

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
DEPARTAMENTO DE GERONTOLOGIA  
BACHARELADO EM GERONTOLOGIA**

**ATIVIDADE E NÍVEIS DA ADAM10 PLASMÁTICA EM INDIVÍDUOS COM  
TRANSTORNO NEUROCOGNITIVO LEVE E DOENÇA DE ALZHEIMER**

**MARINA MANTELLATTO GRIGOLI**

**SÃO CARLOS  
2020**

**MARINA MANTELLATTO GRIGOLI**

**ATIVIDADE E NÍVEIS DA ADAM10 PLASMÁTICA EM INDIVÍDUOS COM  
TRANSTORNO NEUROCOGNITIVO LEVE E DOENÇA DE ALZHEIMER**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado  
junto à Universidade Federal de São Carlos  
com requisito para obtenção do título de  
Bacharel em Gerontologia.

**Orientadora:** Prof<sup>o</sup> Dra. Márcia Regina  
Cominetti

**Coorientadora:** Dra. Izabela Pereira Vatanabe

**SÃO CARLOS  
2020**

MARINA MANTELLATTO GRIGOLI

**ATIVIDADE E NÍVEIS DA ADAM10 PLASMÁTICA EM INDIVÍDUOS COM  
TRANSTORNO NEUROCOGNITIVO LEVE E DOENÇA DE ALZHEIMER**

Trabalho de conclusão de curso apresentado à Universidade Federal de São Carlos  
como exigência parcial para obtenção do título de Bacharel em Gerontologia.

Apresentado em: 18/12/2020

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof<sup>o</sup> Dra. Márcia Regina Cominetti  
Orientadora

---

Dra. Izabela Pereira Vatanabe  
Coorientadora

---

Ms. Lucas Pelegrini N. de Carvalho  
Membro Titular

---

Prof<sup>o</sup> Dr. Marcos Hortes Nisihara Chagas  
Membro Suplente

Dedico este trabalho:

**A Deus,**

Meu suporte, mentor e abrigo em  
todos os momentos.

**Aos meus pais, Alvanir e Márcia,**

Meu maior amor,  
exemplo, suporte, incentivo e proteção  
vocês são a razão da minha vida

**À minha família e amigos,**

Meus maiores tesouros e melhores companhias,  
obrigada pelo amor, carinho e incentivo.

**Aos idosos e seus familiares,**

Por permitirem que esse trabalho  
pudesse ser realizado.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente a Deus e à minha família. Ao meu pai, Alvanir, cujo incentivo e apoio foram fundamentais para que chegasse tão longe, lhe dando orgulho. À minha mãe, Márcia, pelo apoio e dedicação durante todo esse período e por se orgulhar das minhas conquistas. E, principalmente, ambos, que foram o grande pilar que me impediu de desmoronar muitas vezes durante esses anos, vocês foram as pessoas que mais me incentivaram a ir atrás dos meus sonhos, vocês são meu maior exemplo de vida, amor, dedicação, carinho, determinação e sem dúvidas as pessoas que eu mais amo.

Às minhas tias, que sempre estiveram presentes e me socorreram sempre que meus pais não puderam, além de todo apoio e suporte durante esses anos. Aos meus primos, em especial Juliano e Ivan, que sempre me acompanham durante toda a minha caminhada, vibrando a cada conquista.

Aos meus falecidos avós, Amido, Irda e João Luiz, mesmo não conhecendo todos em vida, foram minha inspiração para que eu seguisse a profissão da gerontologia. Tenho muito orgulho de ser neta de vocês.

À minha avó, Olga, cujo amor pela sua família sempre cativou a todos. Você foi sem dúvida a pessoa determinante para minha escolha. E mesmo hoje, estando com doença de Alzheimer, seu cuidado, dedicação e amor, com seus netos, filhos, familiares e amigos é motivo de orgulho. Não imagino minha vida sem você. Você é a luz que me inspira a ir cada vez mais longe.

À minha amiga Beatriz, que sempre me apoiou e sempre me ajudou a passar pelos momentos mais difíceis e que também sempre compartilhou dos melhores momentos e aventuras. Tenho muito orgulho de ser sua amiga e da mulher que você é.

Às minhas amigas de graduação, que me aguentaram por todos esses anos, nos momentos de alegria e tristeza, nem a maldade do tempo conseguirá nos afastar. Em especial, a Caroline (Gafe), por ter trazido luz à minha vida, serei sempre sua “mãerina”. À Bianca e seu filho Lorenzo, cuja determinação e garra me orgulham e inspiram sempre a seguir em frente independente das dificuldades. E à Isabella, por compartilhar dos meus pensamentos, loucuras e do cuidado e dedicação aos cuidados de seus queridos. Sem vocês eu não teria sido nada durante a graduação.

Agradeço à minha amiga de apartamento, Gabriela, que me ajudou a criar um lar em São Carlos, que sempre me apoiou e me lembrava de viver além das tarefas, me trazendo sanidade nos momentos de estafa. E aos meus amores, os meninos da república tio e suas namoradas,

que sempre compartilharam dos melhores momentos vividos durante a graduação e por se tornarem a minha família em São Carlos.

Agradeço também às minhas amigas de laboratório, com as quais eu sempre pude contar, tanto para ajuda técnica, teórica como para descontrair comendo alguns doces e bolos. Vocês são mulheres e cientistas incríveis. E, em especial, às minhas coorientadoras Izabela e Patrícia, por terem permitido que eu utilizasse o banco de pacientes pertencentes a seus trabalhos, pelos ensinamentos profissionais e pessoais, vocês são o espelho dos meus futuros passos e as melhores pessoas que tive a oportunidade de conhecer e compartilhar momentos. À minha orientadora do TCC Márcia Regina Cominetti, uma excelente profissional, de coração grande, que sempre me depositou plena confiança e que me deu muitas oportunidades.

Agradeço às agências de fomento, em especial à FAPESP, pelo financiamento através do processo “2018/05446-0” e a toda estrutura da UFSCar.

“As opiniões, hipóteses e conclusões ou recomendações expressas neste material são de responsabilidade do(s) autor(es) e não necessariamente refletem a visão da FAPESP”.

**Muito Obrigada!**

*“Na vida, não existe nada a temer, mas a entender”*

***Marie Curie***

## RESUMO

Nas demências observa-se alteração do funcionamento cerebral e perda progressiva e global das funções cognitivas, interferindo nas atividades sociais e ocupacionais do indivíduo, sendo a doença de Alzheimer (DA) a principal delas. O transtorno neurocognitivo leve (TNCL) pode ser considerado, em alguns casos, uma fase transitória entre cognição normal e DA e biomarcadores que possam diagnosticar estas duas condições em suas fases iniciais, preferencialmente em amostras que não requeiram procedimentos altamente invasivos de coleta, são alvo de muitos estudos recentes e se apresentam com um grande desafio clínico da área. A DA está fortemente relacionada à formação, acúmulo e agregação do peptídeo  $\beta$ -amilóide ( $A\beta$ ) nos neurônios. Esta molécula é formada pela clivagem sequencial de  $\beta$  e  $\gamma$ -secretases, por uma via chamada amiloidogênica. Em contrapartida, a clivagem sequencial por  $\alpha$  e  $\gamma$ -secretase, pela via não amiloidogênica, impede a formação do  $A\beta$  neuronal, e conseqüentemente, o surgimento e avanço da DA. A ADAM10 é a principal  $\alpha$ -secretase neuronal e está presente também em plaquetas, células brancas e no liquor. Estudos de nosso e outros grupos de pesquisa apontam que os níveis de ADAM10 ativa em plaquetas de pacientes com DA estão diminuídos em comparação com sujeitos saudáveis. Assim, a ADAM10 é uma forte candidata como biomarcador sanguíneo para a DA. Neste sentido, este estudo tem como objetivo avaliar os níveis e a atividade da ADAM10 no plasma sanguíneo de sujeitos com DA e TNCL, de modo a dar suporte à função desta proteína como biomarcador para essas condições. Resultados anteriores de nosso grupo permitiram elaborar a hipótese deste estudo de que os níveis de ADAM10 solúvel e, portanto, possivelmente inativa, no plasma dos sujeitos com TNCL e DA estariam aumentados, comparado com os níveis de sujeitos cognitivamente saudáveis.

**Palavras-chave:** ADAM10, biomarcadores, doença de Alzheimer, demência, plasma



## ABSTRACT

In dementias, alterations in brain functioning and progressive and global loss of cognitive functions are observed, interfering in the individual's social and occupational activities, with Alzheimer's disease (AD) being the main one. Mild neurocognitive impairment (MCI) can be considered a transient phase between normal cognition and AD and biomarkers that can diagnose these diseases in their early stages, preferably in samples that do not require highly invasive collection procedures, are the target of many recent studies and present a major clinical challenge in the area. AD is strongly related to the formation, accumulation and aggregation of the  $\beta$ -amyloid peptide ( $A\beta$ ) in neurons. This molecule is formed by the sequential cleavage of  $\beta$  and  $\gamma$ -secretases, via a pathway called amyloidogenic. On the other hand, the sequential cleavage by  $\alpha$  and  $\gamma$ -secretase, by the non-amyloidogenic pathway, prevents the formation of neuronal  $A\beta$ , and consequently, the appearance and advancement of AD. ADAM10 is the main neuronal  $\alpha$ -secretase and is also present in platelets, white cells and CSF. Studies by our and other research groups indicate that the levels of active ADAM10 in platelets of patients with AD are decreased compared to healthy subjects. Thus, ADAM10 is a strong candidate for blood biomarkers for AD. In this sense, this study aims to evaluate the levels and activity of ADAM10 in the blood plasma of subjects with AD and MCI, in order to support the function of this protein as a biomarker for these conditions. Previous results from our group allowed us to elaborate the hypothesis of this study that the levels of soluble and therefore possibly inactive ADAM10 in the plasma of subjects with MCI and AD would be increased, compared to the levels of cognitively healthy subjects.

**Keywords:** ADAM10, biomarkers, Alzheimer's disease, dementia, blood plasma.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Clivagem da APP por  $\alpha$  e  $\gamma$ -secretases, com formação do peptídeo p3 e por  $\beta$  e  $\gamma$ -secretases, com formação do peptídeo A $\beta$ .....7
- Figura 2.** (A) Estrutura multimodular da ADAM10. ADAM10 CTF = fragmento C-terminal (C), Sadam10 = forma solúvel e inativa da proteína, ADAM10 FL = forma ativa completa, sem a presença do pró-domínio. ProADAM10 = proteína inativa com a presença do pró-domínio. (B) Conformação da ADAM10 ancorada à membrana. A liberação do pró-domínio ativa esta proteína na membrana. (C) ADAM10 solúvel como encontrada no plasma e liquor, sem ancoragem à membrana. Nesta conformação, mesmo na ausência do pró-domínio a proteína apresenta-se inativa. Cyto = domínio citoplasmático, Tm = domínio transmembrana, Cys = domínio rico em cisteína, região onde acontece a clivagem da ADAM10 por outras proteases e quando a proteína solúvel é liberada para o plasma e liquor, Dis = domínio desintegrina, Protease = domínio metaloprotease, responsável pela clivagem da proteína precursora do amiloide (APP) e Pro = pró-domínio, responsável por manter a ADAM10 inativa.....10
- Figura 3.** Esquema de seleção dos participantes para os grupos TNCL, DA e controle.14
- Figura 4.** Imagem referente à membrana representativa dos experimentos de western blotting, mostrando os níveis de ADAM10 em controles (cognitivamente saudáveis) e o controle endógeno (albumina).....22
- Figura 5.** Imagem referente à membrana representativa dos experimentos de *western blotting*, mostrando os níveis de ADAM10 de pacientes com TNCL e controle endógeno (albumina). .....23
- Figura 6.** Imagem referente à membrana representativa dos experimentos de *western blotting*, mostrando os níveis de ADAM10 de pacientes com DA e controle endógeno (albumina). .....23
- Figura 7.** Gráfico de dispersão indicando os níveis plasmáticos de ADAM10 solúvel entre os grupos.....24
- Figura 8.** Atividade da ADAM10 plasmática e plaquetária. ....25

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Critérios de exclusão estabelecidos para a pesquisa. ....	<b>15</b>
<b>Tabela 2.</b> Dados de caracterização socioeconômicos gerais dos sujeitos dos três grupos analisados. ....	<b>21</b>
<b>Tabela 3.</b> Análise descritiva dos níveis descritivos dos valores obtidos a partir da quantificação das bandas de ADAM10 plasmática entre os grupos analisados. ....	<b>24</b>

## LISTA DE SIGAS E ABREVIATURAS

- A $\beta$** -  $\beta$ -amiloide
- ABVD**- Atividades básicas de vida diária
- ABRAZ**- Associação Brasileira de Alzheimer
- ACE-R**- Addenbrooke's cognitive examination revised
- ADAM**- A Disintegrin And Metallopeptidase
- ADI**- Alzheimer's disease international
- AIVD**- Atividades instrumentais de vida diária
- AVD**- Atividades de vida diária
- APP**- Proteína precursora amilóide
- BBB**- Barreira hematoencefálica
- CCL**- Comprometimento cognitivo leve
- CDR**- Clinical dementia rating
- CEME**- Centro de especialidades médicas
- Cj**- Controle jovem
- CT**- Controle cognitivamente saudável
- CTF**- Fragmento C-terminal
- DA**- Doença de Alzheimer
- DSM-V**- Manual diagnóstico e estatístico de transtornos mentais
- ISF**- Fluido interstício
- LABEN**- Laboratório de biologia do envelhecimento
- LCR**- Líquido cefalorraquidiano
- MEEM**- Mini exame do estado mental
- OMS**- Organização Mundial de Saúde
- PNAD**- Pesquisa nacional por amostra de domicílio
- PPP**- Plasma pobre em plaquetas
- PRP**- Plasma rico em plaquetas
- p-tau**- Tau fosforilada
- TNCL**- Transtorno neurocognitivo leve
- TNCLa**- Transtorno neurocognitivo leve amnésico
- t-tau**- Tau total
- USE**- Unidade saúde escola
- USF**- Unidade saúde família

# Sumário

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
1.1	Envelhecimento populacional e demência	1
1.2	Doença de Alzheimer e Transtorno Neurocognitivo Leve	2
1.3	Biomarcadores na doença de Alzheimer	7
1.4	ADAMs	9
<b>2</b>	<b>OBJETIVO</b>	<b>12</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>13</b>
3.1	Procedimentos éticos	13
3.2	Participantes	13
3.3	Crítérios de inclusão e exclusão	13
3.4	Instrumento de avaliação socioeconômica	15
3.5	Instrumentos de avaliação cognitiva	15
3.6	Coleta e processamento do sangue	16
3.7	Quantificação de proteínas totais e da ADAM10	17
3.8	SDS-PAGE e <i>western blotting</i>	17
3.9	Densitometria das bandas	18
3.10	Ensaio de atividade enzimática	18
3.11	Análise estatística	18
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>20</b>
4.1	Dados de caracterização e socioeconômicos	20
4.2	Níveis da ADAM10 nos idosos dos grupos TNCL, DA e controle	21
4.3	Atividade enzimática	24
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO E CONCLUSÃO</b>	<b>26</b>
<b>6</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	<b>31</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>32</b>
	<b>APÊNDICES – Artigos publicados durante o período do estudo</b>	<b>37</b>
	<b>ANEXOS</b>	<b>38</b>
	<b>ANEXO 1- Protocolo de avaliação socioeconômico</b>	<b>38</b>
	<b>ANEXO 2 – Addeenbroke’s Cognitive Examination – resived (ACE-R)</b>	<b>39</b>
	<b>ANEXO 3 – Clinical Dementia Rating (CDR)</b>	<b>45</b>
	<b>ANEXO 4 – Mini Exame do Estado Mental (MEEM)</b>	<b>46</b>
	<b>ANEXO 5- Imagens das membranas referentes aos experimentos de <i>western blotting</i> realizados durante o período do estudo.</b>	<b>47</b>
	<b>ANEXO 6 – Avaliação do trabalho de conclusão de curso</b>	<b>63</b>

## **1 INTRODUÇÃO**

### **1.1 Envelhecimento populacional e demência**

O envelhecimento populacional brasileiro vem assumindo grande destaque nas temáticas referentes à saúde pública. Os principais fatores dessa aceleração na transição demográfica no Brasil são a expressiva redução da taxa de fecundidade, aliada à forte diminuição da taxa de mortalidade e ao aumento significativo da expectativa de vida (IBGE, 2018). Desse modo, o Brasil caminha aceleradamente para um perfil demográfico mais envelhecido, o que caracteriza uma transição epidemiológica na qual as doenças crônico-degenerativas conquistam lugar de destaque e passam a representar as principais causas de mortalidade e morbidade, não só no país, mas também no mundo (SZYBIŃSKA; LEŚNIAK; DISEASE, 2017). Esses fatos demonstram a necessidade de novas políticas públicas que visem oferecer uma melhor assistência à saúde para a população idosa, e consequentemente, uma melhor qualidade de vida (IBGE, 2011; VATANABE, 2020).

