragilidade + TNCL”.

No total, este estudo contou com a participação de 61 idosos voluntários, sendo 41 (67,2%) do sexo feminino e 20 (32,8%) do sexo masculino (Tabela 6). O percentual predominante de mulheres foi identificado nos quatro subgrupos analisados. Estes números são semelhantes aos encontrados por Gross *et al.* (2018), em um estudo transversal de base populacional feito com 555 idosos, em que explorou os níveis de fragilidade em pessoas com 60 anos ou mais e sua associação com as características sociodemográficas. Esta pesquisa foi desenvolvida em uma realidade brasileira em um município do noroeste do estado do Rio Grande do Sul e mostrou que

aproximadamente 60,9% da amostra total pertencia ao sexo feminino, caracterizando uma tendência que a literatura aponta por "feminização da velhice". Ainda, pesquisadores da *University of Western Ontario* – Canadá, em um estudo intitulado "*Disentangling Cognitive-Frailty: Results From the Gait and Brain Study*" feito com 252 idosos com 65 anos ou mais, estimaram que 10,7% dos idosos apresentaram características de fragilidade cognitiva e 63% de sua amostra eram mulheres, evidenciando mais uma vez este predomínio (Montero-Odasso et al., 2016).

A elevada participação feminina nas pesquisas com idosos é uma realidade mundial e, através da literatura existente, pode ser explicada por diversos fatores. Entre eles podemos destacar a menor exposição aos riscos ocupacionais, em vista de outrora pouco atuarem no mercado de trabalho, sendo geralmente responsáveis pelo cuidado dos filhos e do lar. Além disto, estudos mostram que o sexo feminino destina maior parte de seu tempo aos cuidados à saúde, tende a ser menos exposto à mortalidade por causas externas e apresenta menor prevalência de tabagismo e etilismo, quando comparado ao sexo masculino (Souza et al., Del Duca, 2012; 2006).

Com relação a faixa etária deste estudo, verifica-se que a maior parte dos idosos avaliados encontra-se entre as faixas etárias de 60-69 com 44,3% (n=27) e 70-79 anos com 37,7% (n=23) do total da amostra (Tabela 6). Estes dados vão de encontro com diversos estudos correlatos, como o de Gross *et al.* (2018) que também observaram a mesma faixa etária predominante em seu estudo (60 e 70 anos) representando 64,8% (n=160) do total de participantes avaliados. Esta prevalência se explica devido a parcela populacional de idosos mais jovens serem mais ativos e participativos em decorrência de menor incidência de limitações e acúmulo de comorbidades (Beeri et al., 2006).

Segundo o grau de escolaridade, observa-se em todos os grupos o predomínio de indivíduos com ensino fundamental incompleto (de 1 a 4 anos de estudo), representando em média 49,2% (n=30) da população total estudada (n=61) (Tabela 6). Dados semelhantes foram registrados no estudo de Jesus *et al.* (2017), com idosos brasileiros, em que também apresentam o predomínio de idosos neste nível de escolaridade, visto que 41,7% (n=133) dos entrevistados possuía ensino fundamental incompleto.

O estudo de Carneiro et al. (2017) confirma esta tendência mostrando que 85,8% (n=309) de sua amostra também possuía até quatro anos de estudo. Tal tendência pode ocorrer por se tratar de uma realidade brasileira de grande parte da população idosa, que se explica pelo fato de a educação formal ter sido pouco valorizada na época em que esses idosos nasceram e cresceram, além disso, condições socioeconômicas precárias e dificuldade de acesso à educação em zonas rurais agravavam ainda mais o quadro (Santos-Orlandi et al., 2017).

No estudo de Gross et al. (2018) foi demonstrado que idosos com baixa escolaridade tendem a apresentar quadros mais graves, como problemas de saúde mental, fragilidade e condições crônicas de problemas relacionados a saúde. Alguns estudos complementam esses dados ao mostrar que a falta de alfabetização em idosos pode também estar relacionada a situações de incapacidade

funcional, em decorrência de piores hábitos de vida, maior exclusão social, menor nível de informação e condições socioeconômicas desfavoráveis para o acesso adequado à serviços de saúde (Alvarenga et al., 2011; Pereira et al., 2017).

A categoria de renda mais incidente nos participantes desta pesquisa foi a de 1 a 2 salários mínimos, correspondendo a 47,5% (n=29) do total de idosos (Tabela 6). Esta tendência pode ser explicada pela invariabilidade da região de estudo (município de São Carlos) e também pelo fato de predominantemente se tratar de idosos aposentados (n=42, 68,9%), ou seja, com renda pouco variável. Estas informações são condizentes com o estudo de Fluetti et al. (2018) que analisou a relação entre o nível de fragilidade, características sociodemográficas e de saúde de uma população composta por 56 indivíduos com idade igual ou superior a 60 anos. Neste estudo 82,1% (n=46) dos idosos investigados informaram ser aposentados e com renda mensal média em torno de 1 a 2 salários mínimos. Com relação à renda, observa-se que esta condição apresenta grande associação com as variáveis de saúde, visto que pessoas com nível socioeconômico mais baixo tendem a apresentar menor acesso aos serviços de saúde e, portanto, apresentam maiores índices de morbidade e mortalidade (Borim & Neri, 2017).

A etnia foi a única variável que apresentou diferenças significativas entre os grupos. Apesar da predominância ser a etnia branca 67,2% (n=41), o grupo Controle apresentou um maior número de pessoas brancas do que os grupos TNCL e Fragilidade + TNCL. Esta prevalência branca foi verificada também por Cruz et al. (2017), que realizaram este estudo em uma amostra populacional de idosos brasileiros (n=339), a fim de verificar se fatores demográficos, socioeconômicos e de saúde estariam associados à fragilidade em idosos. Nesta pesquisa os autores observaram que a opção étnica mais declarada foi a cor branca, representando 47,8% (n=162) do total de participantes. Reiterando este estudo, Carneiro et al. (2017) observaram a mesma prevalência, sendo que 62,5% (n=225) do total de sua amostra também relatou cor branca. Contudo, vale ressaltar que os dados étnicos são bastante diversos na literatura, pois variam de acordo com aspectos históricos e sociais de cada localidade.

Como mencionado anteriormente, durante a primeira visita domiciliar os voluntários foram submetidos a avaliação mediante aos seguintes instrumentos: IPAQ, avaliação objetiva da fragilidade física segundo os critérios propostos por Fried, CDR e ACE-R.

Com relação ao desempenho dos participantes no IPAQ, assim como esperado, verifica-se que a maior parte dos idosos não frágeis avaliados encontra-se na categoria “ativo” ou “muito ativo” do instrumento, isso representa 72,7% (n=8) do grupo TNCL e 60,8% (n=14) do grupo controle. Já nas condições em que a fragilidade física está presente, observa-se o predomínio dos indivíduos na categoria “insuficiente ativo” ou “sedentário”, com 62,5% (n=5) do grupo fragilidade e 57,9% (n=11) do grupo Fragilidade + TNCL. Apesar das discrepâncias, não houve diferença na comparação entre os grupos (Tabela 7).

Tabela 7. Desempenho dos participantes no IPAQ, critérios de fragilidade de Fried, CDR e ACE-R.

	Controle (N=23)	Fragilidade (N=8)	TNCL (N=11)	Fragilidade + TNCL (N=19)	Total (N=61)	p
IPAQ (n; %)						
Muito ativo / Ativo	14 (60,8%)	3 (37,5%)	8 (72,7%)	8 (42,1%)	33 (54,0%)	0,18
Insuficiente ativo / Sedentário	9 (39,1)	5 (62,5%)	3 (27,3%)	11 (57,9%)	28 (45,0%)	
Critério de fragilidade Fried (n; %)						
Redução de força de preensão	0 (0,0%)	3 (37,5%)	0 (0,0%)	12 (63,2%)	15 (24,6%)	0,22
Perda de peso não intencional	0 (0,0%)	5 (62,5%)	0 (0,0%)	9 (47,4%)	14 (23,0%)	0,47
Redução de velocidade de marcha	0 (0,0%)	5 (62,5%)	0 (0,0%)	11 (57,9%)	16 (26,2%)	0,82
Fadiga	0 (0,0%)	7 (87,5%)	0 (0,0%)	14 (73,7%)	21 (34,4%)	0,43
Redução de atividade física - IPAQ	0 (0,0%)	5 (62,5)	0 (0,0%)	12 (63,2%)	17 (27,9%)	0,90
CDR (n; %)						
Pontuação 0	23 (100%)	8 (100%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	31 (50,8%)	---
Pontuação 0,5	0 (0,0%)	0 (0,0%)	11 (100%)	19 (100%)	30 (49,2%)	
MEEM (média ± desvio-padrão)						
Pontuação total	24,6 ± 3,4	25,1 ± 3,6	22,3 ± 2,2	21,4 ± 4,6	23,3 ± 3,9	<0,05* ^γ
ACE-R (média ± desvio-padrão)						
Atenção e orientação	14,9 ± 2,2	15,0 ± 1,6	13,5 ± 1,2	13,0 ± 3,3	14,1 ± 2,5	0,06
Memória	14,6 ± 3,8	17,0 ± 5,8	11,3 ± 3,1	10,3 ± 4,9	13,0 ± 4,9	<0,05#* ^{¶γ}
Fluência	5,6 ± 2,2	6,2 ± 1,9	5,9 ± 2,5	4,5 ± 2,1	5,4 ± 2,3	0,16
Linguagem	18,3 ± 4,9	18,8 ± 4,9	16,1 ± 5,5	16,7 ± 5,5	17,4 ± 5,2	0,53
Visuoespacial	10,3 ± 3,0	11,0 ± 3,4	8,8 ± 3,4	8,8 ± 3,4	9,7 ± 3,3	0,26
Total	63,9 ± 12,6	68,13 ± 15,6	55,8 ± 11,1	53,5 ± 16,1	59,7 ± 14,8	<0,05* ^γ

As variáveis categóricas foram analisadas com o teste estatístico qui-quadrado e as numéricas com ANOVA *One Way*. IPAQ: Questionário Internacional de Atividade Física; TNCL: Transtorno Neurocognitivo Leve; CDR: *Clinical Dementia Rating*; ACE-R: *Addenbrooke's Cognitive Examination- revised*. ^a *Chi-Squared* da comparação entre o grupo “Fragilidade” vs. “Fragilidade + TNCL”. #p<0,05, “Controle” vs. “TNCL”. *p<0,05, “Controle” vs. “Fragilidade + TNCL”. [¶] p<0,05, “Fragilidade” vs. “TNCL”. ^γ p<0,05, “Fragilidade” vs. “Fragilidade + TNCL”.

Este resultado condiz com o esperado, já que representa um dos fenótipos da síndrome (Fried et al., 2001), uma vez que a baixa tolerância aos estressores físicos e psicológicos, comum à síndrome, pode repercutir na prática de atividade física do idoso (Lernard et al., 2013).

Segundo os critérios de fragilidade física propostos por Fried, o indicador mais prevalente nos grupos classificados como frágeis, foi a “fadiga”, indicada em 73,7% (n=14) dos indivíduos com Fragilidade + TNCL e 87,5% (n=7) dos participantes frágeis. Na sequência o critério mais apontado foi “redução de atividade física” (classificação indicada pelo IPAQ) presente em 63,2% (n=12) dos idosos com Fragilidade + TNCL e em 62,5% (n=5) dos indivíduos frágeis (Tabela 7).

O CDR foi aplicado nos participantes, pois compõe um dos critérios indicados para a classificação de fragilidade cognitiva (Jessen et al., 2014), desta forma, neste estudo só foram incluídos no grupo TNCL aqueles que apresentaram pontuação 0,5 neste instrumento. A tabela 7 aponta que 100% os indivíduos com TNCL (grupos: Fragilidade + TNCL, e TNCL) pontuaram 0,5 neste instrumento.

Ainda na tabela 7 estão apresentados os valores de média e desvio-padrão obtidas pelos quatro grupos estudados no MEEM e em cada domínio avaliado pelo ACE-R, além da pontuação total desta bateria em cada quesito avaliado. Assim como o esperado, foram encontradas diferenças

significativas entre os grupos na pontuação do MEEM, de forma que o grupo Fragilidade + TNCL apresentou pior desempenho cognitivo quando comparado aos grupos Controle e Fragilidade. O mesmo foi observado no domínio “Memória” e na “pontuação total” da escala ACE-R. Ambos os grupos (TNCL e Fragilidade + TNCL) apresentaram pior desempenho nestes domínios, com média de 11,3 e 10,3 no domínio memória e de 55,8 e 53,5 na pontuação final, respectivamente. Vale ressaltar que os escores do ACE-R não foram considerados para o diagnóstico de TNCL dos voluntários, uma vez que este foi determinado mediante a avaliação médica especializada, assim como já exposto anteriormente. A pontuação total obtida por cada participante foi utilizada como parâmetro de exclusão de quadros supostamente demenciais de acordo com as notas de corte estabelecidas nos estudos de César et al., 2017; Schinka et al., 2010).

De uma forma geral, coerentemente, os grupos com TNCL (grupos: Fragilidade + TNCL, e TNCL) apresentaram pontuação total, aproximadamente, 15% inferior a dos grupos sem TNCL (grupos: Fragilidade e Controle), indicando provável sensibilidade do instrumento também na identificação de condições prévias ao surgimento demencial. Estes resultados indicam a necessidade de estudos que explorem, em uma amostra mais ampla, a precisão deste instrumento em condições pré-demenciais, tal qual o TNCL, pois até o momento, o que se sabe é que o ACE-R demonstra elevada sensibilidade e especificidade para detectar demência em estágio leve e que também pode ser útil na diferenciação de DA e demência frontotemporal (DFT) (Carvalho & Caramelli, 2007).

4.2 Níveis plaquetários e plasmáticos de ADAM10

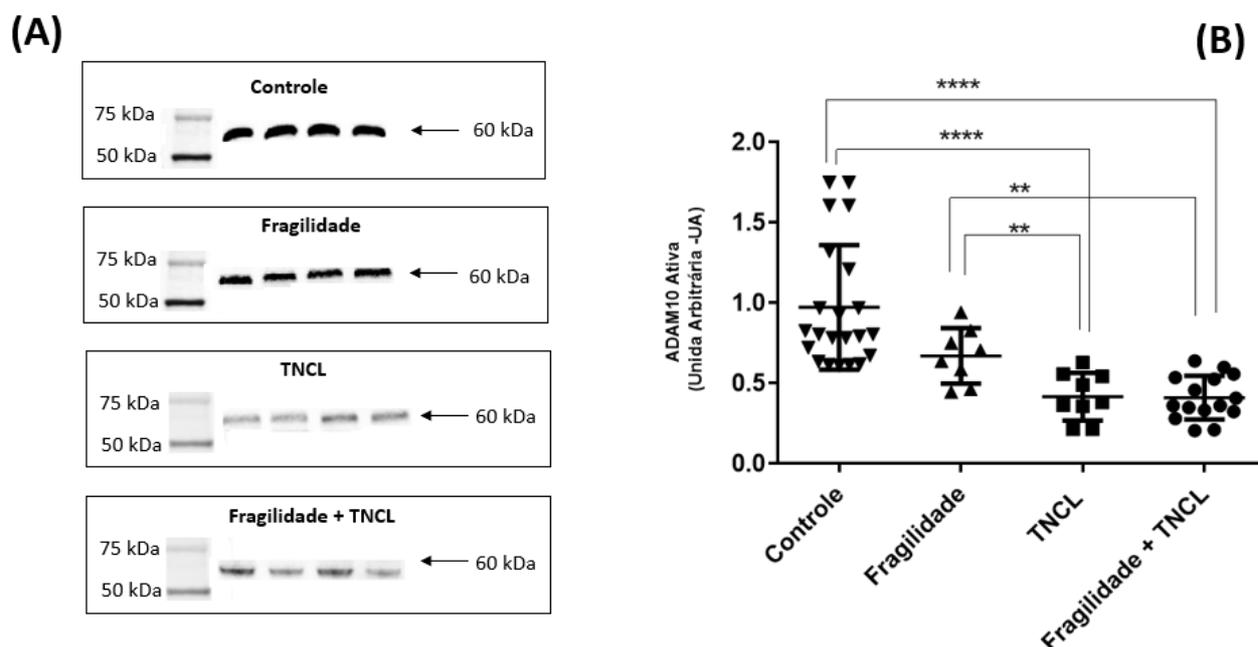
A análise dos níveis plaquetários de ADAM10 foi realizada por comparação entre os grupos, com a totalidade das amostras (Controle, n=23; Fragilidade, n=08; TNCL, n=11; Fragilidade + TNCL, n=19). Da mesma forma, a análise dos níveis plasmáticos de ADAM10 também foi realizada por comparação entre os grupos e contou com um total de 32 amostras analisadas aleatoriamente (Controle n=6; Fragilidade, n= 10; TNCL, n= 08; Fragilidade + TNCL, n= 08).

As Figuras 11A e 12A são imagens representativas das membranas obtidas através do método *Western Blotting* em plaquetas e plasma, respectivamente. Identificou-se que a ADAM10 encontrada em plaquetas possui massa molecular de 60 kDa, enquanto a forma verificada no plasma apresenta 50 kDa. No material suplementar estão disponibilizadas todas as imagens das membranas de todos os experimentos de *Western Blotting* do estudo (anexos 7 e 8).

Os níveis de ADAM10 foram devidamente quantificados e apresentados através dos gráficos de dispersão a seguir (figura 11B e 13B). Os resultados são apresentados como Unidade Arbitrária (UA), sendo que quanto maior a quantidade da protease ADAM10, maior a intensidade

da banda. Vale ressaltar que em plaquetas a β -actina foi utilizada como controle endógeno, enquanto no plasma a albumina foi utilizada para a mesma finalidade.

Figura 11. Ensaios de Western Blotting e quantificação da proteína ADAM10 em plaquetas nos grupos. As bandas apresentadas correspondem à ADAM10 com massa molecular de 60 kDa. (A) Imagens representativas das membranas referentes aos experimentos de *Western Blotting*, contendo ADAM10 e controle endógeno (β -actina). (B) Gráfico de dispersão indicando os níveis plaquetários de ADAM10 (60 kDa) entre os grupos. O gráfico indica a razão da ADAM10/ β -actina/controlado jovem para os grupos de idosos avaliados (Controle, n=23; Fragilidade, n=08; TNCL, n=11; Fragilidade + TNCL, n=19). Teste estatístico U de *Mann-Whitney* e *Kruskal-Wallis* (* $p<0,05$). ***Controle x Fragilidade + TNCL $p<0,0001$; ***Controle x TNCL $p<0,0001$; **Fragilidade x Fragilidade + TNCL $p<0,001$; **Fragilidade x TNCL $p<0,001$; Fragilidade + TNCL x TNCL $p=0,346$; Controle x Fragilidade $p=0,0216$.



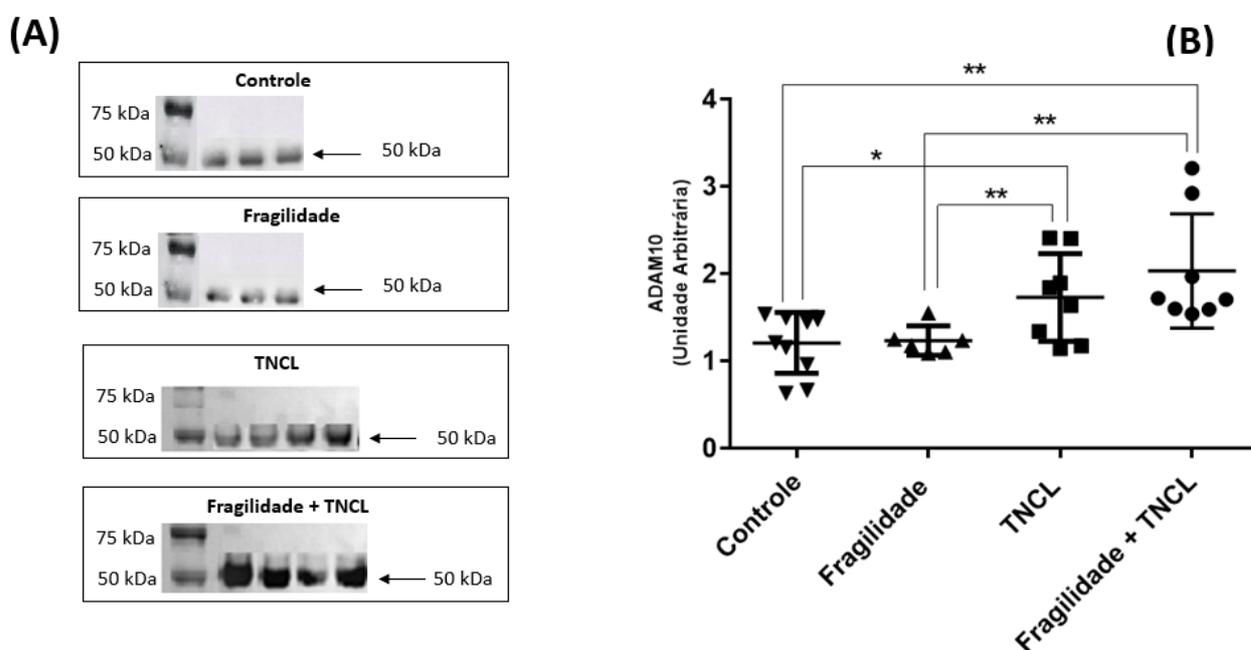
Segundo os resultados exibidos na figura 11B, verificam-se diferenças estatisticamente significativas nos níveis plaquetários de ADAM10 (60 kDa) entre os grupos Controle x Fragilidade + TNCL ($p<0,0001$), Controle x TNCL ($p<0,0001$), Fragilidade x Fragilidade + TNCL ($p<0,001$) e Fragilidade x TNCL ($p<0,001$).

Os resultados mostram que os níveis da ADAM10 em plaquetas estão significativamente reduzidos na condição Fragilidade + TNCL e TNCL em comparação ao grupo Fragilidade e controle ($p<0,0001$). No entanto, não se observa diferença entre os grupos Fragilidade + TNCL e TNCL. Ao analisar estes dados pode-se supor que tal diminuição nos níveis de ADAM10 interferiram isoladamente na condição de TNCL. Esta concepção confirma-se ao observar também redução estatisticamente significativa nestes níveis, ao comparar as condições isoladas de Fragilidade ou de Fragilidade + TNCL ($p<0,001$).

Em contrapartida, ainda em plaquetas, os níveis de ADAM10 não se alteraram na presença de fragilidade física, fato que pode ser observado ao comparar a condição Fragilidade com Controle ($p=0,0216$) e a condição Fragilidade + TNCL com TNCL ($p=0,3465$). Desta forma, pode-se deduzir

que embora os níveis plaquetários de ADAM10 (60 kDa) estejam reduzidos na condição de Fragilidade + TNCL, quando comparado aos idosos saudáveis do grupo Controle, esta queda está relacionada a presença isolada do TNCL e não a presença concomitante da fragilidade física.

Figura 12. Ensaios de *Western Blotting* e quantificação da proteína ADAM10 em plasma nos grupos. As bandas apresentadas correspondem à ADAM10 com massa molecular de 50 kDa. (A) Imagens representativas das membranas referentes aos experimentos de *Western Blotting*, mostrando os níveis de ADAM10 (50 kDa) e do controle endógeno (albumina) entre os grupos. (B) Gráfico de dispersão indicando os níveis plasmáticos de ADAM10 solúvel entre os grupos. O gráfico indica a razão da ADAM10/albumina/controlado jovem para os grupos de idosos avaliados (Controle n=6; Fragilidade, n= 10; TNCL, n= 08; Fragilidade + TNCL, n= 08). Teste estatístico U de *Mann-Whitney* e *Kruskal-Wallis* (* $p \leq 0,05$). **Controle x Fragilidade + TNCL $p \leq 0,01$; *Controle x TNCL $p \leq 0,05$; **Fragilidade x Fragilidade + TNCL $p \leq 0,01$; **Fragilidade x TNCL $p \leq 0,01$; Fragilidade + TNCL x TNCL $p = 0,316$; Controle x Fragilidade $p = 0,577$.



Com relação à análise plasmática, de acordo com os resultados exibidos na figura 12B, é possível verificar diferenças estatisticamente significativas nos níveis de ADAM10 (50 kDa), entre os grupos: Controle x Fragilidade + TNCL ($p \leq 0,01$); Controle x TNCL ($p \leq 0,05$); Fragilidade x Fragilidade + TNCL ($p \leq 0,01$) e Fragilidade x TNCL ($p \leq 0,01$). Sendo assim, os resultados mostram que os níveis da ADAM10 plasmática (50 kDa), ao contrário do que se observou em plaquetas, estão aumentados nas condições Fragilidade + TNCL e TNCL em comparação com os grupos controle e Fragilidade. Analisando este resultado, pode-se inferir que o aumento nos níveis plasmáticos de ADAM10 (50 kDa), assim como em plaquetas, interfere isoladamente na presença da condição de TNCL. Tal resultado confirma-se ao observar aumento estatisticamente significativo nos níveis de ADAM10 ao comparar a condição Controle e TNCL ($p \leq 0,05$), assim como aconteceu entre as condições Fragilidade e Fragilidade + TNCL ($p \leq 0,01$).

Por outro lado, os níveis plasmáticos de ADAM10 (50 kDa), assim como nos achados plaquetários, parecem não influenciar na presença da fragilidade física, fato que pode ser observado pela ausência de diferença estatística entre Controle e Fragilidade ($p=0,577$) e entre Fragilidade + TNCL e TNCL ($p=0,316$). Desta forma, entende-se que embora os níveis plasmáticos de ADAM10 (50 kDa) estejam aumentados na condição de Fragilidade + TNCL, quando comparado aos idosos saudáveis do grupo controle, esta alteração não apresenta relação com a condição de fragilidade física e sim com a condição de TNCL. Isto poderia esclarecer o motivo da ausência de diferença estatística significativa destes níveis entre a condição de Fragilidade + TNCL e o TNCL.

Vale ressaltar que os resultados em plaquetas apresentam forte coerência com estudos prévios de nosso grupo de pesquisa, já citados anteriormente, em que verificou-se uma redução ainda mais significativa nos níveis plaquetários de ADAM10 em pacientes com DA (Manzine et al., 2013a; 2015; 2013b) e que além disso, esta queda está relacionada ao desempenho cognitivo dos idosos, conforme medido pelo teste de desenho do relógio (Manzine et al., 2014) e MEEM (Manzine et al, 2013a). Tomados em conjunto, nossos achados podem indicar que a alteração dos níveis de ADAM10 podem iniciar tão cedo quanto no TNCL e se agravar em casos de evolução para DA.

A hipótese inicial levantada por este estudo compreendia a existência da diferença entre os grupos e que os níveis da ADAM10 seriam encontrados ainda mais alterados em participantes com fragilidade cognitiva, ou seja, na presença concomitante das condições de TNCL e fragilidade física. Contudo, observou-se que os níveis de ADAM10 não interferiram de maneira significativa na fragilidade física, em ambas as frações sanguíneas analisadas. Em contrapartida, os menores valores, de forma estatisticamente significativa, dos níveis de ADAM10 em plaquetas e seu aumento em plasma foi associada à presença isolada do TNCL.

Os resultados obtidos na análise plasmática complementam os achados plaquetários. A explicação deste fato é nitidamente percebida através dos ensaios de *Western Blotting*, pois a ADAM10 identificada em plaquetas corresponde a uma forma de 60kDa, enquanto a única forma identificada no plasma corresponde à de 50 kDa.

Algumas hipóteses podem ser consideradas para explicar a presença de uma ADAM10 solúvel no plasma. A ideia mais considerada por este estudo indica que a ADAM10 plaquetária (60 kDa) poderia ter sido clivada e liberada da membrana plasmática, perdendo domínios e alcançando uma forma solúvel no plasma (50 kDa). Sendo assim, acredita-se que nos participantes com TNCL os níveis plasmáticos mais altos de ADAM10 devem ocorrer proporcionalmente a redução da proteína ancorada à membrana nas plaquetas, ou seja, possivelmente a elevação destes níveis no plasma estão diretamente relacionados ao aumento de seu desligamento da membrana em plaquetas. Esta hipótese baseia-se nas evidências científicas que apontam para a influência de outras ADAMs no processamento da ADAM10 (Gilpin et al., 1998, Haidl et al., 2002; Hernández et al., 2010).

Além disso, evidências indicam que a inibição de ADAM9 aumenta a atividade de ADAM10 na membrana celular, demonstrando sua atuação na regulação dos níveis desta α -secretase (Moss et al., 2011). Isto acontece porque a ADAM9 afeta a clivagem e liberação da ADAM10 da membrana celular (Cissé et al., 2005). De forma semelhante, a ADAM15 cliva a ADAM10, mantendo o domínio citoplasmático intracelular com função potencial na regulação da transcrição de genes no núcleo celular (Tousseyn et al., 2009). Esse tipo de evento de clivagem é conhecido como proteólise intramembrana regulada.

Contudo, embora a hipótese da formação da ADAM10 solúvel através da clivagem da ADAM10 ancorada à membrana seja bastante coerente e provável, não se pode descartar a possibilidade de se tratar de outra isoforma derivada de um processo de *splicing* alternativo resultante do processamento de RNA mensageiro (mRNA).

O *splicing* é um mecanismo capaz de formar o mRNA a partir de um pré-mRNA. Este evento foi descoberto no final dos anos 1970, quando foi demonstrado que os genes eucarióticos continham sequências de íntrons (regiões não codificantes) que não estavam presentes no mRNA. Estudos subsequentes demonstraram que os íntrons eram removidos por um complexo macromolecular, denominado spliceossomo. Foi demonstrado também que esta estrutura é responsável por unir os éxons (regiões codificantes) e formar um RNA maduro, que posteriormente será traduzido e dará origem a uma proteína diferente da original. Isto faz com que um gene possa codificar isoformas diversas da mesma proteína, com funções distintas e algumas vezes até antagônicas, aumentando consideravelmente a capacidade codificante do genoma. Este fato também poderia explicar a fonte da ADAM10 solúvel (50 kDa), bem como justificar a sua diferença com relação a forma plaquetária (60 kDa).

Até o momento não se sabe ao certo a fonte da ADAM10 plasmática. No entanto, independentemente de sua origem, sabe-se que a ADAM10 é uma molécula abundante na superfície celular e que está presente constitutivamente, em níveis altos, na maioria dos tipos de células (Ebsen et al., 2013). Estudos apontam que a localização da protease na membrana está associada positivamente a clivagem não amiloidogênica da APP, ao demonstrar que o aumento de sua externalização, via SA97, aumenta significativamente os níveis de sAPP α em cultura de células primárias de hipocampo de rato (Marcello et al., 2007).

Evidências também apontam que o domínio transmembrana da ADAM10 apresenta função crucial em sua atividade como *shedase*, no entanto este domínio é perdido quando a protease é clivada e, portanto, liberada da membrana plasmática (Sahin et al., 2004). Corroborando com estes indícios, recentemente foi demonstrado que a perda da atividade proteolítica da ADAM10, por inibição ou perda de função, induz a sua remoção ao longo de toda superfície celular, indicando que a atividade da ADAM10 é criticamente necessária para sua expressão na superfície da membrana plasmática celular (Seifert et al., 2020). Com base neste apanhado de evidências,

entende-se que a localização da ADAM10 na membrana representa grande relevância para sua atividade, sendo assim é razoável pensar que uma forma solúvel, livre da membrana plasmática celular, como a forma encontrada no plasma, seja enzimaticamente inativa.

Sabe-se que a ADAM10 é a principal α -secretase que participa da clivagem não amiloidogênica da APP nos neurônios, exercendo, portanto, potencial função protetora ao desenvolvimento da DA (Endres & Deller, 2017), desta forma coerentemente os níveis plasmáticos mais altos de ADAM10, identificado no TNCL, podem indicar uma forma não atuante da mesma. Fortalecendo esta hipótese, foi constatado recentemente que no envelhecimento cognitivamente saudável os níveis plaquetário de ADAM10 apresentam-se aumentados (Schuck et al., 2016), ou seja, a ADAM10 quando atuante na APP, e em quantidades suficientes, age colaborando com o envelhecimento saudável, em contrapartida, quando reduzida representa uma lacuna para o desenvolvimento de processos neurodegenerativos.

Até este momento, em vista do que se conhece, não foram encontrados na literatura trabalhos que tenham identificado biomarcadores periféricos para fragilidade cognitiva. Desta forma, foram utilizados estudos correlatos para melhor discussão dos resultados encontrados.

Inglés e colaboradores (2016) investigaram se os níveis de BDNF (Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro) plasmático, poderiam fortalecer o diagnóstico de fragilidade cognitiva. Neste estudo, foram identificados os níveis plasmáticos de BDNF em 77 idosos não-frágeis, 73 idosos pré-frágeis e 76 idosos frágeis, todavia, foi observado que os níveis de BDNF diminuíram significativamente em participantes frágeis quando comparados com indivíduos não-frágeis, no entanto não se encontrou diferença estatística nos níveis de BDNF entre idosos frágeis e pré-frágeis, sendo assim o estudo considerou o BDNF um bom biomarcador plasmático não específico para fragilidade física em idosos, e inviável para fragilidade cognitiva. Coelho *et al.* (2012) encontraram resultados semelhantes sugerindo que os níveis de BDNF podem mesmo estar relacionados à condição de fragilidade física.

A identificação de biomarcadores para TNCL tem sido um alvo bastante considerado recentemente. No plasma algumas moléculas vêm sendo amplamente investigadas. O lactato, por exemplo, é uma molécula pro-inflamatória que pode aumentar a produção de EROS. Em uma população chinesa, níveis mais altos de lactato foram identificados em participantes com TNCL (Pan et al., 2019). Da mesma forma, o marcador inflamatório TNF- α (fator de necrose tumoral- α), também demonstrou estar aumentado no plasma de participantes afetados pela condição. O mesmo estudo acrescenta ao indicar que estes níveis elevados podem ser induzidos pelo acúmulo de A β e refletir um quadro de perda neuronal (Shen et al., 2019). Além disso, estudos correlatos observam redução dos níveis de HDL-C (*High-density lipoprotein*) (He et al., 2016) e triglicerídeos (Yin et al., 2012) na presença do TNCL. Contudo, vale ressaltar que embora todos estes marcadores tenham apresentado resultados estatisticamente significativos, é possível que possam ser questionados, na

clínica, devido à baixa especificidade para a condição e alta associação com outras comorbidades. Este fato torna a ADAM10 uma molécula mais atraente, tendo em vista a especificidade de 70% e sensibilidade de 80,77% que apresentou na identificação da DA (Manzine et al., 2013b)

Recentemente, o estudo de Oliveira et al. (2020) fortaleceu nossos achados ao identificar, através de uma plataforma microfluídica altamente sensível, que os níveis de ADAM10 no plasma e LCR de pacientes TNCL do tipo amnésico e DA, estavam elevados (Oliveira et al., 2020). De acordo com o *National Institute on Aging (NIA)* um dos principais critérios para biomarcadores ideais envolve a confirmação dos achados por pelo menos dois estudos independentes realizados por pesquisadores qualificados, com os resultados publicados em revistas especializadas (Frank et al., 2003). Sendo assim, esta descoberta (Oliveira et al., 2020) soma-se aos nossos achados de modo a torná-los ainda mais seguros para serem expandidos para a prática clínica.

Devido à sua proximidade com o sistema nervoso, o LCR tem sido alvo de muitos estudos envolvendo biomarcadores, no entanto é importante destacar que o procedimento de punção liquórica envolve uma técnica altamente invasiva, que requer o suporte de um ambiente hospitalar, equipe especializada, além de demandar um alto custo de operação. Outros riscos a serem discutidos incluem a falha na obtenção do material, hematomas localizados, sangramento e desconforto local no local da punção (Doherty & Forbes, 2014). Todas estas questões, muitas vezes, tornam a técnica inviável para estudos de triagem e aplicação clínica em larga escala. Neste sentido, a ADAM10 surge como uma estratégia mais conveniente, representando um biomarcador diagnóstico que pode ser coletado e medido de forma simples, rápida, pouco invasiva e de baixo custo.