Análises estatísticas sobre a expectativa de vida no Brasil indicam que o país atingiu mais que o dobro, no aumento da idade, durante o intervalo de tempo de um século, perpassando de 30 anos nos anos 90 para 76 anos nos anos 2000 (IBGE, 2011). Ademais, em 2012, havia cerca de 810 milhões de idosos no mundo, ao passo que em 2050 esse número deve passar de 2 bilhões, o que representará um quinto da população mundial (ORGANIZATION, 2012). Consequentemente, o número de idosos no mundo será maior que o de crianças e jovens de até 14 anos, fato até então inédito para a história da humanidade (ORGANIZATION, 2012; VATANABE, 2020).

Países em desenvolvimento, ou menos desenvolvidos, como o Brasil, irão enfrentar um acelerado processo de envelhecimento em um estreito período de tempo, quando comparado aos países desenvolvidos (ORGANIZATION, 2013). No Brasil, aproximadamente, 33% da população atual é composta por maiores de 40 anos e 11% é constituída por idosos (IBGE, 2011). No município de São Carlos, local onde este estudo foi realizado, a parcela da população idosa representa 16,8% (SEADE, 2020). Levando em consideração a situação econômica dos países em desenvolvimento, boa parte da parcela dos idosos vivem em situação de alta vulnerabilidade social, revelando um contexto de pobreza e dificuldade de acesso aos serviços sociais e de saúde (BEALES; TULLOCH, 2013; VATANABE, 2020).

Diante do exposto, alguns estudos indicam uma maior incidência de problemas sociais, de saúde e psicológicos na população acima dos 60 anos. Nesta perspectiva, as necessidades de ações de promoção à saúde, bem como a detecção precoce de problemas de saúde, se tornam

estratégias fundamentais para evitar agravos e situações limitantes maiores na população idosa (BEALES; TULLOCH, 2013; VATANABE, 2020).

Neste contexto, as demências se caracterizam como uma enfermidade de grande prevalência na população idosa, visto que no envelhecimento as queixas de memória são mais recorrentes e acarretam na diminuição da qualidade de vida dos idosos, de seus familiares e cuidadores (BALLARD; GAUTHIER; CORBETT; BRAYNE *et al.*, 2011). As demências representam uma síndrome clínica que têm como característica o declínio gradual e progressivo em um ou mais domínios cognitivos, como linguagem, memória, funções executivas, personalidade e comportamento, ou habilidades visuoespaciais. Tal declínio precisa ser suficientemente presente na vida dos indivíduos de modo a interferir de maneira significativa em suas atividades de vida diária (AVD) (VATANABE, 2020; WELLER; BUDSON, 2018).

Esses fatos demonstram o significado das demências na população idosa, visto que segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), no ano de 2012, aproximadamente 35 milhões de pessoas no mundo manifestavam algum tipo de demência. Além disso, as estatísticas apontam que este número poderá triplicar até 2050, alcançando mais de 155 milhões de pessoas.(ORGANIZATION, 2012). Ademais, em 2010 os gastos com as síndromes demenciais geraram um custo mundial de cerca de 604 bilhões de dólares. (ORGANIZATION, 2012). Assim, esses dados expõem o impacto causado pelas demências na população, tornando-se um dos principais temas a estudados no contexto do envelhecimento.

## **1.2 Doença de Alzheimer e Transtorno Neurocognitivo Leve**

As demências possuem uma fase prodrômica designada de transtorno neurocognitivo leve (TNCL), descrito inicialmente por Petersen em 1999 como Comprometimento Cognitivo Leve (CCL) e recentemente atualizado pelo manual diagnóstico e estatístico de transtornos mentais 5 (DSM-V) como TNCL (BATTLE, 2013; PETERSEN; SMITH; WARING; IVNIK *et al.*, 1999).

Em 2001, Petersen e colaboradores apontaram que a detecção precoce das demências pode ser identificada por meio do diagnóstico de TNCL. Uma vez que o TNCL é considerado uma fase intermediária, entre o processo de envelhecimento normal e fases iniciais de demências, em especial a DA (PETERSEN; CARACCILO; BRAYNE; GAUTHIER *et al.*, 2014; PETERSEN; STEVENS; GANGULI; TANGALOS *et al.*, 2001). Mesmo não sendo um fator determinante, o TNCL corresponde ao estágio onde se observa uma perda cognitiva, quando comparado a sujeitos cognitivamente saudáveis da mesma faixa etária. Entretanto, diferente do que ocorre nas demências, no TNCL, a funcionalidade do indivíduo é ainda

preservada, ou seja, os indivíduos apresentam a capacidade de realização das AVDs sem prejuízos mínimos (CHENG; CHEN; CHIU; TREATMENT, 2017; KELLEY; PETERSEN, 2007; PETERSEN; MORRIS, 2005).

O TNCL é classificado em dois subtipos: amnésico e não amnésico (PETERSEN; MORRIS, 2005; WINBLAD; PALMER; KIVIPELTO; JELIC *et al.*, 2004). O subtipo amnésico (TNCLA) ocorre quando o domínio cognitivo comprometido é memória, em especial a episódica. Esse comprometimento de memória pode ser acompanhado por menores déficits cognitivos em outros domínios, como função executiva, linguagem, ou habilidades visuoespaciais, neste caso o TNCL é denominado como múltiplos domínios (PETERSEN; MORRIS, 2005). Nos casos de TNCLA há um maior risco de conversão para DA, em comparação com indivíduos cognitivamente preservados. (PETERSEN; MORRIS, 2005; WINBLAD; PALMER; KIVIPELTO; JELIC *et al.*, 2004)

Desse modo, estudos têm sugerido que o TNCL pode representar uma fase preditora para DA, visto que a taxa de conversão para essa fica em torno de 10 à 16% ao ano, se contrapondo com a taxa de conversão dos indivíduos cognitivamente saudáveis, que varia entre 1 a 2% ao ano (PETERSEN; MORRIS, 2005; WARD; TARDIFF; DYE; ARRIGHI *et al.*, 2013).

Atualmente a doença de Alzheimer (DA) está entre as doenças que provocam demência, correspondendo a cerca de 60% dos casos, o que a torna a principal delas (BROOKMEYER; ABDALLA; KAWAS; CORRADA *et al.*, 2018; NIU; ÁLVAREZ-ÁLVAREZ; GUILLÉN-GRIMA; AGUINAGA-ONTOSO, 2017). Apesar de ser o tipo mais frequente de demência no Brasil e no mundo, existem outras formas de demência que precisam ser levadas em consideração para que se atinja uma conclusão diagnóstica. Em decorrência do acelerado crescimento da população idosa, atualmente as demências são vistas como um dos principais problemas de saúde pública (LIVINGSTON; SOMMERLAD; ORGETA; COSTAFREDA *et al.*, 2017). Atualmente a prevalência dos quadros demenciais na América Latina é de 8,5% da população geral, assemelhando-se as prevalências encontradas em muitos outros estudos ao redor do mundo (CUSTODIO; WHEELLOCK; THUMALA; SLACHEVSKY, 2017).

A idade é o fator de risco mais importante para DA. A prevalência da doença aumenta exponencialmente em pessoas idosas (WANG; DING, 2008). A DA acomete cerca de 5% a 10% de indivíduos acima dos 65 anos e 20% a 40% dos que possuem idade acima de 85 anos (BARNES; WILSON; BIENIAS; SCHNEIDER *et al.*, 2005; LORENA CHAVES; LUIZA CAMOZZATO; GODINHO; PIAZENSKI *et al.*, 2009). De acordo com a *Alzheimer's Disease International (ADI)*, o aumento da incidência da DA na população idosa dobra a cada 20 anos. Estima-se que existam no mundo 35,6 milhões de pessoas com DA e a previsão é que este



número alcance 65,7 milhões em 2030 e 115,4 milhões em 2050. Segundo a *ADI*, os indivíduos que estarão na faixa etária de risco para DA, ou seja, acima de 65 anos de idade, representarão 22% da população mundial em 2050, com 80% desse percentual na Ásia, América Latina e África. Por ano são registrados cerca de 7,7 milhões de novos casos de DA no mundo. Segundo a Associação Brasileira de Alzheimer (ABRAZ), no Brasil atualmente há cerca 1,2 milhão de casos de DA e a maioria deles ainda sem diagnóstico preciso. Calcula-se que 60% dos pacientes com DA no mundo vivem em países em desenvolvimento, como por exemplo, o Brasil, onde essa proporção aumentará para mais de 70% até 2040 (QIU; DE RONCHI; FRATIGLIONI, 2007).

A grande maioria dos indivíduos acometidos pela DA não apresentam, antes dos 50 anos de idade, os sintomas característicos da doença, como confusão mental ou esquecimento (FOLEY; MASAKI; WHITE; ROSS *et al.*, 2001). Contudo, em países com uma população crescente de pessoas idosas, o aumento progressivo da incidência da DA pode representar sérios problemas para a saúde pública e econômica (FOLEY; MASAKI; WHITE; ROSS *et al.*, 2001). Além disso, os custos de cuidados de saúde para esses pacientes são altos, somente nos Estados Unidos os custos anuais com a doença são de 172 bilhões de dólares (DEB; THORNTON; SAMBAMOORTHY; INNES *et al.*, 2017; REITZ; MAYEUX, 2014).

Os indivíduos com DA apresentam declínio de memória e perda lenta e gradual das funções cognitivas, gerando perda na independência com impacto não somente para os indivíduos acometidos, mas também para suas famílias e sistemas de saúde (PLASSMAN; LANGA; FISHER; HEERINGA *et al.*, 2007). Em estágios iniciais da DA, podem ser observadas a perda de memória episódica e a dificuldade na realização de novas tarefas. Esses danos gradualmente envolvem outros domínios cognitivos, como a capacidade de julgamento, cálculo, capacidade de abstração e habilidades visuoespaciais. A afasia pode ocorrer na fase intermediária, com dificuldade em nomear objetos ou expressar ideias, assim como apraxia. Em estágios avançados da doença, mudanças notáveis são observadas, desde alteração do ciclo do sono, comportamento (irritação e agressividade), sintomas psicóticos, dificuldade grave em falar e realizar o autocuidado (BOTTINO; DE PÁDUA; SMID; AREZA-FEGYVERES *et al.*, 2011). Além das mudanças cognitivas e comprometimentos nas atividades de vida diária (AVD), anormalidades motoras podem ser observadas em pacientes com DA, como distúrbios de marcha e diminuição da força muscular de membros superiores e inferiores (SCHERDER; EGGERMONT; SWAAB; VAN HEUVELEN *et al.*, 2007).

Na DA, as AVD são comprometidas, derivando no aumento da demanda de cuidados de familiares ou cuidadores. Esses indivíduos apresentam prejuízo de atividades básicas de vida

diária (ABVD) somente em estágios mais avançados da doença, enquanto as atividades instrumentais de vida diária (AIVD), que exigem capacidade de julgamento, podem estar comprometidas em todas as fases da doença (SCHERDER; EGGERMONT; SWAAB; VAN HEUVELEN *et al.*, 2007).

A síndrome demencial clínica é caracterizada pelo desenvolvimento de déficits cognitivos consideráveis para interferir no funcionamento social e ocupacional diário do indivíduo (QIU; FRATIGLIONI, 2018). De acordo com o manual diagnóstico e estatístico de transtornos mentais 5 (DSM-V) a DA se classifica na categoria de “Transtorno Neurocognitivo Maior”. Para o diagnóstico provável dessa doença os indivíduos devem apresentar dois ou mais desvios padrões abaixo do esperado para a idade nos resultados dos testes cognitivos aplicados, sendo essas alterações suficientes para causar interferência na independência do indivíduo (BATTLE, 2013).

Além da idade, outros fatores de risco estão correlacionados com a DA, tais como depressão, doenças cardiovasculares e cerebrovascular, lesão traumática cerebral, tabagismo, histórico familiar de casos de demência e presença do alelo APOE- $\epsilon$ 4 (KUMAR; SIDHU; GOYAL; TSAO, 2020). Nos níveis fisiológico e morfológico, a DA é caracterizada como uma doença neurodegenerativa gradual e progressiva identificada pela atrofia cortical predominante no lobo temporal medial, região do hipocampo, e microscopicamente, por perdas neuronais extensas e depósitos fibrilares de característica anormais intra e extracelulares, denominadas emaranhados neurofibrilares e placas senis, respectivamente (KUMAR; SIDHU; GOYAL; TSAO, 2020).

Os emaranhados neurofibrilares são formados por proteína Tau em dissociação aos microtúbulos. A Tau é a responsável pela manutenção estrutural e funcional do citoesqueleto dos axônios neuronais, no entanto na DA, a Tau torna-se hiperfosforilada, levando à dissociação dos microtúbulos neuronais, o que por sua vez provoca a formação dos emaranhados intraneuronais e o colapso da estrutura neural. Esse processo se inicia no hipocampo e com o avançar da doença pode ser observado em todo o córtex cerebral (KUMAR; SIDHU; GOYAL; TSAO, 2020).

Já as placas senis se originam a partir da deposição excessiva e consecutiva do peptídeo  $\beta$ -amiloide ( $A\beta$ ) no cérebro. Este peptídeo é originário da clivagem da proteína precursora de amiloide (APP) pela ação das proteases ( $\beta$  e  $\gamma$ -secretases). A clivagem sequencial por  $\beta$  e  $\gamma$ -secretases resulta nos peptídeos de 40 e 42 aminoácidos, sendo o  $A\beta$ 42 o mais hidrofóbico e com maior potencial de agregação e toxicidade neural (KUMAR; SIDHU; GOYAL; TSAO, 2020). A deposição do  $A\beta$  acontece ao redor dos vasos meníngeos e cerebrais representando,

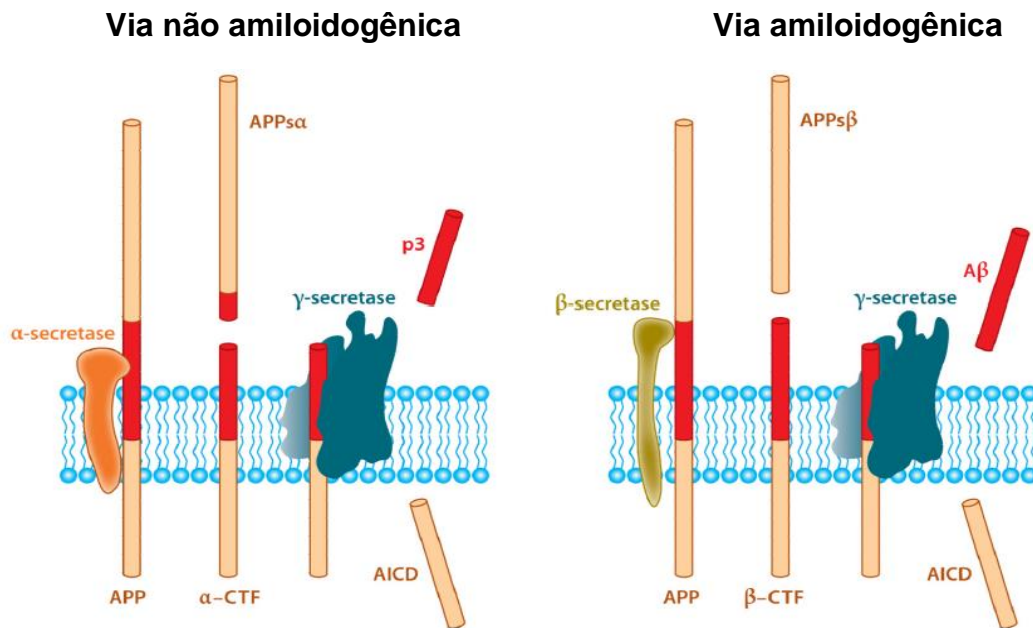
juntamente com a hiperfosforilação da proteína Tau, um dos marcos patológicos da DA (KUMAR; SIDHU; GOYAL; TSAO, 2020). Mesmo que as evidências genéticas e neuroquímicas sustentem as hipóteses citadas, outros fatores de risco também estão presentes na patologia da DA, o que a torna uma doença muito mais complexa do que se sabe.

A APP é um membro de uma família de proteínas, que inclui as proteínas semelhantes a precursores amiloides em mamíferos (APLP1 e APLP2). É produzida em grandes quantidades nos neurônios e é metabolizada muito rapidamente (LEE; RETAMAL; CUITIÑO; CARUANO-YZERMANS *et al.*, 2008), podendo participar da modulação do crescimento celular, motilidade, crescimento de neurônios e sobrevivência celular, funções desempenhadas pelo ectodomínio solúvel, que é liberado após sua clivagem (O'BRIEN; WONG, 2011). Contudo, a função fisiológica precisa da APP ainda não é completamente conhecida, na maioria dos estudos, o aumento da expressão da APP mostra um efeito positivo na saúde e crescimento celular e neuronal. Em um estudo este efeito positivo foi demonstrado em camundongos transgênicos nos quais o aumento da expressão da APP resultou em proliferação neuronal (OH; SAVONENKO; KING; TUCKER *et al.*, 2009).

Existem duas vias alternativas para a proteólise da APP, uma delas leva à geração do peptídeo A $\beta$  e outra não (O'BRIEN; WONG, 2011). Portanto, a APP pode ser clivada por  $\alpha$  ou  $\beta$ -secretases (EVIN; ZHU; HOLSINGER; MASTERS *et al.*, 2003) (Figura 1). Na via não amiloidogênica, na qual as principais proteínas atuantes são as  $\alpha$ -secretases, a APP é clivada entre os aminoácidos Lys16 e Leu17 no meio da região do A $\beta$ , deste modo, liberando o sAPP $\alpha$  – uma estrutura com funções neuroprotetoras – e restando o resíduo C83 na membrana. A clivagem seguinte do C83 por  $\gamma$ -secretases libera o p3 – que é supostamente benéfico e não é encontrado nas placas amiloides, creditando-se a isso a redução na produção do A $\beta$  (EVIN; ZHU; HOLSINGER; MASTERS *et al.*, 2003).

Por outro lado, na via amiloidogênica as  $\beta$ -secretases clivam a APP na região N-terminal do A $\beta$  produzindo uma forma solúvel da APP (sAPP $\beta$ ) que é liberada para o meio extracelular e parece ter uma função pró-apoptótica (NIKOLAEV; MCLAUGHLIN; O'LEARY; TESSIER-LAVIGNE, 2009) e um fragmento C-terminal ligado a membrana (CTF ou C99). A subsequente clivagem da C99 por  $\gamma$ -secretases no domínio C-terminal do A $\beta$  libera o A $\beta$ 1-40 e A $\beta$ 1-42 sendo o A $\beta$ 42 mais hidrofóbico e com maior potencial de agregação. O peptídeo A $\beta$  é, portanto, composto de 39-43 aminoácidos, com massa molecular de aproximadamente 4kDa e é liberado após clivagens da APP pelas vias  $\beta$  e  $\gamma$ -secretases (Figura 1).

**Figura 1.** Clivagem da APP por  $\alpha$  e  $\gamma$ -secretases, com formação do peptídeo p3 e por  $\beta$  e  $\gamma$ -secretases, com formação do peptídeo A $\beta$ . (Extraído de PERON, 2018).



Contudo, a rota predominante de processamento da APP em sujeitos cognitivamente saudáveis, consiste de clivagens sucessivas por  $\alpha$  e  $\gamma$ -secretases, ou seja, a via não amiloidogênica (O'BRIEN; WONG, 2011).

### 1.3 Biomarcadores na doença de Alzheimer

Com base em conhecimentos detalhados sobre a patogênese da DA surgem novas estratégias terapêuticas que propõem efeitos modificadores na evolução da doença, como a identificação de biomarcadores. Os biomarcadores ou marcadores biológicos são entidades que podem ser medidas experimentalmente e que indicam a ocorrência de uma determinada função normal ou patológica de um organismo (BLENNOW, 2017). A identificação de biomarcadores auxilia na prescrição de fármacos que poderão ser administrados precocemente no curso da doença, e auxiliar no reforço diagnóstico e a precisão da medicação que poderá ser administrada antes mesmo do início do extenso processo de neurodegeneração.

Entretanto, somente no ano de 2011 os biomarcadores foram incluídos como ferramenta de diagnóstico nas pesquisas relacionadas à DA (MCKHANN; KNOPMAN; CHERTKOW; HYMAN *et al.*, 2011; SKOOG; DAVIDSSON; AEVARSSON; VANDERSTICHELE *et al.*, 2003) tornando-se assim importantes componentes para o diagnóstico e para as pesquisas relacionadas à DA, uma vez que essas são medidas fisiológicas expressivas que ainda podem

ser realizadas em vida. Desse modo, os biomarcadores ganham cada vez mais importância para o entendimento da biologia dessa doença (JACK; BENNETT; BLENNOW; CARRILLO *et al.*, 2016; PERON, 2018). Dentre os biomarcadores já estudados para DA, temos os estabelecidos no líquido cefalorraquidiano (liquor, LCR), como a proteína Tau total (t-tau), Tau fosforilada (p-tau) e o peptídeo A $\beta$ 42 (SHAW; VANDERSTICHELE; KNAPIK-CZAJKA; CLARK *et al.*, 2009). Alguns estudos investigaram como os marcadores biológicos presentes no LCR podem trazer benefícios diante do prognóstico da DA e mostraram uma redução de A $\beta$ 1-42 e um aumento dos níveis da tau e p-tau no LCR de indivíduos com DA, quando comparados aos cognitivamente saudáveis (GUSTAFSON; SKOOG; ROSENGREN; ZETTERBERG *et al.*, 2007; PERON, 2018; SKOOG; DAVIDSSON; AEVARSSON; VANDERSTICHELE *et al.*, 2003).

Desse modo, os principais biomarcadores para a DA podem ser divididos em três grupos de categorias binárias, o que foi denominado como sistema de classificação A/T/N. Esse sistema está vinculado a classificação dos biomarcadores como critério diagnóstico, sendo que “A” se refere aos biomarcadores derivados do depósito de A $\beta$ , o qual pode ser encontrado em baixa concentração no LCR e está associado a uma grande retenção de ligantes amiloides no exame de imagem de tomografia por emissão de pósitrons (PET). O “T”, seriam os biomarcadores patológicos relacionados com a tau, como os emaranhados neurofibrilares, pois, na DA observa-se aumento na concentração da p-tau no LCR e no PET. Por fim, o “N” engloba os biomarcadores provenientes da neurodegeneração, como é o caso de lesões neuronais da DA, e são associados a t-tau do LCR e a atrofia cortical em regiões típicas da DA que podem ser detectadas em exames de ressonância magnética (BESSON; LA JOIE; DOEUVRE; GAUBERT *et al.*, 2015; KLUNK; ENGLER; NORDBERG; WANG *et al.*, 2004; PERON, 2018).

Em contrapartida, os biomarcadores encontrados no LCR possuem menor capacidade de diferenciar os quadros demenciais. Além disso, sua aplicação na clínica médica para avaliação dos quadros de déficits cognitivos, esbarra com o fato de que sua análise exige punção lombar para obtenção do material biológico, sendo considerado um exame altamente invasivo, doloroso, e com efeitos colaterais ao paciente, além de necessitar de uma equipe especializada para o procedimento de coleta (DINIZ; FORLENZA, 2007).

Alguns estudos também demonstraram que os marcadores biológicos do plasma também podem ser úteis para o diagnóstico e prognóstico da DA. Tais estudos encontraram uma redução nos níveis de A $\beta$ 1-42 no plasma sanguíneo em idosos cognitivamente normais e em pessoas que mais tarde desenvolveram a DA. Recentemente, foi identificado que as mudanças da t-tau

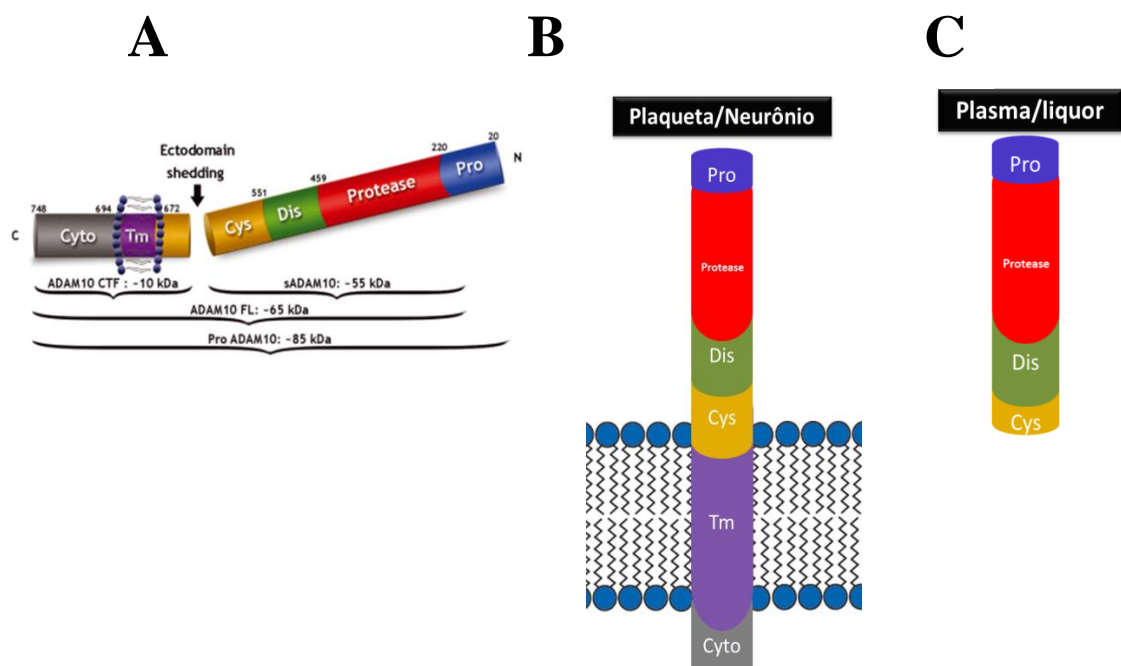
ou da p-tau presentes no plasma sanguíneo e nas imagens de ressonância magnética, discriminaram a DA de outras doenças neurológicas, com valor estatístico significativo quando comparados aos encontrados no LCR, o que pode vir corroborar com biomarcadores do LCR para o diagnóstico de indivíduos com DA (PALMQVIST; JANELIDZE; QUIROZ; ZETTERBERG *et al.*, 2020). Os biomarcadores estabelecidos do plasma sanguíneo fazem a identificação da proteína Tau total, Tau fosforilada (p-tau 181 e p-tau 231) e A $\beta$ 1-42 (BLENNOW, 2017).

#### 1.4 ADAMs

As ADAMs (*A Disintegrin And Metallopeptidase*) são as principais  $\alpha$ -secretases envolvidas na clivagem da APP, membros da superfamília das proteases dependentes de zinco (HOOPER; TURNER, 2002). Dentre as ADAMs, a ADAM10 é a principal  $\alpha$ -secretase neuronal e está envolvida em diferentes processos fisiológicos e patológicos, como DA, câncer, desenvolvimento embrionário, entre outros (PERON; VATANABE; MANZINE; CAMINS *et al.*, 2018). A ADAM10 é uma proteína de membrana de aproximadamente 750 aminoácidos e além da APP, pode clivar mais de 30 diferentes tipos de proteína de membrana, como a Notch, betacellulin, klotho e N-caderin (PERON; VATANABE; MANZINE; CAMINS *et al.*, 2018). Estudos revelam que a ADAM10 é primordial em neurônios primários, que são as células mais afetadas na DA. Sendo assim, estratégias para aumentar a atividade das  $\alpha$ -secretases podem ser consideradas abordagens terapêuticas para pacientes com DA (PERON; VATANABE; MANZINE; CAMINS *et al.*, 2018). Portanto, modular positivamente a expressão da ADAM10 pode ser considerado um objetivo para a intervenção terapêutica, uma vez que é isso que é possível por meio de diferentes tipos de compostos ou vias de regulação (PERON; VATANABE; MANZINE; CAMINS *et al.*, 2018).

A ADAM10 apresenta diferentes domínios, sendo eles: transmembrana, rico em cisteína, domínio desintegrina, domínio metaloprotease e pró-domínio (Figura 2). A ADAM10 é sintetizada como uma forma inativa e no complexo de Golgi sofre a remoção proteolítica do pró-domínio. Em seguida, é transportada para a membrana onde está então madura e cataliticamente ativa (SAFTIG; LICHTENTHALER, 2015).

**Figura 2.** (A) Estrutura multimodular da ADAM10. ADAM10 CTF = fragmento C-terminal (C), Sadam10 = forma solúvel e inativa da proteína, ADAM10 FL = forma ativa completa, sem a presença do pró-domínio. ProADAM10 = proteína inativa com a presença do pró-domínio. (B) Conformação da ADAM10 ancorada à membrana. A liberação do pró-domínio ativa esta proteína na membrana. (C) ADAM10 solúvel como encontrada no plasma e liquor, sem ancoragem à membrana. Nesta conformação, mesmo na ausência do pró-domínio a proteína apresenta-se inativa. Cyto = domínio citoplasmático, Tm = domínio transmembrana, Cys = domínio rico em cisteína, região onde acontece a clivagem da ADAM10 por outras proteases e quando a proteína solúvel é liberada para o plasma e liquor, Dis = domínio desintegrina, Protease = domínio metaloprotease, responsável pela clivagem da proteína precursora do amiloide (APP) e Pro = pró-domínio, responsável por manter a ADAM10 inativa. Extraído e modificado de PERON VATANABE; MANZINE; CAMINS *et al.*, 2018).