O tema tem se tornado bastante pertinente à ciência, pois a prevalência de TNCL em indivíduos acima de 65 anos pode chegar a atingir de 10 à 25% da população de idosos (Luck et al., 2007). É necessário destacar que embora a presença desta condição não signifique um fator determinante para o início de quadros demenciais, representa um ponto que merece muita atenção devido a sua elevada taxa de conversão para DA, em torno de 10 a 15% ao ano, contrastando com a de indivíduos normais, em que varia de 1 a 2% ao ano (Petersen & Morris, 2005). Além disso, a probabilidade de progressão dessa condição para qualquer forma de demência ocorre à uma taxa de 3 à 5 vezes maior do que a de cognição normal (Cambell et al., 2013). Facal e colaboradores (2019) também demonstraram que o TNCL está fortemente associado ao declínio funcional e motor, incluindo caminhada lenta, que também está relacionado às síndromes pré-demenciais e demenciais. Seguindo este raciocínio, alguns autores acreditam que o TNCL do tipo amnésico corresponda ao estágio pré-demencial mais comum (Arahamian et al., 2014; Charchat et al., 2005; Forlenza et al., 2013) e que a progressiva redução do metabolismo neuronal de glicose ou perfusão sanguínea cerebral tendem a aumentar proporcionalmente o risco de conversão para demência (Petersen, 2016).

Com base em tantas evidências é importante ressaltar que o TNCL representa uma condição considerada tratável (Lozano-Montoya et al., 2017), sendo assim cuidados a saúde, mudanças nutricionais (Moraes et al., 2018), atividade física praticada regularmente (Losa-Reyna et al., 2019) e estimulação cognitiva são consideradas intervenções efetivas para a condição. Além disso, o TNCL pode ser uma condição secundária a outros processos patológicos, como distúrbios neurológicos, sistêmicos ou psiquiátricos) (Huey et al., 2013). Nestes casos, alguns quadros de TNCL podem estar associados a causas reversíveis de comprometimento cognitivo, sendo assim, a condição, desde que adequadamente diagnosticada, pode até ser considerada reversível (Castel et al., 2017). Em contrapartida a DA, até o momento, não possui cura e uma vez iniciada pode ter sua evolução retardada, mas não mais revertida (Potter, 2019). Desta forma, é notória a importância da identificação do TNCL também como estratégia preventiva.

Até o momento não há teste específico para confirmação do diagnóstico de TNCL, ou seja, o clínico decide se a condição é a causa mais provável dos sintomas com base em diversos exames de imagem, como ressonância magnética estrutural funcional (RM), tomografia de emissão de pósitrons (PET), triagem por tomografia computadorizada de emissão de fóton único (SPECT) e análise de LCR (Herukka et al., 2017), além de avaliação neuropsicológica e avaliação de Atividades Instrumentais de vida diária (AIVDs) (Arahamian et al., 2014). Este cenário reforça a importância e a necessidade de biomarcadores diagnósticos periféricos, que possam representar maior facilidade no procedimento.

Segundo Forlenza e colaboradores (2013) clinicamente ainda é uma tarefa difícil diferenciar a DA incipiente, do envelhecimento cognitivo normal e do declínio cognitivo sutil, sendo assim a identificação de biomarcadores representaria uma estratégia que auxiliaria pesquisadores e clínicos a aumentar a sensibilidade e a especificidade do diagnóstico. Soma-se a isto, o fato de que a detecção precoce do TNCL é fundamental para o delineamento da conduta de cuidado ao idoso e representa um espaço para intervenções precoces capazes de reduzir ou interromper processos de declínio cognitivo (reabilitação neuropsicológica, tratamento psiquiátrico, controle de comorbidades, mudanças nutricionais e exercícios físicos) (Roberts & Knopman, 2013).

Tomados em conjunto com as evidências apresentadas, entende-se que os resultados do presente estudo, embora pertençam a um tema ainda pouco explorado, demonstram forte congruência com o que vem sendo publicado na literatura. Além disso, os resultados apresentados respondem adequadamente a demanda, apontando a ADAM10 como uma importante molécula biomarcadora para TNCL e destacando sua relevância clínica. Acredita-se que estes achados possam contribuir para a implementação de ferramentas que auxiliem no diagnóstico do TNCL. Tais ferramentas poderão ser utilizadas para um planejamento mais adequado das equipes de saúde, com o objetivo de proporcionar diagnóstico mais assertivo, direcionar intervenções precoces e

possibilitar a prevenção de agravos. Finalmente, a discussão e reflexão destes resultados poderão também impulsionar novos questionamentos e novas investigações a respeito de biomarcadores de TNCL.

**CAPÍTULO II – INFLUÊNCIA DA LOCALIZAÇÃO CELULAR DA ADAM10
EM SUA ATIVIDADE**

APRESENTAÇÃO

APRESENTAÇÃO

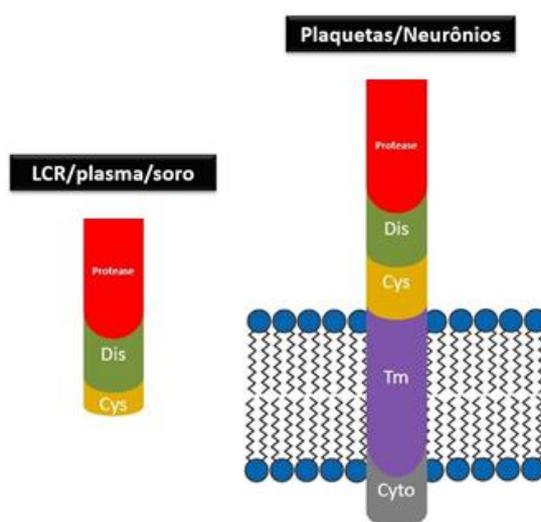
Os resultados que serão apresentados neste capítulo correspondem aos ensaios realizados durante o BEPE (Bolsa Estágio de Pesquisa no Exterior) - FAPESP. Este projeto foi aprovado com vigência de 28/11/2019 à 27/05/2020 e, portanto, coincidiu com a chegada da pandemia de COVID-19 (*Corona Virus Disease 2019*) na Europa, o que exigiu a adoção de medidas especiais de saúde e segurança em todo o mundo, a fim de conter ou impedir a propagação da doença. Este estudo foi realizado na *Università Degli Studi di Milano*, localizada na região da Lombardia, no norte da Itália, uma das regiões mais afetadas no mundo pela pandemia. Assim, como medida de segurança, a Universidade colocou todos os estudantes e funcionários em quarentena e permaneceu fechada desde o dia 24 de fevereiro de 2020, reabrindo apenas recentemente, em julho de 2020. Em decorrência disto, foi possível desenvolver apenas três de um projeto planejado para seis meses. Após um mês de isolamento, devido ao alto risco à saúde e à impossibilidade de finalização ou mesmo continuidade do projeto, foi considerado prudente a interrupção do estudo e retorno antecipado ao Brasil. Considerando estas circunstâncias e adversidades, este capítulo apresentará os resultados obtidos no período de três meses de estágio na referida universidade.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Como mencionado anteriormente no capítulo 1, vários estudos foram realizados por nosso grupo na área de biomarcadores sanguíneos para DA e resultaram em publicações que vêm, ao longo do tempo, consolidando o papel da ADAM10 como molécula biomarcadora para DA (Manzine et al., 2013a; 2015; 2013b; Peron et al., 2018). Colaborando com estes estudos, o presente trabalho, realizado no Brasil, teve como objetivo verificar se os níveis plasmáticos e plaquetários de ADAM10 poderiam ser considerados como biomarcadores para a condição de fragilidade física associada ao comprometimento cognitivo, o que representa o novo construto de fragilidade cognitiva (Kelaiditi et al., 2013). No entanto, este estudo mostrou que os níveis de ADAM10 não interferiram significativamente na condição de fragilidade física dos participantes do estudo, mas somente estavam alterados na presença isolada do TNCL. Desta forma, a ADAM10 não apresentou efetividade como molécula biomarcadora para fragilidade cognitiva, no entanto confirmou seu papel como biomarcadora para TNCL. Nos resultados apresentados no capítulo 1 observou-se que em plaquetas os níveis de ADAM10 foram menores em participantes com TNCL, quando comparado aos participantes saudáveis, já no plasma esses níveis mostraram-se aumentados. Desta forma, este estudo levantou uma hipótese adicional relacionada à presença de duas formas da ADAM10, plaquetária e plasmática, que seriam respectivamente, ativa quando ancorada à membrana das plaquetas, assim como nos neurônios, mas solúvel e possivelmente inativa no plasma, bem como no soro e LCR (figura 13).

Figura 13. Hipótese do estudo - Estrutura da ADAM10 quando ancorada à membrana de neurônios e plaquetas e na forma solúvel no LCR, plasma e soro.



Os resultados encontrados no plasma estão de acordo com as análises obtidas nas plaquetas. Supostamente, a ADAM10 por estar solúvel no plasma, ou seja, livre da membrana plasmática é encontrada inativa, ou seja, sem atividade de α -secretase. No ambiente fluido característico do plasma sanguíneo, acredita-se que a ADAM10 adquira menor massa, dada a ausência dos domínios transmembrana e citoplasmático.

Nossa hipótese se baseou em algumas evidências científicas, como no estudo de Reiss e colaboradores (2017) que indicou que o microambiente de membrana plasmática pode regular a função das ADAMs como *shedases*. Foi demonstrado também que o recrutamento da ADAM10 para a membrana plasmática e, conseqüentemente, sua atividade, são favorecidas pela ação da proteína SAP97 (Marcello et al., 2017) e que o aumento de sua localização na membrana plasmática, mediado pela ação dos oligômeros A β 1-42, também demonstra a influência em sua atuação como α -secretase (Marcello et al., 2019a). Estes pesquisadores observaram que o tráfego de ADAM10 por meio da SAP97 ocorre através de uma interação direta entre os domínios ricos em prolina da ADAM10 e o domínio SH3 da SAP97 e que a associação perturbada de ADAM10 / SAP97 *in vivo*, por peptídeos permeáveis às células, alterou a localização dessa protease na membrana pós-sináptica influenciando negativamente sua atividade em relação à APP (Marcello et al., 2007).

Reiss & Sucharit (2017), apresentam uma hipótese nova afirmando que as ADAMs são posicionados em locais precisamente definidos dentro do ambiente mosaico da membrana plasmática, os chamados “*nanodomains*”, desta forma é possível que as *shedases* exerçam sua função essencialmente dentro das restrições dos *nanodomains* em que situam-se, ou seja, a proximidade ou a co-localização membranar da ADAM10 com um substrato (APP) pode ser um fator-chave para determinar sua atuação. O mesmo estudo indicou que a atividade das ADAMs na membrana é favorecida pela exposição contínua da fosfatidilserina (PS). Desta forma, a atividade de *shedase* supostamente aumentará à medida que as rodadas de translocação de PS sejam renovadas. Recentemente, Bleibaum e colaboradores (2019) completam esta ideia ao demonstrarem que, de fato, a externalização transitória da PS (assimetria da membrana) na membrana plasmática, induzida pela elevação intracelular do cálcio, desempenha um papel relevante na regulação da atividade da ADAM10, indicando também a importância da localização dessa protease na membrana para o bom desempenho de sua atividade (Bleibaum et al., 2019). Colaborando ainda com estes indícios, recentemente foi apresentado que a perda da atividade proteolítica da ADAM10, por inibição ou na perda de sua função, induz a sua remoção ao longo de toda superfície celular, sendo sua atividade criticamente necessária para sua expressão superficial na membrana plasmática celular (Seifert et al., 2020).

Apesar de todos esses resultados encontrados na literatura, não existem estudos que comprovem a ADAM10 livre da membrana plasmática, assim como encontrada no plasma, seja inativa e, portanto, incapaz de atuar na APP. Assim, o objetivo inicial desta pesquisa foi testar a atividade enzimática da ADAM10 em diferentes condições (com e sem membrana) para avaliar se sua atividade enzimática é completamente dependente de sua ancoragem à membrana plasmática. Para isto, foi realizado o cultivo de células de neuroblastoma humano (SH-SY5Y) *in vitro* para desenvolver e padronizar uma técnica de fracionamento celular e isolamento da fração de membrana e testar a atividade enzimática da ADAM10 ancorada e solúvel.

No Brasil não foram encontrados centros com experiência específica no isolamento da membrana plasmática de células neuronais. Sendo assim, foi estabelecida parceria com um centro de referência mundial no assunto (Laboratório de Farmacologia de Neurodegeneração - LPN da *Università Degli Studi di Milano* – UNIMI) através do Laboratório da Prof. Dra. Elena Marcello, que se dedica ao estudo dos papéis da ADAM10 na plasticidade sináptica, e possui vasta experiência e competência nesse tipo de análise. Sendo assim, os resultados apresentados neste capítulo são frutos de um estudo (BEPE - Bolsa Estágio de Pesquisa no Exterior) realizado a partir desta parceria.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

- Desenvolver um protocolo de isolamento da membrana plasmática por fracionamento celular em células de neuroblastoma da linhagem SH-SY5Y e testar a atividade enzimática da ADAM10 nas diferentes frações.

MATERIAIS E MÉTODOS

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Cultura celular de Neuroblastoma Humano (SH-SY5Y)

As células SH-SY5Y foram cultivadas em meio Eagle (MEM; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) contendo 1% L-glutamina (Sigma-Aldrich) e 1% de penicilina-estreptomicina (Sigma-Aldrich). As células foram mantidas em uma incubadora úmida com 5% de CO₂ e 95% de O₂ à 37°C, em frascos específicos da cultura de células até atingirem a confluência necessária para uso nos ensaios propostos.

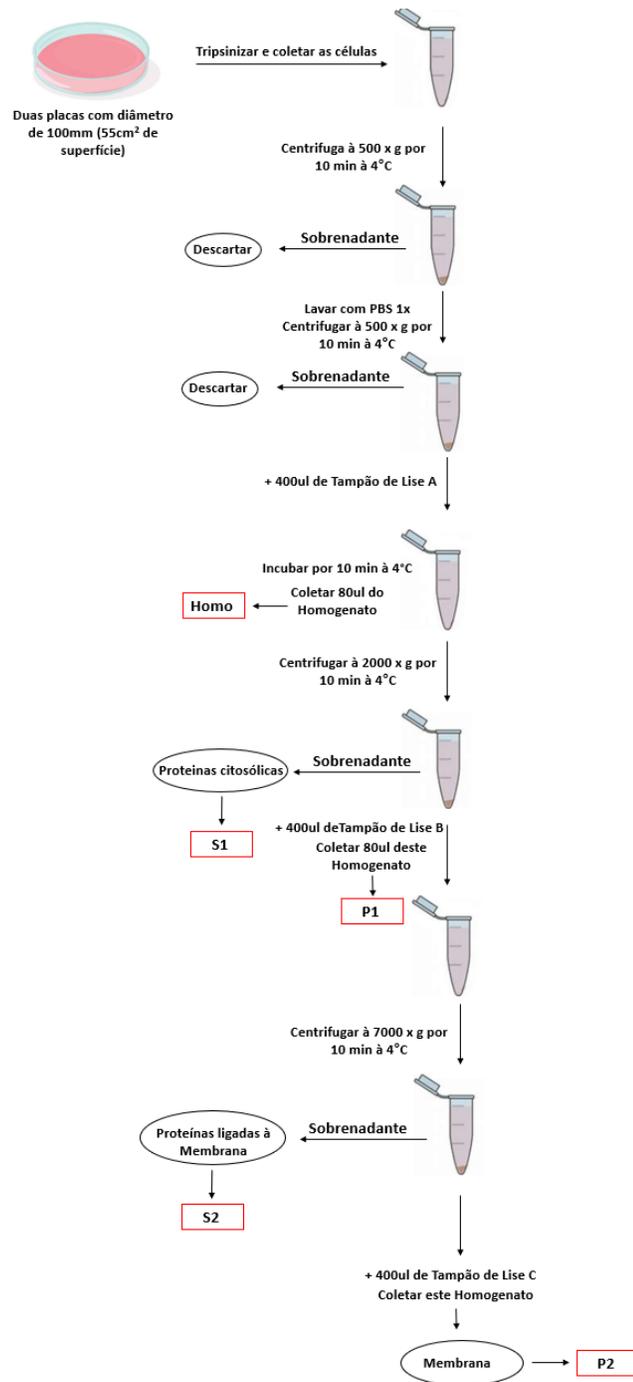
3.2 Fracionamento celular

3.2.1 Protocolo 1

Este protocolo foi desenvolvido com base em um estudo anterior (Baghirova et al., 2015). Para tal, as células foram cultivadas, como descrito acima, até atingirem cerca de 80% de confluência. Posteriormente, foram submetidas ao processo de tripsinização, pela incubação com 1ml de solução de tripsina em estufa úmida com 5% de CO₂ e 95% de O₂ a 37°C durante 5 minutos. A reação é parada através da adição de 1ml de meio de cultura enriquecido com Soro Fetal Bovino, com subsequente centrifugação (1000 rpm por 5 minutos). Após isto, as células foram coletadas, transferidas para microtubos de centrifugação, lavadas com solução salina tamponada com fosfato (PBS) e centrifugadas à 5000 × g por 10 minutos à 4°C. Após a lavagem, o sobrenadante foi descartado e o sedimento celular foi lisado com o tampão A, contendo 150 mM de NaCl, 50 mM de HEPES pH 7.4, Digitonina (Sigma, D141) 25 µg/mL, e 1% de inibidores de protease (*Roche, Complete Protease Inhibitor Cocktail*). Após a suspensão deste sedimento, 80 µL deste volume foi reservado e nomeado “Homo” e o restante foi centrifugado por 10 minutos a 2000 × g a 4°C. A fração sobrenadante corresponde às proteínas citosólicas. Essa fração foi reservada e denominada S1. O pellet foi ressuspenso em tampão B contendo 150 mM de NaCl, 50 mM de HEPES com pH 7.4, 50 mM de NP-40, 1% de inibidores de protease (*Roche, Complete Protease Inhibitor Cocktail*) e incubado por 30 minutos a 4°C. Após a suspensão deste pellet, 80 µL deste volume foi reservado como P1 e o restante foi centrifugado por 10 minutos à 7000 × g a 4°C. A fração do sobrenadante nesta fase corresponde as proteínas ligadas à membrana, portanto essa fração foi reservada e denominada S2. O sedimento foi ressuspenso em tampão C contendo 150 mM de NaCl, 50 mM de HEPES à um pH 7.4, 1% de inibidores de protease (*Roche, Complete Protease Inhibitor Cocktail*) e coletada como a fração P2 (figura 14).

Todas as etapas foram realizadas em câmara fria a 4°C. Os níveis de ADAM10 foram verificados pela técnica de *Western Blotting* em todas as frações coletadas (Homo, S1, P1, S2, P2). As amostras foram testadas para confirmar o isolamento da fração correspondente à membrana plasmática por anticorpo específico para cada fração celular. Os anticorpos utilizados foram: anti-APP22C11 (Membrane - MAB348, *Millipore*, Billerica, MA), anti-GAPDH (Citosol - SC-25778, *Santa Cruz Biotech*, Dallas, TX) e Anti-Histone H3 (Núcleo - 17168-1-ap, *Proteintech*, Chicago, IL).

Figura 14. Diagrama esquemático do protocolo para o fracionamento de células cultivadas (Protocolo 1)



3.2.2 Protocolo 2

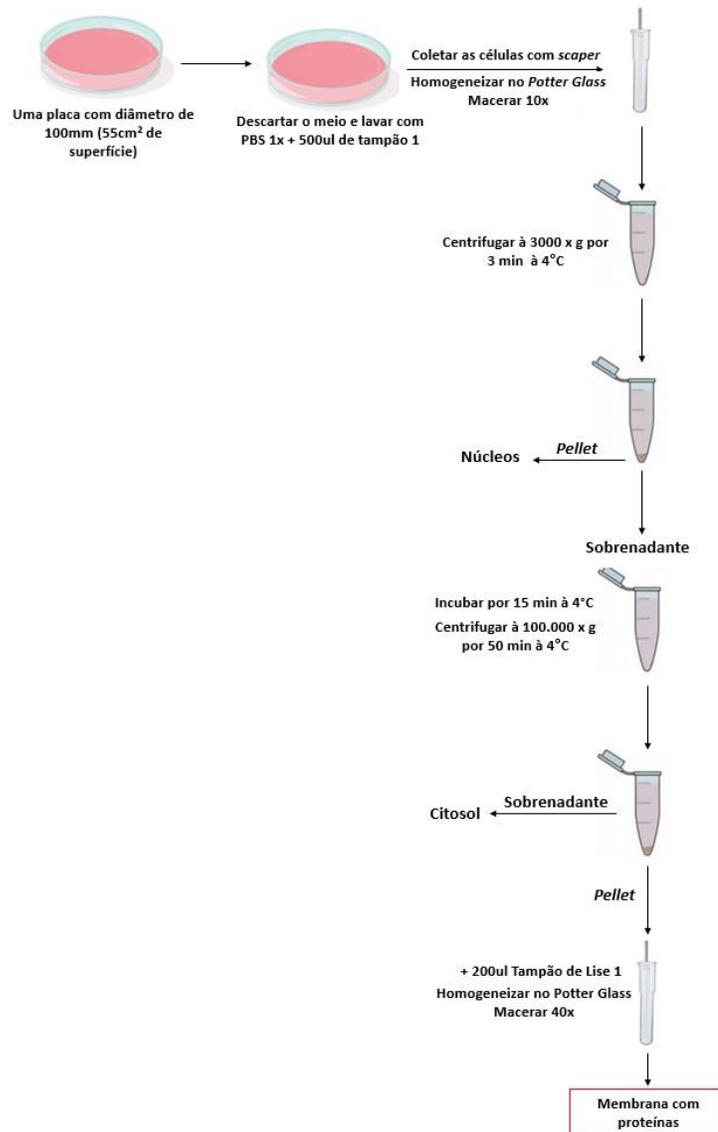
O protocolo experimental 2 foi elaborado com base em um estudo realizado pelo centro LPN-UNIMI. Assim como o protocolo 1, as células foram cultivadas até que atingissem cerca de 80% de confluência. Posteriormente, foram lavadas com solução salina tamponada com fosfato

(PBS), coletadas por raspagem (com *scraper*), maceradas no triturador de tecidos em vidro (*Potter-Glass*) juntamente com o tampão de lise contendo 25 mM de Tris HCl com pH 7.4, 2 mM de EDTA, 1 mM de EGTA, 0.1 mM de fluoreto de fenilmetilsulfonil e inibidores de protease (*Roche, Complete Protease Inhibitor Cocktail*). Depois disso, esse conteúdo foi transferido para um microtubo e centrifugado por 3 min à $3000 \times g$ a 4°C para. Após esse estágio, o sedimento (núcleo) foi descartado e o sobrenadante foi transferido para um tubo de ultracentrífuga e ultra-centrífugado sequencialmente por 50 min a 4°C e $100,000 \times g$. O sedimento resultante corresponde à fração da membrana com proteínas. Os níveis de ADAM10 foram verificados pela técnica de *Western Blotting*. Todas as etapas foram realizadas em câmara fria a 4°C . A amostra foi testada para confirmar o isolamento da fração correspondente à membrana plasmática por anticorpo específico para frações celulares. Além dos já mencionados no protocolo 1, foram utilizados também os seguintes anticorpos: Anti-GM130 (Complexo de Golgi - 610822, *Transduction Laboratories*, Lexington, KY), Anti-Calnexina (Reticulo Endoplasmático - ADI-SPA-860-F, *Enzo Life Sciences*, Farmingdale, NY) e Anti- β -Actina (Citoesqueleto - A5060, *Sigma-Aldrich*, St. Louis, MO).

3.3 Quantificação de proteínas

Para quantificação total de proteínas, o volume de 10 μL de cada amostra, obtida no processo de fracionamento celular, foi submetido à determinação espectrofotométrica de proteínas pelo método de Bradford. Este método é baseado na interação entre o corante coomassie brilliant blue (BG-250) e macromoléculas de proteínas. Esta interação gera uma reação de pH que provoca o deslocamento do equilíbrio do corante e o faz absorver fortemente um comprimento de onda. Quanto mais concentrada for a solução, maior será a absorção de luz. Por fim, esta intensidade é medida numericamente por meio do espectrofotômetro. Vale ressaltar que para minimizar possíveis erros, as determinações foram realizadas em duplicata.

Figura 15. Diagrama esquemático do protocolo para o fracionamento de células cultivadas (Protocolo 2)



3.4 Ensaio de Western Blotting

O conteúdo proteico das amostras (30 µg) foi aplicado em gel de poliacrilamida de 7% (Laemmli 1970) e transferido para membranas de nitrocelulose. A membrana foi bloqueada com 10% de leite e em seguida, após lavagens com TBST, incubada com anticorpo primário anti-ADAM10 (*Prosci 2051 rabbit*, 1:1000 ou *Abcam 39153* 1:1000) *overnight* (12h) em solução de bloqueio, seguido por lavagens e então incubadas com anticorpo secundário (*Abcam 97051 anti-rabbit*, 1:2000) conjugado com HRP por uma hora. A revelação das bandas proteicas foi realizada

em leitor de quimioluminescência – fotodocumentador (*Chemidoc – BioRad*). Após a revelação, as bandas marcadas foram quantificadas com auxílio do *software ImageLab (BioRad)*. As bandas exibidas pelo ensaio de *Western Blotting* foram reveladas no aparelho *ChemiDoc TM MP Imaging System (BioRad)*. A quantificação das bandas foi feita usando o *software ImageLab – BioRad* e os dados foram analisados com auxílio do *Excel e GraphPad Prism 5*.

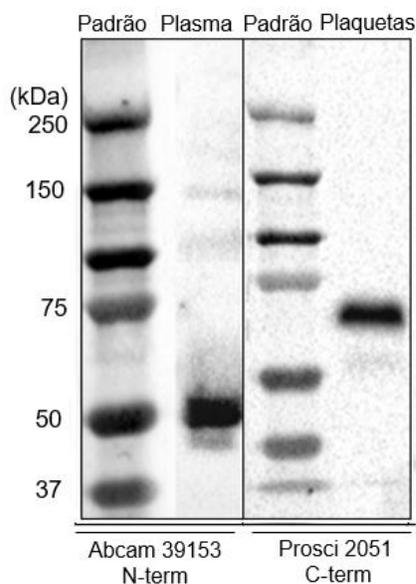
RESULTADOS E DISCUSSÃO

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. ADAM10 em plasma e plaquetas

A Figura 16 representa a imagem comparativa do ensaio de *Western Blotting* em plasma e plaquetas, na qual é nítida a presença de duas formas da ADAM10, em plasma com massa molecular de 50 kDa, e em plaquetas com 60 kDa.

Figura 16. Estrutura multimodular da ADAM10 e suas diferentes formas. Imagem representativa das membranas referentes aos experimentos de *Western Blotting*, mostrando a ADAM10 presente no plasma e em plaquetas, de forma comparada. O conteúdo proteico dos materiais foi aplicado em gel 7% de poliacrilamida. As proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose e coradas com *Ponceau*, incubadas em solução de bloqueio (10% de leite) e mantidas sob refrigeração *overnight* (12h) com anticorpos primários anti-ADAM10 C-term (*Prosci* 2051) e N-term (*Abcam* 39153). Posteriormente foram incubadas com anticorpo secundário (*goat anti-rabbit*) conjugado com HRP por 1 hora em temperatura ambiente. A revelação das bandas foi realizada utilizando o kit *Clarity Western ECL Substrate* (*BioRad*). As membranas foram fotografadas através do *software ImageLab – BioRad* para visualização das bandas.



Este resultado confirmou o que foi encontrado durante o desenvolvimento do estudo no Brasil (capítulo 1), mostrando que no plasma apenas a forma já clivada da ADAM10, portanto solúvel, está presente, enquanto em plaquetas somente a forma ancorada à membrana plasmática é observada. Ao que tudo indica, a ADAM10 no plasma pode corresponder ao domínio extracelular da enzima, decorrente da perda dos domínios transmembrana e citoplasmático. Esta forma solúvel pode ser resultado da clivagem da ADAM10 por outras ADAMs, como as ADAM9 e 15 (Tousseyn et al., 2009). No entanto, não se pode descartar a possibilidade de se tratar de outra isoforma, fruto de uma produção alternativa da proteína, como já discutido no capítulo anterior. Com base nestes

resultados, o presente estudo levantou a hipótese de que a ADAM10 estaria ativa quando ancorada à membrana de plaquetas, mas solúvel e inativa no plasma.

Vários achados científicos apontaram a importância da localização membranar da ADAM10 para sua atividade (Dreymueller et al., 2015 ; Ebsen et al., 2013; Marcello et al., 2007; Sahin et al., 2004), além disso, recentemente Seifert e colaboradores (2020) descobriram que a perda da função da mesma, induz a sua remoção ao longo de toda superfície celular, no entanto até o momento não foi comprovado que o seu desligamento da membrana plasmática induz a sua inatividade enzimática, e que quando solúvel, livre da membrana plasmática da célula, assim como no plasma, é realmente inativa. Com base nisto, planejou-se para este estudo o cultivo de células de neuroblastoma (SH-SY5Y), a fim de desenvolver e padronizar técnicas de fracionamento celular e isolamento da fração de membrana, de modo a testar a atividade enzimática da ADAM10 em diferentes meios (rico em membranas ou livre de membranas).

Vários métodos de fracionamento celular disponíveis para o isolamento de organelas analisadas são imperfeitos e deixam contaminantes de regiões indesejadas da célula. Esses contaminantes são muitas vezes inevitáveis, no entanto este estudo buscou escolher e adaptar dois protocolos que atingissem os mais altos níveis de pureza possíveis, a fim de otimizar a análise dos resultados. Desta forma, para verificar a efetividade do fracionamento celular e pureza do isolamento das organelas nas frações obtidas optamos por utilizar 6 anticorpos (APP22C11, Anti-GAPDH, Anti-Histona H3, GM130, Calnexina e Actina), cada um direcionado a um marcador de organela específico (figuras 17 e 18). A presença de membrana plasmática é determinada pelo anticorpo APP22C11 (~106-115 kDa); o citosol é indicado por Anti-GAPDH (~37 kDa); os núcleos por Anti-Histona H3 (~17 kDa); complexo de Golgi por GM130 (~130 kDa); retículo endoplasmático por Calnexina (~70 kDa) e citoesqueleto por Actina (~45 kDa). Estes anticorpos foram devidamente testados em todas as frações celulares alcançadas. As frações obtidas com células de neuroblastoma humano (SH-SY5Y) foram: Homo (homogenato com células lisadas), S1 (proteínas citosólicas), P1 (pellet resultante de S1 com tampão B), S2 (proteínas ligadas à membrana), P2 (*pellet* resultante de S2) por meio do protocolo 1, e Homo (homogenato com células lisadas), citosol e membrana com proteínas através do protocolo 2.

Figura 17. Imagem da membrana referente ao experimento de *Western Blotting*, mostrando a efetividade do fracionamento celular e pureza do isolamento das organelas nas frações obtidas com o protocolo 1 em células de neuroblastoma humano (SH-SY5Y). O conteúdo proteico dos materiais foi aplicado em gel 7% de poliacrilamida. As proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose, coradas com *Ponceau*, incubadas em solução de bloqueio (10% de leite) e mantidas sob refrigeração *overnight* (12h) com os anticorpos primários indicados (APP22C11, Anti-GAPDH, Anti-Histona H3). Posteriormente foram incubadas com anticorpos secundários (*goat anti-rabbit and anti-mouse*) conjugados com HRP por 1 hora em temperatura ambiente. A revelação das bandas foi realizada utilizando o kit *Clarity Western ECL Substrate (BioRad)*. As membranas foram fotografadas através do *software ImageLab – BioRad* para visualização das bandas.

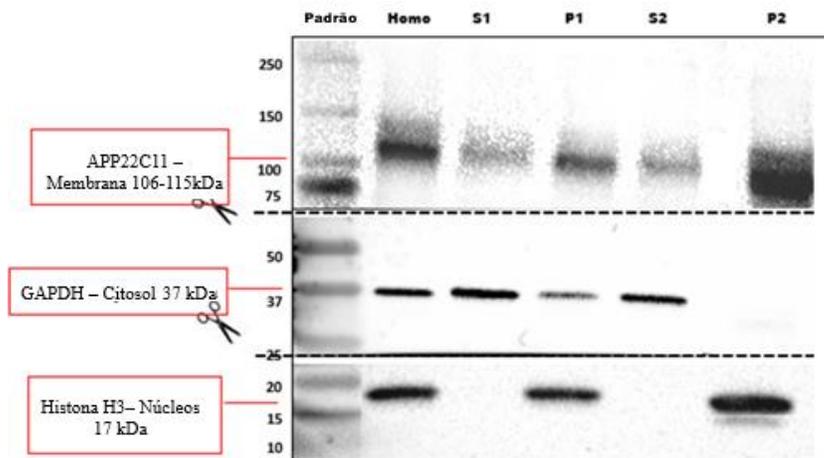
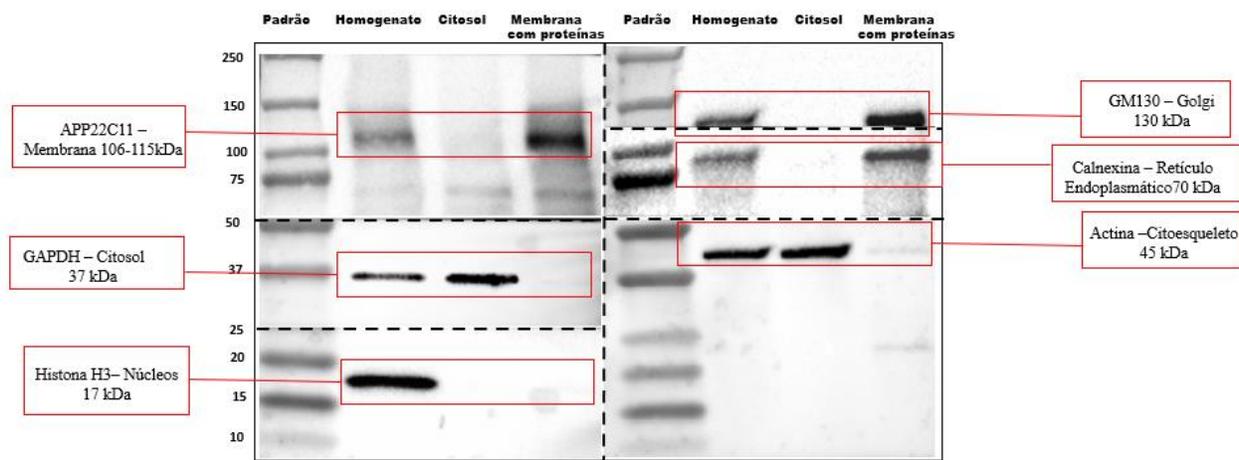


Figura 18. Imagem da membrana referente ao experimento de *Western Blotting*, mostrando a efetividade do fracionamento celular e pureza do isolamento das organelas nas frações obtidas com o protocolo 2 em células de neuroblastoma humano (SHSY5Y). O conteúdo proteico dos materiais foi aplicado em gel 7% de poliacrilamida. As proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose, coradas com *Ponceau*, incubadas em solução de bloqueio (10% de leite) e mantidas sob refrigeração *overnight* (12h) com os anticorpos primários indicados (APP22C11, Anti-GAPDH, Anti-Histona H3, GM130, Calnexina e Actina). Posteriormente foram incubadas com anticorpos secundários (*goat anti-rabbit and anti-mouse*) conjugados com HRP por 1 hora em temperatura ambiente. A revelação das bandas foi realizada utilizando o kit *Clarity Western ECL Substrate* (BioRad). As membranas foram fotografadas através do *software ImageLab – BioRad* para visualização das bandas.



Como pode ser observado nas figuras 17 e 18, com os protocolos escolhidos e adaptados, foi possível obter o fracionamento celular adequado e desejado. Da mesma forma atingimos o nível de pureza desejável para as organelas, de modo a afastar qualquer possibilidade de reatividade cruzada ou confusão na análise dos resultados.