Nas plaquetas e neurônios a ADAM10 está presente em sua forma ativa, ancorada à membrana plasmática onde exerce sua função de metaloproteinase clivando outras proteínas também ancoradas à membrana (BLEIBAUM; SOMMER; VEIT; RABE *et al.*, 2019). Desse modo, é sugerido que no plasma sanguíneo esta proteína apresenta-se em sua forma inativa, uma vez que ela não estaria mais ancorada à membrana plasmática. Estudos anteriores demonstraram que os níveis da ADAM10 estão diminuídos em plaquetas de pacientes com DA (COLCIAGHI; BORRONI; PASTORINO; MARCELLO *et al.*, 2002). Estudos do nosso grupo também revelam que os níveis de ADAM10 nas plaquetas estão reduzidos em pacientes com DA (Manzine, Barham *et al.* 2013, Manzine, de França Bram *et al.* 2013, Manzine, Barham *et al.* 2014), porém a expressão do gene para ADAM10 nas plaquetas dos pacientes com DA não apresentou diferenças significativas em relação ao grupo de transtorno neurocognitivo leve ou

controles cognitivamente saudáveis (DE OLIVEIRA; ERBERELI; MANZINE; MAGALHAES *et al.*, 2020; MANZINE; MARCELLO; BORRONI; KAMPHUIS *et al.*, 2015). Sendo assim, a identificação do ADAM10 como um biomarcador pode ser usado como importante ferramenta auxiliar no diagnóstico clínico de DA.

A alteração dos níveis de ADAM10 nas plaquetas de indivíduos com DA representa uma característica muito interessante para um biomarcador, qual seja, a possibilidade de avaliação por uma via pouco invasiva, como a sanguínea. Ao contrário, o LCR representa uma coleta invasiva, que pode resultar em efeitos colaterais aos pacientes, especialmente em idosos, tais como dor ou desconforto local pós-punção dural, enjoos e vômitos, cefaleia, meningite, sangramentos, herniação cerebral, paralisia do abducente, tumor epidermoide e sintomas radiculares e lombalgia (OLIVEIRA; MENDES; MARTINS; SANVITO, 2020).

A análise dos níveis de ADAM10 no plasma é considerada biologicamente relevante, pois este tecido representa um material biológico que reflete a fisiologia cerebral por estar diretamente em contato com o LCR, devido as lesões encontradas na barreira hematoencefálica (BBB) ao longo do progresso da doença (BRINKER; STOPA; MORRISON; KLINGE, 2014). Habitualmente, as propriedades da BBB têm ampla relação com as do endotélio capilar cerebral, que contrasta com as propriedades do endotélio de outros vasos do corpo pela presença de *tight junctions* (junções estreitas), grande resistência elétrica e baixa permeabilidade a solutos polares.

Pelo exposto acima, o plasma como um material biológico periférico pode ser utilizado com indicador dos acontecimentos cerebrais e assim permitir que esse material possa ser utilizado para análises diagnósticas. A exemplo, um estudo recente que mediu os níveis de ADAM10 plasmática com auxílio de um sensor eletroquímico capaz de detectar quantidades extremamente baixas da proteína, da ordem de picogramas, mostrou um maior nível da ADAM10 no plasma de pacientes com TNCL e DA, em comparação com sujeitos com a cognição preservada (DE OLIVEIRA; ERBERELI; MANZINE; MAGALHAES *et al.*, 2020).

Levando em consideração o exposto, a hipótese deste estudo é a de que haveria uma quantidade maior de ADAM10 inativa no plasma sanguíneo dos pacientes com TNCL e/ou DA, comparando com sujeitos cognitivamente saudáveis. Assim, os níveis plasmáticos de ADAM10, aliados aos níveis dos biomarcadores clássicos para DA, poderiam contribuir com uma maior precisão diagnóstica dos estágios da doença, inclusive em fases iniciais, permitindo que sejam implementadas estratégias precoces de tratamento para a doença, de modo a retardar sua evolução.



## **2 OBJETIVO**

Comparar os níveis e a atividade da ADAM10 em amostras de plasma sanguíneo de indivíduos com Transtorno Neurocognitivo Leve (TNCL) e doença de Alzheimer (DA), em comparação com sujeitos sem alteração cognitiva.

### **3 MATERIAIS E MÉTODOS**

Trata-se de um estudo descritivo e transversal baseado nos pressupostos da pesquisa quantitativa. Foi desenvolvido no município de São Carlos – SP em parceria com diferentes grupos de pesquisa da UFSCar cadastrados no CNPq, sendo eles: Biologia do Envelhecimento, Saúde e Envelhecimento, Neurologia Cognitiva e Comportamental, Bioquímica e Biologia Molecular. A amostra foi formada por 88 sujeitos (TNCL, n = 28; DA n = 31; controles, n = 29), com idade igual ou superior a 50 anos. Os indivíduos desse estudo fazem parte do banco de dados de pesquisa do Laboratório de Biologia do Envelhecimento (LABEN) sob a supervisão da orientadora e outros estudos do grupo de pesquisa que também compartilham estes materiais (Processos FAPESP 2012/08654-7; 2015/26084-1; 2016/06226-9).

#### **3.1 Procedimentos éticos**

Todas as etapas deste trabalho obedeceram às diretrizes da resolução CNS 466/2012 e CNS 510-2016 que trata sobre ética na pesquisa com seres humanos. Os pareceres consubstanciados desse estudo foram registrados com os números CAAE: 02760312.0.0000.5504/ n° parecer:112.543; CAAE: 51995615.3.1001.5504/ n° parecer: 1.566.831; CAAE: 78602515.5.0000.5504/ n° parecer: 1.524.578.

#### **3.2 Participantes**

Os sujeitos desta pesquisa são pessoas com idade de 50 ou mais, usuários de três serviços de saúde do município de São Carlos, serviços de referência e contra referência em demência: Unidade saúde escola (USE), centro de especialidades médicas (CEME) e unidades saúde da família (USFs). A coleta foi realizada nos anos de 2012, 2016 e 2017. Os participantes foram divididos em 3 grupos (Figura 3).

#### **3.3 Critérios de inclusão e exclusão**

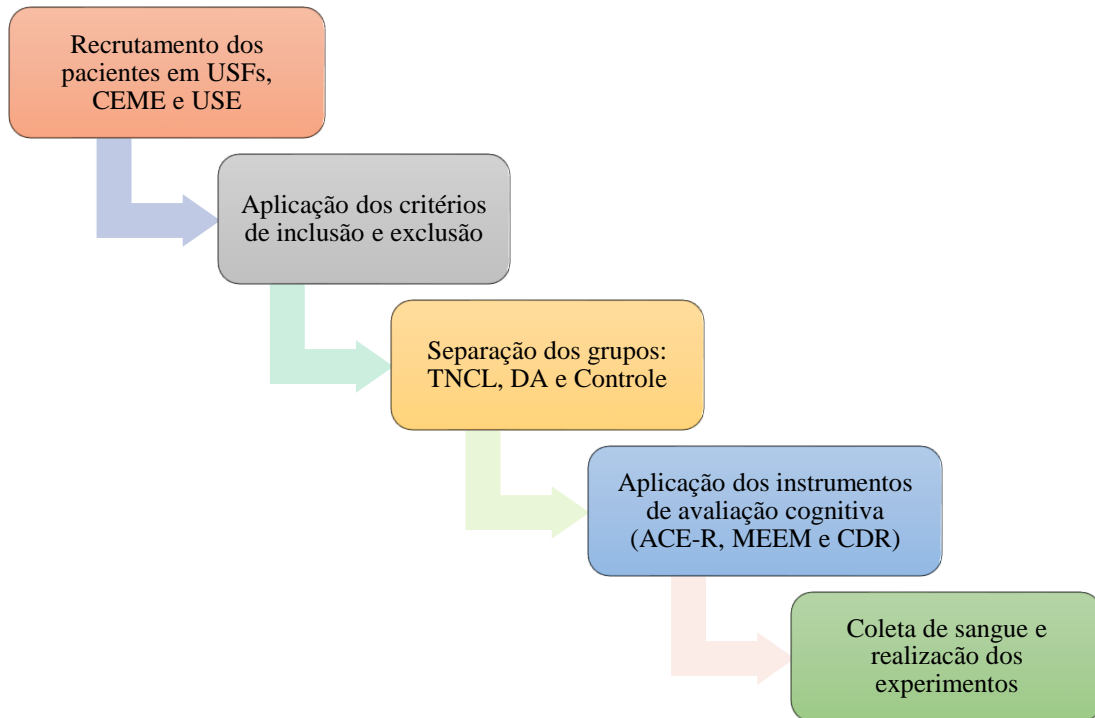
Para a inclusão dos sujeitos em seus respectivos grupos foram aplicados os seguintes critérios:

##### *Critérios de Inclusão dos sujeitos para o Grupo DA*

1. Residir no município de São Carlos;
2. Ser cadastrado nas instituições USE e/ou CEME;
3. Ter acompanhamento ou ter sido acompanhado por médico da USE ou do CEME;

4. Apresentar diagnóstico de provável DA<sup>1</sup> leve, moderada ou avançada de acordo com o *Clinical Dementia Rating* (CDR);
5. Estar em uso das medicações para a doença de Alzheimer (Donepezila, Rivastigmina, Galantamina e/ou Memantina).

**Figura 3.** Esquema de seleção dos participantes para os grupos TNCL, DA e controle.



*Critérios de Inclusão dos sujeitos para o Grupo TNCL*

1. Residir no município de São Carlos;
2. Ser cadastrado nas instituições USE e/ou CEME;
3. Ter acompanhamento ou ter sido acompanhado por médico da USE ou do CEME;
4. Apresentar diagnóstico de TNCL de acordo com o *Clinical Dementia Rating* (CDR);

*Critérios de Inclusão dos sujeitos para o Grupo Controle*

1. Residir no município de São Carlos;
2. Ser usuário de uma USF;
3. Ser cadastrado no banco de dados do Grupo de Pesquisa “Saúde e Envelhecimento”;
4. Não apresentar alteração cognitiva de acordo com o *Clinical Dementia Rating* (CDR).

<sup>1</sup> De acordo com o critério NINCDS-ADRDA (MCKHANN; DRACHMAN; FOLSTEIN; KATZMAN *et al.*, 1984).

Além das características acima, todos os participantes da pesquisa foram ser submetidos aos critérios de exclusão, os quais se encontram apresentados na Tabela 1.

**Tabela 1.** Critérios de exclusão estabelecidos para a pesquisa.

<b>CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO<sup>2</sup></b>
Transtorno Depressivo Maior <sup>3</sup>
Transtorno Bipolar <sup>3</sup>
Esquizofrenia <sup>3</sup>
Retardo Mental <sup>3</sup>
Transtorno por uso de substância <sup>3</sup>
Hidrocefalia <sup>4</sup>
Massa intracraniana <sup>4</sup>
Doença cerebrovascular <i>significativa</i> participando como etiologia da demência;
Alterações clinicamente significativas na vitamina B12;
Alterações clinicamente significativas na Sorologia de Sífilis;
História de Trauma craniano (clinicamente significativo em relação ao quadro demencial);
Outra doença neurológica (clinicamente significativa em relação ao quadro demencial);
Déficits Auditivos (clinicamente significativos e sem correção);
Déficits Visuais (clinicamente significativos e sem correção);
Doenças sistêmicas <i>clinicamente significativas</i> ou <i>não compensadas</i> , incluindo: Diabetes,
Hipertensão, Hipotireoidismo, Câncer, Doenças Hepáticas, Doenças Renais, Doenças
Cardíacas, Doenças Pulmonares.
Em uso de medicações: Antiplaquetárias, Anticoagulantes e/ou Corticosteróides.

### 3.4 Instrumento de avaliação socioeconômica

Para a avaliação da caracterização socioeconômica da amostra foi desenvolvido um protocolo que analisasse os critérios segundo o sexo, faixa etária, anos de escolaridade e renda dos idosos.

### 3.5 Instrumentos de avaliação cognitiva

Para a avaliação da disfunção cognitiva foi utilizado o Mini Exame do Estado Mental (MEEM), um teste neuropsicológico para rastreamento da função cognitiva que utiliza a escolaridade dos avaliados para estabelecer a nota de corte. Este teste avalia a orientação temporal (cinco pontos), orientação espacial (cinco pontos), memória imediata – curto prazo (três pontos), atenção e cálculo (cinco pontos), memória e evocação (três pontos), linguagem – nomeação, repetição, compreensão e praxia, leitura e escrita – (oito pontos) e capacidade visuo-constructiva (um ponto). A pontuação abaixo da nota de corte é indicativa de perdas cognitivas.

<sup>2</sup> Extraído de(COLCIAGHI; MARCELLO; BORRONI; ZIMMERMANN *et al.*, 2004).

<sup>3</sup> De acordo com os critérios do DSM-IV (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders).

<sup>4</sup> Por Tomografia Computadorizada ou Ressonância Magnética nos últimos 18 meses.

Para este estudo foi adotado os pontos de cortes do MEEM, segundo a escolaridade, conforme recomenda (BRUCKI; NITRINI; CARAMELLI; BERTOLUCCI *et al.*, 2003).

Além desse instrumento, foram aplicados os seguintes testes, o *Addenbrooke's Cognitive Examination*, versão revisada (ACE-R) e o *Clinical Dementia Rating* (CDR). O instrumento ACE-R avalia seis domínios cognitivos num todo, oferecendo notas parciais para cada um deles, tais como: atenção, orientação, memória, fluência verbal, linguagem e habilidades visuais- espaciais, sendo sua pontuação total máxima distribuída entre os mesmos. Os pontos referentes aos seis domínios podem ser calculados separadamente, e as somas de todos os itens equivalem ao escore total do indivíduo (CARVALHO; CARAMELLI; NEUROPSYCHOLOGIA, 2007). No instrumento de avaliação CDR avalia a cognição e o comportamento, além da influência das perdas cognitivas na capacidade de realização adequada nas atividades de vida diária. Nesse instrumento para se concluir a classificação não há necessidade de notas de corte estabelecidas pelo desempenho populacional, pois os indivíduos são comparados aos seus próprios desempenhos passados. Tal instrumento está dividido em seis categorias cognitiva- comportamentais: memória, orientação, julgamento ou solução de problemas, relações comunitárias, atividades no lar ou de lazer e cuidados pessoais. Cada uma dessas categorias deve ser classificada em: 0 (nenhuma alteração); 0,5 (comprometimento cognitivo ou demência questionável); 1 (demência leve); 2 (demência moderada); e 3 (demência grave), exceto a categoria de cuidado pessoal, a qual não tem a classificação 0,5 (MACEDO MONTAÑO; RAMOS, 2005).

### **3.6 Coleta e processamento do sangue**

As coletas foram realizadas em parcerias com as unidades saúde da família (USFs), centro de especialidades médicas (CEME) e unidade saúde escola (USE), no município de São Carlos. O material foi coletado com auxílio de escalpes (*BD Vacutainer Push Button Blood Collection Set*), garrote de média compressão, álcool 70% e algodão. Foram usados tubos contendo solução de citrato de sódio (3,8%) e glicose (136 mM). Os tubos foram invertidos 10x e mantidos a temperatura de 4°C durante a fase de armazenamento e transporte após feita a coleta. O material coletado foi conduzido até o laboratório de biologia do envelhecimento (LABEN), onde ocorreu o processamento do material que consiste na centrifugação a 1.200 rpm durante 10 minutos, para obter-se o plasma rico em plaquetas (PRP). Uma nova centrifugação a 2.400 rpm por complementares 10 minutos foi feita para a separação das plaquetas e do plasma pobre em plaquetas (PPP). Posteriormente essas amostras foram armazenadas em ultra freezer (-80°C).

### 3.7 Quantificação de proteínas totais e da ADAM10

Para a quantificação de proteína totais, 10µl das amostras de plasma foram aplicadas em uma placa de 96 poços e o *kit* de quantificação de proteínas BCA (*Thermo Scientific*) foi utilizado seguindo as instruções do fabricante. A leitura da absorbância foi realizada no equipamento *LT-4000 Micoplate Reader-Labtech* em 540nm. Em seguida, após determinada a concentração de proteínas totais, foi realizada a quantificação dos níveis da ADAM10 utilizando a técnica de análise SDS-PAGE seguida por *western blotting*.

### 3.8 SDS-PAGE e *western blotting*

O volume para 15µg/µl de proteína foi diluído em 10µl de tampão de amostra para SDS-PAGE [Tris- HCl 0.125M pH 6.8, SDS 4% (w/v), glicerol 20% (v/v), β- mercaptoetanol 0.1M e azul de bromofenol 0.02% (w/v)]. Antes da aplicação nos géis de poliacrilamida (10%), as amostras foram fervidas a 100°C por cinco minutos no banho seco. As corridas de eletroforese foram realizadas durante 90 minutos a 100V e em seguida as proteínas presentes nos géis foram transferidas para membranas de nitrocelulose (BioRad) através do sistema de transferência mini trans-blot cell (*BioRad*) em tampão Tris-HCl (25mM), glicina (92mM), metanol (20%) e SDS (0.1%). As transferências foram realizadas a 250mA (mili-Ampéres) durante duas horas a 4°C. Para confirmar a eficiência das transferências e para a identificação do controle endógeno (albumina plasmática) os géis de poliacrilamida foram corados com Ponceau (2g dissolvidos em 10ml de ácido acético e 990ml de água destilada). Posteriormente, as membranas foram incubadas por três horas na solução de bloqueio contendo caseína (2,5g de leite em pó desnatado dissolvidos em 50 ml de TBST composto de 100ml TBST10x, 900ml de H<sub>2</sub>O destilada e 500µl de Tween 20) em temperatura ambiente. Após lavagens sucessivas em TBST as membranas foram incubadas *overnight*, a 4°C em geladeira, com anticorpo primário anti-ADAM10 (*Ab39180 rabbit, 1:1000 em 1% Casein Blocker*). Em seguida, as membranas foram incubadas por 1h, em temperatura ambiente, com anticorpo secundário (*Ab97051 rabbit 1:2000 em 1% Casein Blocker*). Ambas as incubações com os anticorpos ocorreram sob agitação suave.

A revelação das proteínas seguiu o protocolo do *kit Clarity Western ECL Substrate* (BioRad) com auxílio do leitor de imagens *ChemiDoc™ MP Imaging System* (BioRad). Vale ressaltar que além do controle endógeno citado acima, foi preparada uma amostra de plasma de um participante jovem saudável seguindo os mesmos protocolos. Essa amostra foi aplicada em todos os géis, sendo denominada de controle jovem (Cj), e teve a finalidade de corrigir as variações analíticas entre os experimentos realizados em dias diferentes. Para obtenção dos valores finais a razão entre as médias da ADAM10 pela albumina foram divididas pelos valores

do controle jovem de cada gel correspondente.

### 3.9 Densitometria das bandas

Após a revelação das membranas, as bandas marcadas pela reação com os anticorpos foram quantificadas com auxílio do software *Quantity One* (BioRad). O parâmetro para análise foi o volume ajustado das bandas, que significa o volume total, diminuído do background. Para a quantificação das amostras foi implantada a análise cega dos sujeitos.

### 3.10 Ensaio de atividade enzimática

O ensaio enzimático ou ensaio de atividade é um procedimento que mede a velocidade das reações enzimáticas e as mudanças no consumo do substrato. A atividade enzimática da ADAM10 plasmática foi avaliada utilizando vinte microgramas (20µg) de plasma que foi incubado com 10µM de peptídeo fluorogênico (sequência derivada do TNFα: Mca-P-L-A-Q-A-V-Dpa-R-S-S-S-R-NH<sub>2</sub>, Cat. No. ES003, *R&D Systems, Wiesbaden, Germany*) em tampão de reação (25 mM Tris-HCl, pH 8.0, 2,5 µM ZnCl<sub>2</sub>) com volume final de 50µl por poço em placa escura de 96 poços (*Greiner Bio-One, Frickenhausen, Germany*). O aumento da intensidade da fluorescência foi determinado em leitor de microplaca (*Fluostar Omega, BMG Labtech, Ortenberg, Germany*) com comprimento de onda de 320nm (excitação) e 400nm (emissão) a cada 2 min por 160 min, mantendo a temperatura de 37°C durante as medidas. Um passo de agitação foi incluído antes de cada ciclo de medida. Para análise comparativa, os valores obtidos 60 min após o início da reação foram utilizados, subtraídos do branco (tampão sem proteína). Análises com a ADAM10 recombinante humana (Cat. No. 936-AD-020, *R&D Systems, Wiesbaden, Germany*) foram realizadas de acordo com protocolo do fabricante para construção da curva padrão. Para checar a especificidade do sinal obtido, duplicatas das amostras foram incubadas previamente a adição do peptídeo fluorogênico por 5 min a 37°C com 10 µM de GI254023X (Cat. No. 3995, *R&D Systems, Wiesbaden, Germany*), um inibidor específico da ADAM10. A quantificação da ADAM10 ativa foi analisada via curva padrão considerando diferentes tempos e variações de concentrações (25ng/ml – 0,39ng/ml) subtraído do valor da curva branco correspondente de cada paciente no tempo de 60 minutos.

### 3.11 Análise estatística

Os dados obtidos foram planilhados utilizando o *software* Microsoft Excel e a partir desse software foi feita a razão dos valores totais obtidos nas bandas de ADAM10 pelo controle endógeno da albumina e também pelo controle jovem. A normalidade dos dados foi averiguada

através dos testes de Kolmogorov-Smirnov e Shapiro Wilk. Os testes estáticos e os gráficos foram feitos utilizando o *software GraphPad Prism 8*, e para esses foi adotado nível de significância de 5%. As análises referentes aos níveis de ADAM10 foi utilizado o Teste U de Mann-Whitney, que avalia dados não paramétricos, e para as análises referentes ao ensaio de atividade foram aplicados os testes de ANOVA One -Way e Kruskal-Wallis, que avaliam dados paramétricos e não paramétricos, respectivamente. Diante disso, todos os indivíduos que manifestaram valores anormais, com grande discrepância dos demais, conhecidos como *outliers*, foram excluídos, após serem identificados pelo *software*.



## **4 RESULTADOS**

### **4.1 Dados de caracterização e socioeconômicos**

A tabela 2 apresenta os dados da caracterização socioeconômica da amostra analisada, dividida nos três grupos de interesse. Os dados estão distribuídos segundo o sexo, faixa etária, anos de escolaridade e renda dos idosos.

O estudo compreendeu 88 idosos, sendo 55 (62,5%) do sexo feminino e 33 (37,5) do sexo masculino. Com relação à faixa etária verificou-se que a maior parte dos idosos tinha idades entre 70-79 (n = 38) representando 43,2% e 80-89 (n = 20) representando 22,7% do total da amostra (Tabela 2).

Na categoria renda, a maior parcela dos participantes desta pesquisa, representando 32,9% (n = 29) do total de idosos, se concentrou no grupo de dois salários mínimos. Quanto ao grau de escolaridade foi observado entre os grupos o predomínio de sujeitos com ensino fundamental incompleto (de 1 a 4 anos de estudo), o que representa aproximadamente 62,5% (n = 55) da população analisada (Tabela 2).

**Tabela 2.** Dados de caracterização socioeconômicos gerais dos sujeitos dos três grupos analisados.

	DA		TNCL		Controle		Total	
<b>Idosos (n, %)</b>	31	35,2	28	31,8	29	33,0	88	100
<b>Sexo (n, %)</b>								
<i>Feminino</i>	17	54,8	21	75	17	58,6	55	62,5
<i>Masculino</i>	14	45,2	7	25	12	41,4	33	37,5
<b>Faixa etária (n, %)</b>								
<i>50-59 anos</i>	-	-	-	-	1	3,4	1	1,1
<i>60-69 anos</i>	4	12,9	8	28,6	9	31,0	21	23,9
<i>70-79 anos</i>	12	38,7	11	39,3	15	51,7	38	43,2
<i>80-89 anos</i>	12	38,7	6	21,4	4	13,8	20	22,7
<i>90 anos ou mais</i>	3	9,7	2	7,1	-	-	5	5,7
<b>Grau de escolaridade (n, %)</b>								
<i>Nenhum</i>	-	-	8	28,6	2	6,9	10	11,4
<i>1-4 anos</i>	19	61,3	15	53,6	21	72,4	55	62,5
<i>5-8 anos</i>	6	19,4	3	10,7	2	6,9	11	12,5
<i>9 anos ou mais</i>	6	19,4	2	7,1	4	13,8	12	13,6
<b>Renda do Idoso (n, %)</b>								
<i>De 1/2 a 1 salário mínimo</i>	6	19,4	3	10,7	2	6,9	11	12,5
<i>De 1 a 2 salários mínimos</i>	3	9,7	16	57,1	10	34,5	29	33,0
<i>De 2 a 3 salários mínimos</i>	6	19,4	3	10,7	4	13,8	13	14,8
<i>De 3 a 4 salários mínimos</i>	1	3,2	1	3,6	5	17,2	7	8,0
<i>Acima de 4 salários mínimos</i>	1	3,2	-	-	2	6,9	3	3,4
<i>Não aceitou declarar</i>	14	45,2	5	17,9	6	20,7	25	28,4
<b>ACE-R* (n, %)</b>								
<i>0-20 pontos</i>	2	6,5	1	3,6	-	-	3	3,4
<i>21-40 pontos</i>	2	6,5	3	10,7	2	6,9	7	8,0
<i>41-60 pontos</i>	3	9,7	14	50,0	5	17,2	22	25,0
<i>61-80 pontos</i>	3	9,7	10	35,7	3	10,3	16	18,2
<i>81-100 pontos</i>	-	-	-	-	2	6,9	2	2,3
<b>MEEM (n, %)</b>								
<i>17 pontos ou mais</i>	21	67,7	8	28,6	5	17,2	34	38,6
<i>22 pontos ou mais</i>	3	9,7	8	28,6	3	10,3	14	15,9
<i>24 pontos ou mais</i>	2	6,5	7	25,0	6	20,7	15	17,0
<i>26 pontos ou mais</i>	1	3,2	1	3,6	14	48,3	16	18,2
<i>30 pontos</i>	-	-	-	-	1	3,4	1	1,1
<i>Não pontou</i>	4	12,9	4	14,3	-	-	8	9,1
<b>CDR (n, %)</b>								
<i>0 ponto</i>	-	-	1	3,5	29	100	30	34,1
<i>0,5 ponto</i>	1	3,2	27	96,4	-	-	28	31,8
<i>1 ponto</i>	14	45,1	-	-	-	-	14	15,9
<i>2 pontos</i>	10	32,2	-	-	-	-	10	11,4
<i>3 pontos</i>	6	19,3	-	-	-	-	6	6,8

\*O número de participantes no instrumento ACE-R varia nos grupos DA e controle sendo, n = 10 no grupo DA e n = 12 no grupo controle, visto que esses dados foram obtidos por dois estudos anteriores de nosso grupo de pesquisa.

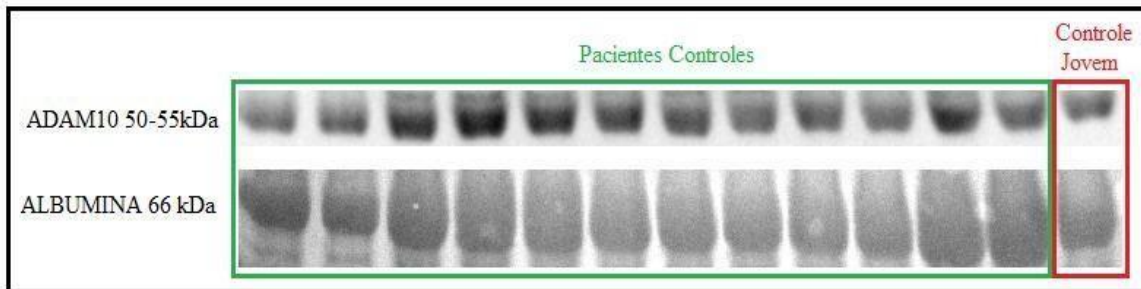
#### 4.2 Níveis da ADAM10 nos idosos dos grupos TNCL, DA e controle

As figuras 4, 5 e 6 exemplificam as imagens das membranas obtidas através da técnica de *western blotting*. A ADAM10 solúvel no plasma apresenta massa molecular entre 50-55kDa.

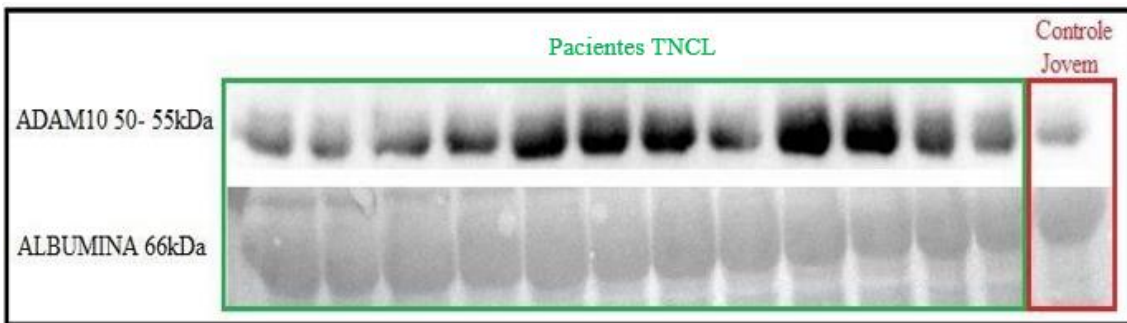
Com massa molecular superior à da ADAM10 são demonstradas as imagens referentes às bandas de albumina (66kDa) correspondentes a cada sujeito.

Para análise estatística dos dados, quatro valores apresentados como *outliers* pelo programa estatístico utilizado foram removidos, sendo n = 2 sujeitos do grupo TNCL, n = 1 sujeito do grupo DA e n = 1 sujeito controle. A tabela 4 apresenta os dados descritivos dos valores obtidos a partir da quantificação das bandas de ADAM10 solúvel entre os diferentes grupos.

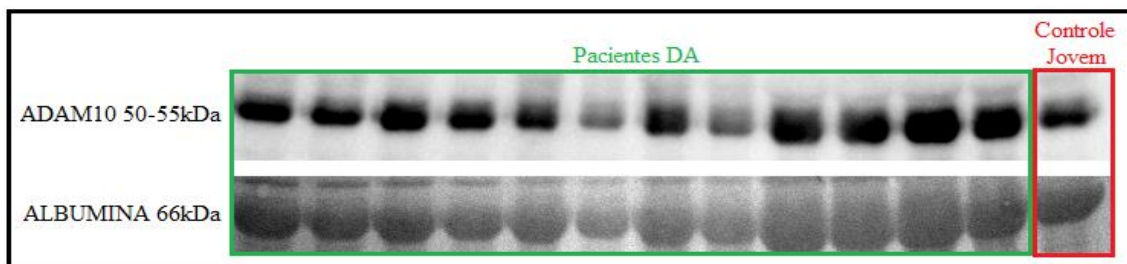
**Figura 4. Imagem referente à membrana representativa dos experimentos de western blotting, mostrando os níveis de ADAM10 em controles (cognitivamente saudáveis) e o controle endógeno (albumina).** O plasma dos sujeitos foi diluído 10x e o conteúdo proteico foi aplicado em gel de poliacrilamida 10%. As proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose e coradas com Ponceau, incubadas em solução de bloqueio por 2 h e incubadas overnight com anticorpo primário anti-ADAM10 e posteriormente em anticorpo secundário (*Goat Anti-Rabbit IgG-HRP*) por 1 hora. A revelação das bandas foi realizada utilizando o kit *Western RCL Substrate* (BioRad). As membranas foram fotografadas e a imagem das bandas específicas de ADAM10 e albumina estão apresentadas nesta figura, além da banda que representa o controle jovem.