Em decorrência da interrupção deste estudo por conta da pandemia, não foi possível concluir o ensaio de atividade enzimática planejado para as frações celulares isoladas. No entanto, outro estudo realizado por nosso grupo de pesquisa avaliou a atividade enzimática da ADAM10 no LCR, plaquetas e plasma de indivíduos com DA, TNCL e controles, mostrando que a ADAM10 encontrada no plasma e LCR foi incapaz de clivar um peptídeo fluorogênico e, portanto, mostrou-se, de fato, inativa (resultados ainda não publicados). Por outro lado, a proteína mostrou-se ativa em plaquetas e células de neuroblastoma. Embora até o momento não tenha sido possível completar estes resultados identificando a atividade enzimática da ADAM10 nas frações celulares, com base neste estudo correlato, é possível fortalecer a hipótese levantada e inferir que a ADAM10 solúvel (50 kDa), aumentada no plasma de indivíduos com TNCL, é inativa, enquanto que a ADAM10

plaquetária (60 kDa), encontrada reduzida nos mesmos participantes, é ativa, supostamente como a forma ancorada à membrana plasmática.

Até o momento a fonte de ADAM10 solúvel inativa presente no plasma não é conhecida pela literatura e é possível que seja resultado da clivagem da ADAM10 ancorada à membrana plasmática, por ação de outras ADAMs, como as ADAM9 e 15 (Tousseyn et al., 2009), já discutido anteriormente.

Como uma via alternativa de formação deve se considerar a possibilidade de um evento denominado *splicing* alternativo, conforme já discutido no capítulo anterior. Mudanças na estrutura primária da proteína original podem alterar as propriedades de ligação da mesma, influenciar sua localização celular e modificar sua atividade enzimática, desta forma, a escala das mudanças provocadas pelo *splicing* alternativo varia desde modulações sutis de função até à perda total de sua capacidade de atuação (Stamm et al., 2005). Isto se explica pois este fenômeno pode ocasionar a exclusão de domínios de ligação na estrutura da proteína ou introduzir mudanças estruturais capazes de limitar sua atividade, alterando também sua afinidade aos ligantes (Stamm et al., 2005). Outra consequência importante do evento de *splicing* alternativo envolve a localização e interação destas proteínas com a membrana plasmática. Algumas isoformas de proteínas podem perder suas propriedades de ligação à membrana (Stam et al., 2002; 2005), com isto estas isoformas solúveis podem ser liberadas da célula, por exemplo no sangue, ou se alocarem em compartimentos intercelulares diferentes.

É importante frisar que as isoformas solúveis de proteases são passíveis de perda de sua função, ou seja, quando livre da membrana plasmática a molécula pode adquirir funções diferentes, exercer efeitos negativos ou até mesmo modular a função da própria forma original (Kestler et al., 1995; Tone et al., 2001). Desta forma, por promover a formação de diferentes isoformas a partir de um mesmo produto gênico, o *splicing* alternativo indiretamente pode ser responsável por mudanças na afinidade, especificidade de substrato e propriedades catalíticas de cada nova formação (Stamm et al., 2005).

Independentemente da maneira como é formada, a ADAM10 solúvel corresponde a uma forma com massa molecular menor quando comparada à ADAM10 ativa, o que pode ocorrer devido à perda de um domínio intracelular (citoplasmático) e outro responsável por ligar a protease à membrana celular (transmembrana). Evidências científicas apontam que a ausência destes domínios pode representar forte relevância para sua atividade, uma vez que foi demonstrado que estímulos externos, como ionóforo e éster de forbol, podem modular a atividade da ADAM10, provavelmente

através de um mecanismo no qual sua região citoplasmática está envolvida (Allinson et al., 2004; Deng et al., 2014; Sanderson et al., 2005). Além disso, foi sugerido também que a ADAM10 quando ancorada à membrana, forma um homodímero, assim como a ADAM17, e este é um comportamento fundamental para sua ativação (Xu & Derynck, 2012). Deng e colaboradores (2014) mostraram que embora o domínio citoplasmático seja relevante para a atividade da protease, o mesmo se mostra intrinsecamente desordenado, e que a presença de um domínio transmembranar, vizinho, é fundamental para proporcionar ordem a esta estrutura e assim otimizar sua funcionalidade. Sahin et al. (2004) contribuíram ao apresentar que o domínio transmembranar também exerce função crucial na atividade da ADAM10 como protease. Até aqui, estes achados corroboram com a hipótese levantada no presente estudo e fortalecem a ideia de que, de fato, o desligamento da ADAM10 da membrana plasmática, com consequente perda de domínios fundamentais, possa ser responsável por sua inatividade quando solúvel.

Outras evidências científicas apontam para a importância da localização na membrana na atividade da ADAM10. O grupo de pesquisa da Profa. Elena Marcello, na UNIMI, tem identificado alguns mecanismos que regulam o tráfego intracelular e a entrega da ADAM10 à membrana. Em 2007, eles demonstraram a participação da SAP97 no tráfego da ADAM10 para a membrana celular pós-sináptica (Marcello et al., 2007). Este grupo revelou que a associação da SAP97 à ADAM10 é regulada pela fosforilação da proteína quinase C (PKC) e que esse processo é alterado no cérebro de pacientes com DA (Saraceno et al., 2014). Fato este que pode ajudar a explicar a menor disponibilidade de ADAM10 ativa na DA encontrada por Manzine et al. (2013b). Também foi demonstrado que a atividade da ADAM10 em relação à APP pode ser modulada positivamente pelo tratamento com acetil-L-carnitina (ALC) (Epis et al., 2008) e negativamente pela super expressão do miRNA 221 (Manzine et al., 2018).

Recentemente também foi apresentado que o aumento da localização sináptica da ADAM10 (na membrana plasmática), além de ser mediado via SAP97, também pode ser regulado pela ação dos oligômeros A β 1-42 via inibição da Proteína Adaptadora de Clatrina (AP2), por redução de sua endocitose (Marcello et al., 2019a).

Recentemente, Seifert e colaboradores (2020) demonstraram que a atividade da ADAM10 é criticamente necessária para sua expressão na superfície de diferentes tipos de células. Reiss & Sucharit (2017), indicaram que possivelmente o sítio de atuação da ADAM10 procure seus alvos dentro de seu raio de ação limitado. Bleibaum e colaboradores (2019) contribuíram ao verificar que a externalização transitória da fosfatidilserina na membrana plasmática, induzida pela elevação de

cálcio intracelular, desempenha um papel relevante na regulação da atividade da ADAM10 como protease, sendo assim, todos estes achados, em conjunto, demonstram a importância da localização da ADAM10, na membrana sináptica, para o adequado desempenho de sua atividade

Por fim, os resultados apresentados mostram que, de fato, a ADAM10 livre da membrana plasmática, com 50 kDa, corresponde ao tipo solúvel e inativo da proteína, e que a com 60 kDa, corresponde a forma ancorada e ativa da proteína. Além disso, todas as evidências científicas levantadas até aqui tornam os resultados apresentados congruentes com a literatura e apontam para a importância da localização membranar da ADAM10 para sua atividade como *shedase*, assim como a presença de alguns domínios fundamentais. Possivelmente a ADAM10 só possa exercer sua atividade e clivar a APP quando ambas se localizam na membrana plasmática.

Até o momento a fonte de ADAM10 solúvel inativa, presente no plasma, não é conhecida pela literatura. A hipótese mais defendida neste estudo envolve a sua formação a partir da clivagem da ADAM10 ativa na membrana plasmática. Trata-se de uma alternativa bastante coerente e provável, mas até o momento não pode ser considerada como única via de formação. Desta forma, para nos certificarmos, ensaios de espectrometria de massa da ADAM10 plasmática serão realizados em breve, em parceria com o laboratório parceiro em Milão. Com base nestes ensaios, será possível detectar e identificar a molécula de interesse por meio da medição da sua massa e caracterização de sua sequência de aminoácidos, comprovando tratar-se ou não da proteína em questão.

Nesta pesquisa algumas limitações podem ser apontadas, como a grande dificuldade em se obter idosos voluntários, a extensa gama de critérios de exclusão necessários para uma análise confiável e a interrupção do projeto adicional em virtude do quadro pandêmico. Mesmo diante das dificuldades e limitações apontadas, os resultados com a ADAM10 plasmática e plaquetária mostraram-se satisfatórios e a continuidade desta linha de pesquisa se faz necessária.

CONCLUSÃO

5. CONCLUSÃO

Este estudo mostrou que os níveis de ADAM10 estão reduzidos em plaquetas e aumentados em plasma de idosos com TNCL em comparação com os controles saudáveis, de forma independente da condição de fragilidade física. Sendo assim, foi demonstrado que a ADAM10 não pode ser considerada como biomarcadora de fragilidade cognitiva, mas que pode atuar de forma eficaz como biomarcadora para o TNCL.

O presente estudo também apresentou a padronização de protocolos de fracionamento de células de neuroblastoma humano (SH-SY5Y). Não foi possível realizar o teste de atividade enzimática nas frações celulares isoladas, porém estudos do nosso grupo de pesquisa mostraram que a forma de 50 kDa encontrada elevada no plasma de idosos com TNCL corresponde à forma inativa da proteína, e que a com 60 kDa, encontrada reduzida em plaquetas dos mesmos indivíduos, corresponde a forma ativa da mesma.

Tomados em conjunto os resultados devem contribuir para um melhor entendimento da biologia da ADAM10, bem como para implantação de ferramentas que atuem no diagnóstico de TNCL, de forma a contribuir para um planejamento mais adequado das equipes de saúde, a fim de direcionar intervenções preventivas e cuidados mais assertivos, visando a diminuição do risco de incapacidade e auxiliando na tomada de decisão, planos de ações e tratamentos.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- Allinson, T. M., Parkin, E. T., Condon, T. P., Schwager, S. L., Sturrock, E. D., Turner, A. J., & Hooper, N. M. (2004). The role of ADAM10 and ADAM17 in the ectodomain shedding of angiotensin converting enzyme and the amyloid precursor protein. *Eur J Biochem*, 271(12), 2539-2547. doi:10.1111/j.1432-1033.2004.04184.x
- Alvarenga, Márcia Regina Martins, Oliveira, Maria Amélia de Campos, Domingues, Marisa Accioly Rodrigues, Amendola, Fernanda, & Faccenda, Odival. (2011). Rede de suporte social do idoso atendido por equipes de Saúde da Família %J Ciência & Saúde Coletiva. 16, 2603-2611.
- Annamalai, B; Won, J. S; Choi, S; Singh, I; Singh, A. K. (2015). Role of S-nitrosoglutathione mediated mechanisms in tau hyper-phosphorylation. *Biochem Biophys Res Commun*, 458(1), 214-219. doi:10.1016/j.bbrc.2015.01.093
- Aprahamian I, Radanovic M, Forlenza OV. (2014). Aprahamian I, Radanovic M, Forlenza OV. In Atheneu (Ed.), *Neuropsiquiatria geriátrica* (Vol. 2ed).
- Armstrong, J. J., Stolee, P., Hirdes, J. P., & Poss, J. W. (2010). Examining three frailty conceptualizations in their ability to predict negative outcomes for home-care clients. *Age Ageing*, 39(6), 755-758. doi:10.1093/ageing/afq121
- Armstrong, N. M., Andrews, R., Gross, A. L., Varma, V. R., Xue, Q. L., & Carlson, M. C. (2020). The association of a novel cognitive frailty index and physical functioning in older at-risk adults. *Aging Ment Health*, 24(1), 129-136. doi:10.1080/13607863.2018.1531377
- Avila-Funes, J. A., Amieva, H., Barberger-Gateau, P., Le Goff, M., Raoux, N., Ritchie, K., . . . Dartigues, J. F. (2009). Cognitive impairment improves the predictive validity of the phenotype of frailty for adverse health outcomes: the three-city study. *J Am Geriatr Soc*, 57(3), 453-461. doi:10.1111/j.1532-5415.2008.02136.x
- Baghirova, Sabina, Hughes, Bryan G., Hendzel, Michael J., & Schulz, Richard. (2015). Sequential fractionation and isolation of subcellular proteins from tissue or cultured cells. *MethodsX*, 2, 440-445. doi:10.1016/j.mex.2015.11.001
- Ballard, C., Gauthier, S., Corbett, A., Brayne, C., Aarsland, D., & Jones, E. (2011). Alzheimer's disease. *Lancet*, 377(9770), 1019-1031. doi:10.1016/s0140-6736(10)61349-9
- Baylis, D., Bartlett, D. B., Syddall, H. E., Ntani, G., Gale, C. R., Cooper, C., . . . Sayer, A. A. (2013). Immune-endocrine biomarkers as predictors of frailty and mortality: a 10-year longitudinal study in community-dwelling older people. *Age (Dordr)*, 35(3), 963-971. doi:10.1007/s11357-012-9396-8
- Beales, David L., & Tulloch, Alistair J. (2013). Community care of vulnerable older people: cause for concern. *The British journal of general practice : the journal of the Royal College of General Practitioners*, 63(615), 549-550. doi:10.3399/bjgp13X673892
- Beeri, M. S., Schmeidler, J., Sano, M., Wang, J., Lally, R., Grossman, H., & Silverman, J. M. (2006). Age, gender, and education norms on the CERAD neuropsychological battery in the oldest old. *Neurology*, 67(6), 1006-1010. doi:10.1212/01.wnl.0000237548.15734.cd

Bleibaum, F., Sommer, A., Veit, M., Rabe, B., Andrä, J., Kunzelmann, K., . . . Reiss, K. (2019). ADAM10 sheddase activation is controlled by cell membrane asymmetry. *J Mol Cell Biol*, *11*(11), 979-993. doi:10.1093/jmcb/mjz008

Blennow, K., & Zetterberg, H. (2018). The Past and the Future of Alzheimer's Disease Fluid Biomarkers. *J Alzheimers Dis*, *62*(3), 1125-1140. doi:10.3233/jad-170773

Borim, Flávia Silva Arbex, Francisco, Priscila Maria Stolses Bergamo, & Neri, Anita Liberalesso. (2017). Sociodemographic and health factors associated with mortality in community-dwelling elderly %J Revista de Saúde Pública. *51*.

Boyle, P.A, Buchman, A.S, Wilson, R.S, Leurgans, S.E, & Bennett, D.A. (2010). Physical frailty is associated with incident mild cognitive impairment in community - based older persons. *Am Geriatr Soc*.

Brinker, T., Stopa, E., Morrison, J., & Klinge, P. (2014). A new look at cerebrospinal fluid circulation. *Fluids Barriers CNS*, *11*, 10. doi:10.1186/2045-8118-11-10

Brummer, Tobias, Müller, Stephan A., Pan-Montojo, Francisco, Yoshida, Fumiaki, Fellgiebel, Andreas, Tomita, Taisuke, . . . Lichtenthaler, Stefan F. (2019). NrCAM is a marker for substrate-selective activation of ADAM10 in Alzheimer's disease. *EMBO Molecular Medicine*, *11*(4), e9695. doi:10.15252/emmm.201809695

Buchman, Aron S., Yu, Lei, Wilson, Robert S., Boyle, Patricia A., Schneider, Julie A., Bennett, David A., & Kritchevsky, Stephen. (2014). Brain Pathology Contributes to Simultaneous Change in Physical Frailty and Cognition in Old Age. *The Journals of Gerontology: Series A*, *69*(12), 1536-1544. doi:10.1093/gerona/glu117 %J The Journals of Gerontology: Series A

Califf, Robert M. (2018). Biomarker definitions and their applications. *Experimental biology and medicine (Maywood, N.J.)*, *243*(3), 213-221. doi:10.1177/1535370217750088

Calvani, Riccardo, Marini, Federico, Cesari, Matteo, Tosato, Matteo, Anker, Stefan D., von Haehling, Stephan, . . . consortium, Sprintt. (2015). Biomarkers for physical frailty and sarcopenia: state of the science and future developments. *Journal of cachexia, sarcopenia and muscle*, *6*(4), 278-286. doi:10.1002/jcsm.12051

Campbell, N. L., Unverzagt, F., LaMantia, M. A., Khan, B. A., & Boustani, M. A. (2013). Risk factors for the progression of mild cognitive impairment to dementia. *Clin Geriatr Med*, *29*(4), 873-893. doi:10.1016/j.cger.2013.07.009

Canevelli, M., & Cesari, M. (2017). Cognitive Frailty: Far From Clinical and Research Adoption. *J Am Med Dir Assoc*, *18*(10), 816-818. doi:10.1016/j.jamda.2017.07.004

Canevelli, Marco, Cesari, Matteo, & van Kan, Gabor Abellan. (2015). Frailty and cognitive decline: how do they relate? , *18*(1), 43-50. doi:10.1097/mco.0000000000000133

Carneiro, Jair Almeida, & Caldeira, Rafael Rodrigues Cardoso; Meiriellen Silva Durães; Maria Clara Araújo Guedes; Frederico Leão Santos; Fernanda Marques da Costa; Antônio Prates. (2017). Frailty in the elderly: prevalence and associated factors *Rev Bras Enferm. REBEn*.

Carvalho, Viviane Amaral, & Caramelli, Paulo. (2007). Brazilian adaptation of the Addenbrooke's Cognitive Examination-Revised (ACE-R) %J *Dementia & Neuropsychologia*. 1, 212-216.

Castel, A., Lluch, C., Ribas, J., Borràs, L., & Moltó, E. (2017). Effects of a cognitive stimulation program on psychological well-being in a sample of elderly long-term care hospital inpatients. *Aging Ment Health*, 21(1), 88-94. doi:10.1080/13607863.2015.1099033

César, Karolina G., Yassuda, Mônica S., Porto, Fabio H. G., Brucki, Sonia M. D., & Nitrini, Ricardo. (2017). Addenbrooke's cognitive examination-revised: normative and accuracy data for seniors with heterogeneous educational level in Brazil. *Int Psychogeriatr*, 29(8), 1345-1353. doi:10.1017/S1041610217000734

Charchat-Fichman, Helenice, Caramelli, Paulo, Sameshima, Koichi, & Nitrini, Ricardo. (2005). Declínio da capacidade cognitiva durante o envelhecimento %J *Brazilian Journal of Psychiatry*. 27, 79-82.

Chen, Caoyi, Gu, Jianlan, Basurto-Islas, Gustavo, Jin, Nana, Wu, Feng, Gong, Cheng-Xin, . . . Liu, Fei. (2017). Up-regulation of casein kinase 1 ϵ is involved in tau pathogenesis in Alzheimer's disease. *Scientific Reports*, 7(1), 13478. doi:10.1038/s41598-017-13791-5

Chen, Guo-fang; Xu, Ting-hai; Yan, Yan; Zhou, Yu-ren; Jiang, Yi; Melcher, Karsten; Xu, H. Eric. (2017b). Amyloid beta: structure, biology and structure-based therapeutic development. *Acta Pharmacologica Sinica*, 38(9), 1205-1235. doi:10.1038/aps.2017.28

Cheng, Yu-Wen, Chen, Ta-Fu, & Chiu, Ming-Jang. (2017). From mild cognitive impairment to subjective cognitive decline: conceptual and methodological evolution. *Neuropsychiatric disease and treatment*, 13, 491-498. doi:10.2147/NDT.S123428

Chouliara, Z., Kearney, N., Stott, D., Molassiotis, A., & Miller, M. (2004). Perceptions of older people with cancer of information, decision making and treatment: a systematic review of selected literature. *Ann Oncol*, 15(11), 1596-1602. doi:10.1093/annonc/mdh423

Cissé, M. A., Sunyach, C., Lefranc-Jullien, S., Postina, R., Vincent, B., & Checler, F. (2005). The disintegrin ADAM9 indirectly contributes to the physiological processing of cellular prion by modulating ADAM10 activity. *The Journal of biological chemistry*, 280(49), 40624-40631. doi:10.1074/jbc.M506069200

Coelho, F. M., Pereira, D. S., Lustosa, L. P., Silva, J. P., Dias, J. M., Dias, R. C., . . . Pereira, L. S. (2012). Physical therapy intervention (PTI) increases plasma brain-derived neurotrophic factor (BDNF) levels in non-frail and pre-frail elderly women. *Arch Gerontol Geriatr*, 54(3), 415-420. doi:10.1016/j.archger.2011.05.014

Colciaghi, & F; Borroni, B; Pastorino, L; Marcello, E; Zimmermann, M; Cattabeni, F; Padovani, A; Di Luca, M. (2002). [alpha]-Secretase ADAM10 as well as [alpha]APPs is reduced in platelets and CSF of Alzheimer disease patients. *Mol Med*, 8(2), 67-74.

Colciaghi, Francesca, Borroni, Barbara, Pastorino, Lucia, Marcello, Elena, Zimmermann, Martina, Cattabeni, Flaminio, . . . Di Luca, Monica. (2002). α -Secretase ADAM10 as Well as α APPs Is

Reduced in Platelets and CSF of Alzheimer Disease Patients. *Molecular Medicine*, 8(2), 67-74. doi:10.1007/BF03402076

Cole, Sarah L., & Vassar, Robert. (2007). The Alzheimer's disease beta-secretase enzyme, BACE1. *Molecular neurodegeneration*, 2, 22-22. doi:10.1186/1750-1326-2-22

Cruz, Danielle Teles da, Vieira, Marcel de Toledo, Bastos, Ronaldo Rocha, & Leite, Isabel Cristina Gonçalves. (2017). Factors associated with frailty in a community-dwelling population of older adults %J Revista de Saúde Pública. 51.

Drachman, Jonathan G. Inherited thrombocytopenia: when a low platelet count does not mean ITP. *Blood* (2004) 103 (2): 390–398. <https://doi.org/10.1182/blood-2003-05-1742>

Oliveira, T. R., Erbereli, C. R., Manzine, P. R., Magalhães, T. N. C., Balthazar, M. L. F., Cominetti, M. R., & Faria, R. C. (2020). Early Diagnosis of Alzheimer's Disease in Blood Using a Disposable Electrochemical Microfluidic Platform. *ACS Sens*, 5(4), 1010-1019. doi:10.1021/acssensors.9b02463

Del Duca, Giovâni Firpo; Silva, Shana Ginar da; Thumé, Elaine; Santos, Iná S; Hallal, Pedro C. (2012). Predictive factors for institutionalization of the elderly: a case-control study / Indicadores de la institucionalización de ancianos: estudio de casos y controles. *Rev. saúde pública*.

Deng, Wei, Cho, Sungyun, Su, Pin-Chuan, Berger, Bryan W., & Li, Renhao. (2014). Membrane-enabled dimerization of the intrinsically disordered cytoplasmic domain of ADAM10. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(45), 15987-15992. doi:10.1073/pnas.1409354111

Di Luca, M; Colciaghi, F; Pastorino, L; Borroni, B; Padovani, A; Cattabeni, F. (2000). Platelets as a peripheral district where to study pathogenetic mechanisms of alzheimer disease: the case of amyloid precursor protein. *Eur J Pharmacol*, 405(1-3), 277-283. doi:10.1016/s0014-2999(00)00559-8

Doherty, Carolynne M., & Forbes, Raeburn B. (2014). Diagnostic Lumbar Puncture. *The Ulster medical journal*, 83(2), 93-102.

Dornier, Emmanuel, Coumailleau, Franck, Ottavi, Jean-François, Moretti, Julien, Boucheix, Claude, Mauduit, Philippe, . . . Rubinstein, Eric. (2012). TspanC8 tetraspanins regulate ADAM10/Kuzbanian trafficking and promote Notch activation in flies and mammals. *J Cell Biol*, 199(3), 481-496. doi:10.1083/jcb.201201133

Dreymueller, Daniela, Uhlig, Stefan, & Ludwig, Andreas. (2015). ADAM-family metalloproteinases in lung inflammation: potential therapeutic targets. 308(4), L325-L343. doi:10.1152/ajplung.00294.2014

Duarte, Yeda Aparecida de Oliveira. (2009). Indicadores de fragilidade em pessoas idosas visando o estabelecimento de medidas preventivas %J BIS. Boletim do Instituto de Saúde (Impresso). 49-52.

Dugger, Brittany N., Davis, Kathryn, Malek-Ahmadi, Michael, Hentz, Joseph G., Sandhu, Shawn, Beach, Thomas G., . . . Sabbagh, Marwan N. (2015). Neuropathological comparisons of amnestic

and nonamnesic mild cognitive impairment. *BMC Neurology*, 15(1), 146. doi:10.1186/s12883-015-0403-4

Eaton, S. L., Roche, S. L., Llavero Hurtado, M., Oldknow, K. J., Farquharson, C., Gillingwater, T. H., & Wishart, T. M. (2013). Total protein analysis as a reliable loading control for quantitative fluorescent Western blotting. *PLoS One*, 8(8), e72457. doi:10.1371/journal.pone.0072457

Ebsen, H; Lettau, M; Kabelitz, D; Janssen, O. (2014). Identification of SH3 domain proteins interacting with the cytoplasmic tail of the α disintegrin and metalloprotease 10 (ADAM10). *PLoS One*, 9(7), e102899. doi:10.1371/journal.pone.0102899

Ebsen, Henriette, Schröder, Alexandra, Kabelitz, Dieter, & Janssen, Ottmar. (2013). Differential Surface Expression of ADAM10 and ADAM17 on Human T Lymphocytes and Tumor Cells. *PLoS One*, 8(10), e76853. doi:10.1371/journal.pone.0076853

Endres, K., & Fahrenholz, F. (2012). The Role of the anti-amyloidogenic secretase ADAM10 in shedding the APP-like proteins. *Curr Alzheimer Res*, 9(2), 157-164. doi:10.2174/156720512799361664

Endres, Kristina, & Deller, Thomas. (2017). Regulation of Alpha-Secretase ADAM10 In vitro and In vivo: Genetic, Epigenetic, and Protein-Based Mechanisms. *10(56)*. doi:10.3389/fnmol.2017.00056

Epis, R., Marcello, E., Gardoni, F., Longhi, A., Calvani, M., Iannuccelli, M., . . . Di Luca, M. (2008). Modulatory effect of acetyl-L-carnitine on amyloid precursor protein metabolism in hippocampal neurons. *Eur J Pharmacol*, 597(1-3), 51-56. doi:10.1016/j.ejphar.2008.09.001

Evin, G; Zhu, A; Holsinger, R; Masters, C. L; Li, Q. X. (2003). Proteolytic processing of the Alzheimer's disease amyloid precursor protein in brain and platelets. *J Neurosci Res*, 74(3), 386-392. doi:10.1002/jnr.10745

Facal, David, Maseda, Ana, Pereiro, Arturo X., Gandoy-Crego, Manuel, Lorenzo-López, Laura, Yanguas, Javier, & Millán-Calenti, José C. (2019). Cognitive frailty: A conceptual systematic review and an operational proposal for future research. *Maturitas*, 121, 48-56. doi:

Fahrenholz, Falk. (2010). 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*, 32(8), 1245-1245. doi:10.1111/j.1460-9568.2010.07461.x

Falcon, Benjamin, Zhang, Wenjuan, Murzin, Alexey G., Murshudov, Garib, Garringer, Holly J., Vidal, Ruben, . . . Goedert, Michel. (2018). Structures of filaments from Pick's disease reveal a novel tau protein fold. *Nature*, 561(7721), 137-140. doi:10.1038/s41586-018-0454-y

Ferrucci, L., Guralnik, J. M., Studenski, S., Fried, L. P., Cutler, G. B., Jr., & Walston, J. D. (2004). Designing randomized, controlled trials aimed at preventing or delaying functional decline and disability in frail, older persons: a consensus report. *J Am Geriatr Soc*, 52(4), 625-634. doi:10.1111/j.1532-5415.2004.52174.x

Ferrucci, Luigi, & Fabbri, Elisa. (2018). Inflammaging: chronic inflammation in ageing, cardiovascular disease, and frailty. *Nature reviews. Cardiology*, 15(9), 505-522. doi:10.1038/s41569-018-0064-2

Fluetti, Marina Tadini, Fhon, Jack Roberto Silva, Oliveira, Ana Paula de, Chiquito, Larissa Martins Ortega, & Marques, Sueli. (2018). The frailty syndrome in institutionalized elderly persons. [Síndrome da fragilidade em idosos institucionalizados]. *Rev. bras. geriatr. gerontol. (Online)*, 21(1), 60-69.

Forlenza, Orestes V. (2005). Tratamento farmacológico da doença de Alzheimer %J *Archives of Clinical Psychiatry (São Paulo)*. 32, 137-148.

Forlenza, Orestes V., Diniz, Breno S., Stella, Florindo, Teixeira, Antonio L., & Gattaz, Wagner F. (2013). Mild cognitive impairment (part 1): clinical characteristics and predictors of dementia %J *Brazilian Journal of Psychiatry*. 35, 178-185.

Forlenza, Orestes V., Diniz, Breno S., Teixeira, Antonio L., Stella, Florindo, & Gattaz, Wagner. (2013). Mild cognitive impairment (part 2): biological markers for diagnosis and prediction of dementia in Alzheimer's disease %J *Brazilian Journal of Psychiatry*. 35, 284-294.

Frank, R. A., Galasko, D., Hampel, H., Hardy, J., de Leon, M. J., Mehta, P. D., . . . Trojanowski, J. Q. (2003). Biological markers for therapeutic trials in Alzheimer's disease. Proceedings of the biological markers working group; NIA initiative on neuroimaging in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*, 24(4), 521-536. doi:10.1016/s0197-4580(03)00002-2

Fried L.P., & Tangen, C. M; Walston, J; Newman, A. B; Hirsch, C; Gottdiener, J; Seeman, T; Tracy, R; Kop, W. J; Burke, G; McBurnie, M. A. (2001). Frailty in older adults: evidence for a phenotype. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 56(3), M146-156. doi:10.1093/gerona/56.3.m146

Fried, L.P.; Walston, J. (1999). Frailty and failure to thrive. Principles of geriatric medicine and Gerontology. *New York: MacGraw-Hill. Chapter 109, p.1387-1402. 4th ed.*

Fried; L.P., & Walston, J. . (2003). Frailty and failure to thrive. In: Hazzard WR, Blass JP, Ettinger WH, Halter JB, Ouslander JG (eds) Principles of geriatric medicine and gerontology. . *Five Edition. New York: McGraw Hill; 5: 1487-502.*

Golde, T. E. (2006). Disease modifying therapy for AD? *J Neurochem*, 99(3), 689-707. doi:10.1111/j.1471-4159.2006.04211.x

Gross, Carolina Baldissera, Kolankiewicz, Adriane Cristina Bernat, Schmidt, Catielle Raquel, & Berlezi, Evelise Moraes. (2018). Níveis de fragilidade de idosos e sua associação com as características sociodemográficas %J *Acta Paulista de Enfermagem*. 31, 209-216.

Gu, L., Liu, C., & Guo, Z. (2013). Structural insights into A β 2 oligomers using site-directed spin labeling. *The Journal of biological chemistry*, 288(26), 18673-18683. doi:10.1074/jbc.M113.457739

Haining, Elizabeth J., Yang, Jing, Bailey, Rebecca L., Khan, Kabir, Collier, Richard, Tsai, Schickwann, . . . Tomlinson, Michael G. (2012). The TspanC8 subgroup of tetraspanins interacts with A disintegrin and metalloprotease 10 (ADAM10) and regulates its maturation and cell surface

expression. *The Journal of biological chemistry*, 287(47), 39753-39765. doi:10.1074/jbc.M112.416503

Halil, M., Cemal Kizilarlanoglu, M., Emin Kuyumcu, M., Yesil, Y., & Cruz Jentoft, A. J. (2015). Cognitive aspects of frailty: mechanisms behind the link between frailty and cognitive impairment. *J Nutr Health Aging*, 19(3), 276-283. doi:10.1007/s12603-014-0535-z

Han, E.S., & Kim, Y. Lee; J. (2014). Association of cognitive impairment with frailty in community-dwelling older adults. *Int Psychogeriatr*.

Hayden, E. Y. (2016). Alzheimer's treatment appears to alleviate memory loss in small trial. *Nature*.

He, Q., Li, Q., Zhao, J., Wu, T., Ji, L., Huang, G., & Ma, F. (2016). Relationship between plasma lipids and mild cognitive impairment in the elderly Chinese: a case-control study. *Lipids Health Dis*, 15(1), 146. doi:10.1186/s12944-016-0320-6

Heringa, S. M., van den Berg, E., Reijmer, Y. D., Nijpels, G., Stehouwer, C. D., Schalkwijk, C. G., . . . Biessels, G. J. (2014). Markers of low-grade inflammation and endothelial dysfunction are related to reduced information processing speed and executive functioning in an older population - the Hoorn Study. *Psychoneuroendocrinology*, 40, 108-118. doi:10.1016/j.psyneuen.2013.11.011

Herukka, S. K., Simonsen, A. H., Andreasen, N., Baldeiras, I., Bjerke, M., Blennow, K., . . . Waldemar, G. (2017). Recommendations for cerebrospinal fluid Alzheimer's disease biomarkers in the diagnostic evaluation of mild cognitive impairment. *Alzheimers Dement*, 13(3), 285-295. doi:10.1016/j.jalz.2016.09.009

Huey, E. D., Manly, J. J., Tang, M. X., Schupf, N., Brickman, A. M., Manoochehri, M., . . . Mayeux, R. (2013). Course and etiology of dysexecutive MCI in a community sample. *Alzheimers Dement*, 9(6), 632-639. doi:10.1016/j.jalz.2012.10.014

Hughes, C. P., Berg, L., Danziger, W. L., Coben, L. A., & Martin, R. L. (1982). A new clinical scale for the staging of dementia. *Br J Psychiatry*, 140, 566-572. doi:10.1192/bjp.140.6.566

IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística-. (2011). SP/São Carlos informações completas. , *Rio de Janeiro*.

Inglés, M., Serra-Añó, P., Gambini, J., Abu-Sharif, F., Dromant, M., Garcia-Valles, R., . . . Gomez-Cabrera, M. C. (2016). Active paraplegics are protected against exercise-induced oxidative damage through the induction of antioxidant enzymes. *Spinal Cord*, 54(10), 830-837. doi:10.1038/sc.2016.5

Jacobs, J. M., Cohen, A., Ein-Mor, E., Maaravi, Y., & Stessman, J. (2011). Frailty, cognitive impairment and mortality among the oldest old. *J Nutr Health Aging*, 15(8), 678-682. doi:10.1007/s12603-011-0096-3

Jessen, Frank, Amariglio, Rebecca E., van Boxtel, Martin, Breteler, Monique, Ceccaldi, Mathieu, Chételat, Gaël, . . . Subjective Cognitive Decline Initiative Working, Group. (2014). A conceptual framework for research on subjective cognitive decline in preclinical Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement*, 10(6), 844-852. doi:10.1016/j.jalz.2014.01.001

Jesus, Isabela Thais Machado de, Orlandi, Ariene Angelini dos Santos, Grazziano, Eliane da Silva, & Zazzetta, Marisa Silvana. (2017). Fragilidade de idosos em vulnerabilidade social %J Acta Paulista de Enfermagem. 30, 614-620.

Jorissen, Ellen, Prox, Johannes, Bernreuther, Christian, Weber, Silvio, Schwanbeck, Ralf, Serneels, Lutgarde, . . . Saftig, Paul. (2010). The disintegrin/metalloproteinase ADAM10 is essential for the establishment of the brain cortex. *J Neurosci*, 30(14), 4833-4844. doi:10.1523/JNEUROSCI.5221-09.2010

Jouannet, S., Saint-Pol, J., Fernandez, L., Nguyen, V., Charrin, S., Boucheix, C., . . . Rubinstein, E. (2016). TspanC8 tetraspanins differentially regulate the cleavage of ADAM10 substrates, Notch activation and ADAM10 membrane compartmentalization. *Cell Mol Life Sci*, 73(9), 1895-1915. doi:10.1007/s00018-015-2111-z

Kelaiditi, E., Cesari, M., Canevelli, M., van Kan, G. A., Ousset, P. J., Gillette-Guyonnet, S., . . . Vellas, B. (2013). Cognitive frailty: rational and definition from an (I.A.N.A./I.A.G.G.) international consensus group. *J Nutr Health Aging*, 17(9), 726-734. doi:10.1007/s12603-013-0367-2

Kelley, B. J., & Petersen, R. C. (2007). Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Neurol Clin*, 25(3), 577-609, v. doi:10.1016/j.ncl.2007.03.008

Kestler, DP, Agarwal, S, Cobb, J, Goldstein, KM, & Hall, RE. (1995). Detection and analysis of an alternatively spliced isoform of interleukin-6 mRNA in peripheral blood mononuclear cells. *Blood*, 86(12), 4559-4567. doi:10.1182/blood.V86.12.4559.bloodjournal86124559 %J Blood

Khan, Shahzad S., & Bloom, George S. (2016). Tau: The Center of a Signaling Nexus in Alzheimer's Disease. *Frontiers in neuroscience*, 10, 31-31. doi:10.3389/fnins.2016.00031

Kim, Young-Jung, Yoo, Ji-Young, Kim, Ok-Soon, Kim, Han-byeol, Ryu, Junghwa, Kim, Hye-Sun, . . . Woo, Ran-Sook. (2018). Neuregulin 1 regulates amyloid precursor protein cell surface expression and non-amyloidogenic processing. *Journal of Pharmacological Sciences*, 137(2), 146-

Kobrosly, R. W., Seplaki, C. L., Jones, C. M., & van Wijngaarden, E. (2012). Physiologic dysfunction scores and cognitive function test performance in U.S. adults. *Psychosom Med*, 74(1), 81-88. doi:10.1097/PSY.0b013e3182385b1e

Kumar, R., Chaterjee, P., Sharma, P. K., Singh, A. K., Gupta, A., Gill, K., . . . Dey, S. (2013). Sirtuin1: a promising serum protein marker for early detection of Alzheimer's disease. *PLoS One*, 8(4), e61560. doi:10.1371/journal.pone.0061560

LaFerla, F. M., Green, K. N., & Oddo, S. (2007). Intracellular amyloid-beta in Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci*, 8(7), 499-509. doi:10.1038/nrn2168

Lee, Jiyeon, Retamal, Claudio, Cuitiño, Loreto, Caruano-Yzermans, Amy, Shin, Jung-Eun, van Kerkhof, Peter, . . . Bu, Guojun. (2008). Adaptor protein sorting nexin 17 regulates amyloid precursor protein trafficking and processing in the early endosomes. *The Journal of biological chemistry*, 283(17), 11501-11508. doi:10.1074/jbc.M800642200

Lenard M.H; Sousa J.R; Carneiro N.H.K; Betiolli S.E; Ribeiro D.K.M.N. Atividade física de idosos e fatores associados à pré-fragilidade. Acta Paul Enferm. 2013; 26(3):269-75.

Lesko, L. J., & Atkinson, A. J., Jr. (2001). Use of biomarkers and surrogate endpoints in drug development and regulatory decision making: criteria, validation, strategies. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 41, 347-366. doi:10.1146/annurev.pharmtox.41.1.347

Lichtenthaler, S. F. (2011). alpha-secretase in Alzheimer's disease: molecular identity, regulation and therapeutic potential. *J Neurochem*, 116(1), 10-21. doi:10.1111/j.1471-4159.2010.07081.x

Liu, C. K., Lyass, A., Massaro, J. M., D'Agostino, R. B., Sr., Fox, C. S., & Murabito, J. M. (2014). Chronic kidney disease defined by cystatin C predicts mobility disability and changes in gait speed: the Framingham Offspring Study. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 69(3), 301-307. doi:10.1093/gerona/glt096

Losa-Reyna, J., Baltasar-Fernandez, I., Alcazar, J., Navarro-Cruz, R., Garcia-Garcia, F. J., Alegre, L. M., & Alfaro-Acha, A. (2019). Effect of a short multicomponent exercise intervention focused on muscle power in frail and pre frail elderly: A pilot trial. *Exp Gerontol*, 115, 114-121. doi:10.1016/j.exger.2018.11.022

Lourenço, R. A. . (2008). A síndrome de fragilidade no Idoso: marcadores clínicos e biológicos. *Revista do Hospital Universitário Pedro Ernesto*.

Lozano-Montoya, I., Correa-Pérez, A., Abraha, I., Soiza, R. L., Cherubini, A., O'Mahony, D., & Cruz-Jentoft, A. J. (2017). Nonpharmacological interventions to treat physical frailty and sarcopenia in older patients: a systematic overview - the SENATOR Project ONTOP Series. *Clinical interventions in aging*, 12, 721-740. doi:10.2147/cia.S132496

Luck, T., Riedel-Heller, S. G., Kaduszkiewicz, H., Bickel, H., Jessen, F., Pentzek, M., . . . Weyerer, S. (2007). Mild cognitive impairment in general practice: age-specific prevalence and correlate results from the German study on ageing, cognition and dementia in primary care patients (AgeCoDe). *Dement Geriatr Cogn Disord*, 24(4), 307-316. doi:10.1159/000108099

Lundgren, Jolanta L., Vandermeulen, Lina, Sandebring-Matton, Anna, Ahmed, Saheeb, Winblad, Bengt, Di Luca, Monica, . . . Frykman, Susanne. (2020). Proximity ligation assay reveals both pre- and postsynaptic localization of the APP-processing enzymes ADAM10 and BACE1 in rat and human adult brain. *BMC neuroscience*, 21(1), 6-6. doi:10.1186/s12868-020-0554-0

Macedo Montaña, Maria Beatriz M, & Ramos, Luiz Roberto. (2005). Validade da versão em português da Clinical Dementia Rating %J Revista de Saúde Pública. 39, 912-917.

Malmstrom, T. K., & Morley, J. E. (2013). The frail brain. *J Am Med Dir Assoc*, 14(7), 453-455. doi:10.1016/j.jamda.2013.04.010

Malta, Monica, Cardoso, Leticia Oliveira, Bastos, Francisco Inacio, Magnanini, Monica Maria Ferreira, & Silva, Cosme Marcelo Furtado Passos da. (2010). Iniciativa STROBE: subsídios para a comunicação de estudos observacionais %J Revista de Saúde Pública. 44, 559-565.

Manzine, P. R., Barham, E. J., Vale, F. A., Selistre-de-Araújo, H. S., Pavarini, S. C., & Cominetti, M. R. (2014). Platelet a disintegrin and metallopeptidase 10 expression correlates with clock

drawing test scores in Alzheimer's disease. *Int J Geriatr Psychiatry*, 29(4), 414-420. doi:10.1002/gps.4020

Manzine, P. R., Barham, E. J., Vale Fde, A., Selistre-de-Araujo, H. S., Iost Pavarini, S. C., & Cominetti, M. R. (2013a). Correlation between mini-mental state examination and platelet ADAM10 expression in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*, 36(2), 253-260. doi:10.3233/jad-130125

Manzine, P. R., Marcello, E., Borroni, B., Kamphuis, W., Hol, E., Padovani, A., . . . Cominetti, M. R. (2015). ADAM10 gene expression in the blood cells of Alzheimer's disease patients and mild cognitive impairment subjects. *Biomarkers*, 20(3), 196-201. doi:10.3109/1354750x.2015.1062554

Manzine, P. R., Pelucchi, S., Horst, M. A., Vale, F. A. C., Pavarini, S. C. I., Audano, M., . . . Cominetti, M. R. (2018). microRNA 221 Targets ADAM10 mRNA and is Downregulated in Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis*, 61(1), 113-123. doi:10.3233/jad-170592

Manzine, P. R., Vatanabe, I. P., Peron, R., Grigoli, M. M., Pedroso, R. V., Nascimento, C. M. C., & Cominetti, M. R. (2020). Blood-based Biomarkers of Alzheimer's Disease: The Long and Winding Road. *Curr Pharm Des*, 26(12), 1300-1315. doi:10.2174/1381612826666200114105515

Manzine, P. R.; de França Bram, J. M; Barham, E. J; do Vale Fde, A; Selistre-de-Araújo, H. S; Cominetti, M. R; Iost Pavarini, S. C. (2013b). ADAM10 as a biomarker for Alzheimer's disease: a study with Brazilian elderly. *Dement Geriatr Cogn Disord*, 35(1-2), 58-66. doi:10.1159/000345983

Manzine; Patrícia Regina; Barham, Elisabeth Joan; Vale, Francisco de Assis Carvalho do; Selistre-de-Araújo, Heloisa Sobreiro; Iost Pavarini, Sofia Cristina; Cominetti, Márcia Regina. (2013a). Correlation Between Mini-Mental State Examination and Platelet ADAM10 Expression in Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, 36, 253-260. doi:10.3233/JAD-130125

Marcello, E., Borroni, B., Pelucchi, S., Gardoni, F., & Di Luca, M. (2017). ADAM10 as a therapeutic target for brain diseases: from developmental disorders to Alzheimer's disease. *Expert Opin Ther Targets*, 21(11), 1017-1026. doi:10.1080/14728222.2017.1386176

Marcello, E., Gardoni, F., Mauceri, D., Romorini, S., Jeromin, A., Epis, R., . . . Di Luca, M. (2007). Synapse-associated protein-97 mediates alpha-secretase ADAM10 trafficking and promotes its activity. *J Neurosci*, 27(7), 1682-1691. doi:10.1523/jneurosci.3439-06.2007

Marcello, E., Musardo, S., Vandermeulen, L., Pelucchi, S., Gardoni, F., Santo, N., . . . Di Luca, M. (2019a). Amyloid-beta Oligomers Regulate ADAM10 Synaptic Localization Through Aberrant Plasticity Phenomena. *Mol Neurobiol*. doi:10.1007/s12035-019-1583-5

Marcello, E., Musardo, S., Vandermeulen, L., Pelucchi, S., Gardoni, F., Santo, N., . . . Di Luca, M. (2019b). Amyloid- β Oligomers Regulate ADAM10 Synaptic Localization Through Aberrant Plasticity Phenomena. *Molecular neurobiology*, 56(10), 7136-7143. doi:10.1007/s12035-019-1583-

Marcello, Elena, Gardoni, Fabrizio, Mauceri, Daniela, Romorini, Stefano, Jeromin, Andreas, Epis, Roberta, . . . Di Luca, Monica. (2007). Synapse-Associated Protein-97 Mediates α -Secretase ADAM10 Trafficking and Promotes Its Activity. 27(7), 1682-1691. doi:10.1523/JNEUROSCI.3439-06.2007 %J The Journal of Neuroscience

Maretzky, T., Evers, A., Le Gall, S., Alabi, R. O., Speck, N., Reiss, K., & Blobel, C. P. (2015). The cytoplasmic domain of a disintegrin and metalloproteinase 10 (ADAM10) regulates its constitutive activity but is dispensable for stimulated ADAM10-dependent shedding. *The Journal of biological chemistry*, 290(12), 7416-7425. doi:10.1074/jbc.M114.603753

Martelli, Anderson Martelli; Fabiana Palermo. (2014). Brain Changes and Histopathological Analysis of Neurofibrillary Tangles in Alzheimer's Disease. *UNICIÊNCIAS*.

Mathuranath, P. S; Nestor, P. J; Berrios, G. E; Rakowicz, W; Hodges, J. R. (2000). A brief cognitive test battery to differentiate Alzheimer's disease and frontotemporal dementia. *Neurology*, 55(11), 1613-1620. doi:10.1212/01.wnl.0000434309.85312.19

Matos, Robson Kleber de Souza, & Vieira, Luciana Leila Fontes. (2014). Fazer viver e deixar morrer: a velhice na era do biopoder %J Psicologia: Ciência e Profissão. 34, 196-213.

Merkwirth, C., Martinelli, P., Korwitz, A., Morbin, M., Brönneke, H. S., Jordan, S. D., . . . Langer, T. (2012). Loss of prohibitin membrane scaffolds impairs mitochondrial architecture and leads to tau hyperphosphorylation and neurodegeneration. *PLoS Genet*, 8(11), e1003021. doi:10.1371/journal.pgen.1003021

Mitnitski, A. B., Mogilner, A. J., & Rockwood, K. (2001). Accumulation of deficits as a proxy measure of aging. *TheScientificWorldJournal*, 1, 323-336.

Montero-Odasso, M. M., Barnes, B., Speechley, M., Muir Hunter, S. W., Doherty, T. J., Duque, G., . . . Wells, J. L. (2016). Disentangling Cognitive-Frailty: Results From the Gait and Brain Study. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 71(11), 1476-1482. doi:10.1093/gerona/glw044

Moraes, Mariana Bordinhon de, Araujo, Carolina Fumico Massuda, Avgerinou, Christina, & Vidal, Edison Iglesias de Oliveira. (2018). Nutritional interventions for the treatment of frailty in older adults: a systematic review protocol. *Medicine*, 97(52), e13773-e13773. doi:10.1097/MD.00000000000013773

Morley, John E., Vellas, Bruno, Abellan van Kan, G., Anker, Stefan D., Bauer, Juergen M., Bernabei, Roberto, . . . Walston, Jeremy. (2013). Frailty Consensus: A Call to Action. *J Am Med Dir Assoc*, 14(6), 392-397.

Morris, John C. (1993). The Clinical Dementia Rating (CDR). *Current version and scoring rules*, 43(11), 2412-2412-a. doi:10.1212/WNL.43.11.2412-a %J Neurology

Moss, Marcia L., Powell, Gary, Miller, Miles A., Edwards, Lori, Qi, Bin, Sang, Qing-Xiang Amy, . . . Bartsch, Jörg W. (2011). ADAM9 inhibition increases membrane activity of ADAM10 and controls α -secretase processing of amyloid precursor protein. *The Journal of biological chemistry*, 286(47), 40443-40451. doi:10.1074/jbc.M111.280495

Neri, A. L., Yassuda, M. S., Araújo, L. F., Eulálio Mdo, C., Cabral, B. E., Siqueira, M. E., . . . Moura, J. G. (2013). [Methodology and social, demographic, cognitive, and frailty profiles of community-dwelling elderly from seven Brazilian cities: the FIBRA Study]. *Cad Saude Publica*, 29(4), 778-792.

Nilsen, T. W. (2003). The spliceosome: the most complex macromolecular machine in the cell? *Bioessays*, 25(12), 1147-1149. doi:10.1002/bies.10394

O'Brien, R. J., & Wong, P. C. (2011). Amyloid precursor protein processing and Alzheimer's disease. *Annu Rev Neurosci*, 34, 185-204. doi:10.1146/annurev-neuro-061010-113613

Oh, Esther S., Savonenko, Alena V., King, Julie F., Fangmark Tucker, Stina M., Rudow, Gay L., Xu, Guilian, . . . Troncoso, Juan C. (2009). Amyloid precursor protein increases cortical neuron size in transgenic mice. *Neurobiol Aging*, 30(8), 1238-1244. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2007.12.024

Padovani, A., Borroni, B., Colciaghi, F., Pastorino, L., Archetti, S., Cottini, E., . . . Di Luca, M. (2001). Platelet amyloid precursor protein forms in AD: a peripheral diagnostic tool and a pharmacological target. *Mech Ageing Dev*, 122(16), 1997-2004.

Paganini-Hill, Annlia; Clark, Linda J; Henderson, Victor W; Birge, Stanley J. (2001). Clock Drawing: Analysis in a Retirement Community. 49(7), 941-947. doi:10.1046/j.1532-5415.2001.49185.x

Pan, H., Huang, X., Li, F., Ren, M., Zhang, J., Xu, M., & Wu, M. (2019). Association among plasma lactate, systemic inflammation, and mild cognitive impairment: a community-based study. *Neurol Sci*, 40(8), 1667-1673. doi:10.1007/s10072-019-03900-9

Panza, F., D'Introno, A., Colacicco, A. M., Capurso, C., Parigi, A. D., Capurso, S. A., . . . Solfrizzi, V. (2006). Cognitive frailty: Predementia syndrome and vascular risk factors. *Neurobiol Aging*, 27(7), 933-940. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2005.05.008

Panza, F., Lozupone, M., Solfrizzi, V., Sardone, R., Dibello, V., Di Lena, L., . . . Logroscino, G. (2018). Different Cognitive Frailty Models and Health- and Cognitive-related Outcomes in Older Age: From Epidemiology to Prevention. *J Alzheimers Dis*, 62(3), 993-1012. doi:10.3233/jad-170963

Panza, F., Lozupone, M., Solfrizzi, V., Stallone, R., Bellomo, A., Greco, A., . . . Logroscino, G. (2017). Cognitive frailty: a potential target for secondary prevention of dementia. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 13(10), 1023-1027. doi:10.1080/17425255.2017.1372424

Panza, F., Solfrizzi, V., Frisardi, V., Maggi, S., Sancarlo, D., Adante, F., . . . Pilotto, A. (2011). Different models of frailty in predementia and dementia syndromes. *J Nutr Health Aging*, 15(8), 711-719. doi:10.1007/s12603-011-0126-1

Panza, F; Lozupone, M; Logroscino, G. (2019). Understanding frailty to predict and prevent dementia. *Lancet Neurol*, 18(2), 133-134. doi:10.1016/s1474-4422(18)30446-0

Pel-Littel, R. E; Schuurmans, M. J; Emmelot-Vonk, M. H; Verhaar, H. J. J. (2009). Frailty: Defining and measuring of a concept. *JNHA - The Journal of Nutrition, Health and Aging*, 13(4), 390-394. doi:10.1007/s12603-009-0051-8

Pereira, Livia Carvalho, Figueiredo, Maria do Livramento Fortes, Beleza, Cinara Maria Feitosa, Andrade, Elaine Maria Leite Rangel, Silva, Maria Josefina da, & Pereira, Antonio Francisco Machado. (2017). Fatores preditores para incapacidade funcional de idosos atendidos na atenção básica %J Revista Brasileira de Enfermagem. 70, 112-118.

- Perl, Daniel P. (2010). Neuropathology of Alzheimer's disease. *The Mount Sinai journal of medicine, New York*, 77(1), 32-42. doi:10.1002/msj.20157
- Peron, R., Vatanabe, I. P., Manzine, P. R., Camins, A., & Cominetti, M. R. (2018). Alpha-Secretase ADAM10 Regulation: Insights into Alzheimer's Disease Treatment. *Pharmaceuticals (Basel)*, 11(1). doi:10.3390/ph11010012
- Peron, R.; Vatanabe, I. P.; Manzine, P. R.; Camins, A.; Cominetti, M. R. (2018). Alpha-Secretase ADAM10 Regulation: Insights into Alzheimer's Disease Treatment. *Pharmaceuticals (Basel)*, 11(1). doi:10.3390/ph11010012
- Petersen, R. C., Caracciolo, B., Brayne, C., Gauthier, S., Jelic, V., & Fratiglioni, L. (2014). Mild cognitive impairment: a concept in evolution. *J Intern Med*, 275(3), 214-228. doi:10.1111/joim.12190
- Petersen, R. C., & Morris, J. C. (2005). Mild cognitive impairment as a clinical entity and treatment target. *Arch Neurol*, 62(7), 1160-1163; discussion 1167. doi:10.1001/archneur.62.7.1160
- Petersen, R. C., Stevens, J. C., Ganguli, M., Tangalos, E. G., Cummings, J. L., & DeKosky, S. T. (2001). Practice parameter: early detection of dementia: mild cognitive impairment (an evidence-based review). Report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology*, 56(9), 1133-1142. doi:10.1212/wnl.56.9.1133
- Petersen, Ronald C. (2016). Mild Cognitive Impairment. *Continuum (Minneapolis, Minn.)*, 22(2 Dementia), 404-418. doi:10.1212/CON.0000000000000313
- Potter, Pamela E. (2019). Chapter 10 - Curcumin Offers Potential Efficacy for Treating Alzheimer's Disease. In Tahira Farooqui & Akhlaq A. Farooqui (Eds.), *Curcumin for Neurological and Psychiatric Disorders* (pp. 191-209): Academic Press.
- Prox, J., Willenbrock, M., Weber, S., Lehmann, T., Schmidt-Arras, D., Schwanbeck, R., . . . Schwake, M. (2012). Tetraspanin15 regulates cellular trafficking and activity of the ectodomain sheddase ADAM10. *Cell Mol Life Sci*, 69(17), 2919-2932. doi:10.1007/s00018-012-0960-2
- Qingwei., Ruan, Yu, Z., Chen, M., Bao, Z., Li, J., & He, W. (2015). Cognitive frailty, a novel target for the prevention of elderly dependency. *Ageing Res Rev*, 20, 1-10. doi:10.1016/j.arr.2014.12.004
- Reiss, Karina, & Bhakdi, Sucharit. (2017). The plasma membrane: Penultimate regulator of ADAM sheddase function. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1864(11, Part B), 2082-2087.
- Robertson, D. A., Savva, G. M., & Kenny, R. A. (2013). Frailty and cognitive impairment--a review of the evidence and causal mechanisms. *Ageing Res Rev*, 12(4), 840-851. doi:10.1016/j.arr.2013.06.004
- Rockwood, K., & Mitnitski, A. (2006). Limits to deficit accumulation in elderly people. *Mech Ageing Dev*, 127(5), 494-496. doi:10.1016/j.mad.2006.01.002
- Rockwood, Kenneth. (2005). Frailty and Its Definition: A Worthy Challenge. 53(6), 1069-1070. doi:10.1111/j.1532-5415.2005.53312.x

Rockwood, Kenneth, & Mitnitski, Arnold. (2007). Frailty in Relation to the Accumulation of Deficits. *The Journals of Gerontology: Series A*, 62(7), 722-727. doi:10.1093/gerona/62.7.722 %J The Journals of Gerontology: Series A

Saedi, A. A; Feehan, J; Phu, S; Duque, G. (2019). Current and emerging biomarkers of frailty in the elderly. *Clinical interventions in aging*, 14, 389-398. doi:10.2147/CIA.S168687

Saftig, P., & Lichtenthaler, S. F. (2015). The alpha secretase ADAM10: A metalloprotease with multiple functions in the brain. *Prog Neurobiol*, 135, 1-20. doi:10.1016/j.pneurobio.2015.10.003

Sahin, U., Weskamp, G., Kelly, K., Zhou, H. M., Higashiyama, S., Peschon, J., . . . Blobel, C. P. (2004). Distinct roles for ADAM10 and ADAM17 in ectodomain shedding of six EGFR ligands. *J Cell Biol*, 164(5), 769-779. doi:10.1083/jcb.200307137

Sanderson, M. P., Erickson, S. N., Gough, P. J., Garton, K. J., Wille, P. T., Raines, E. W., . . . Dempsey, P. J. (2005). ADAM10 mediates ectodomain shedding of the betacellulin precursor activated by p-aminophenylmercuric acetate and extracellular calcium influx. *The Journal of biological chemistry*, 280(3), 1826-1837. doi:10.1074/jbc.M408804200

Santos-Orlandi, Ariene Angelini dos, Brito, Tábatta Renata Pereira de, Ottaviani, Ana Carolina, Rossetti, Estefani Serafim, Zazzetta, Marisa Silvana, Gratão, Aline Cristina Martins, . . . Pavarini, Sofia Cristina Iost. (2017). Perfil de idosos que cuidam de outros idosos em contexto de alta vulnerabilidade social %J Escola Anna Nery. 21.

Saraceno, C., Marcello, E., Di Marino, D., Borroni, B., Claeyen, S., Perroy, J., . . . Di Luca, M. (2014). SAP97-mediated ADAM10 trafficking from Golgi outposts depends on PKC phosphorylation. *Cell Death Dis*, 5, e1547. doi:10.1038/cddis.2014.492

Schinka, John A., Loewenstein, David A., Raj, Ashok, Schoenberg, Mike R., Banko, Jessica L., Potter, Huntington, & Duara, Ranjan. (2010). Defining Mild Cognitive Impairment: Impact of Varying Decision Criteria on Neuropsychological Diagnostic Frequencies and Correlates. *The American Journal of Geriatric Psychiatry*, 18(8), 684-691. doi:

Schuck, & F; Wolf, D; Fellgiebel, A.; Endres, K. (2016). Increase of α -Secretase ADAM10 in Platelets Along Cognitively Healthy Aging. *J Alzheimers Dis*, 50(3), 817-826. doi:10.3233/jad-150737

SEADE, Fundação Sistema Estadual de Análise de Dados -. (2020). Índice Paulista de Responsabilidade Social (IPRS). . *Secretaria de Planejamento e desenvolvimento Regional do Estado de São Paulo*.

Seals, D. F., & Courtneidge, S. A. (2003). The ADAMs family of metalloproteases: multidomain proteins with multiple functions. *Genes Dev*, 17(1), 7-30. doi:10.1101/gad.1039703

Seetlani, Naresh Kumar, Kumar, Narindar, Imran, Khalid, Ali, Asif, Shams, Nadia, & Sheikh, Taha. (2016). Alzheimer and vascular dementia in the elderly patients. *Pakistan journal of medical sciences*, 32(5), 1286-1290. doi:10.12669/pjms.325.10792

- Seifert, Anke, Düsterhöft, Stefan, Wozniak, Justyna, Koo, Chek Z., Tomlinson, Michael G., Nuti, Elisa, . . . Ludwig, Andreas. (2020). The metalloproteinase ADAM10 requires its activity to sustain surface expression. *Cellular and Molecular Life Sciences*. doi:10.1007/s00018-020-03507-w
- Serrano-Pozo, Alberto, Frosch, Matthew P., Masliah, Eliezer, & Hyman, Bradley T. (2011). Neuropathological alterations in Alzheimer disease. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 1(1), a006189-a006189. doi:10.1101/cshperspect.a006189
- Shen, X. N., Lu, Y., Tan, C. T. Y., Liu, L. Y., Yu, J. T., Feng, L., & Larbi, A. (2019). Identification of inflammatory and vascular markers associated with mild cognitive impairment. *Aging (Albany NY)*, 11(8), 2403-2419. doi:10.18632/aging.101924
- Shi, Liu, Baird, Alison L., Westwood, Sarah, Hye, Abdul, Dobson, Richard, Thambisetty, Madhav, & Lovestone, Simon. (2018). 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 : JAD*, 62(3), 1181-1198. doi:10.3233/JAD-170531
- Souza, Luccas Melo de, Morais, Eliane Pinheiro de, & Barth, Quenia Camille Martins. (2006). Socioeconomic and demographic characteristics and health condition of elderly people from a family health program in Porto Alegre, Brazil %J Revista Latino-Americana de Enfermagem. 14, 901-906.
- Soysal, P., Veronese, N., Thompson, T., Kahl, K. G., Fernandes, B. S., Prina, A. M., . . . Stubbs, B. (2017). Relationship between depression and frailty in older adults: A systematic review and meta-analysis. *Ageing Res Rev*, 36, 78-87. doi:10.1016/j.arr.2017.03.005
- Stamm, Stefan. (2002). Signals and their transduction pathways regulating alternative splicing: a new dimension of the human genome. *Human Molecular Genetics*, 11(20), 2409-2416. doi:10.1093/hmg/11.20.2409 %J Human Molecular Genetics
- Stamm, Stefan, Ben-Ari, Shani, Rafalska, Ilona, Tang, Yesheng, Zhang, Zhaiyi, Toiber, Debra, . . . Soreq, Hermona. (2005). Function of alternative splicing. *Gene*, 344, 1-20.
- Strimbu, Kyle, & Tavel, Jorge A. (2010). What are biomarkers? *Current opinion in HIV and AIDS*, 5(6), 463-466. doi:10.1097/COH.0b013e32833ed177
- Tang, K., Hynan, L. S., Baskin, F., & Rosenberg, R. N. (2006). Platelet amyloid precursor protein processing: a bio-marker for Alzheimer's disease. *J Neurol Sci*, 240(1-2), 53-58. doi:10.1016/j.jns.2005.09.002
- Teixeira, Ilka. (2012). Revisão da literatura sobre conceitos e definições de fragilidade em idosos - doi:10.5020/18061230.2008.p297. *Revista Brasileira em Promoção da Saúde*, 21. doi:10.5020/576
- Teo, Nigel, Yeo, Pei Shi, Gao, Qi, Nyunt, Ma Shwe Zin, Foo, Jie Jing, Wee, Shiou Liang, & Ng, Tze Pin. (2019). A bio-psycho-social approach for frailty amongst Singaporean Chinese community-dwelling older adults – evidence from the Singapore Longitudinal Aging Study. *BMC Geriatrics*, 19(1), 350. doi:10.1186/s12877-019-1367-9

- Tone, Masahide, Tone, Yukiko, Fairchild, Paul J., Wykes, Michelle, & Waldmann, Herman. (2001). Regulation of CD40 function by its isoforms generated through alternative splicing. *98(4)*, 1751-1756. doi:10.1073/pnas.98.4.1751 %J Proceedings of the National Academy of Sciences
- Tousseyn, Thomas, Thathiah, Amantha, Jorissen, Ellen, Raemaekers, Tim, Konietzko, Uwe, Reiss, Karina, De Strooper, Bart. (2009). ADAM10, the rate-limiting protease of regulated intramembrane proteolysis of Notch and other proteins, is processed by ADAMS-9, ADAMS-15, and the gamma-secretase. *The Journal of biological chemistry*, *284(17)*, 11738-11747. doi:10.1074/jbc.M805894200
- United., Nations Organization - ONU. (2013). Economic and Social Affairs, Population Division. *New York*.
- United., Nations Organization - ONU. (2019). World Population Prospects 2019. *New York*.
- Vetrano, Davide L, Palmer, Katie M, Galluzzo, Lucia, Giampaoli, Simona, Marengoni, Alessandra, Bernabei, Roberto, & Onder, Graziano. (2018). Hypertension and frailty: a systematic review and meta-analysis. *8(12)*, e024406. doi:10.1136/bmjopen-2018-024406 %J BMJ Open
- Ward, Alex; Tardiff, Sarah; Dye, Catherine; Arrighi, H. Michael. (2013). Rate of conversion from prodromal Alzheimer's disease to Alzheimer's dementia: a systematic review of the literature. *Dementia and geriatric cognitive disorders extra*, *3(1)*, 320-332. doi:10.1159/000354370
- Weller, Jason, & Budson, Andrew. (2018). Current understanding of Alzheimer's disease diagnosis and treatment. *F1000Research*, *7*, F1000 Faculty Rev-1161. doi:10.12688/f1000research.14506.1
- White, Judith M. (2003). ADAMs: modulators of cell-cell and cell-matrix interactions. *Current opinion in cell biology*, *15(5)*, 598-606. doi:10.1016/j.ceb.2003.08.001
- WHO, World Health Organization -. (2012). *Dementia: a public health priority*. Geneva: World Health Organization.
- Winblad, B., Palmer, K., Kivipelto, M., Jelic, V., Fratiglioni, L., Wahlund, L. O., . . . Petersen, R. C. (2004). Mild cognitive impairment--beyond controversies, towards a consensus: report of the International Working Group on Mild Cognitive Impairment. *J Intern Med*, *256(3)*, 240-246. doi:10.1111/j.1365-2796.2004.01380.x
- Xu, P., Liu, J., Sakaki-Yumoto, M., & Derynck, R. (2012). TACE activation by MAPK-mediated regulation of cell surface dimerization and TIMP3 association. *Sci Signal*, *5(222)*, ra34. doi:10.1126/scisignal.2002689
- Yiannopoulou, Konstantina G., & Papageorgiou, Sokratis G. (2020). Current and Future Treatments in Alzheimer Disease: An Update. *Journal of central nervous system disease*, *12*, 1179573520907397-1179573520907397. doi:10.1177/1179573520907397
- Yin, Z. X., Shi, X. M., Kraus, V. B., Fitzgerald, S. M., Qian, H. Z., Xu, J. W., . . . Zeng, Y. (2012). High normal plasma triglycerides are associated with preserved cognitive function in Chinese oldest-old. *Age Ageing*, *41(5)*, 600-606. doi:10.1093/ageing/afs033

APÊNDICES



Review

Alpha-Secretase ADAM10 Regulation: Insights into Alzheimer's Disease Treatment

Rafaela Peron ¹, Izabela Pereira Vatanabe ¹, Patricia Regina Manzine ^{1,2}, Antoni Camins ^{2,3,4}
and Márcia Regina Cominetti ^{1,*} 

¹ Department of Gerontology, Federal University of São Carlos, São Carlos 13565-905, Brazil;

rafaelaperoncardoso@gmail.com (R.P.); izabelavatanabe1@gmail.com (I.P.V.);

patricia_manzine@yahoo.com.br (P.R.M.)

² Departament de Farmacologia, Toxicologia i Química Terapèutica, Facultat de Farmàcia i Ciències de l'Alimentació, Universitat de Barcelona, 08028 Barcelona, Spain; camins@ub.edu

³ Biomedical Research Networking Centre in Neurodegenerative Diseases (CIBERNED), 28031 Madrid, Spain

⁴ Institut de Neurociències, Universitat de Barcelona, 08035 Barcelona, Spain

* Correspondence: mcominetti@ufscar.br; Tel.: +55-16-3306-6663

Received: 27 December 2017; Accepted: 23 January 2018; Published: 29 January 2018

Abstract: ADAM (a disintegrin and metalloproteinase) is a family of widely expressed, transmembrane and secreted proteins of approximately 750 amino acids in length with functions in cell adhesion and proteolytic processing of the ectodomains of diverse cell-surface receptors and signaling molecules. ADAM10 is the main α -secretase that cleaves APP (amyloid precursor protein) in the non-amyloidogenic pathway inhibiting the formation of β -amyloid peptide, whose accumulation and aggregation leads to neuronal degeneration in Alzheimer's disease (AD). ADAM10 is a membrane-anchored metalloprotease that sheds, besides APP, the ectodomain of a large variety of cell-surface proteins including cytokines, adhesion molecules and notch. APP cleavage by ADAM10 results in the production of an APP-derived fragment, sAPP α , which is neuroprotective. As increased ADAM10 activity protects the brain from β -amyloid deposition in AD, this strategy has been proved to be effective in treating neurodegenerative diseases, including AD. Here, we describe the physiological mechanisms regulating ADAM10 expression at different levels, aiming to propose strategies for AD treatment. We report in this review on the physiological regulation of ADAM10 at the transcriptional level, by epigenetic factors, miRNAs and/or translational and post-translational levels. In addition, we describe the conditions that can change ADAM10 expression in vitro and in vivo, and discuss how this knowledge may help in AD treatment. Regulation of ADAM10 is achieved by multiple mechanisms that include transcriptional, translational and post-translational strategies, which we will summarize in this review.

Keywords: ADAM10; Alzheimer's disease; regulation; treatment

1. Introduction

ADAM (a disintegrin and metalloproteinase) is a family of transmembrane and secreted

P4-538

**ADAM10 AS A BIOMARKER OF MILD
COGNITIVE IMPAIRMENT BUT NOT OF
COGNITIVE FRAILITY**



Izabela Pereira Vatanabe, Marina Mantellatto Grigoli,
Marina Araújo Naves, Patricia Regina Manzine,
Marcos Hortes Nisihara Chagas, Daiene de Moraes Fabrício,
Márcia Regina Cominetti, *Federal University of São Carlos, São
Carlos, Brazil. Contact e-mail: izabelavatanabe1@gmail.com*

Background: Frailty syndrome is very prevalent in elderly worldwide. Cognitive frailty (CF) is defined by physical frailty (PF) associated with mild cognitive impairment (MCI), without dementia diagnosis. This new concept has been considered as a subtype of frailty which, together with the aging process, accelerates functional declines and can result in a poor quality of life. ADAM10 (a disintegrin and metalloprotease 10) is a transmembrane protein and the main neuronal α -secretase cleaving APP (amyloid precursor protein) in the non-amyloidogenic pathway. As a result, ADAM10 inhibits the formation of the β -amyloid peptide, one of the pathological hallmarks of Alzheimer's disease. The aim of this study was to evaluate whether platelet and plasma levels of ADAM10 could act as biomarkers of CF. **Methods:** Sixty-eight elderly were evaluated and diagnosed according to the criteria of cognition and PF and divided into MCI and cognitively healthy (control) groups, with and without the presence of PF. Platelet and plasma proteins were analyzed on SDS-PAGE (10%) and ADAM10 expression was identified by western blotting. β -actin or serum albumin were used as the endogenous controls. Data were analyzed using comparison statistical methods. **Results:** Platelets and plasma ADAM10 levels did not change significantly in the CF condition compared to cognitively healthy participants, indicating that PF does not lead to changes in ADAM10 levels. However, plasma ADAM10 were shown to be increased in the elderly with MCI, presenting or not PF, when compared to healthy controls ($p < 0.0070$ and $p < 0.0048$ respectively), whereas in platelets these levels have been reduced ($p < 0.0001$). These results corroborate our previous studies indicating that ADAM10 platelet levels are reduced in MCI when compared to cognitively healthy controls. **Conclusions:** ADAM10 is not a relevant biomarker for CF, although it can be of high relevance for the diagnosis of MCI. The partial results obtained bring significant contributions to an accurate diagnosis of MCI in the perspective of ADAM10 as a biomarker for this disease.