**Figura 5. Imagem referente à membrana representativa dos experimentos de *western blotting*, mostrando os níveis de ADAM10 de pacientes com TNCL e controle endógeno (albumina).** O plasma dos sujeitos foi diluído em 10x e o conteúdo proteico foi aplicado em gel de poliácridamida 10%. As proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose e coradas com Ponceau, incubadas em solução de bloqueio por 2h e incubadas overnight em anticorpo primário anti-ADAM10 e posteriormente em anticorpo secundário (*Goat Anti-Rabbit IgG-HRP*) por 1 hora. A revelação das bandas foi realizada utilizando o kit *Western RCL Substrate* (BioRad). As membranas foram fotografadas e a imagem das bandas específicas de ADAM10 e albumina, estão apresentadas nesta figura, além da banda que representa o controle jovem.



**Figura 6. Imagem referente à membrana representativa dos experimentos de *western blotting*, mostrando os níveis de ADAM10 de pacientes com DA e controle endógeno (albumina).** O plasma dos sujeitos foi diluído em 10x e o conteúdo proteico foi aplicado em gel de poliácridamida 10%. As proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose e coradas com Ponceau, incubadas em solução de bloqueio por 2h e incubadas overnight em anticorpo primário anti-ADAM10 e posteriormente em anticorpo secundário (*Goat Anti-Rabbit IgG-HRP*) por 1 hora. A revelação das bandas foi realizada utilizando o kit *Western RCL Substrate* (BioRad). As membranas foram fotografadas e a imagem das bandas específicas de ADAM10 e albumina, estão apresentadas nesta figura, além da banda que representa o controle jovem.

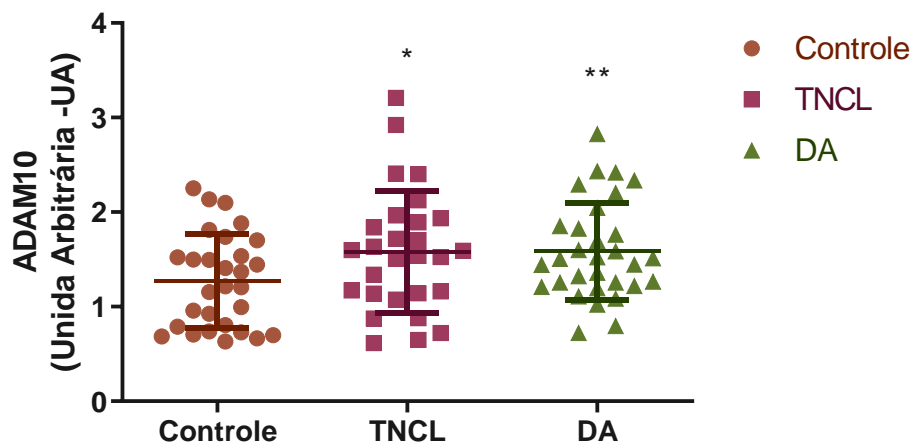


**Tabela 3.** Análise descritiva dos níveis descritivos dos valores obtidos a partir da quantificação das bandas de ADAM10 plasmática entre os grupos analisados.

	Controle	TNCL	DA
Valores	29	28	31
Mínimo	0.6327	0.6141	0.7211
Percentil 25%	0.7630	1.139	1.219
Mediana	1.213	1.566	1.507
Percentil 75%	1.619	1.924	1.853
Máximo	2.253	3.208	2.826
Média	1.269	1.581	1.584
Desvio Padrão	0.4956	0.6428	0.5121
Erro padrão da média	0.09202	0.1215	0.09198
Intervalo de confiança (CI 95%) inferior da média	1.080	1.332	1.396
Intervalo de confiança (CI 95%) superior da média	1.457	1.830	1.772
Soma	36.79	44.27	49.10

Estes valores foram quantificados e ilustrados na Figura 7 possibilitando verificar a homogeneidade dos dados apresentados.

**Figura 7.** Gráfico de dispersão indicando os níveis plasmáticos de ADAM10 solúvel entre os grupos. O gráfico indica a razão da ADAM10/albumina/controle jovem para os grupos de idosos avaliados (TNCL, n = 29; DA, n = 31; Controle, n = 28). Teste estatístico U de Mann-Whitney (CT vs TNCL\* p = <0,0325; CT vs DA \*\* p = 0,0129).



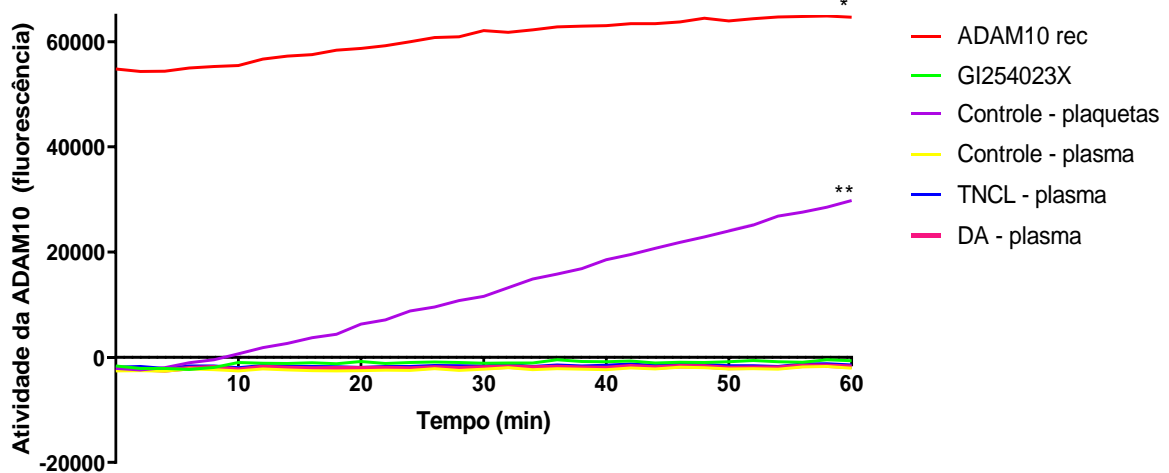
### 4.3 Atividade enzimática

Para avaliar a atividade da ADAM10 o número de amostras utilizadas foi de 21 (TNCL, n= 7; DA, n=7; controle, n=7). O controle positivo foi obtido pela ADAM10 recombinante humana, na concentração de 25ng/ml (Figura 8, linha vermelha). Também foi utilizada uma amostra de plaquetas de paciente jovem e a mesma mostrou-se positiva para atividade da

ADAM10 (linha roxa). Para certificar que a ADAM10 é a protease que realmente apresenta atividade na amostra de plaqueta, um inibidor de ADAM10 – GI254023X (linha verde) – também foi utilizado, tendo sido previamente incubado com a amostra de plaqueta antes do experimento, a fim de mostrar que a atividade presente corresponde majoritariamente a ADAM10 e não a outras proteases que possam estar eventualmente presentes na amostra, visto que o substrato fluorogênico pode ser clivado por outras ADAMs.

A atividade proteolítica da ADAM10 foi consideravelmente maior nas amostras de plaqueta e para a ADAM10 recombinante, quando comparado às amostras de plasma, tanto para os idosos com comprometimento cognitivo leve (TNCL, linha azul), doença de Alzheimer (DA, linha rosa) e os idosos saudáveis cognitivamente (linha amarela). No entanto, não houve diferença significativa com relação a atividade da ADAM10 entre os grupos, mas apenas entre as amostras de plasma e plaquetas. A ADAM10 recombinante, controle positivo usado no experimento, também apresentou atividade enzimática, conforme o esperado.

**Figura 8. Atividade da ADAM10 plasmática e plaquetária.** Análise da atividade da ADAM10 durante o período de sessenta minutos entre os grupos controle (linha amarela, comprometimento cognitivo leve (TNCL, linha azul) e doença de Alzheimer (DA, linha rosa) no plasma. Um controle com amostra de plaqueta (linha roxa) e de ADAM10 recombinante (linha vermelha), além da utilização de um inibidor específico para ADAM10 (linha verde) foram representados no gráfico. A atividade de ADAM10 no plasma dos grupos TNCL, DA e controle apresentou diferença estatística significativa quando comparada à atividade da ADAM10 em plaquetas (\* $p < 0.001$ ) e com a atividade da ADAM10 recombinante (\*\* $p < 0.0001$ ). O teste ANOVA One-way foi realizado no programa *Graph Pad Prism 8.0*.



## 5 DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

No presente estudo comparamos os níveis e a atividade da ADAM10 em amostras de plasma de indivíduos com doença de Alzheimer (DA) e transtorno neurocognitivo leve (TNCL) com os níveis e atividade da ADAM10 obtidos nos indivíduos cognitivamente saudáveis. A maioria dos participantes do estudo era do sexo feminino nos três grupos analisados. Estes resultados são similares aos encontrados por (SUDRÉ; REINERS; DE SOUZA AZEVEDO; FLORIANO, 2015) em um estudo realizado com 352 idosos por meio de entrevistas estruturadas através de um programa conduzido pelas Equipes de Saúde da Família no município de Cuiabá. Esse estudo mostrou que aproximadamente 61,6% da amostra era composta pelo sexo feminino. Esses dados também são semelhantes a diversos estudos encontrados na literatura e corroboram com o senso brasileiro de 2010 (IBGE, 2010), em que se observa diferença significativa entre o número de homens e mulheres com idade igual ou superior a 60 anos (SOUZA; BERLESE; CUNHA; CABRAL *et al.*, 2017; SUDRÉ; REINERS; DE SOUZA AZEVEDO; FLORIANO, 2015).

A ampla participação feminina nas pesquisas com idosos pode ser explicada por diversos fatores, tais como a menor exposição a situações de risco ocupacional e maior existência da atuação domiciliar. Além disso, estudos apontam que o sexo feminino tem uma maior inclinação para destinar o máximo do seu tempo aos cuidados da saúde, tornando-se menos exposto à mortalidade quando comparado aos homens (DEL DUCA; SILVA; THUMÉ; SANTOS *et al.*, 2012; SOUZA; MORAIS; BARTH, 2006).

Com relação a faixa etária verificou-se que a maior parte dos idosos tinha idades entre 70-79. Estes dados corroboram com as indicações do censo brasileiro de 2010 (IBGE, 2010) visto que as amostras predominantes se encontraram entre o grupo de idosos com faixa etária entre 70-74 anos (SOUZA; BERLESE; CUNHA; CABRAL *et al.*, 2017). Outro estudo realizado no Brasil também apresentou predomínio de idosos com idade entre os 60-79 anos; tal fenômeno pode ser explicado devido ao fato de que, de maneira distinta ao que ocorre nos países desenvolvidos, no Brasil o envelhecimento populacional teve início mais recentemente, mais especificamente na década de 60, onde sucedeu-se a queda da taxa de fecundidade que passou de 6,2 filhos por mulher em 1940 para 0,93% dos filhos em 2011 e 2012. Os idosos com mais de 80 anos representam 13% da população mundial, estimando um acréscimo de 7% com projeção para o ano de 2020 (SUDRÉ; REINERS; DE SOUZA AZEVEDO; FLORIANO, 2015).

Na categoria de renda, a maior parcela dos participantes desta pesquisa se concentrou no grupo de dois salários mínimos. Este predomínio pode ser devido ao fato de que a região onde

ocorreu o estudo no município de São Carlos é de alta vulnerabilidade social. Esses dados corroboram como o trabalho de Duarte et al. (2013), no qual foram estudados 166 idosos, com o propósito de avaliar o predomínio e as condições sociodemográficas relacionadas à vulnerabilidade. Nele foi verificado que a renda pessoal influente também foi a de um a dois salários mínimos caracterizando 59% da amostra total (DUARTE; FERNANDES; RODRIGUES; NÓBREGA, 2013).

Quanto ao grau de escolaridade foi observado entre os grupos o predomínio de sujeitos com ensino fundamental incompleto (de 1 a 4 anos de estudo). Dados semelhantes a estes foram encontrados no estudo de Souza et al. (2017) com o predomínio de idosos nesta escolaridade (36%). O estudo de Carneiro et al. (2017) mostrou que 85,8% da amostra possuía até 4 anos de escolaridade. Outro estudo aponta que os resultados obtidos relativos ao grau de escolaridade dos idosos não são diferentes aos encontrados na PNAD (Pesquisa Nacional por Amostra de Domicílio) 2009, na qual 50,2% dos sujeitos com 60 anos ou mais possuíam menos de 4 anos de escolaridade (SUDRÉ; REINERS; DE SOUZA AZEVEDO; FLORIANO, 2015). Isto pode ser explicado pelo fato de a educação formal ter sido pouco valorizada na época de infância e juventude desses idosos, além das condições socioeconômicas menos favoráveis e maior difícil de acesso à educação em áreas rurais (DEL DUCA; SILVA; THUMÉ; SANTOS *et al.*, 2012).

Com relação aos resultados referentes níveis plasmáticos de ADAM10, como observado nos experimentos de *western blotting*, não mostraram diferenças entre os sujeitos com TNCL e os sujeitos com DA. Entretanto, foi possível verificar níveis significativamente maiores de ADAM10 plasmática nos grupos TNCL e DA, quando comparado com o grupo controle sem alteração cognitiva.

Até o momento, tendo em vista o que se conhece na literatura, não foram encontrados trabalhos que tenham estudado os níveis de ADAM10 solúvel no plasma de idosos com TNCL ou DA, devido a isso foram utilizados outros estudos correlatos para a discussão desse trabalho. Estudos anteriores realizados por nosso grupo de pesquisa evidenciaram que os idosos com DA apresentam níveis proteicos plaquetários diminuídos de ADAM10 (60 kDa) comparado com idosos cognitivamente saudáveis e que essa diminuição foi ainda maior com o avanço da doença (MANZINE; BARHAM; VALE; SELISTRE-DE-ARAÚJO *et al.*, 2014; MANZINE; BARHAM; VALE; SELISTRE-DE-ARAÚJO *et al.*, 2013; MANZINE; MARCELLO; BORRONI; KAMPHUIS *et al.*, 2015). Vale lembrar que nos estudos citados acima, os resultados foram obtidos pela razão ADAM10/ $\beta$ -actina. Em nosso estudo, utilizamos a albumina como controle endógeno, pois não foi possível encontrar outra proteína que pudesse ser utilizada como controle endógeno nas amostras de plasma, devido a presença de grande



quantidade de albumina.