ELSEVIER

Available online at
ScienceDirect
www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France
EM|consulte
www.em-consulte.com



History of neurology

Historic concepts of dementia and Alzheimer's disease: From ancient times to the present

I.P. Vatanabe^{*}, P.R. Manzine, M.R. Cominetti

Department of Gerontology, Federal University of São Carlos, Rod Washington Luís, Km 235, CEP 13565-905, São Carlos SP, Brazil

INFO ARTICLE

Article history:

Received 27 November 2018

Received in revised form

25 February 2019

Accepted 6 March 2019

Available online xxx

Keywords:

Alzheimer disease

Dementia

Biomarkers

Concept Formation

ABSTRACT

The aim of this work is to describe the history of dementia and Alzheimer's disease (AD) concepts, from early descriptions in antiquity, through studies and authors from different historical periods throughout the centuries, to the latest updates of the Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM-V). The article also presents the inclusion of the biomarkers from the cerebrospinal fluid, such as Tau and phosphorylated Tau proteins and beta-amyloid peptide in the most recent diagnostic criteria. A literature search was carried out in order to construct a reflexive narrative review of studies dated up to 2015 in the LILACS and Medline databases and with the inclusion of bibliographical references of the area. The different terms used throughout the history of the dementia and Alzheimer's disease concepts were contextualized according to the scientific perspective of a given epoch and its way of producing and reproducing knowledge. The concepts of dementia and AD continue to evolve, largely due to their complexity. Considering the importance and the growth of AD cases in the last and the next decades, this review may contribute in practice with the historical knowledge of the concepts related to dementia and AD.

© 2019 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

REVIEW ARTICLE

Blood-based Biomarkers of Alzheimer's Disease: The Long and Winding Road

Patricia Regina Manzine¹, Izabela Pereira Vatanabe¹, Rafaela Peron¹, Marina Mantellatto Grigoli¹, Renata Valle Pedroso¹, Carla Manuela Crispim Nascimento¹ and Marcia Regina Cominetti^{1,*}

¹Department of Gerontology, Federal University of Sao Carlos, São Carlos, SP, Brazil. Rod. Washington Luis, Km 235. Monjolinho, CEP 13565-905

Abstract: Background: Blood-based biomarkers can be very useful in formulating new diagnostic and treatment proposals in the field of dementia, especially in Alzheimer's disease (AD). However, due to the influence of several factors on the reproducibility and reliability of these markers, their clinical use is still very uncertain. Thus, up-to-date knowledge about the main blood biomarkers that are currently being studied is extremely important in order to discover clinically useful and applicable tools, which could also be used as novel pharmacological strategies for the AD treatment.

Objective: The aim of this paper was to carry out a literature review on the major blood-based biomarkers for AD, connecting them with the pathophysiology of the disease.

Results: Recent advances in the search of blood-based AD biomarkers were summarized in this review. The biomarkers were classified according to the topics related to the main hallmarks of the disease such as inflammation, amyloid, and tau deposition, synaptic degeneration and oxidative stress. Moreover, molecules involved in the regulation of proteins related to these hallmarks were described, such as non-coding RNAs, neurotrophins, growth factors and metabolites. Cells or cellular components with the potential to be considered as blood-based AD biomarkers were described in a separate topic.

Conclusion: A series of limitations undermine new discoveries on blood-based AD biomarkers. The lack of reproducibility of findings due to the small size and heterogeneity of the study population, different analytical methods and other assay conditions make longitudinal studies necessary in this field to validate these structures, especially when considering a clinical evaluation that includes a broad panel of these potential and promising blood-based biomarkers.

ARTICLE HISTORY

Received: October 31, 2019
Accepted: November 27, 2019

DOI:

10.2174/1381612826666200114105515

Keywords: Alzheimer's disease, biomarkers, blood, dementia, diagnosis, elderly, plasma.

***Informação adicional:** Além destes, dois novos artigos e um capítulo de livro estão em fase de publicação.

ANEXOS

ANEXOS

Anexo 1– Termo de consentimento livre e esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

DEPARTAMENTO DE GERONTOLOGIA

(Resolução 466/2012 do CNS)

ESTUDO DA ATIVIDADE DOS BIOMARCADORES NOS PACIENTES COM SÍNDROME DE FRAGILIDADE COGNITIVA

A fragilidade é uma síndrome geriátrica caracterizada por perdas progressivas das capacidades físicas e falta de resistência aos estressores que podem comprometer a independência de idosos. A síndrome está ganhando reconhecimento como um importante problema de saúde pública e clínica. Estima-se que a prevalência de fragilidade é entre 10 e 25% das pessoas acima de 65 anos e 46% acima dos 85 anos que vivem na comunidade podem ser considerados frágeis. A fragilidade cognitiva é um conceito recente na literatura e tem sido considerada como um subtipo de fragilidade, que juntamente com o processo de envelhecimento e sua interação com a fragilidade física, aceleram o ciclo de declínio funcional e resultam em má qualidade de vida em idosos.

Sendo assim, ainda não existem marcadores biológicos específicos que auxiliem no diagnóstico precoce e na identificação do risco potencial para o desenvolvimento desta síndrome. O Laboratório de Biologia do Envelhecimento do Departamento de Gerontologia da UFSCar pretende estudar como estas substâncias no sangue podem interferir e auxiliar no início da fragilidade cognitiva em idosos. O conhecimento sobre o funcionamento de marcadores, especialmente ao longo do tempo, pode auxiliar no entendimento sobre as possíveis causas da síndrome, de tal forma que no futuro ela possa ser tratada e diagnosticada de forma mais eficaz e até, para a elaboração de estratégias preventivas.

O Sr./Sra., está sendo convidado a participar como voluntário nesta pesquisa, ajudando na produção de conhecimento na área. O senhor (a) foi selecionado (a), ao acaso, por fazer tratamento em um ambulatório universitário e sua participação não é obrigatória. Para isso, sua participação nesta pesquisa consistirá em doar uma amostra de sangue e responder à questionários de avaliação da condição física e cognitiva.

A coleta de sangue será realizada no próprio ambulatório universitário, por profissional habilitado em uma veia do braço usando luvas, máscara, agulha e seringa descartáveis, após serem tomados todos os cuidados de anti-sepsia preconizados para este tipo de procedimento. A coleta, normalmente, não acarreta maiores riscos para a saúde do paciente. Entretanto, em alguns casos poderá surgir nas primeiras horas, no local da punção, um hematoma ou pequeno desconforto que deverá desaparecer em no máximo 3 a 4 dias. Algumas pessoas poderão sentir tonteira durante ou após o procedimento. Para minimizar esse acontecimento, você será orientado a permanecer sentado durante alguns minutos até que se sinta confortável para levantar. Posteriormente serão coletadas informações para sua identificação, além de alguns dados clínicos e físicos. O procedimento de avaliação não oferece risco imediato ao (a) senhor (a), porém considera-se a possibilidade de um risco subjetivo, pois algumas perguntas podem remeter à algum desconforto ou levar à um leve cansaço após responder os questionários. A participação na pesquisa não é obrigatória, e a sua recusa não implicará em nenhum prejuízo no seu tratamento de rotina ou em sua relação com o pesquisador

ou com a instituição. Você poderá se desejar, retirar-se do estudo a qualquer momento sem que isto afete os seus cuidados médicos no presente ou no futuro, ou traga qualquer tipo de prejuízo.

As avaliações serão gratuitas e não haverá compensação em dinheiro pela sua participação. Todas as informações a seu respeito serão mantidas em segredo. Para isso, na ficha de exame clínico não aparecerá nenhum nome que o identifique, apenas um número que somente o pesquisador principal saberá a quem se refere. Os dados coletados poderão ser divulgados em eventos, revistas e/ou trabalhos científicos, sempre preservando a sua identidade.

Não haverá nenhuma despesa decorrente da sua participação na pesquisa. Você terá direito a indenização por qualquer tipo de dano resultante da sua participação na pesquisa.

Como benefícios indiretos da sua participação, os dados obtidos nessa pesquisa poderão servir para ajudar imensamente outras pessoas na medida em que, poderemos compreender melhor como essa síndrome aparece e como poderemos tratá-la de forma melhor e talvez até definitiva.

Se você tiver qualquer problema ou dúvida durante a sua participação na pesquisa poderá comunicar-se pelo telefone (016) 3306-6672 ou vir ao nosso laboratório a qualquer dia e procurar a pesquisadora Izabela Pereira Vatanabe. Você receberá uma via deste termo, rubricada em todas as páginas por você e pelo pesquisador, onde consta o telefone e o endereço do pesquisador principal. Você poderá tirar suas dúvidas sobre o projeto e sua participação agora ou a qualquer momento.

Declaro que entendi os objetivos, riscos e benefícios de minha participação na pesquisa e concordo em participar. O pesquisador me informou que o projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da UFSCar que funciona na Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa da Universidade Federal de São Carlos, localizada na Rodovia Washington Luiz, Km. 235 - Caixa Postal 676 - CEP 13.565-905 - São Carlos - SP – Brasil. Fone (16) 3351-8110. Endereço eletrônico: cephumanos@ufscar.br

Endereço para contato (24 horas por dia e sete dias por semana):

Pesquisador Responsável: Izabela Pereira Vatanabe

Endereço: Rod. Washington Luis, km 235 – São Carlos –SP

Contato telefônico: (16) 3306-6663 e-mail: izabelavatanabe1@gmail.com

Local e data: São Carlos ____/____/____

Izabela Pereira Vatanabe
(Pesquisadora Responsável)
UFSCar e-mail: izabelavatanabe1@gmail.com
Fone (16) 3306-6672

Assinatura do Participante

Anexo 2– Critérios de Avaliação de Fragilidade de Fried

- IMC = **Peso/ Altura²**

IMC= _____

- Força de preensão palmar:

1ª medida: _____

2ª medida: _____ média _____

3ª medida: _____

Homens	
Quadril de IMC (Kg/m ²)	Força de preensão manual (kg)
≤ 24,0	≤ 29,0
24,1 – 26,0	≤ 30,0
26,1 – 28,0	≤ 30,0
> 28,0	≤ 32,0
Mulheres	
Quadril de IMC (Kg/m ²)	Força de preensão manual (kg)
≤ 23,0	≤ 17,0
23,1 – 26,0	≤ 17,3
26,1 – 29,0	≤ 18,0
> 29,0	≤ 21,0

Ponto

- Perda de peso não intencional: “No último ano, você perdeu mais que 4,5 kg de peso não intencional”? (1) sim (2) não

Ponto

- Velocidade de marcha (4,5m):

1ª medida: _____

2ª medida: _____

3ª medida: _____

Homens	
Altura (m)	Velocidade de caminhada (s)
Altura = 1,73	= 7,0
Altura > 1,73	= 6,0
Mulheres	
Altura (m)	Velocidade de caminhada (s)
Altura = 1,59	= 7,0
Altura > 1,59	= 6,0

Ponto

- Fadiga: “Com que frequência, na última semana, o sr(a) sentiu que tudo que fez exigiu um grande esforço”

0 = raramente ou em nenhum momento (menos de 1 dia),

1 = poucos momentos (1 a 2 dias),

2= parcela moderada de tempo (3 a 4 dias)

3= maioria do tempo

Ponto

“Com que frequência, na última semana, o sr(a) sentiu que não conseguiu levar adiante suas coisas?”

0 = raramente ou em nenhum momento (menos de 1 dia),

1 = poucos momentos (1 a 2 dias),

2= parcela moderada de tempo (3 a 4 dias)

3= maioria do tempo

Ponto

- Baixa de atividade física: IPAQ

<u>3 ou +</u>	<u>frágil</u>
----------------------	----------------------

Dispêndio calórico semanal (Kcal)	
Homens	383,0
Mulheres	270,0

Ponto

<u>1 ou 2</u>	<u>Pré-frágil</u>
<u>0</u>	<u>Normal</u>

Anexo 3 – Questionário Internacional de Atividade Física – Versão Curta

Nome: _____
Data: __/__/____ Idade : _____ Sexo: F () M ()

Nós estamos interessados em saber que tipos de atividade física as pessoas fazem como parte do seu dia a dia. Este projeto faz parte de um grande estudo que está sendo feito em diferentes países ao redor do mundo. Suas respostas nos ajudarão a entender que tão ativos nós somos em relação à pessoas de outros países. As perguntas estão relacionadas ao tempo que você gasta fazendo atividade física na **ÚLTIMA** semana. As perguntas incluem as atividades que você faz no trabalho, para ir de um lugar a outro, por lazer, por esporte, por exercício ou como parte das suas atividades em casa ou no jardim. Suas respostas são **MUITO** importantes. Por favor responda cada questão mesmo que considere que não seja ativo. Obrigado pela sua participação !

Para responder as questões lembre que:

- atividades físicas **VIGOROSAS** são aquelas que precisam de um grande esforço físico e que fazem respirar **MUITO** mais forte que o normal
- atividades físicas **MODERADAS** são aquelas que precisam de algum esforço físico e que fazem respirar **UM POUCO** mais forte que o normal

Para responder as perguntas pense somente nas atividades que você realiza **por pelo menos 10 minutos contínuos** de cada vez.

1a Em quantos dias da última semana você **CAMINHOU** por pelo menos 10 minutos contínuos em casa ou no trabalho, como forma de transporte para ir de um lugar para outro, por lazer, por prazer ou como forma de exercício?

dias por **SEMANA** () Nenhum

1b Nos dias em que você caminhou por pelo menos 10 minutos contínuos quanto tempo no total você gastou caminhando **por dia**?

horas: _____ Minutos:

2a. Em quantos dias da última semana, você realizou atividades **MODERADAS** por pelo menos 10 minutos contínuos, como por exemplo pedalar leve na bicicleta, nadar, dançar, fazer ginástica aeróbica leve, jogar vôlei recreativo, carregar pesos leves, fazer serviços domésticos na casa, no quintal ou no jardim como varrer, aspirar, cuidar do jardim, ou qualquer atividade que fez aumentar

moderadamente sua respiração ou batimentos do coração (**POR FAVOR NÃO INCLUA CAMINHADA**)

dias por **SEMANA** () Nenhum

2b. Nos dias em que você fez essas atividades moderadas por pelo menos 10 minutos contínuos, quanto tempo no total você gastou fazendo essas atividades **por dia**?

horas: _____ Minutos: _____

3a Em quantos dias da última semana, você realizou atividades **VIGOROSAS** por pelo menos 10 minutos contínuos, como por exemplo correr, fazer ginástica aeróbica, jogar futebol, pedalar rápido na bicicleta, jogar basquete, fazer serviços domésticos pesados em casa, no quintal ou cavoucar no jardim, carregar pesos elevados ou qualquer atividade que fez aumentar **MUITO** sua respiração ou batimentos do coração.

dias por **SEMANA** () Nenhum

3b Nos dias em que você fez essas atividades vigorosas por pelo menos 10 minutos contínuos quanto tempo no total você gastou fazendo essas atividades **por dia**?

horas: _____ Minutos: _____

Estas últimas questões são sobre o tempo que você permanece sentado todo dia, no trabalho, na escola ou faculdade, em casa e durante seu tempo livre. Isto inclui o tempo sentado estudando, sentado enquanto descansa, fazendo lição de casa visitando um amigo, lendo, sentado ou deitado assistindo TV. Não inclua o tempo gasto sentando durante o transporte em ônibus, trem, metrô ou carro.

4a. Quanto tempo no total você gasta sentado durante um **dia de semana**?
_____ horas _____ minutos

4b. Quanto tempo no total você gasta sentado durante em um **dia de final de semana**?
_____ horas _____ minutos

Forma de análise - IPAQ:

- Todos os minutos de atividade da caminhada X quantidade de dias que as realizou= total x 3,3 = total 1

- Todos os minutos de atividade da moderada X a quantidade de dias que as realizou= total x 4,0 = total 2

- Todos os minutos de atividade da vigorosa X a quantidade de dias que as realizou= total x 8,0 = total 3

Somatória → total 1 + total 2 + total 3 = TOTAL FINAL X PESO / 60 (min) = _____ Kcal

Valores referenciais do nível de atividade física em dispêndio calórico (kcal) por sexo.

Cardiovascular Health Study, 2001.

Anexo 4 – Classificação do Nível de Atividade Física do IPAQ



CLASSIFICAÇÃO DO NÍVEL DE ATIVIDADE FÍSICA IPAQ

1. MUITO ATIVO: aquele que cumpriu as recomendações de:

- a) VIGOROSA: ≥ 5 dias/sem e ≥ 30 minutos por sessão
- b) VIGOROSA: ≥ 3 dias/sem e ≥ 20 minutos por sessão + MODERADA e/ou CAMINHADA: ≥ 5 dias/sem e ≥ 30 minutos por sessão.

2. ATIVO: aquele que cumpriu as recomendações de:

- a) VIGOROSA: ≥ 3 dias/sem e ≥ 20 minutos por sessão; **ou**
- b) MODERADA ou CAMINHADA: ≥ 5 dias/sem e ≥ 30 minutos por sessão; ou
- c) Qualquer atividade somada: ≥ 5 dias/sem e ≥ 150 minutos/sem (caminhada + moderada + vigorosa).

3. IRREGULARMENTE ATIVO: aquele que realiza atividade física porém insuficiente para ser classificado como ativo pois não cumpre as recomendações quanto à frequência ou duração. Para realizar essa classificação soma-se a frequência e a duração dos diferentes tipos de atividades (caminhada + moderada + vigorosa). Este grupo foi dividido em dois sub-grupos de acordo com o cumprimento ou não de alguns dos critérios de recomendação:

IRREGULARMENTE ATIVO A: aquele que atinge pelo menos um dos critérios da recomendação quanto à frequência ou quanto à duração da atividade:

- a) Frequência: 5 dias /semana **ou**
- b) Duração: 150 min / semana

IRREGULARMENTE ATIVO B: aquele que não atingiu nenhum dos critérios da recomendação quanto à frequência nem quanto à duração.

4. SEDENTÁRIO: aquele que não realizou nenhuma atividade física por pelo menos 10 minutos contínuos durante a semana.

Exemplos:

Indivíduos	Caminhada		Moderada		Vigorosa		Classificação
	F	D	F	D	F	D	
1	-	-	-	-	-	-	Sedentário
2	4	20	1	30	-	-	Irregularmente Ativo A
3	3	30	-	-	-	-	Irregularmente Ativo B
4	3	20	3	20	1	30	Ativo
5	5	45	-	-	-	-	Ativo
6	3	30	3	30	3	20	Muito Ativo
7	-	-	-	-	5	30	Muito Ativo

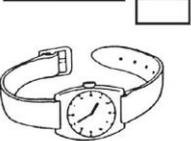
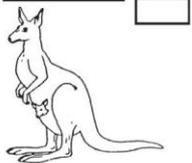
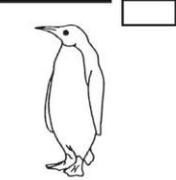
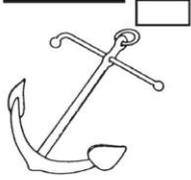
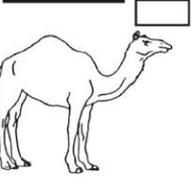
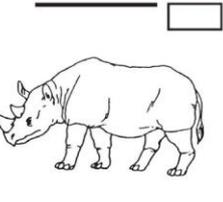
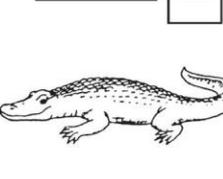
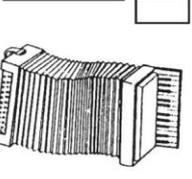
F = Frequência – D = Duração

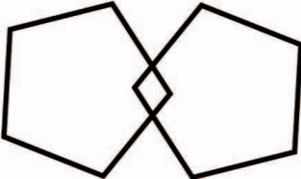
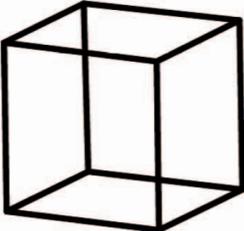
CENTRO COORDENADOR DO IPAQ NO BRASIL – CELAFISCS -
INFORMAÇÕES ANÁLISE, CLASSIFICAÇÃO E COMPARAÇÃO DE RESULTADOS NO BRASIL
Tel-Fax: – 011-42298980 ou 42299643. E-mail: celafiscs@celafiscs.com.br
Home Page: www.celafiscs.com.br IPAQ Internacional: www.ipaq.ki.se

Anexo 5 – Addenbrooke’s Cognitive Examination- revised (ACE-R)

EXAME COGNITIVO DE ADDENBROOKE - VERSÃO REVISADA								
Título original: Addenbrooke's Cognitive Examination - Revised (ACE-R)								
Referências bibliográficas - Versão original: Mioshi E, Dawson K, Mitchell J, Arnold R, Hodges JR. The Addenbrooke's Cognitive Examination Revised (ACE-R): a brief cognitive test battery for dementia screening. Int J Geriatr Psychiatry 2006; 21:1 078-85. Versão adaptada: Amaral Carvalho V & Caramelli P. Brazilian adaptation of the Addenbrooke's Cognitive Examination-Revised. Dementia & Neuropsychologia 2007; 2: 212-216.								
Nome:			Data da avaliação:...../...../.....					
Data de nascimento:			Nome do examinador:.....					
Nome do Hospital:			Escolaridade:.....					
			Profissão:.....					
			Dominância manual:.....					
ORIENTAÇÃO								
➤	Perguntar: Qual é	Dia da semana	O dia do mês	O mês	O ano	A hora aproximada	[Escore 0-5] <input type="text"/> <input type="text"/>	O R I E N T A Ç Ã O
➤	Perguntar: Qual é	Local específico	Local genérico	Bairro ou rua próxima	Cidade	Estado	[Escore 0-5] <input type="text"/> <input type="text"/>	
REGISTRO								
➤	Diga: "Eu vou dizer três palavras e você irá repeti-las a seguir: carro, vaso, tijolo "(Dar um ponto para cada palavra repetida acertadamente na 1ª vez, embora possa repeti-las até três vezes para o aprendizado, se houver erros). Use palavras não relacionadas.						[Escore 0-3] <input type="text"/> <input type="text"/>	A T E N Ç Ã O E O R I E N T A Ç Ã O
	Registre o número de tentativas:							
ATENÇÃO & CONCENTRAÇÃO								
➤	Subtração de setes seriadamente (100-7, 93-7, 86-7, 79-7, 72-7, 65). Considere um ponto para cada resultado correto. Se houver erro, corrija-o e prossiga. Considere correto se o examinando espontaneamente se corrigir. Pare após 5 subtrações (93, 86, 79, 72, 65):						[Escore 0-5] <input type="text"/> <input type="text"/>	A T E N Ç Ã O E O R I E N T A Ç Ã O
MEMÓRIA - Recordação								
➤	Pergunte quais as palavras que o indivíduo acabara de repetir. Dar um ponto para cada.						[Escore 0-3] <input type="text"/> <input type="text"/>	A
MEMÓRIA - Memória anterógrada								
➤	Diga: " Eu vou lhe dar um nome e um endereço e eu gostaria que você repetisse depois de mim. Nós vamos fazer isso três vezes, assim você terá a possibilidade de aprendê-los. Eu vou lhe perguntar mais tarde." Pontuar apenas a terceira tentativa:						[Escore 0-7] <input type="text"/>	M E M Ó R I A
		1ª Tentativa	2ª Tentativa	3ª Tentativa				
	Renato Moreira				
	Rua Bela Vista 73				
	Santarém				
	Pará				
MEMÓRIA - Memória Retrógrada								
➤	Nome do atual presidente da República.....						[Escore 0-4] <input type="text"/>	M E M Ó R I A
➤	Nome do presidente que construiu Brasília.....							
➤	Nome do presidente dos EUA.....							
➤	Nome do presidente dos EUA que foi assassinado nos anos 60.....							

FLUÊNCIA VERBAL – Letra “P” e Animais																											
<p>➤ Letras</p> <p>Diga: “ Eu vou lhe dizer uma letra do alfabeto e eu gostaria que você dissesse o maior número de palavras que puder começando com a letra, mas não diga nomes de pessoas ou lugares. Você está pronto(a) ? Você tem um minuto e a letra é “P”.</p>					<p>[Escore 0-7]</p> <input style="width: 30px; height: 20px;" type="text"/>	A I C N E U L F																					
<table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 25%; height: 80px;"></td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; font-size: small;">0-15 seg</td> <td style="text-align: center; font-size: small;">16-30 seg</td> <td style="text-align: center; font-size: small;">31-45 seg</td> <td style="text-align: center; font-size: small;">46-60 seg</td> </tr> </table>					0-15 seg		16-30 seg	31-45 seg	46-60 seg	<table style="width: 100%; border-collapse: collapse; font-size: x-small;"> <tr><td style="border: 1px dashed black;">>17</td><td style="border: 1px dashed black;">7</td></tr> <tr><td style="border: 1px dashed black;">14-17</td><td style="border: 1px dashed black;">6</td></tr> <tr><td style="border: 1px dashed black;">11-13</td><td style="border: 1px dashed black;">5</td></tr> <tr><td style="border: 1px dashed black;">8-10</td><td style="border: 1px dashed black;">4</td></tr> <tr><td style="border: 1px dashed black;">6-7</td><td style="border: 1px dashed black;">3</td></tr> <tr><td style="border: 1px dashed black;">4-5</td><td style="border: 1px dashed black;">2</td></tr> <tr><td style="border: 1px dashed black;">2-3</td><td style="border: 1px dashed black;">1</td></tr> <tr><td style="border: 1px dashed black;"><2</td><td style="border: 1px dashed black;">0</td></tr> <tr><td style="border: 1px dashed black;">total</td><td style="border: 1px dashed black;">acertos</td></tr> </table>	>17	7	14-17	6	11-13	5	8-10	4	6-7	3	4-5	2	2-3	1	<2	0	total
0-15 seg	16-30 seg	31-45 seg	46-60 seg																								
>17	7																										
14-17	6																										
11-13	5																										
8-10	4																										
6-7	3																										
4-5	2																										
2-3	1																										
<2	0																										
total	acertos																										
<p>➤ Animais</p> <p>Diga: “Agora você poderia dizer o maior número de animais que conseguir, começando com qualquer letra?”</p>					<p>[Escore 0-7]</p> <input style="width: 30px; height: 20px;" type="text"/>	E U L F																					
<table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 25%; height: 80px;"></td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; font-size: small;">0-15 seg</td> <td style="text-align: center; font-size: small;">16-30 seg</td> <td style="text-align: center; font-size: small;">31-45 seg</td> <td style="text-align: center; font-size: small;">46-60 seg</td> </tr> </table>					0-15 seg		16-30 seg	31-45 seg	46-60 seg	<table style="width: 100%; border-collapse: collapse; font-size: x-small;"> <tr><td style="border: 1px dashed black;">>21</td><td style="border: 1px dashed black;">7</td></tr> <tr><td style="border: 1px dashed black;">17-21</td><td style="border: 1px dashed black;">6</td></tr> <tr><td style="border: 1px dashed black;">14-16</td><td style="border: 1px dashed black;">5</td></tr> <tr><td style="border: 1px dashed black;">11-13</td><td style="border: 1px dashed black;">4</td></tr> <tr><td style="border: 1px dashed black;">9-10</td><td style="border: 1px dashed black;">3</td></tr> <tr><td style="border: 1px dashed black;">7-8</td><td style="border: 1px dashed black;">2</td></tr> <tr><td style="border: 1px dashed black;">5-6</td><td style="border: 1px dashed black;">1</td></tr> <tr><td style="border: 1px dashed black;"><5</td><td style="border: 1px dashed black;">0</td></tr> <tr><td style="border: 1px dashed black;">total</td><td style="border: 1px dashed black;">acertos</td></tr> </table>	>21	7	17-21	6	14-16	5	11-13	4	9-10	3	7-8	2	5-6	1	<5	0	total
0-15 seg	16-30 seg	31-45 seg	46-60 seg																								
>21	7																										
17-21	6																										
14-16	5																										
11-13	4																										
9-10	3																										
7-8	2																										
5-6	1																										
<5	0																										
total	acertos																										
LINGUAGEM - Compreensão						M E G A U G N L																					
<p>➤ Mostrar a instrução escrita e pedir ao indivíduo para fazer o que está sendo mandado (não auxilie se ele pedir ajuda ou se só ler a frase sem realizar o comando):</p>					<p>[Escore 0-1]</p> <input style="width: 30px; height: 20px;" type="text"/> <input style="width: 30px; height: 20px;" type="text"/>																						
Feche os olhos																											
<p>➤ Comando : “ Pegue este papel com a mão direita, dobre-o ao meio e coloque -o no chão.” Dar um ponto para cada acerto. Se o indivíduo pedir ajuda no meio da tarefa não dê dicas.</p>					<p>[Escore 0-3]</p> <input style="width: 30px; height: 20px;" type="text"/> <input style="width: 30px; height: 20px;" type="text"/>																						
LINGUAGEM - Escrita																											
<p>➤ Peça ao indivíduo para escrever uma frase: Se não compreender o significado, ajude com: <i>alguma frase que tenha começo, meio e fim; alguma coisa que aconteceu hoje; alguma coisa que queira dizer.</i> Para a correção não são considerados erros gramaticais ou ortográficos. Dar um ponto.</p>					<p>[Escore 0-1]</p> <input style="width: 30px; height: 20px;" type="text"/> <input style="width: 30px; height: 20px;" type="text"/>																						

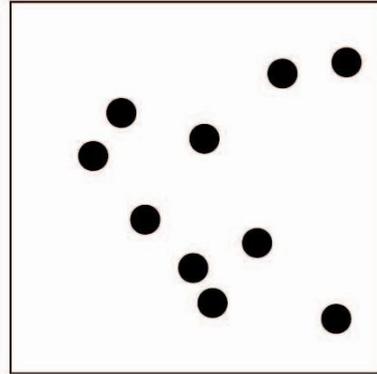
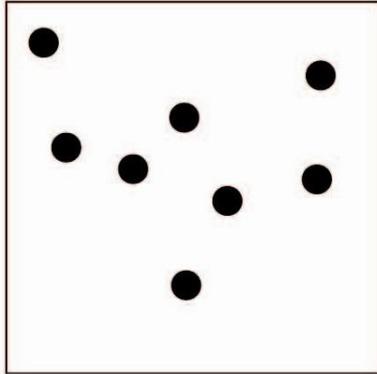
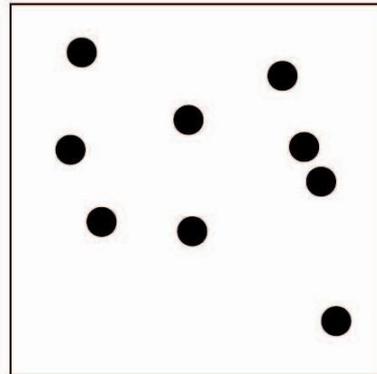
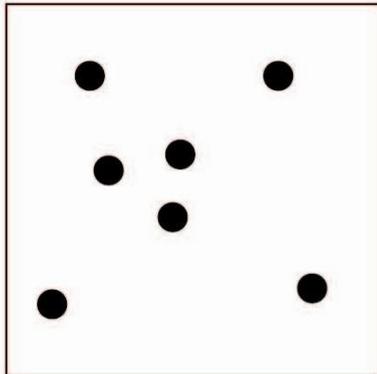
LINGUAGEM - Repetição			
<p>➤ Peça ao indivíduo para repetir: “hipopótamo”; “excentricidade”; “ininteligível”; “estatístico”. Diga uma palavra por vez e peça ao indivíduo para repetir imediatamente depois de você. Pontue 2, se todas forem corretas; 1, se 3 forem corretas; 0, se 2 ou menos forem corretas.</p>	[Escore 0-2] <input type="text"/>		
<p>➤ Peça ao indivíduo que repita: “Acima, além e abaixo”</p>	[Escore 0-1] <input type="text"/>		
<p>➤ Peça ao indivíduo que repita: “Nem aqui, nem ali, nem lá”</p>	[Escore 0-1] <input type="text"/>		
LINGUAGEM - Nomeação			
<p>➤ Peça ao indivíduo para nomear as figuras a seguir:</p>	[Escore 0-2] caneta + relógio <input type="text"/>		
 <input type="text"/>  <input type="text"/>  <input type="text"/>			M
 <input type="text"/>  <input type="text"/>  <input type="text"/>	[Escore 0-10] <input type="text"/>		E
 <input type="text"/>  <input type="text"/>  <input type="text"/>			G
 <input type="text"/>  <input type="text"/>  <input type="text"/>			A
			U
			G
			N
			I
			L
LINGUAGEM - Compreensão			
<p>➤ Utilizando as figuras acima, peça ao indivíduo para:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Apontar para aquela que está associada com a monarquia _____ • Apontar para aquela que é encontrada no Pantanal _____ • Apontar para aquela que é encontrada na Antártica _____ • Apontar para aquela que tem uma relação náutica _____ 	[Escore 0-4] <input type="text"/>		

LINGUAGEM - Leitura		L I N G U A G E M
<p>➤ Peça ao indivíduo para ler as seguintes palavras: [Pontuar com 1, se todas estiverem corretas]</p> <p style="text-align: center;">táxi testa saxofone fixar ballet</p>	[Escore 0-1] <input type="text"/>	
HABILIDADES VISUAIS-ESPACIAIS		V I S U A L - E S P A C I A L
<p>➤ Pentágonos sobrepostos: Peça ao indivíduo para copiar o desenho e para fazer o melhor possível.</p>	[Escore 0-1] <input type="text"/>	
		
<p>➤ Cubo: Peça ao indivíduo para copiar este desenho (para pontuar, veja guia de instruções)</p>	[Escore 0-2] <input type="text"/>	
		
<p>➤ Relógio: Peça ao indivíduo para desenhar o mostrador de um relógio com os números dentro e os ponteiros marcando 5:10 h. (para pontuar veja o manual de instruções: círculo = 1; números = 2; ponteiros = 2, se todos corretos)</p>	[Escore 0-5] <input type="text"/>	

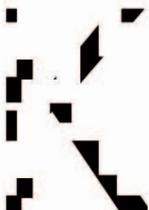
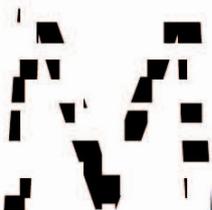
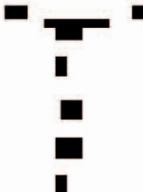
HABILIDADES PERCEPTIVAS

➤ Peça ao indivíduo para contar os pontos sem apontá-los.

[Escore 0-4]

V I S U A L - E S P A C I A L

HABILIDADES PERCEPTIVAS			
> Peça ao indivíduo para identificar as letras:		[Escore 0-4]	V I S U A L - E S P A C I A L
<input type="text"/> <input type="text"/>			
<input type="text"/> <input type="text"/>			
RECORDAÇÃO & RECONHECIMENTO			
> Peça "Agora você vai me dizer o que você se lembra daquele nome e endereço que nós repetimos no começo".		[Escore 0-7]	M E M Ó R I A
Renato Moreira Rua Bela Vista 73 Santarém Pará	<input type="text"/>	
> Este teste deve ser realizado caso o indivíduo não consiga se recordar de um ou mais itens. Se todos os itens forem recordados, salte este teste e pontue 5. Se apenas parte for recordada, assinale os itens lembrados na coluna sombreada do lado direito. A seguir, teste os itens que não foram recordados dizendo "Bom, eu vou lhe dar algumas dicas: O nome / endereço era X, Y ou Z?" e assim por diante. Cada item reconhecido vale um ponto que é adicionado aos pontos obtidos pela recordação.		[Escore 0-5]	
Ricardo Moreira	Renato Moreira	Renato Nogueira	Recordação
Bela Vida	Boa Vista	Bela Vista	Recordação
37	73	76	Recordação
Santana	Santarém	Belém	Recordação
Pará	Ceará	Paraíba	Recordação
Escore Geraís			
		MEEM	/30
		ACE-R	/100
Subtotais			
		Atenção e Orientação	/18
		Memória	/26
		Fluência	/14
		Linguagem	/26
		Visual-espacial	/16
			E S C O R E S

Anexo 6 – Guia de Instruções para aplicação do ACE-R

EXAME COGNITIVO DE ADDENBROOKE – VERSÃO REVISADA

Título original: Addenbrooke's Cognitive Examination - Revised(ACE-R)

Referências bibliográficas

Versão original: Mioshi E, Dawson K, Mitchell J, Arnold R, Hodges JR. The Addenbrooke's Cognitive Examination Revised (ACE-R): a brief cognitive test battery for dementia screening. *Int J Geriatr Psychiatry* 2006; 21:1 078-85.

Versão adaptada: Amaral Carvalho V & Caramelli P. Brazilian adaptation of the Addenbrooke's Cognitive Examination-Revised. *Dementia & Neuropsychologia* 2007; 2: 212-216.

PONTUAÇÃO E GUIA DE INSTRUÇÕES

Estas instruções foram projetadas em ordem para que o examinador dê as instruções e pontue de forma clara. Por favor leia-as cuidadosamente antes de aplicar o teste.

Se possível, deixe a pontuação para o fim da sessão, visto que o indivíduo não poderá checar se o examinador está conferindo as respostas corretas ou cortando as erradas. Isso poderia evitar a ansiedade, que normalmente perturba o desempenho do indivíduo no teste.

O R I E N T A Ç Ã O – Pontuação de 0 a 10

- Pergunte ao indivíduo qual é o dia da semana, o dia do mês, o mês, o ano e a hora aproximada. Aceite erros para a hora aproximada (+ ou – 1 hora). Um ponto para cada.
- Pergunte ao indivíduo qual é o local específico (consultório , dormitório , sala – apontando para o chão); local genérico (apontando ao redor num sentido mais amplo: hospital, casa de repouso, própria casa); o bairro ou o nome de rua próxima; a cidade e o estado. Registre as respostas.

R E G I S T R O – Pontuação de 0 a 3

- Diga ao indivíduo para repetir. Fale lentamente. Repita se necessário (máximo de 3 vezes). Registre o número de tentativas.

A T E N Ç Ã O E C O N C E N T R A Ç Ã O – Pontuação de 0 a 5

- Cálculo: Subtração de setes seriadamente (100-7, 93-7, 86-7, 79-7, 72-7, 65). Se houver erro, corrija o indivíduo e prossiga. Considere correto se o examinando espontaneamente se corrigir.

Registre as respostas. Um ponto para cada acerto de cálculo.

R E C O R D A Ç Ã O - Pontuação de 0 a 3

- Pergunte ao indivíduo quais as palavras que ele acabara de repetir.

Registre as respostas. Dê um ponto para cada.

M e m ó r i a A n t e r ó g r a d a – Pontuação de 0 a 7

- Diga ao indivíduo: " Eu vou lhe dar um nome e um endereço e eu gostaria que você repetisse depois de mim. Nós vamos fazer isso três vezes, assim você terá a possibilidade de aprendê-los. Eu vou lhe perguntar mais tarde." Se o indivíduo começar a repetir ao mesmo tempo que você , peça a ele / ela para esperar até que você termine de falar. Anote a pontuação para cada tentativa. Entretanto, apenas a terceira tentativa contribuirá para a pontuação do ACE (0 – 7 pontos).

M e m ó r i a R e t r ó g r a d a - Pontuação de 0 a 4

- Pergunte ao indivíduo o nome do atual presidente da República, o nome do presidente que construiu Brasília, o presidente dos EUA e o presidente dos EUA que foi assassinado nos anos sessenta.

Dê um ponto para cada, permitindo respostas como Lula; Juscelino; J.K; Bush; Kennedy.

F L U Ê N C I A V E R B A L

Letras - Pontuação de 0 a 7

O indivíduo pode repetir ou perseverar palavras, ex. produzir, produção, produtivo. Escreva e conte-as no espaço 'total' fornecido, mas não considere – as para a pontuação final. Do mesmo modo, intrusões como palavras começando com outras letras são registradas, mas não pontuadas. Nomes próprios (Pedro, Paraná, Petrópolis) não contam.

Animais - Pontuação de 0 a 7

Pode ser que o indivíduo repita palavras. Escreva e conte-as, mas elas não devem ser consideradas para a pontuação final. Também pode acontecer de o indivíduo interpretar mal ou perseverar dizendo animais começando com 'p'. Repita o objetivo da tarefa ao longo dos 60 segundos, se necessário.

Se o indivíduo disser peixe, e mais tarde salmão e truta, conte e registre as 3 como 'total', mas não aceite então, peixe como 'correta' (conte apenas 2 de 3, ex. salmão e truta). As mesmas aplicações para répteis, pássaros, raças de cachorros e espécies de insetos.

LINGUAGEM – Nomeação

Nomeação (relógio e caneta) - Pontue de 0 a 2

Respostas corretas: caneta; relógio de pulso ou relógio.

Nomeação (5 animais e 5 objetos) – pontue de 0 a 10

Respostas corretas: pingüim; âncora; camelo ou dromedário; barril ou banheira; coroa; crocodilo ou jacaré; harpa ou lira; rinoceronte; canguru; acordeom ou sanfona.
Dê um ponto para cada.

LINGUAGEM - Compreensão

Compreensão – pontue de 0 a 4

- Peça ao indivíduo para apontar as figuras de acordo com o que for lido.
Dê um ponto para cada. Permita auto-correções.

Compreensão - pontue de 0 a 1

- Mostrar a instrução escrita e pedir ao indivíduo para fazer o que está sendo mandado (não auxilie se ele pedir ajuda ou se só ler a frase sem realizar o comando).

Compreensão – pontue de 0 a 3

- Dê um ponto para cada comando realizado corretamente.

LINGUAGEM -Escrita

A sentença deve conter um sujeito e um verbo, e deve ter um sentido. Não aceite " Feliz Aniversário" ou " Bom dia" como sentença.

LINGUAGEM - Leitura

Peça ao indivíduo para ler as palavras em voz alta. Dê um ponto apenas se as palavras forem lidas corretamente. Registre os erros.

LINGUAGEM - Repetição

Diga uma palavra por vez e peça ao indivíduo para repetir imediatamente depois de você. Circule as palavras que forem repetidas incorretamente. Pontue apenas a primeira tentativa.

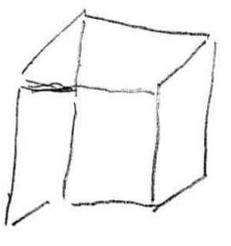
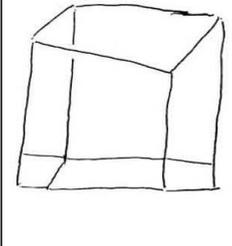
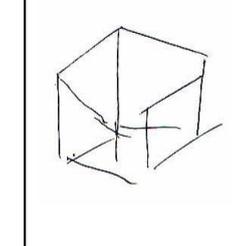
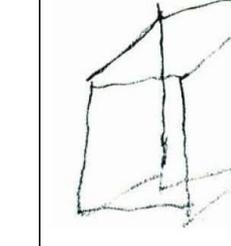
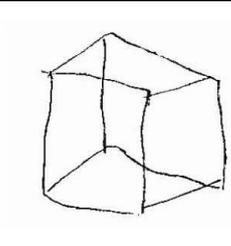
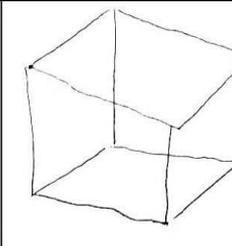
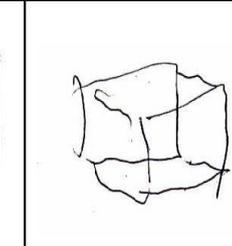
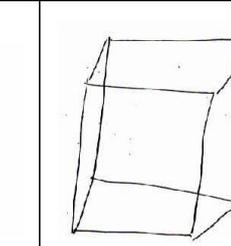
HABILIDADES VISUOESPACIAIS

Pentágonos - pontue 0 ou 1

Considerar apenas se houver dois pentágonos interseccionados (10 ângulos) formando uma figura de quatro lados ou com dois ângulos.

Pontue 0		
Pontue 1		

Cubo – pontue 0 a 2

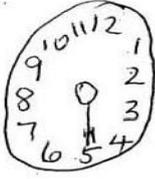
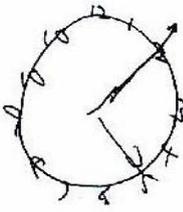
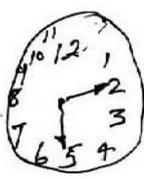
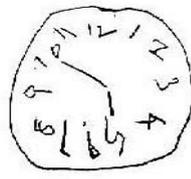
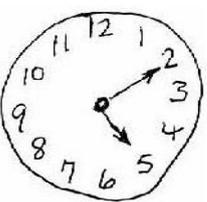
Pontue 1			
			
Pontue 2			
			

Relógio - pontue de 0 a 5

Peça ao indivíduo para desenhar o mostrador de um relógio com os números dentro. Quando ele/ ela terminar, peça para colocar os ponteiros marcando 'cinco e dez'.

Círculo	Máximo de 1 ponto, se for um círculo razoável
Números	2 pontos, se estiver tudo incluído e bem distribuído 1 ponto, se tudo estiver incluído, mas mal distribuído
Ponteiros	2 pontos, se ambos os ponteiros forem bem desenhados, com comprimentos diferentes e colocados nos números corretos (você pode perguntar qual é o ponteiro pequeno e qual é o ponteiro grande) 1 ponto, se os dois forem colocados nos números corretos, mas com comprimentos errados ou 1 ponto, se um ponteiro estiver colocado no número correto e desenhado com comprimento correto ou 1 ponto, se apenas um ponteiro estiver desenhado e colocado no número correto, ex. 5 para ' cinco e dez'.

Pontue 2	
Círculo (1); um ponteiro colocado corretamente (1)	Círculo(1); todos os números mas não estão colocados dentro do círculo (1)
	

Pontue 3		
Círculo (1); todos os números, mas não distribuídos proporcionalmente (1); um ponteiro colocado corretamente(1)	Círculo (1); todos os números ,mas não colocados dentro do círculo (1); um ponteiro colocado corretamente (1)	Círculo (1); note que os números não estão dentro do círculo e há 2 números 10 (0); ponteiros colocados corretamente (2)
		
Pontue 4		
Círculo (1); números distribuídos proporcionalmente (2); um ponteiro colocado corretamente (1)	Círculo (1); todos os números, mas não distribuídos proporcionalmente (1); ambos os ponteiros colocados corretamente (2)	Círculo (1); números distribuídos proporcionalmente (2); um ponteiro colocado corretamente (1)
		
Pontue 5		
Círculo (1); números distribuídos proporcionalmente nas duas metades da face do relógio (2); ponteiros colocados corretamente (2)		
		

HABILIDADES PERCEPTIVAS

Contagem de pontos – pontue 0 a 4

Não é permitido que o indivíduo os aponte.

Respostas corretas, a partir do canto esquerdo: 8, 10, 9 e 7.

Identificação de letras – pontue de 0 a 4

Respostas corretas, a partir do canto esquerdo: K, M, T e A.

RECORDAÇÃO E RECONHECIMENTO

Recordação – pontue de 0 a 7

➤ Assinale e dê um ponto para cada item recordado.

Reconhecimento – pontue de 0 a 5

➤ Diga ao indivíduo: "Eu vou lhe dar algumas dicas. Era" e então continue com as opções das partes incorretas ou esquecidas.

Exemplo 1

Ricardo Oliveira	0 + 0	
Boa Vista 78	0 + 1 + 0	
Santana	0	
Pará	1	Escore 2/7

-
- O examinador deverá perguntar então:
- Era Ricardo Moreira, Renato Moreira ou Renato Nogueira?
 - Era Bela Vida, Boa Vista ou Bela Vista?
 - Era 37, 73 ou 76?
 - Era Santana, Santarém ou Belém?
-

Exemplo 2

Renato Moreira	1 + 1	Score 5/7
Grande Vista 73	0 + 1 + 1	
Mantena	0	
Pará	1	

- O examinador deverá perguntar então:
- Era Bela Vida, Boa Vista ou Bela Vista?
 - Era Santana, Santarém ou Belém?
-

Exemplo 3

Renato Oliveira	1 + 0	Score 2/7
Boa Vida 33	0 + 0 + 0	
Bela Silveira	0 + 0	
Sabará	0	
Pará	1	

- O examinador deverá perguntar então:
- Era Ricardo Moreira, Renato Moreira ou Renato Nogueira?
 - Era 37, 73 ou 76?
 - Era Bela Vida, Boa Vista ou Bela Vista?
 - Era Santana, Santarém ou Belém?
-

Anexo 7– Instrumento *Clinical Dementia Rating (CDR)*

	Saudável CDR 0	Demência questionável CDR 0,5	Demência leve CDR 1	Demência moderada CDR 2	Demência grave CDR 3
MEMÓRIA	Sem perda de memória, ou apenas esquecimento discreto e inconsistente	Esquecimento leve e consistente; lembrança parcial de eventos; "esquecimento benigno"	Perda de memória moderada, mais acentuada para fatos recentes; o déficit interfere com atividades do dia-a-dia	Perda de memória grave; apenas material <i> muito </i> aprendido é retido; materiais novos são rapidamente perdidos	Perda de memória grave; apenas fragmentos permanecem
ORIENTAÇÃO	Plenamente orientado	Plenamente orientado	Dificuldade moderada com as relações de tempo; orientado no espaço no exame, mas pode ter desorientação geográfica em outros locais	Geralmente desorientado	Orientação pessoal apenas
JULGAMENTO E SOLUÇÃO DE PROBLEMAS	Resolve bem problemas do dia-a-dia, juízo crítico é bom em relação ao desempenho passado	Leve comprometimento na solução de problemas, semelhanças e diferenças	Dificuldade moderada na solução de problemas, semelhanças e diferenças; julgamento social geralmente mantido	Gravemente comprometido para solução de problemas, semelhanças e diferenças. Juízo social geralmente comprometido	Incapaz de resolver problemas ou de ter qualquer juízo crítico
ASSUNTOS NA COMUNIDADE	Função independente na função habitual de trabalho, compras, negócios, finanças, e grupos sociais	Leve dificuldade nestas atividades	Incapaz de funcionar independentemente nestas atividades embora ainda possa desempenhar algumas; pode parecer normal à avaliação superficial	Sem possibilidade de desempenho fora de casa. Parece suficientemente bem para ser levado a atividades fora de casa	Sem possibilidade de desempenho fora de casa. Parece muito doente para ser levado a atividades fora de casa
LAR E PASSATEMPOS	Vida em casa, passatempos, e interesses intelectuais mantidos	Vida em casa, passatempos, e interesses intelectuais levemente afetados	Comprometimento leve mas evidente em casa; abandono das tarefas mais difíceis; passatempos e interesses mais complicados são também abandonados	Só realiza as tarefas mais simples. Interesses muito limitados e pouco mantidos	Sem qualquer atividade significativa em casa
CUIDADOS PESSOAIS	Plenamente capaz	Plenamente capaz	Necessita assistência ocasional	Requer assistência no vestir e na higiene	Requer muito auxílio nos cuidados pessoais. Geralmente incontinente

Anexo 8 – Imagens integras das membranas referentes aos experimentos de Western Blotting feitos durante todo o período do estudo.

Análise plaquetária

Figura S1 a. Imagem da membrana referente aos níveis de ADAM10 na condição controle.

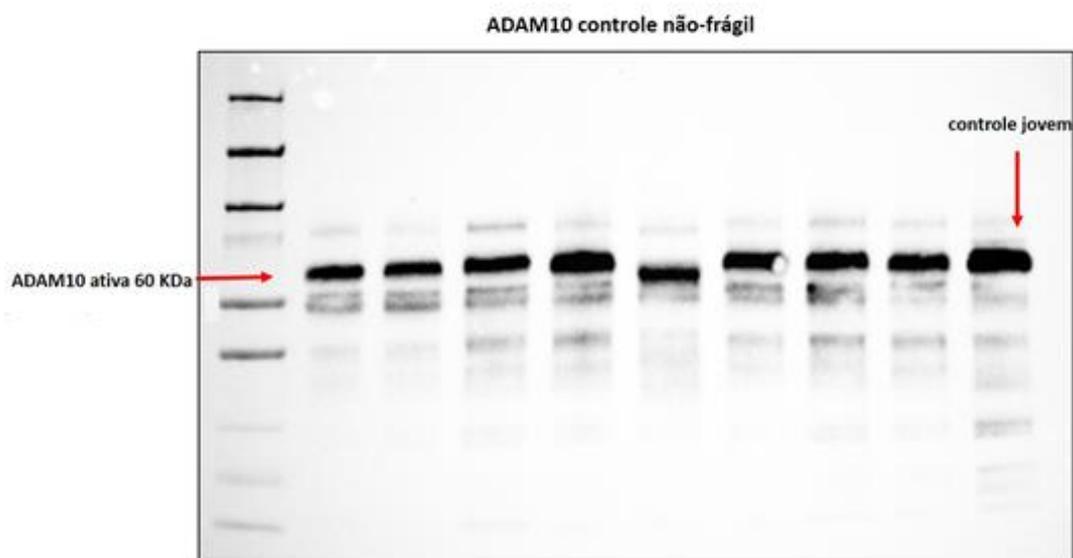


Figura S1 b. Imagem da membrana referente ao controle endógeno (β -actina) da figura S1 a.

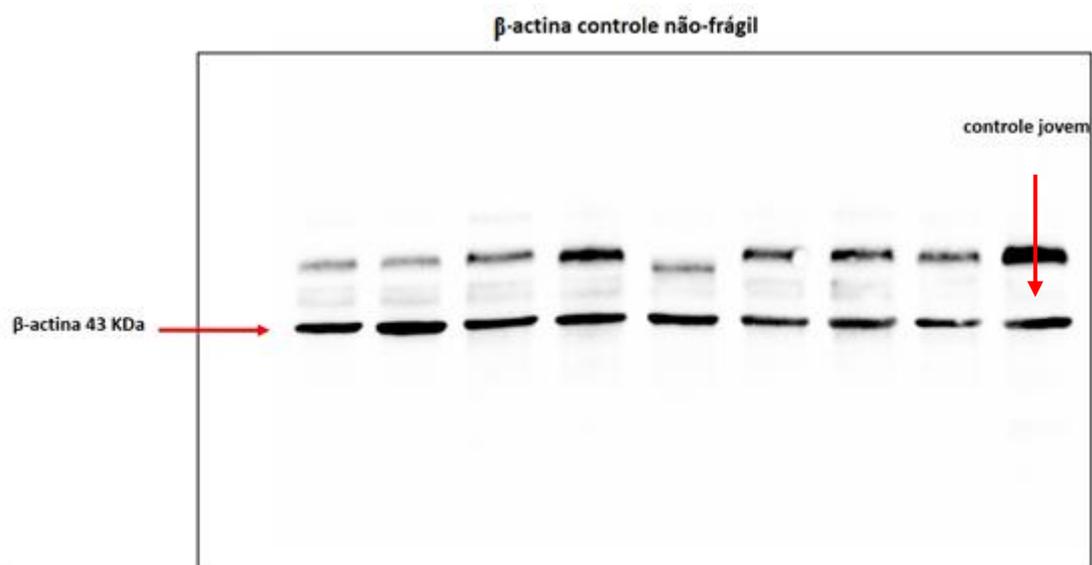


Figura S2 a. Imagem da membrana referente aos níveis de ADAM10 na condição controle.

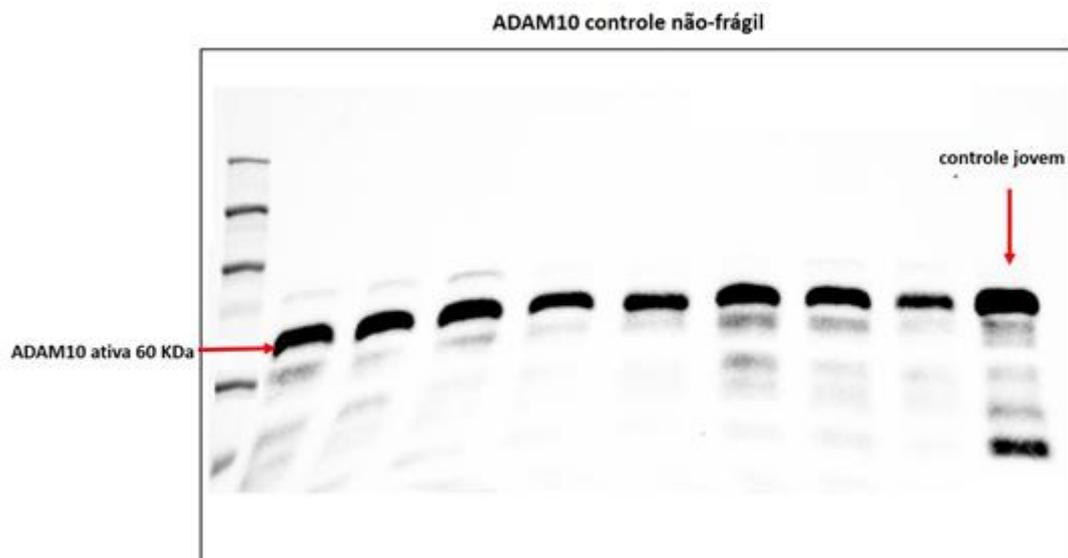


Figura S2 b. Imagem da membrana referente ao controle endógeno (β -actina) da figura S2 a.

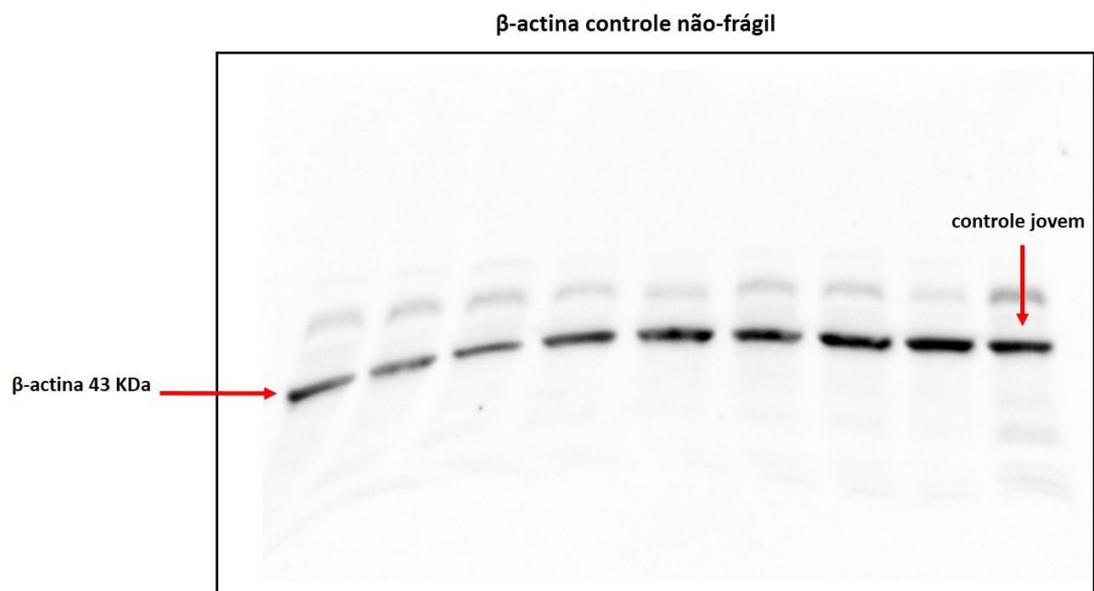


Figura S3 a. Imagem da membrana referente aos níveis de ADAM10 na condição Fragilidade.

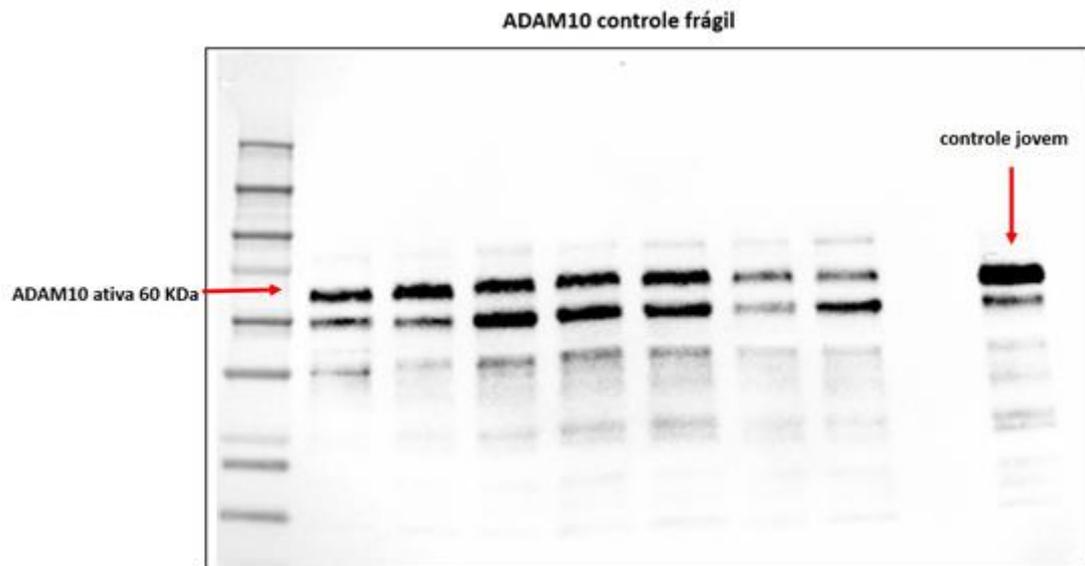


Figura S3 b. Imagem da membrana referente ao controle endógeno (β -actina) da figura S3 a.

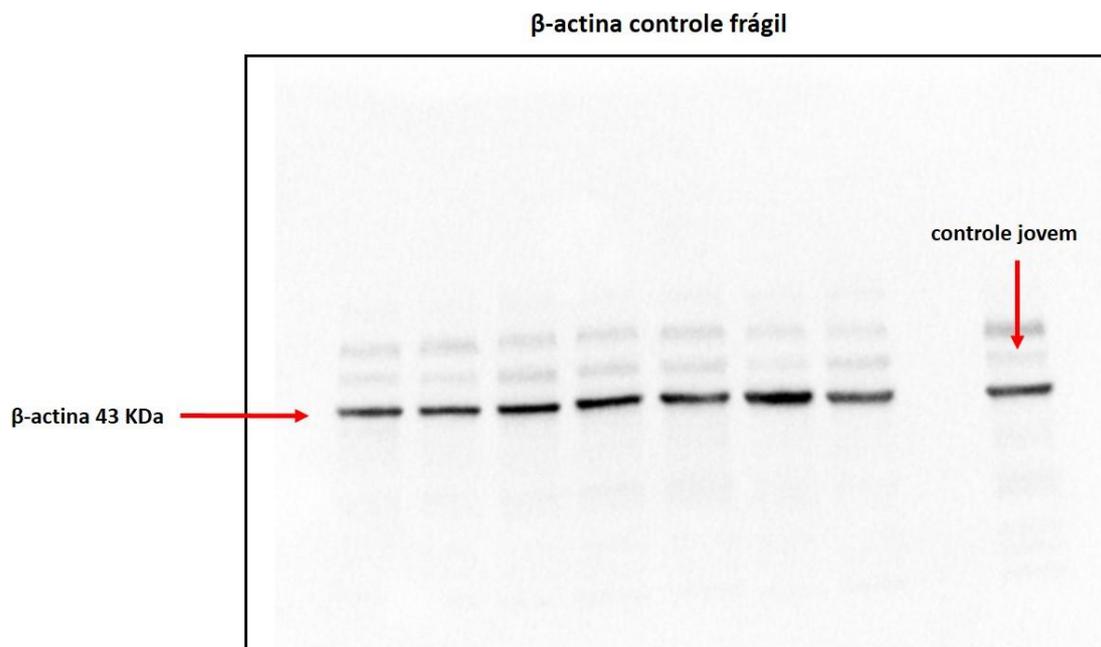


Figura S4 a. Imagem da membrana referente aos níveis de ADAM10 na condição Fragilidade.

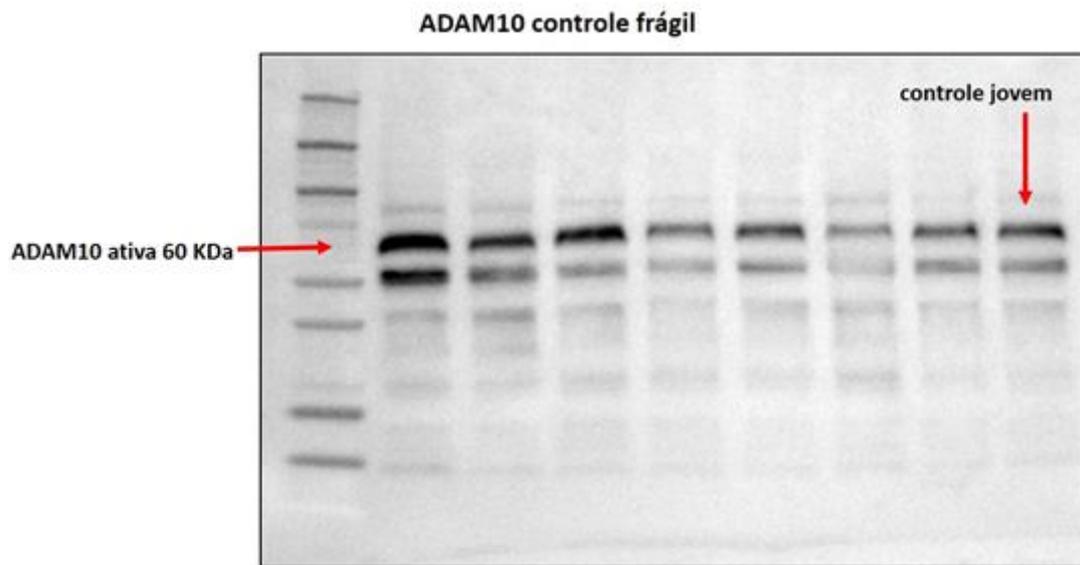


Figura S4 b. Imagem da membrana referente ao controle endógeno (β -actina) da figura S4 a.

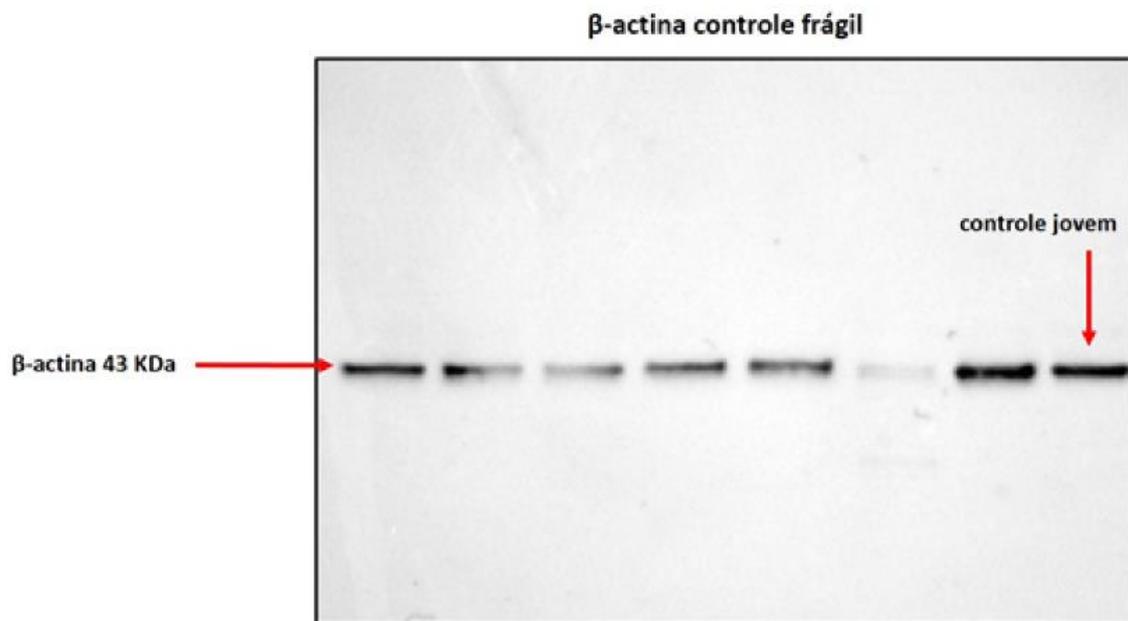


Figura S5 a. Imagem da membrana referente aos níveis de ADAM10 na condição TNCL.

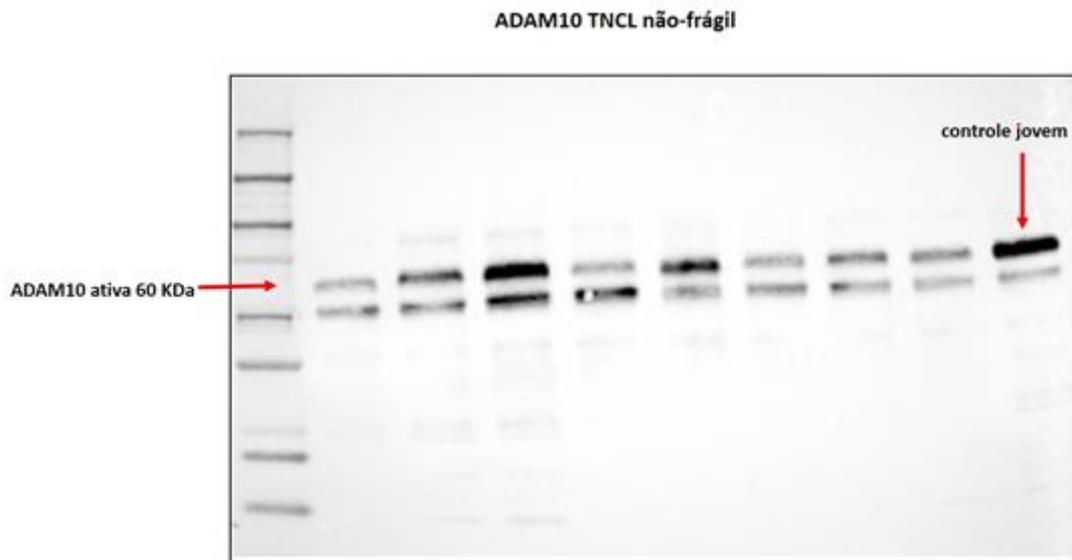


Figura S5 b. Imagem da membrana referente ao controle endógeno (β -actina) da figura S5 a.