Outro estudo de nosso grupo de pesquisa avaliou os níveis e a atividade da ADAM10 em amostras de líquido cefalorraquidiano (LCR) e soro sanguíneo de sujeitos com DA e transtorno cognitivo leve do tipo amnésico (TNCLa) em comparação com idosos com cognição preservada (PERON, 2018). No referido estudo, após a realização de ensaios específicos de atividade foi verificado que a ADAM10 no LCR se apresenta inativa. Não foram encontradas diferenças entre os níveis de ADAM10 inativa entre os pacientes com TNCLa em comparação com os controles cognitivamente saudáveis. Entretanto, os idosos do grupo DA apresentaram aumento da ADAM10 inativa em comparação ao grupo controle, o que corrobora com nossa hipótese, de que os níveis de ADAM10 solúvel no plasma dos sujeitos com TNCL e DA estariam aumentados, quando comparados com os níveis dos sujeitos cognitivamente saudáveis (PERON, 2018).

Recentemente, Sogorb-Esteve *et al.* (2018) também analisaram os níveis de ADAM10 no LCR por meio da técnica de SDS-PAGE, utilizando ultracentrifugação diferencial em gradiente de sacarose, bem como imunoprecipitação. No estudo citado, os autores relataram que a ADAM10 presente no LCR humano possui diferentes massas moleculares e que as formas que classificaram como maduras e ativas da ADAM10 estavam reduzidas no LCR de indivíduos com DA, ao mesmo tempo em que as concentrações que denominaram como imaturas (pró-ADAM10 de ~80 kDa) estavam inalteradas (SOGORB-ESTEVE; GARCÍA-AYLLÓN; GOBOM; ALOM *et al.*, 2018). Estes resultados podem ter ocorrido devido ao uso de anticorpos diferentes do nosso estudo e os do grupo de Sogorb-Esteve, que usaram anticorpos específicos para a região média da ADAM10 (OAGA02442, Aviva Systems Biology, San Diego, USA), anticorpo anti-N-terminal (ab39153, Abcam, Cambridge, UK) e o anticorpo ADAM10 anti-C-terminal (ab124695, Abcam, Cambridge, UK), enquanto nosso grupo de pesquisa utilizou apenas o anticorpo que detecta a porção N-terminal da ADAM10 (ab39180, Abcam).

Com relação a atividade enzimática da ADAM10, pudemos observar que esta protease se encontra inativa em amostras de plasma, enquanto em amostras de plaquetas, a ADAM10 apresentou-se ativa, porém não houve diferença da atividade da ADAM10 entre as amostras de plasma dos grupos TNCL, DA e cognitivamente saudáveis.

Esses resultados corroboram com nossa hipótese de que os níveis de ADAM10 solúvel estão aumentados no plasma, mas que tais níveis plasmáticos representam ADAM10 inativa em sujeitos com TNCL e DA. A inatividade da ADAM10 também foi observada no plasma dos sujeitos cognitivamente saudáveis, apesar de seus níveis estarem menores nestes participantes, como apresentando no relatório anterior pelos ensaios de *western blotting*. É possível que o

teste de atividade para ADAM10 não seja uma ferramenta que permita diferenciar os pacientes cognitivamente saudáveis, daqueles com TNCL ou DA, no entanto, e de forma mais vantajosa no que tange à simplicidade de análise, os níveis plasmáticos da ADAM10 permitem diferenciar os grupos citados de maneira estatisticamente significativa (MANZINE; BARHAM; VALE; SELISTRE-DE-ARAÚJO *et al.*, 2014; PERON, 2018).

Outros autores já mostraram que a ADAM10 é sintetizada de forma inativa (com a presença do pró-domínio). Durante o seu transporte ao longo da via secretória algumas enzimas clivam o pró-domínio da ADAM10 de modo a liberar sua forma madura/ativa, o que garante sua atividade enzimática na membrana plasmática (ANDERS; GILBERT; GARTEN; POSTINA *et al.*, 2001; LAMMICH; KOJRO; POSTINA; GILBERT *et al.*, 1999). Do mesmo modo, já foi demonstrado que o recrutamento da ADAM10 na membrana sináptica, e consequentemente sua atividade, são favorecidos através da ligação com a proteína SAP97. Assim, esse mecanismo exemplifica uma nova via de ativação da clivagem fisiológica da ADAM10 nas sinapses neurais, podendo assim, explicar a presença de atividade destas proteínas apenas quando as mesmas estão vistas ancoradas à membrana, sejam essas neuronais ou plaquetárias (MARCELLO; BORRONI; PELUCCHI; GARDONI *et al.*, 2017).

Além da SAP97, foi demonstrado que outras proteínas se associam com a ADAM10, como as tetraspaninas (Tspans), que regulam o tráfego intracelular, mobilidade lateral e agrupamento na superfície celular da ADAM10 (CHARRIN; JOUANNET; BOUCHEIX; RUBINSTEIN, 2014; HEMLER, 2014). A TspanC8, especificamente, regula a saída da ADAM10 do retículo endoplasmático e a transporta para a membrana plasmática, promovendo assim sua maturação (DORNIER; COUMAILLEAU; OTTAVI; MORETTI *et al.*, 2012; HAINING; YANG; BAILEY; KHAN *et al.*, 2012).

Sendo assim, os resultados encontrados nesse estudo demonstraram que a atividade da ADAM10 está ausente no plasma sanguíneo e presente em plaquetas, o que leva a confirmação da hipótese inicial desse trabalho, de que a ADAM10 só teria atividade biológica de protease quando ancorada à membrana, como no caso das plaquetas. Estudos futuros de fracionamento celular poderão confirmar com maior precisão estes resultados.

O diagnóstico diferencial para DA e TNCL ainda é desafiador devido às sobreposições das características de outras demências. Por essa razão, a procura por biomarcadores em doenças neurodegenerativas como a DA são de extrema importância para a definição de diagnósticos mais precisos e precoces para estas doenças. Dessa forma a relevância desse estudo está relacionada ao aprimoramento sobre o conhecimento dos biomarcadores, em especial a ADAM10, o que pode vir contribuir para a precisão diagnóstica das doenças citadas. Desse

modo, a atuação do gerontólogo na pesquisa científica reforça a visão generalista desse profissional, uma vez que os resultados desse trabalho podem trazer impactos não somente no entendimento e identificação dessas doenças, mas também nas questões sociais, como políticas públicas de saúde que visem uma melhor assistência para os pacientes e seus cuidadores.

## **6 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

As limitações deste trabalho incluem fato de o estudo ter sido transversal e ter contado com amostras coletadas por diferentes trabalhos, não tendo sido possível obter resultados homogêneos nos instrumentos de avaliação cognitiva, visto que para parte das amostras analisadas não foram aplicados o instrumento de avaliação ACE-R. Outro fator limitante do estudo, foi a exclusão de alguns valores considerados *outliers* na amostra, por representarem dados altamente discrepantes da maioria. Isso pode ser devido a vários fatores, como por exemplo erros no processamento das amostras ou erros de pipetagem durante a execução dos experimentos.

Não obstante, o desenvolvimento desse trabalho possibilitou o acréscimo na literatura com relação aos biomarcadores sanguíneos para a DA e o TNCL, bem como colaborou para melhor entendimento sobre a regulação da protease ADAM10.

## REFERÊNCIAS

- ANDERS, A.; GILBERT, S.; GARTEN, W.; POSTINA, R. *et al.* Regulation of the  $\alpha$ -secretase ADAM10 by its prodomain and proprotein convertases. 15, n. 10, p. 1837-1839, 2001.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE ALZHEIMER (ABRAZ); Disponível em <www.abraz.org.br>. Acesso em: 18 novembro 2020.
- ASSOCIATION, A. P. DSM-5: Manual diagnóstico e estatístico de transtornos mentais. Artmed Editora, 2014. 8582711832.
- ALZHEIMER'S DISEASE INTERNATIONAL (ADI); Disponível em <www.alzint.org>. Acesso em: 18 novembro 2020.
- BALLARD, C.; GAUTHIER, S.; CORBETT, A.; BRAYNE, C. *et al.* Alzheimer's disease. *Lancet*, 377, n. 9770, p. 1019-1031, Mar 19 2011.
- BARNES, L. L.; WILSON, R. S.; BIENIAS, J. L.; SCHNEIDER, J. A. *et al.* Sex differences in the clinical manifestations of Alzheimer disease pathology. 62, n. 6, p. 685-691, 2005.
- BATTLE, D., 2013, Diagnostic and statistical manual of mental disorders (DSM). 191.
- BEALES, D. L.; TULLOCH, A. J. J. B. J. G. P. Community care of vulnerable older people: cause for concern. 63, n. 615, p. 549-550, 2013.
- BESSON, F. L.; LA JOIE, R.; DOEUVRE, L.; GAUBERT, M. *et al.* Cognitive and brain profiles associated with current neuroimaging biomarkers of preclinical Alzheimer's disease. 35, n. 29, p. 10402-10411, 2015.
- BLEIBAUM, F.; SOMMER, A.; VEIT, M.; RABE, B. *et al.* ADAM10 sheddase activation is controlled by cell membrane asymmetry. *J Mol Cell Biol*, 11, n. 11, p. 979-993, Dec 23 2019.
- BLENNOW, K. A Review of Fluid Biomarkers for Alzheimer's Disease: Moving from CSF to Blood. *Neurol Ther*, 6, n. Suppl 1, p. 15-24, Jul 2017.
- BOTTINO, C. M.; DE PÁDUA, A. C.; SMID, J.; AREZA-FEGYVERES, R. *et al.* Differential diagnosis between dementia and psychiatric disorders: Diagnostic criteria and supplementary exams. Recommendations of the Scientific Department of Cognitive Neurology and Aging of the Brazilian Academy of Neurology. 5, n. 4, p. 288, 2011.
- BRINKER, T.; STOPA, E.; MORRISON, J.; KLINGE, P. A new look at cerebrospinal fluid circulation. *Fluids Barriers CNS*, 11, p. 10, 2014.
- BROOKMEYER, R.; ABDALLA, N.; KAWAS, C. H.; CORRADA, M. M. J. A. s. *et al.* Forecasting the prevalence of preclinical and clinical Alzheimer's disease in the United States. 14, n. 2, p. 121-129, 2018.
- BRUCKI, S.; NITRINI, R.; CARAMELLI, P.; BERTOLUCCI, P. H. *et al.* Suggestions for utilization of the mini-mental state examination in Brazil. 61, n. 3B, p. 777-781, 2003.
- CARVALHO, V. A.; CARAMELLI, P. J. D.; NEUROPSYCHOLOGIA. Adaptação brasileira do exame cognitivo de Addenbrooke-Revisado. 1, n. 2, p. 212-216, 2007.
- CHARRIN, S.; JOUANNET, S.; BOUCHEIX, C.; RUBINSTEIN, E. J. J. o. c. s. Tetraspanins at a glance. 127, n. 17, p. 3641-3648, 2014.
- CHENG, Y.-W.; CHEN, T.-F.; CHIU, M.-J. J. N. D.; TREATMENT. From mild cognitive impairment to subjective cognitive decline: conceptual and methodological evolution. 13, p. 491, 2017.
- COLCIAGHI, F.; BORRONI, B.; PASTORINO, L.; MARCELLO, E. *et al.*  $\alpha$ -Secretase ADAM10 as well as  $\alpha$ APPs is reduced in platelets and CSF of Alzheimer disease patients. 8, n. 2, p. 67-74, 2002.

- COLCIAGHI, F.; MARCELLO, E.; BORRONI, B.; ZIMMERMANN, M. *et al.* Platelet APP, ADAM 10 and BACE alterations in the early stages of Alzheimer disease. *Neurology*, 62, n. 3, p. 498-501, Feb 10 2004.
- CUSTODIO, N.; WHEELOCK, A.; THUMALA, D.; SLACHEVSKY, A. J. F. *et al.* Dementia in Latin America: epidemiological evidence and implications for public policy. 9, p. 221, 2017.
- DE OLIVEIRA, T. R.; ERBERELI, C. R.; MANZINE, P. R.; MAGALHAES, T. N. C. *et al.* Early Diagnosis of Alzheimer's Disease in Blood Using a Disposable Electrochemical Microfluidic Platform. *ACS Sens*, 5, n. 4, p. 1010-1019, Apr 24 2020.
- DEB, A.; THORNTON, J. D.; SAMBAMOORTHY, U.; INNES, K. J. E. *et al.* Direct and indirect cost of managing Alzheimer's disease and related dementias in the United States. 17, n. 2, p. 189-202, 2017.
- DEL DUCA, G. F.; SILVA, S. G. d.; THUMÉ, E.; SANTOS, I. S. *et al.* Indicadores da institucionalização de idosos: estudo de casos e controles. 46, p. 147-153, 2012.
- DINIZ, B. S. d. O.; FORLENZA, O. V. J. A. o. C. P. O uso de biomarcadores no líquido cefalorraquidiano no diagnóstico precoce da doença de Alzheimer. 34, n. 3, p. 144-145, 2007.
- DORNIER, E.; COUMAILLEAU, F.; OTTAVI, J.-F.; MORETTI, J. *et al.* TspanC8 tetraspanins regulate ADAM10/Kuzbanian trafficking and promote Notch activation in flies and mammals. 199, n. 3, p. 481-496, 2012.
- DUARTE, M. C. S.; FERNANDES, M. d. G. M.; RODRIGUES, R. A. P.; NÓBREGA, M. M. L. d. J. R. b. d. e. Prevalence and sociodemographic factors associated with frailty in elderly women. 66, n. 6, p. 901-906, 2013.
- EVIN, G.; ZHU, A.; HOLSINGER, R. D.; MASTERS, C. L. *et al.* Proteolytic processing of the Alzheimer's disease amyloid precursor protein in brain and platelets. 74, n. 3, p. 386-392, 2003.
- FOLEY, D.; MASAKI, K.; WHITE, L.; ROSS, G. W. *et al.* Practice parameter: risk of driving and Alzheimer's disease. 56, n. 5, p. 695-695, 2001.
- GUSTAFSON, D. R.; SKOOG, I.; ROSENGREN, L.; ZETTERBERG, H. *et al.* Cerebrospinal fluid  $\beta$ -amyloid 1-42 concentration may predict cognitive decline in older women. 78, n. 5, p. 461-464, 2007.
- HAINING, E. J.; YANG, J.; BAILEY, R. L.; KHAN, K. *et al.* The TspanC8 subgroup of tetraspanins interacts with A disintegrin and metalloprotease 10 (ADAM10) and regulates its maturation and cell surface expression. 287, n. 47, p. 39753-39765, 2012.
- HEMLER, M. E. J. N. r. C. Tetraspanin proteins promote multiple cancer stages. 14, n. 1, p. 49-60, 2014.
- HOOPER, N.; TURNER, A. J. C. m. c. The search for  $\alpha$ -secretase and its potential as a therapeutic approach to Alzheimer's disease. 9, n. 11, p. 1107-1119, 2002.
- IBGE, C. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/cidadesat/topwindow.htm?1>. 3, 2010.
- IBGE, C. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 2018.
- IBGE, I. J. I. D. d. P. C. d. P. e. I. S. E. d. P. r. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 2010. p. 2009, 2011.
- JACK, C. R.; BENNETT, D. A.; BLENNOW, K.; CARRILLO, M. C. *et al.* A/T/N: an unbiased descriptive classification scheme for Alzheimer disease biomarkers. 87, n. 5, p. 539-547, 2016.
- KELLEY, B. J.; PETERSEN, R. C. J. N. c. Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. 25, n. 3, p. 577-609, 2007.