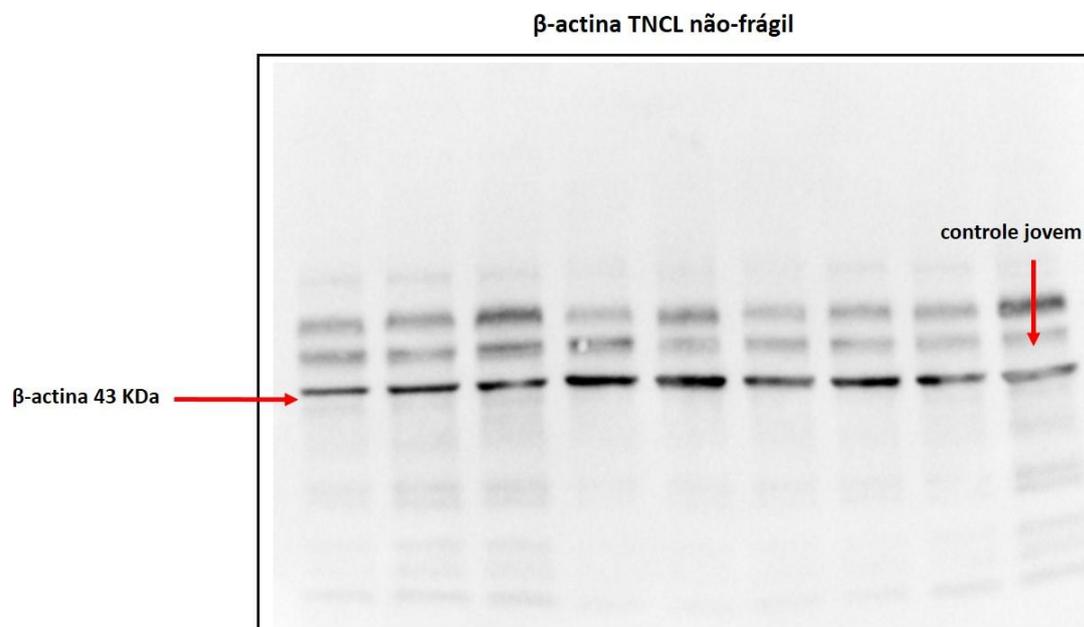


Figura S6 a. Imagem da membrana referente aos níveis de ADAM10 na condição TNCL.

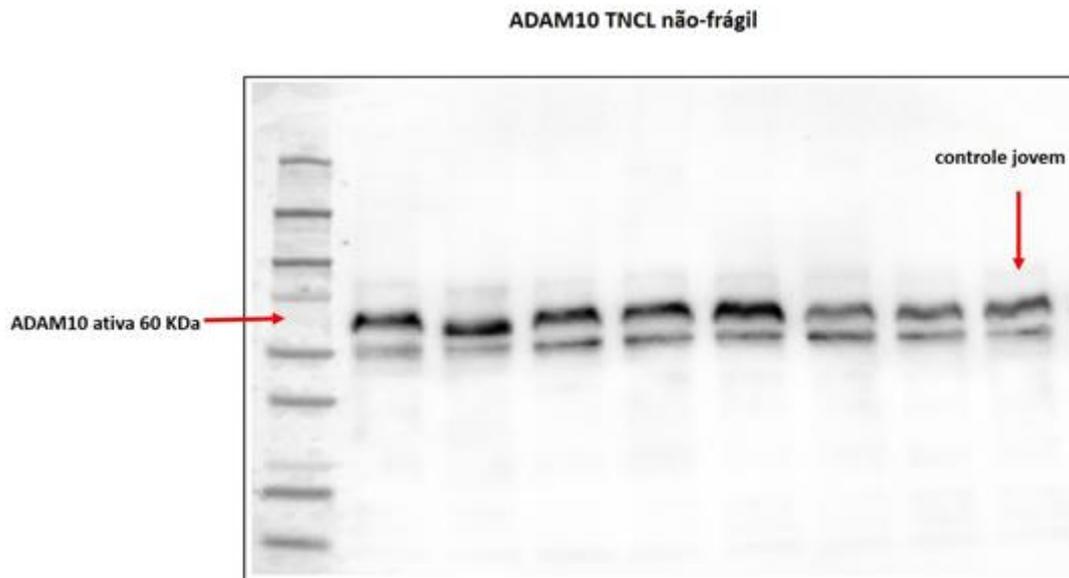


Figura S6 b. Imagem da membrana referente ao controle endógeno (β -actina) da figura S6 a.

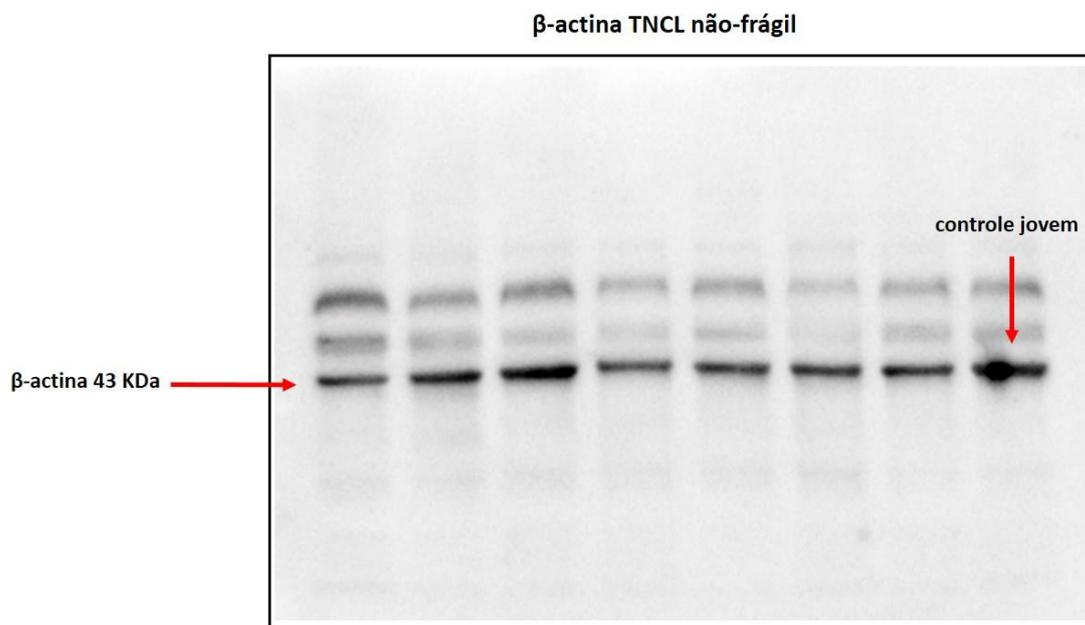


Figura S7 a. Imagem da membrana referente aos níveis de ADAM10 na condição Fragilidade + TNCL.

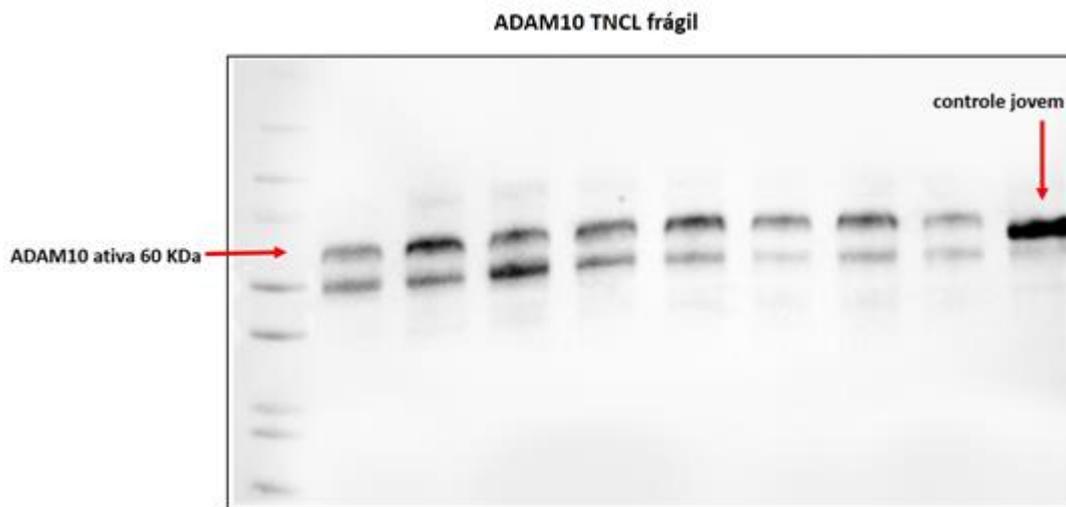


Figura S7 b. Imagem da membrana referente ao controle endógeno (β -actina) da figura S7 a.

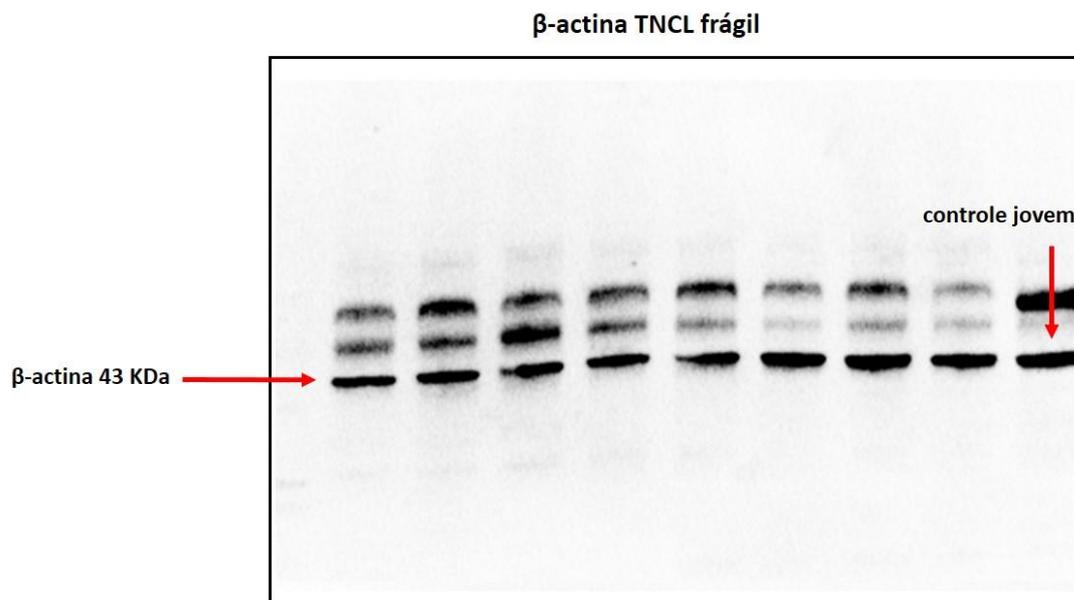


Figura S8 a. Imagem da membrana referente aos níveis de ADAM10 na condição Fragilidade + TNCL.

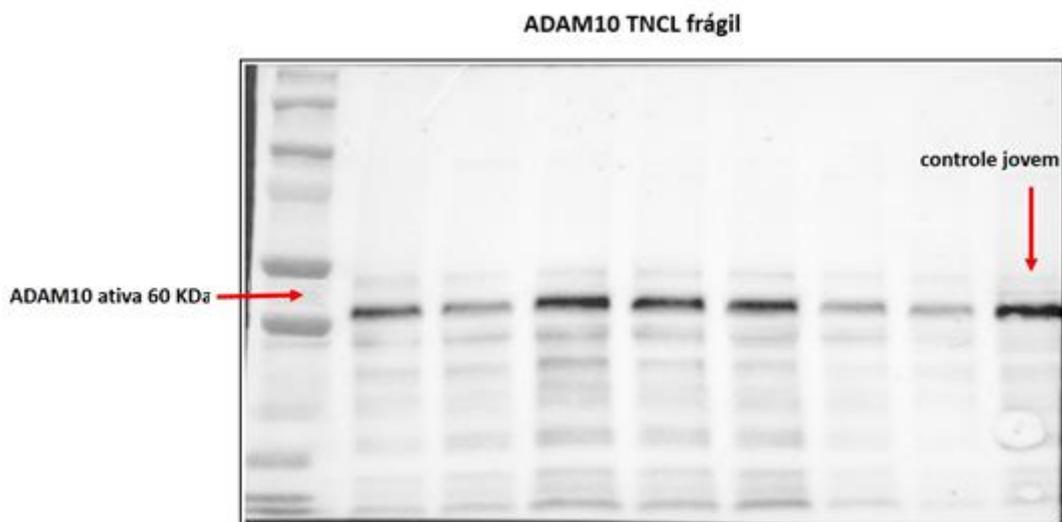


Figura S8 b. Imagem da membrana referente ao controle endógeno (β -actina) da figura S8 a.

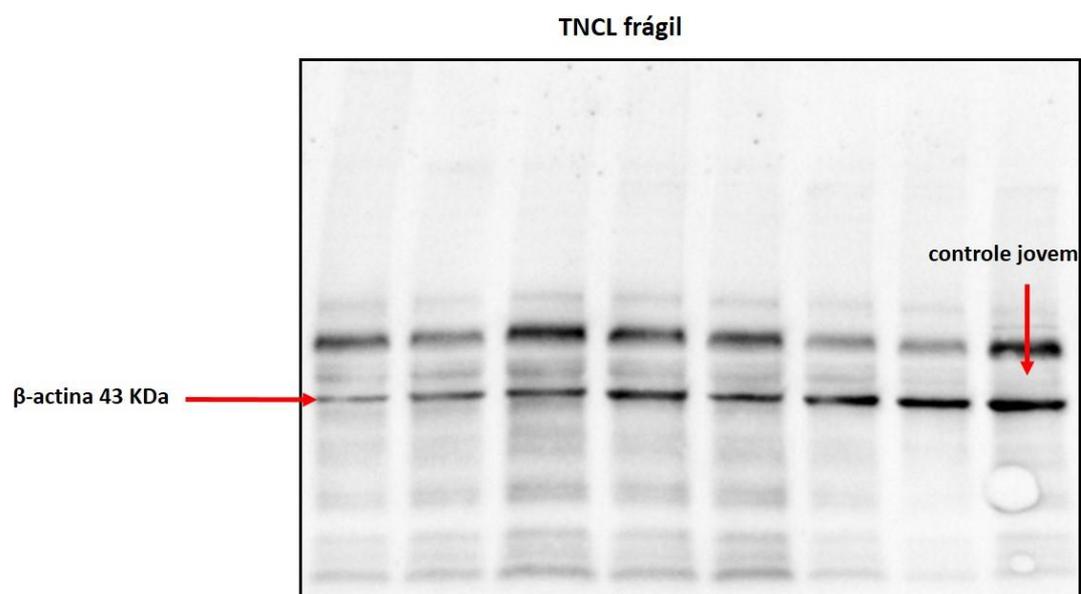


Figura S9 a. Imagem da membrana referente aos níveis de ADAM10 na condição Fragilidade + TNCL / Controle.

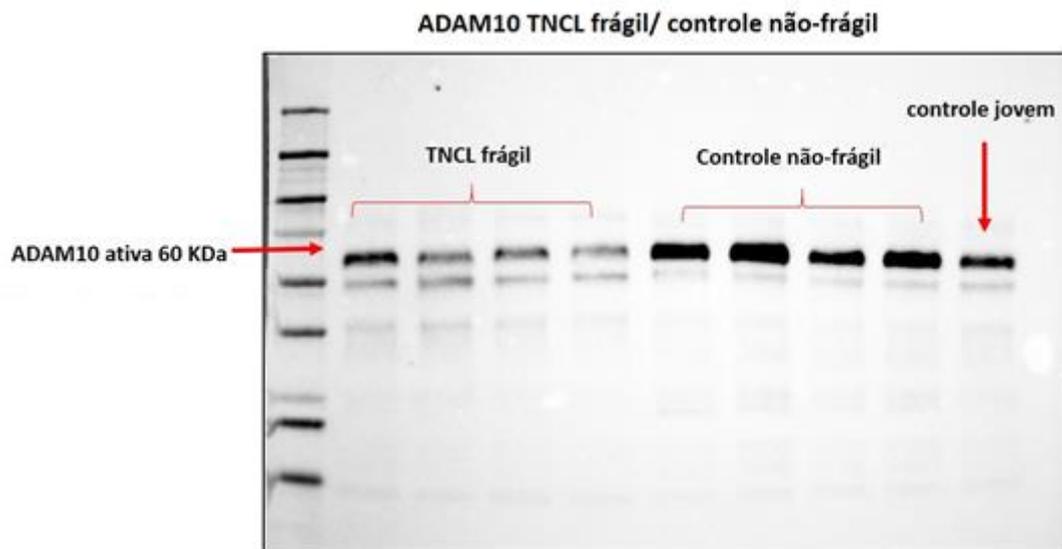


Figura S9 b. Imagem da membrana referente ao controle endógeno (β -actina) da figura S9 a.

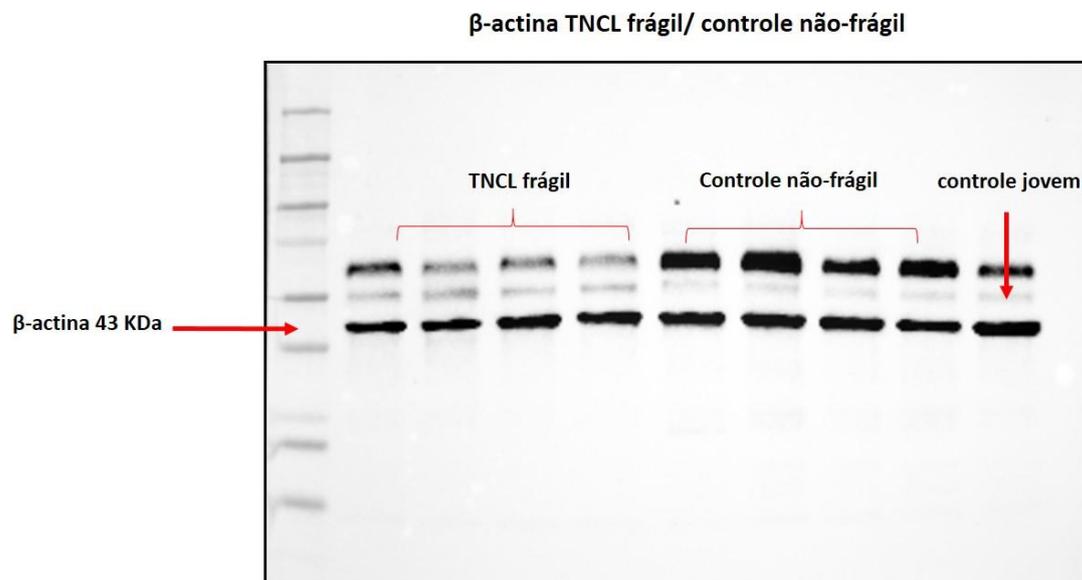


Figura S10a. Imagem da membrana referente aos níveis de ADAM10 nas condições Controle, Fragilidade e TNCL.

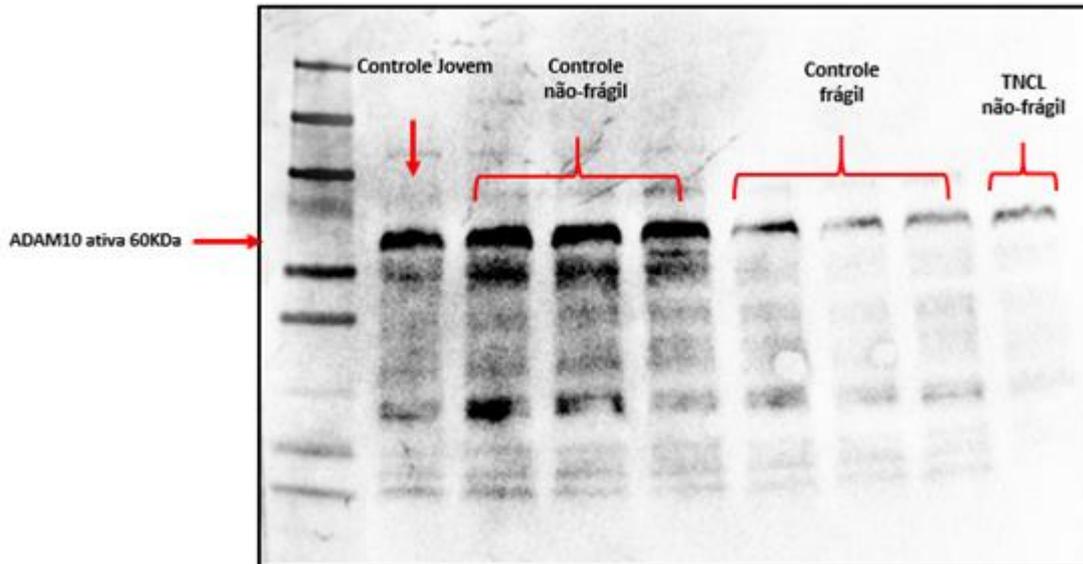
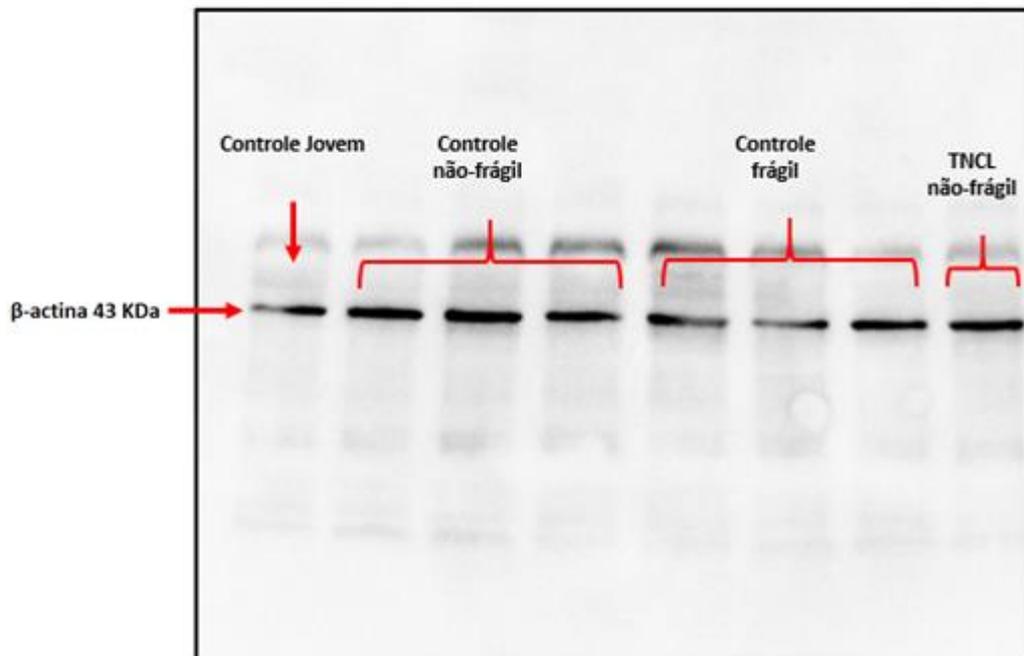


Figura S10b. Imagem da membrana referente ao controle endógeno (β -actina) da figura S10a.



Anexo 9 – Imagens integras das membranas referentes aos experimentos de Western Blotting feitos durante todo o período do estudo.

Análise plasmática

Figura S11a. Imagem da membrana referente aos níveis de ADAM10 na condição controle

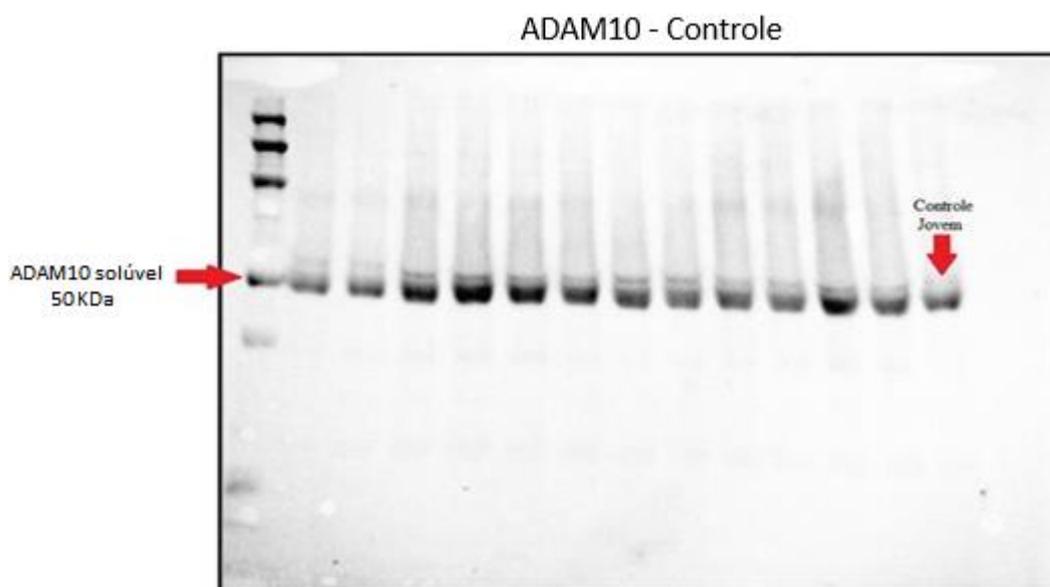


Figura S11b. Imagem da membrana referente ao controle endógeno (albumina) da figura S11a.

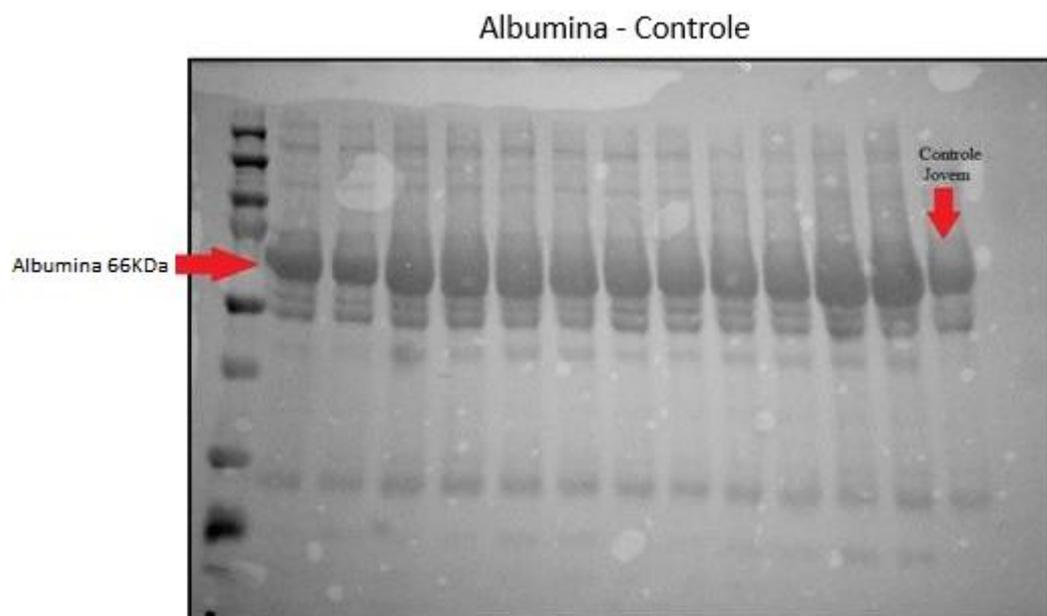


Figura S12a. Imagem da membrana referente aos níveis de ADAM10 na condição Fragilidade + TNCL e TNCL.

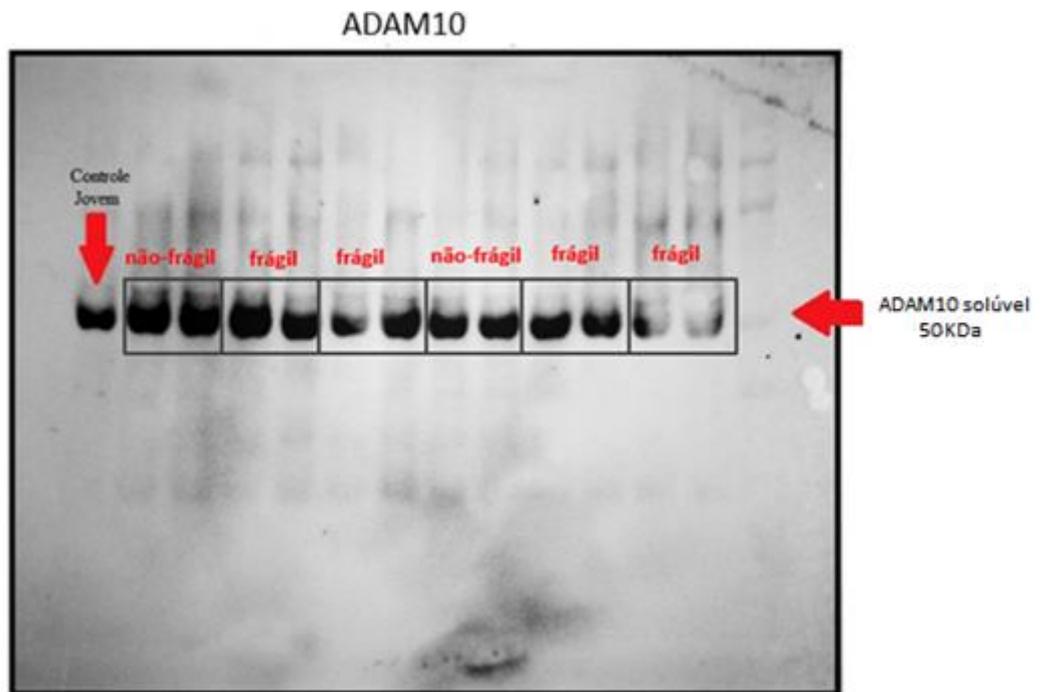


Figura S12b. Imagem da membrana referente ao controle endógeno (Albumina) da figura S12a.

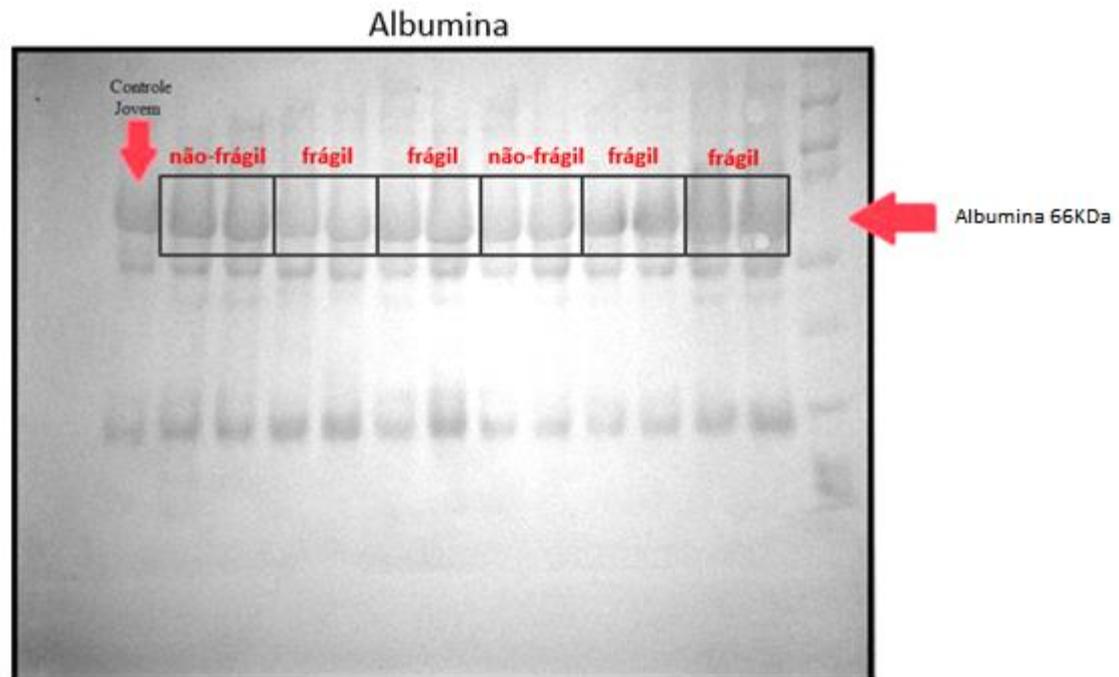


Figura S13a. Imagem da membrana referente aos níveis de ADAM10 na condição Fragilidade + TNCL e TNCL.

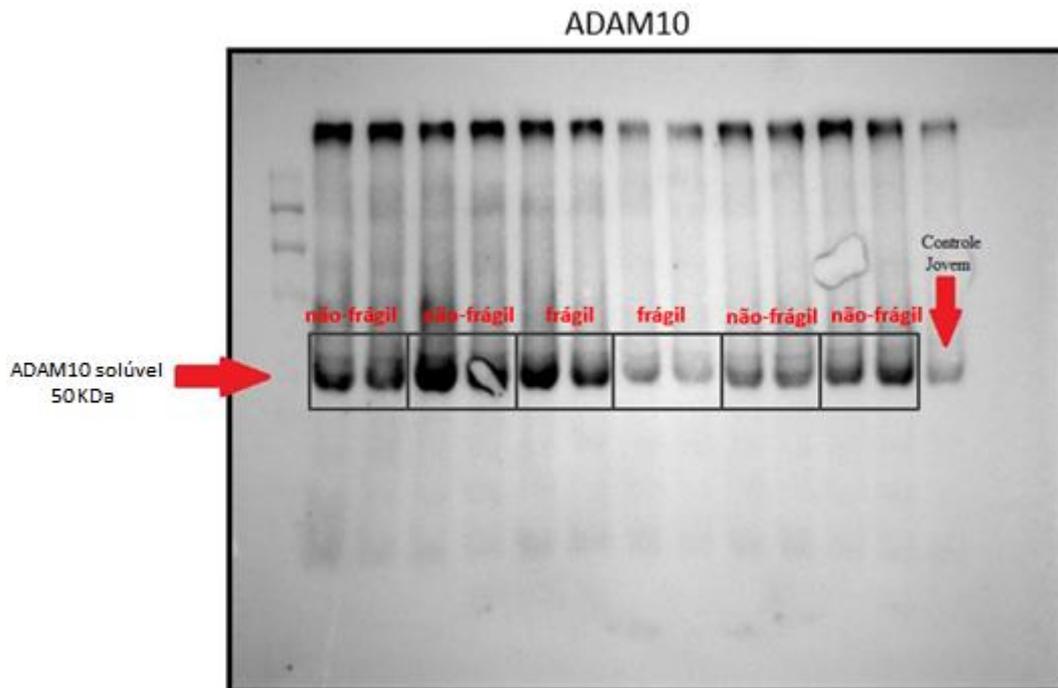


Figura S13b. Imagem da membrana referente ao controle endógeno (Albumina) da figura S13a.

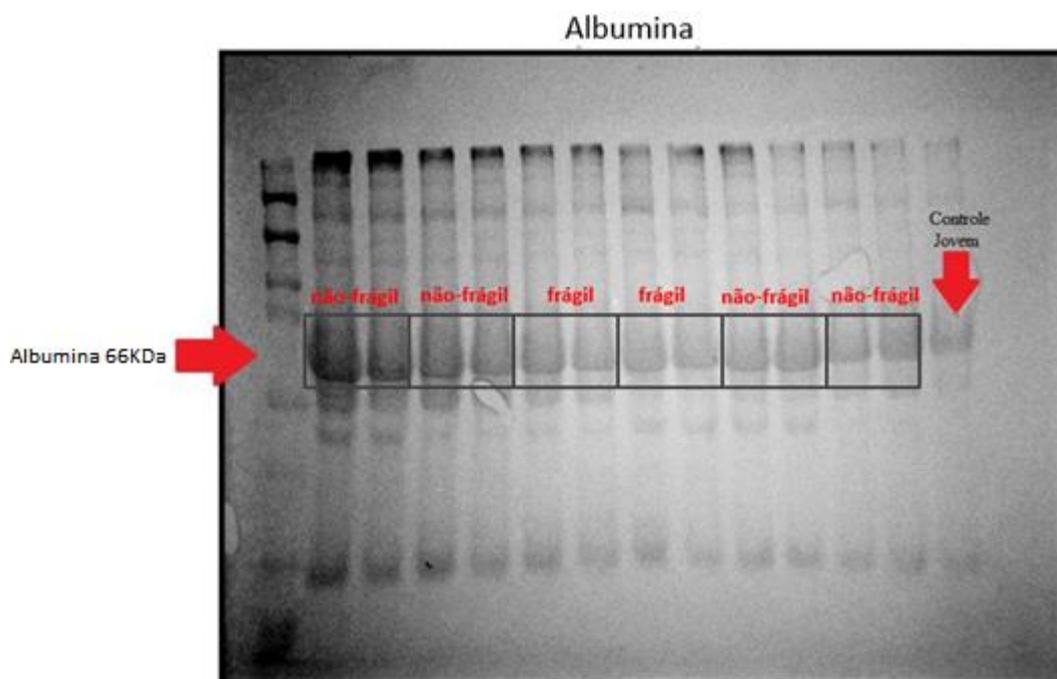


Figura S14a. Imagem da membrana referente aos níveis de ADAM10 na condição Fragilidade + TNCL e TNCL.

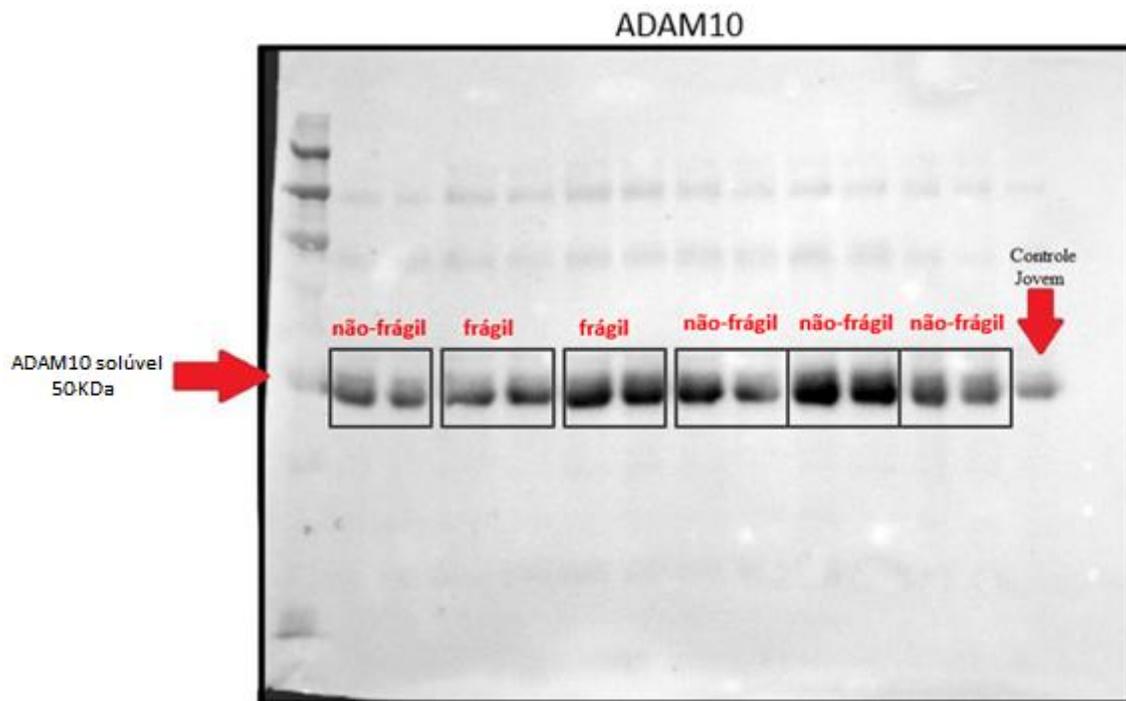


Figura S14b. Imagem da membrana referente ao controle endógeno (Albumina) da figura S14a.

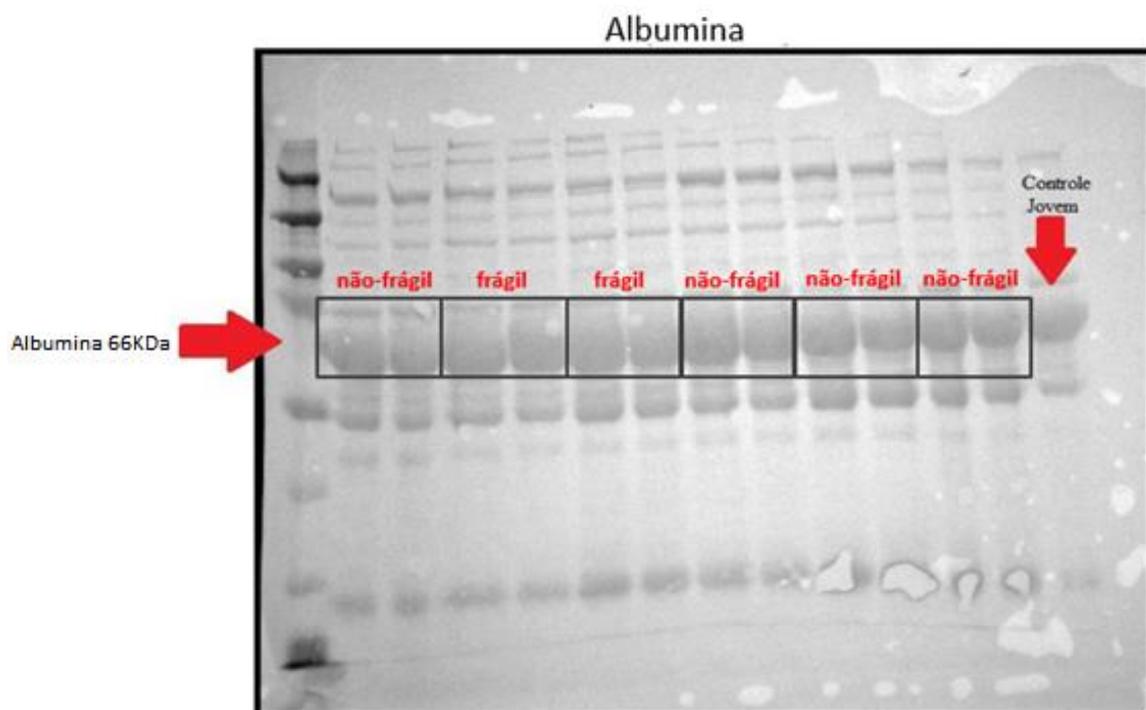


Figura S15a. Imagem da membrana referente aos níveis de ADAM10 na condição Fragilidade + TNCL e TNCL.

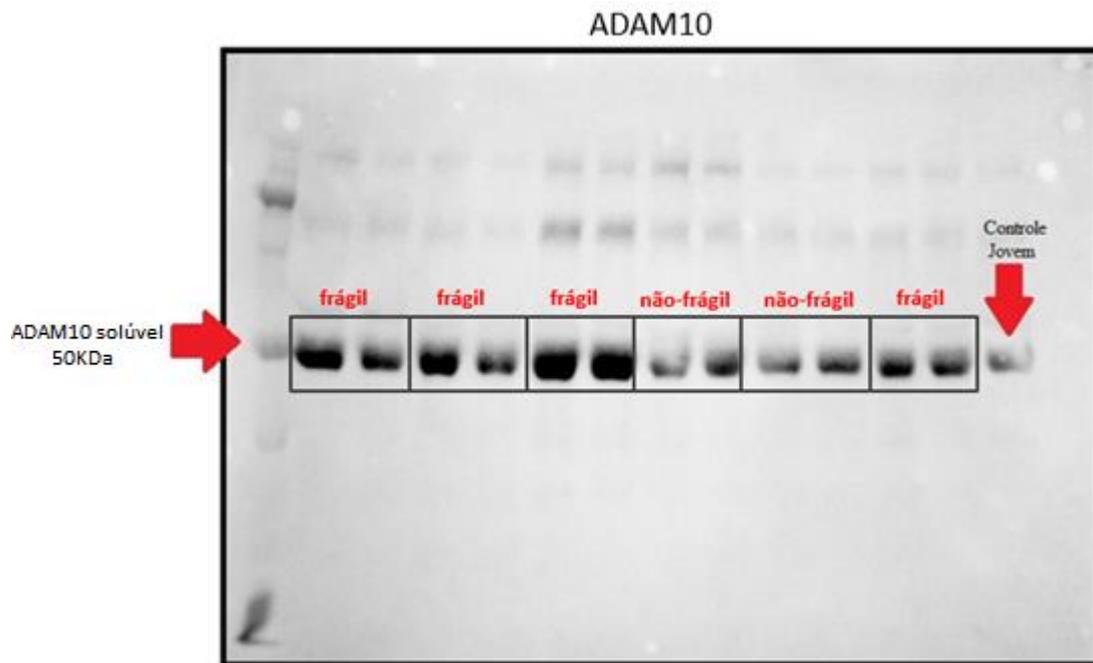


Figura S15b. Imagem da membrana referente ao controle endógeno (Albumina) da figura S15a.

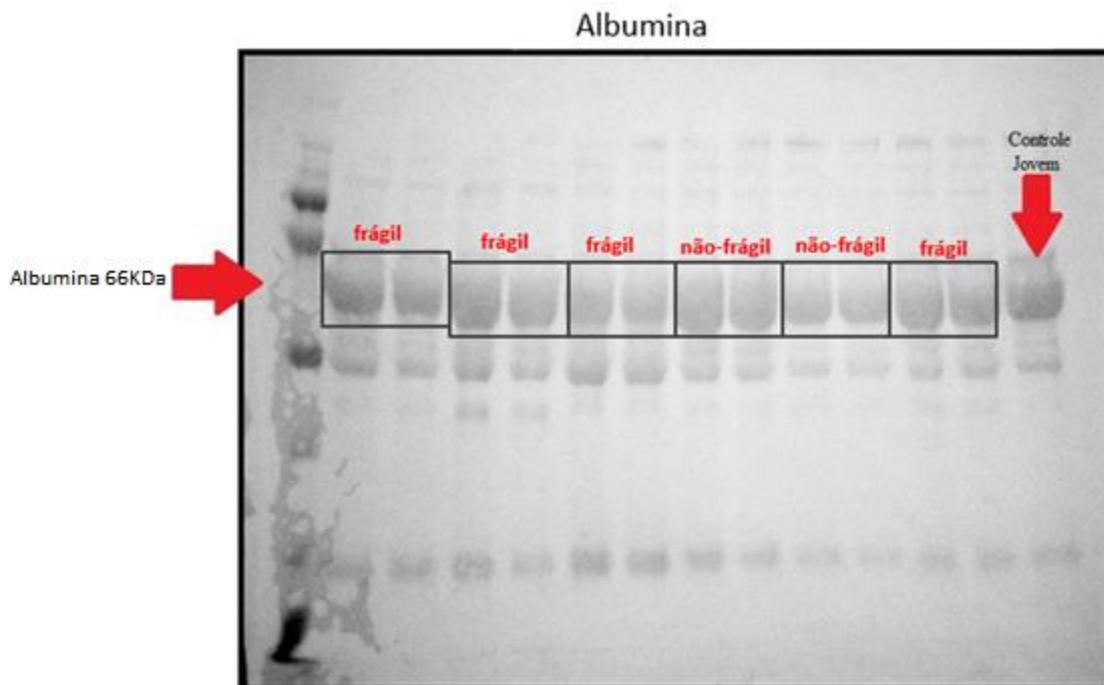


Figura S16a. Imagem da membrana referente aos níveis de ADAM10 na condição Controle.

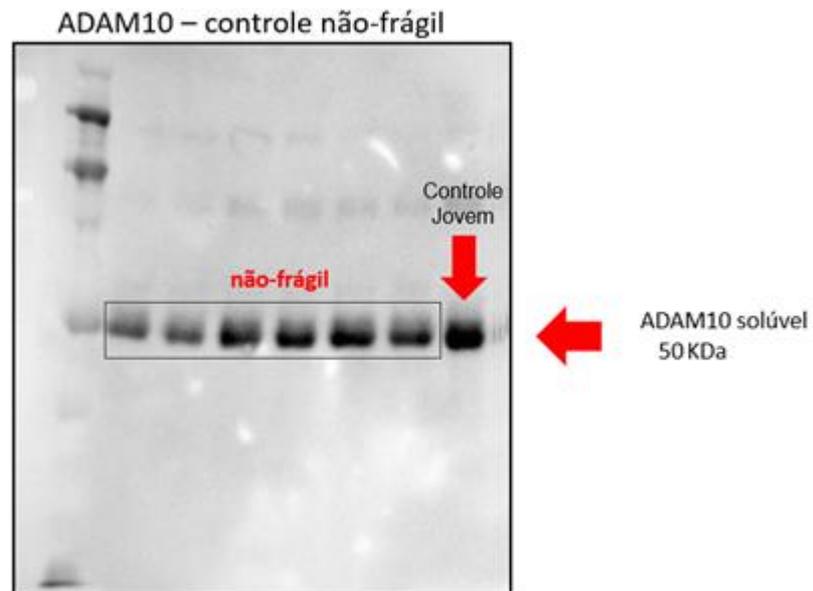


Figura S16b. Imagem da membrana referente ao controle endógeno (albumina) da figura S16a.

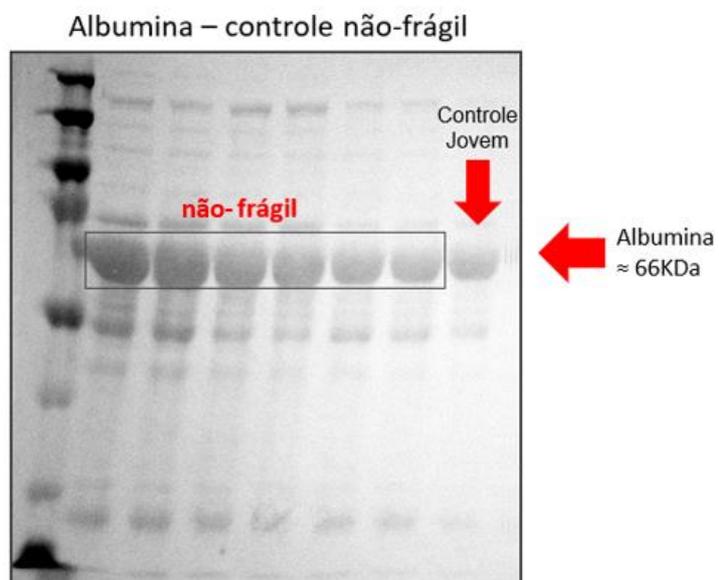


Figura S17a. Imagem da membrana referente aos níveis de ADAM10 na condição Fragilidade.

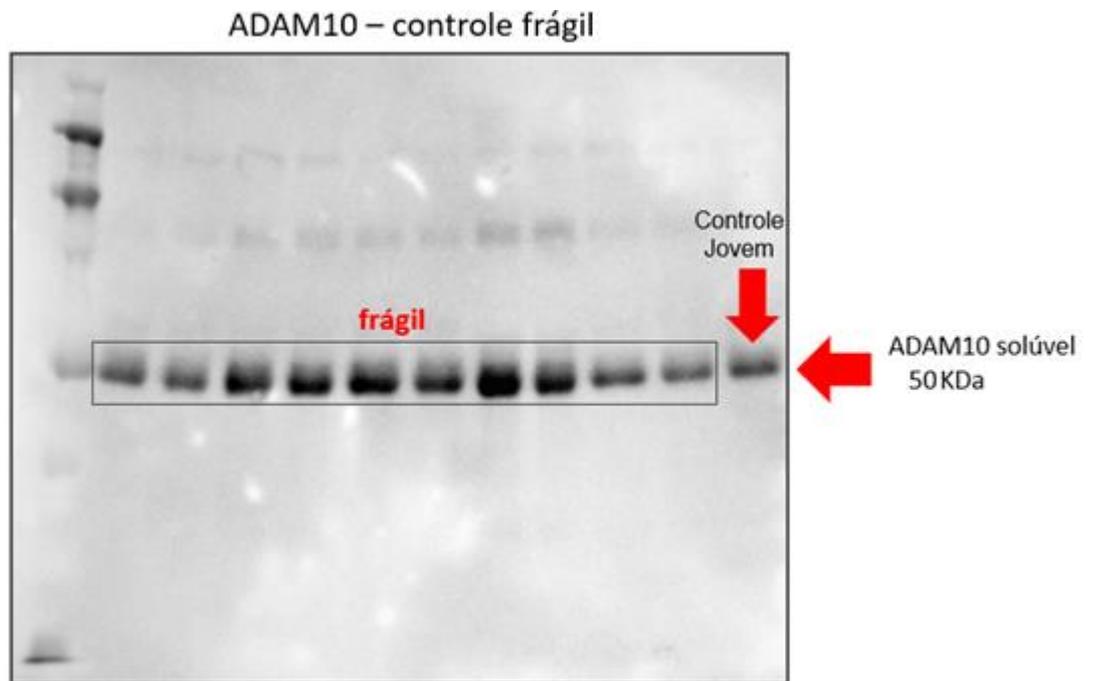


Figura S17b. Imagem da membrana referente ao controle endógeno (albumina) da figura S17a.

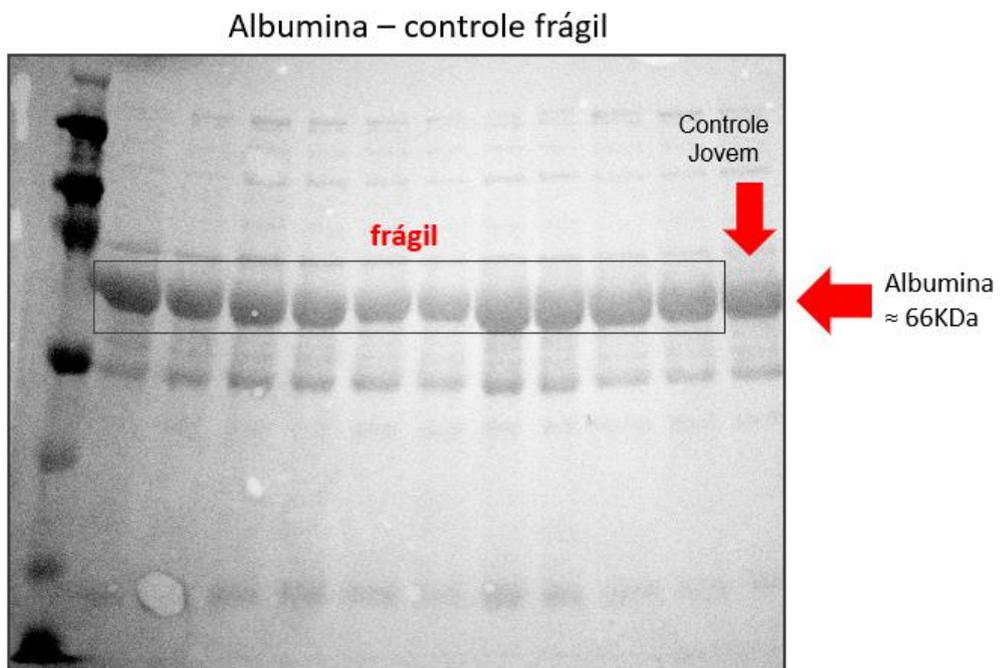


Figura S18a. Imagem da membrana referente aos níveis de ADAM10 na condição Fragilidade + TNCL e TNCL.

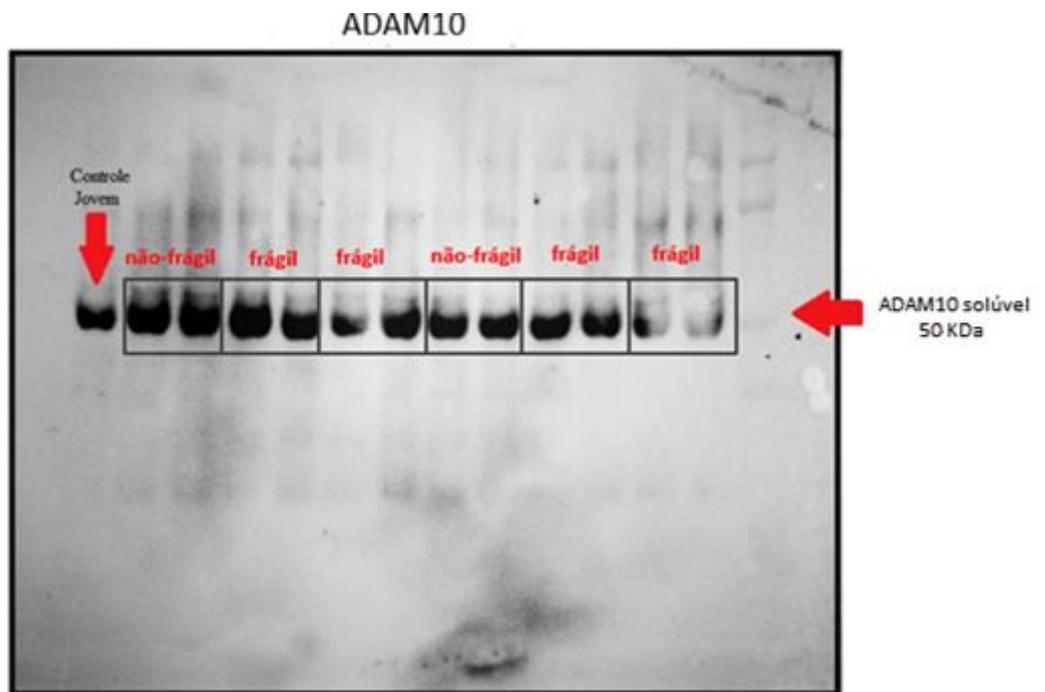


Figura S18b. Imagem da membrana referente ao controle endógeno (Albumina) da figura S18a.

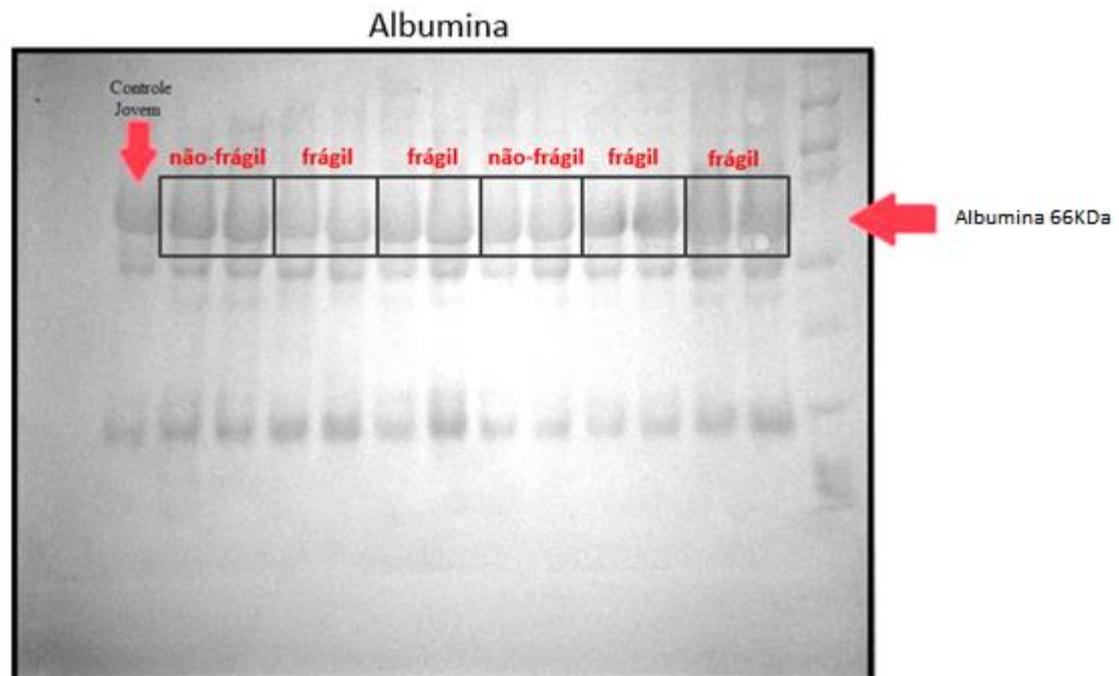


Figura S19a. Imagem da membrana referente aos níveis de ADAM10 na condição Fragilidade + TNCL e TNCL.

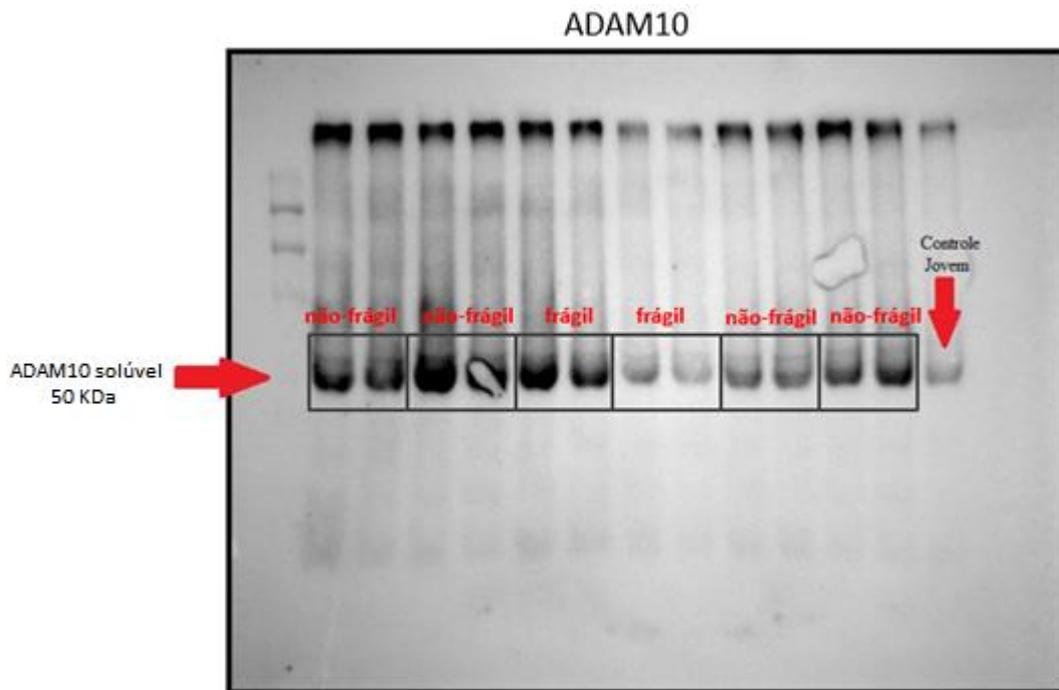


Figura S19b. Imagem da membrana referente ao controle endógeno (Albumina) da figura S19a.

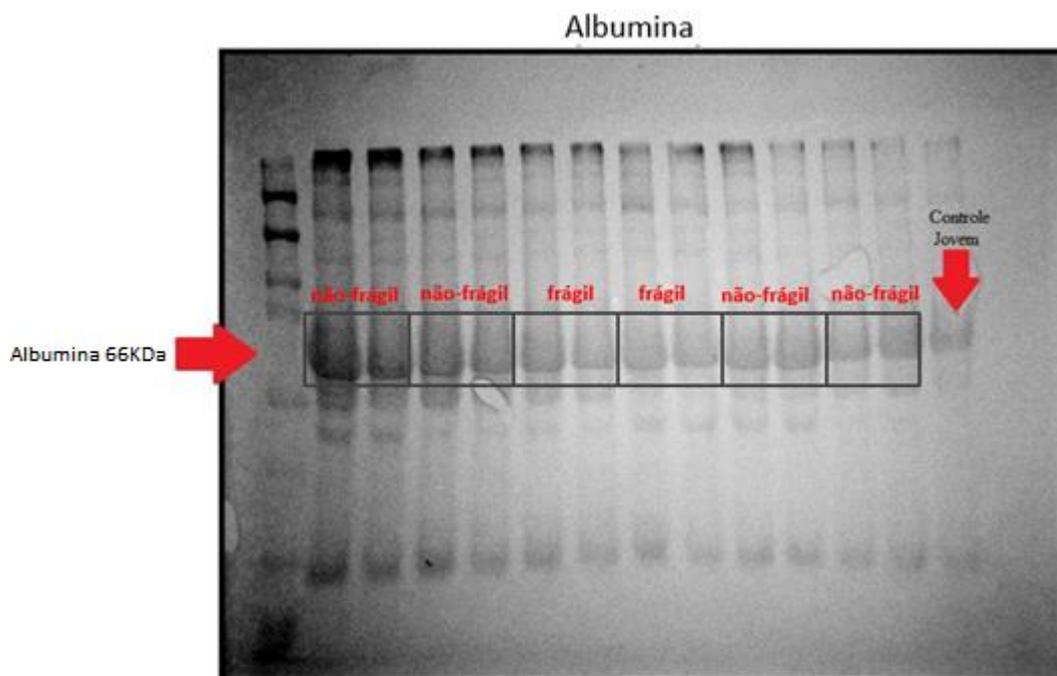


Figura S20a. Imagem da membrana referente aos níveis de ADAM10 na condição Fragilidade + TNCL e TNCL.

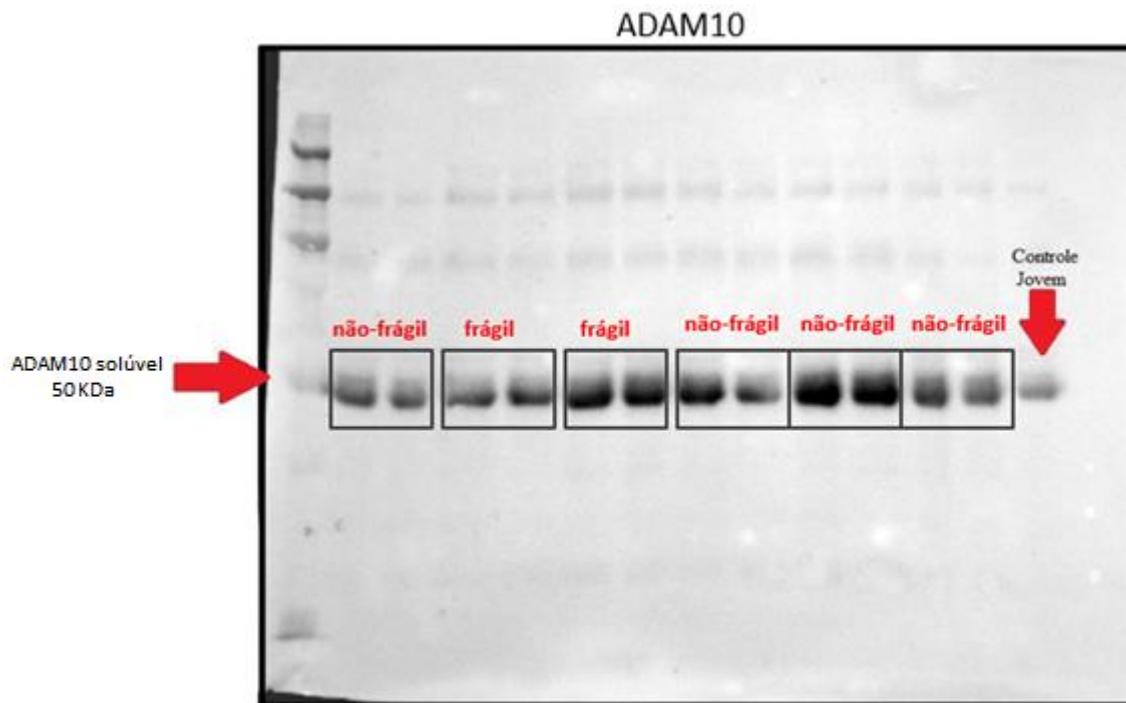


Figura S20b. Imagem da membrana referente ao controle endógeno (Albumina) da figura S20a.

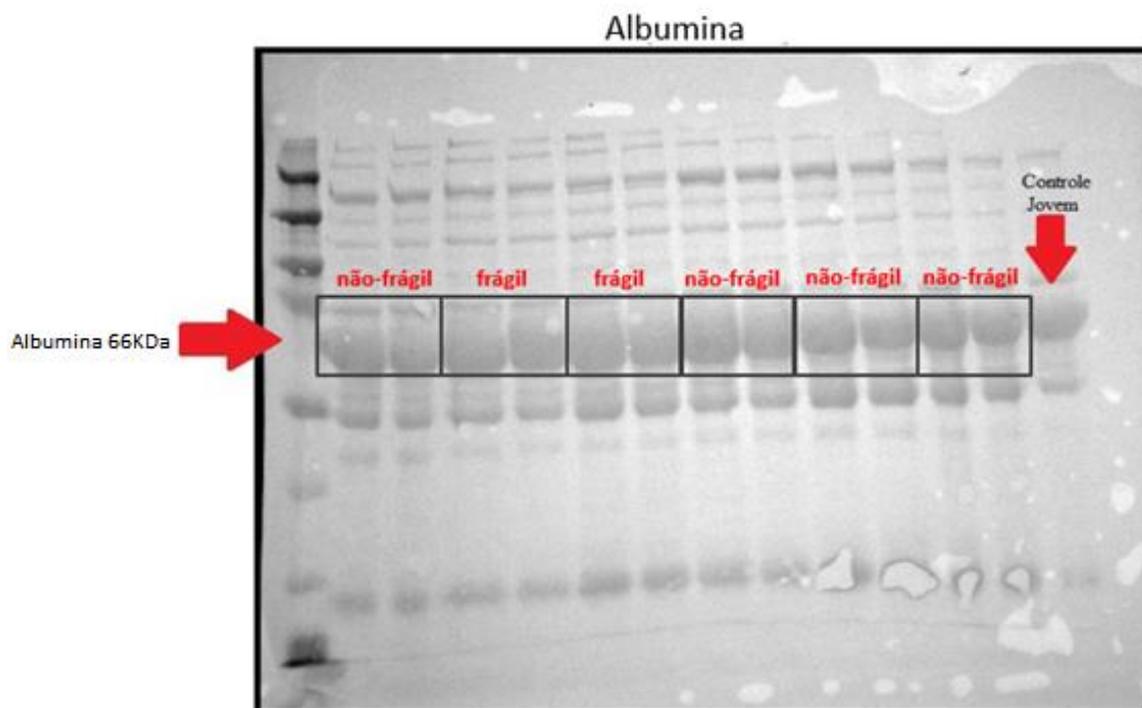


Figura S21a. Imagem da membrana referente aos níveis de ADAM10 na condição Fragilidade + TNCL e TNCL.

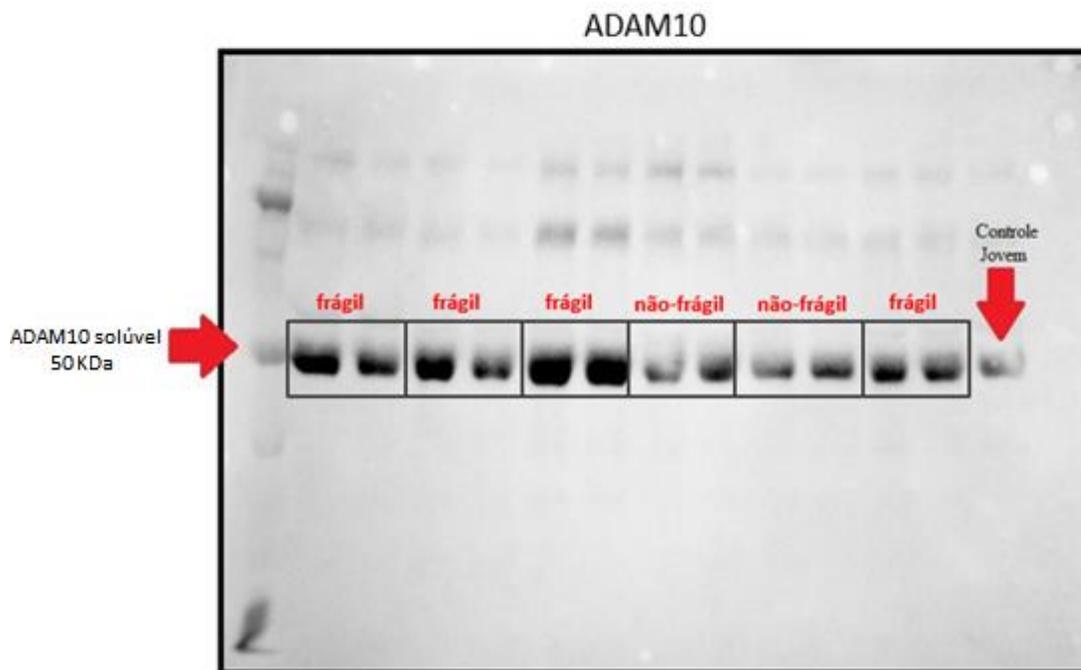


Figura S21b. Imagem da membrana referente ao controle endógeno (Albumina) da figura S21a.