- KLUNK, W. E.; ENGLER, H.; NORDBERG, A.; WANG, Y. *et al.* Imaging brain amyloid in Alzheimer's disease with Pittsburgh Compound-B. 55, n. 3, p. 306-319, 2004.
- KUMAR, A.; SIDHU, J.; GOYAL, A.; TSAO, J. W. Alzheimer Disease. : StatPearls Publishing, Treasure Island (FL) 2020.
- LAMMICH, S.; KOJRO, E.; POSTINA, R.; GILBERT, S. *et al.* Constitutive and regulated  $\alpha$ -secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by a disintegrin metalloprotease. 96, n. 7, p. 3922-3927, 1999.
- LEE, J.; RETAMAL, C.; CUITIÑO, L.; CARUANO-YZERMANS, A. *et al.* Adaptor protein sorting nexin 17 regulates amyloid precursor protein trafficking and processing in the early endosomes. 283, n. 17, p. 11501-11508, 2008.
- LIVINGSTON, G.; SOMMERLAD, A.; ORGETA, V.; COSTAFREDA, S. G. *et al.* Dementia prevention, intervention, and care. 390, n. 10113, p. 2673-2734, 2017.
- LORENA CHAVES, M.; LUIZA CAMOZZATO, A.; GODINHO, C.; PIAZENSKI, I. *et al.* Incidence of mild cognitive impairment and Alzheimer disease in Southern Brazil. 22, n. 3, p. 181-187, 2009.
- MACEDO MONTAÑO, M. B. M.; RAMOS, L. R. J. R. d. S. P. Validade da versão em português da Clinical Dementia Rating. 39, p. 912-917, 2005.
- MANZINE, P. R.; BARHAM, E. J.; VALE, F. A. C.; SELISTRE-DE-ARAÚJO, H. S. *et al.* Platelet a disintegrin and metallopeptidase 10 expression correlates with clock drawing test scores in Alzheimer's disease. 29, n. 4, p. 414-420, 2014.
- MANZINE, P. R.; BARHAM, E. J.; VALE, F. d. A. C. d.; SELISTRE-DE-ARAUJO, H. S. *et al.* Correlation between mini-mental state examination and platelet ADAM10 expression in Alzheimer's disease. 36, n. 2, p. 253-260, 2013.
- MANZINE, P. R.; MARCELLO, E.; BORRONI, B.; KAMPHUIS, W. *et al.* ADAM10 gene expression in the blood cells of Alzheimer's disease patients and mild cognitive impairment subjects. 20, n. 3, p. 196-201, 2015.
- MARCELLO, E.; BORRONI, B.; PELUCCHI, S.; GARDONI, F. *et al.* ADAM10 as a therapeutic target for brain diseases: from developmental disorders to Alzheimer's disease. 21, n. 11, p. 1017-1026, 2017.
- MCKHANN, G.; DRACHMAN, D.; FOLSTEIN, M.; KATZMAN, R. *et al.* Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease. Neurology, 34, n. 7, p. 939-944, Jul 1984.
- MCKHANN, G. M.; KNOPMAN, D. S.; CHERTKOW, H.; HYMAN, B. T. *et al.* The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. 7, n. 3, p. 263-269, 2011.
- NIKOLAEV, A.; MCLAUGHLIN, T.; O'LEARY, D. D.; TESSIER-LAVIGNE, M. J. N. APP binds DR6 to trigger axon pruning and neuron death via distinct caspases. 457, n. 7232, p. 981-989, 2009.
- NIU, H.; ÁLVAREZ-ÁLVAREZ, I.; GUILLÉN-GRIMA, F.; AGUINAGA-ONTOSO, I. J. N. Prevalencia e incidencia de la enfermedad de Alzheimer en Europa: metaanálisis. 32, n. 8, p. 523-532, 2017.
- O'BRIEN, R. J.; WONG, P. C. J. A. r. o. n. Amyloid precursor protein processing and Alzheimer's disease. 34, p. 185-204, 2011.
- OH, E. S.; SAVONENKO, A. V.; KING, J. F.; TUCKER, S. M. F. *et al.* Amyloid precursor protein increases cortical neuron size in transgenic mice. 30, n. 8, p. 1238-1244, 2009.



- OLIVEIRA, J. P. S.; MENDES, N. T.; MARTINS, Á. R.; SANVITO, W. L. J. J. B. P. M. L. Líquido cefalorraquidiano: história, técnicas de coleta, indicações, contraindicações e complicações. 56, p. 1-11, 2020.
- ORGANIZATION, O.-U. N. Economic and Social Affairs, Population Division. New York 2013.
- ORGANIZATION, W. H. Dementia: a public health priority. World Health Organization, 2012. 9241564458.
- PALMQVIST, S.; JANELIDZE, S.; QUIROZ, Y. T.; ZETTERBERG, H. *et al.* Discriminative Accuracy of Plasma Phospho-tau217 for Alzheimer Disease vs Other Neurodegenerative Disorders. *Jama*, 324, n. 8, p. 772-781, Aug 25 2020.
- PERON, R.; VATANABE, I. P.; MANZINE, P. R.; CAMINS, A. *et al.* Alpha-secretase ADAM10 regulation: insights into Alzheimer's disease treatment. 11, n. 1, p. 12, 2018.
- PERON, R. C. Níveis de ADAM10 no líquido cefalorraquidiano e soro de indivíduos com doença de Alzheimer. 2018.
- PETERSEN, R. C.; CARACCILO, B.; BRAYNE, C.; GAUTHIER, S. *et al.* Mild cognitive impairment: a concept in evolution. *J Intern Med*, 275, n. 3, p. 214-228, Mar 2014.
- PETERSEN, R. C.; MORRIS, J. C. Mild cognitive impairment as a clinical entity and treatment target. *Arch Neurol*, 62, n. 7, p. 1160-1163; discussion 1167, Jul 2005.
- PETERSEN, R. C.; SMITH, G. E.; WARING, S. C.; IVNIK, R. J. *et al.* Mild cognitive impairment: clinical characterization and outcome. 56, n. 3, p. 303-308, 1999.
- PETERSEN, R. C.; STEVENS, J. C.; GANGULI, M.; TANGALOS, E. G. *et al.* 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. 56, n. 9, p. 1133-1142, 2001.
- PLASSMAN, B. L.; LANGA, K. M.; FISHER, G. G.; HEERINGA, S. G. *et al.* Prevalence of dementia in the United States: the aging, demographics, and memory study. 29, n. 1-2, p. 125-132, 2007.
- QIU, C.; DE RONCHI, D.; FRATIGLIONI, L. J. C. o. i. p. The epidemiology of the dementias: an update. 20, n. 4, p. 380-385, 2007.
- QIU, C.; FRATIGLIONI, L. J. J. o. A. s. D. Aging without dementia is achievable: current evidence from epidemiological research. 62, n. 3, p. 933-942, 2018.
- REITZ, C.; MAYEUX, R. J. B. p. Alzheimer disease: epidemiology, diagnostic criteria, risk factors and biomarkers. 88, n. 4, p. 640-651, 2014.
- SAFTIG, P.; LICHTENTHALER, S. F. J. P. i. n. The alpha secretase ADAM10: A metalloprotease with multiple functions in the brain. 135, p. 1-20, 2015.
- SCHERDER, E.; EGGERMONT, L.; SWAAB, D.; VAN HEUVELEN, M. *et al.* Gait in ageing and associated dementias; its relationship with cognition. 31, n. 4, p. 485-497, 2007.
- SEADE, F. S. E. d. A. d. D.-. Índice Paulista de Responsabilidade Social (IPRS). Secretaria de Planejamento e desenvolvimento Regional de Estado de São Paulo, 2020.
- SHAW, L. M.; VANDERSTICHELE, H.; KNAPIK-CZAJKA, M.; CLARK, C. M. *et al.* Cerebrospinal fluid biomarker signature in Alzheimer's disease neuroimaging initiative subjects. 65, n. 4, p. 403-413, 2009.
- SKOOG, I.; DAVIDSSON, P.; AEVARSSON, O.; VANDERSTICHELE, H. *et al.* Cerebrospinal fluid beta-amyloid 42 is reduced before the onset of sporadic dementia: a population-based study in 85-year-olds. 15, n. 3, p. 169-176, 2003.



- SOGORB-ESTEVE, A.; GARCÍA-AYLLÓN, M.-S.; GOBOM, J.; ALOM, J. *et al.* Levels of ADAM10 are reduced in Alzheimer's disease CSF. 15, n. 1, p. 213, 2018.
- SOUZA, D. d. S.; BERLESE, D. B.; CUNHA, G. L. d.; CABRAL, S. M. *et al.* Análise da relação do suporte social e da síndrome de fragilidade em idosos. 18, n. 2, p. 420-433, 2017.
- SOUZA, L. M. d.; MORAIS, E. P. d.; BARTH, Q. C. M. J. R. l.-a. d. e. Socioeconomic and demographic characteristics and health condition of elderly people from a family health program in Porto Alegre, Brazil. 14, n. 6, p. 901-906, 2006.
- SUDRÉ, M. R. S.; REINERS, A. A. O.; DE SOUZA AZEVEDO, R. C.; FLORIANO, L. A. J. C., Cuidado e Saúde. < b> Características socioeconômicas e de saúde de idosos assistidos pelas Equipes de Saúde da Família/Socioeconomic and health conditions of the elderly assisted by Family Health Teams< b. 14, n. 1, p. 933-940, 2015.
- SZYBIŃSKA, A.; LEŚNIAK, W. J. A.; DISEASE. P53 dysfunction in neurodegenerative diseases-the cause or effect of pathological changes? 8, n. 4, p. 506, 2017.
- VATANABE, I. P. ADAM10 como biomarcadora de Transtorno Neurocognitivo Leve. 2020.
- WANG, X.-P.; DING, H.-L. J. N. B. Alzheimer's disease: epidemiology, genetics, and beyond. 24, n. 2, p. 105, 2008.
- WARD, A.; TARDIFF, S.; DYE, C.; ARRIGHI, H. M. J. D. *et al.* Rate of conversion from prodromal Alzheimer's disease to Alzheimer's dementia: a systematic review of the literature. 3, n. 1, p. 320-332, 2013.
- WELLER, J.; BUDSON, A. Current understanding of Alzheimer's disease diagnosis and treatment. F1000Research. 2018.
- WINBLAD, B.; PALMER, K.; KIVIPELTO, M.; JELIC, V. *et al.* Mild cognitive impairment—beyond controversies, towards a consensus: report of the International Working Group on Mild Cognitive Impairment. 256, n. 3, p. 240-246, 2004.

## APÊNDICES – Artigos publicados durante o período do estudo

### Artigo 1. 2019

Developing Topics Poster Presentations | [Full Access](#)

### P4-538: ADAM10 AS A BIOMARKER OF MILD COGNITIVE IMPAIRMENT BUT NOT OF COGNITIVE FRAILTY

Izabela Pereira Vatanabe ✉, Marina Mantellatto Grigoli, Marina Araújo Naves, Patricia Regina Manzine, Marcos Hortes Nishihara Chagas, Daiene de Moraes Fabrício, Márcia Regina Cominetti

First published: 01 July 2019 | <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2019.08.085>

### Artigo 2. 2020



**Review Article**

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

**Author(s):** Patricia R. Manzine <sup>ORCID</sup>, Izabela P. Vatanabe <sup>ORCID</sup>, Rafaela Peron <sup>ORCID</sup>, Marina M. Grigoli <sup>ORCID</sup>, Renata V. Pedroso <sup>ORCID</sup>, Carla M.C. Nascimento <sup>ORCID</sup>, Marcia R. Cominetti\* <sup>ORCID</sup>

**Journal Name:** Current Pharmaceutical Design

**Volume 26 , Issue 12 , 2020**      **DOI :** 10.2174/1381612826666200114105515

[Download](#)      [Journal Home](#)

### Artigo 3. 2020



ISSN (print) 1516-2587  
ISSN (eletronico) 2176-901X

CAPA   SOBRE   ACESSO   CADASTRO   PESQUISA   ATUAL   ANTERIORES   NOTÍCIAS   PROGRAMA DE ESTUDOS PÓS-GRADUADOS EM GERONTOLOGIA   NORMAS PARA SUBMISSÃO DE ARTIGOS   PORTAL DO ENVELHECIMENTO

Capa > v. 23 (2020) > Peron

### Avaliação dos níveis e atividade da ADAM10 em diferentes meios biológicos

Rafaela Peron, Izabela Pereira Vatanabe, Patricia Regina Manzine, Marina Mantellatto Grigoli, Márcia Regina Cominetti

#### Resumo

A doença de Alzheimer (DA) afeta milhões de pessoas no mundo e resulta de dois marcos patológicos principais, os emaranhados neurofibrilares e a placas senis. Estas últimas derivam da clivagem da proteína precursora do amiloide (APP) pela via amiloidogênica, o que é evitado pela a-secretase ADAM10. Este estudo buscou avaliar níveis e atividade da ADAM10 em diferentes meios biológicos de indivíduos com DA, comparando estes achados com os obtidos em sujeitos sem alteração cognitiva, de modo a colaborar para o reforço diagnóstico da doença.

**ANEXOS****ANEXO 1- Protocolo de avaliação socioeconômico****PROTOCOLO DE AVALIAÇÃO SOCIOECONÔMICO**

Nome: \_\_\_\_\_

Data de Nascimento: \_\_\_\_\_ Data Consulta: \_\_\_\_\_ Prontuário: \_\_\_\_\_

Sexo:  Masculino  FemininoMedicamentos: \_\_\_\_\_  Antiplaquetários: \_\_\_\_\_**Escolaridade em anos:**

- Nenhum  
 1 a 4 anos  
 5 a 8 anos  
 9 anos ou mais

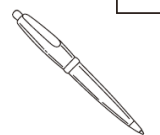
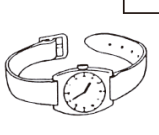





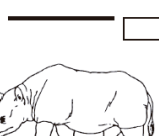

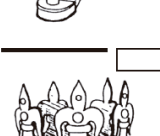
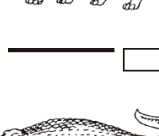
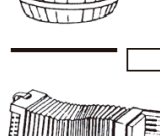
**Renda do idoso**

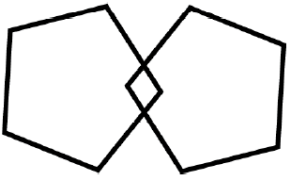
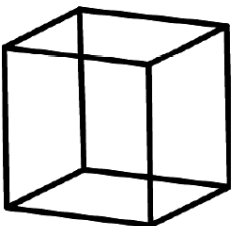
- Até <sup>1/3</sup> salário mínimo (R\$ 499,00)  
 De <sup>1/3</sup> a 01 salário mínimo (entre R\$ 499,00 e R\$ 998,00)  
 De 01 a 02 salários mínimos (entre R\$ 998,00 e R\$ 1.996,00)  
 De 02 a 03 salários mínimos (entre R\$ 1.996,00 e R\$ 2.994,00)  
 De 03 a 04 salários mínimos (entre R\$ 2.994,00 e R\$ 3.992,00)  
 De 04 a 05 salários mínimos (entre R\$ 3.992,00 e R\$ 4.990,00)  
 De 05 a 06 salários mínimos (entre R\$ 4.990,00 e R\$ 5.988,00)  
 Mais que 06 salários mínimos (R\$ 5.988,00 ou mais)  
 Não aceitou declarar

## ANEXO 2 – Addeenbroke’s Cognitive Examination – resived (ACE-R)

EXAME COGNITIVO DE ADDENBROOKE - VERSÃO REVISADA						
Título original: Addenbrooke's Cognitive Examination - Revised (ACE-R)						
<small>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 &amp; Caramelli P. Brazilian adaptation of the Addenbrooke's Cognitive Examination-Revised. Dementia &amp; Neuropsychologia 2007; 2: 212-216.</small>						
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] □ □
> Perguntar: Qual é	Local específico	Local genérico	Bairro ou rua próxima	Cidade	Estado	[Escore 0-5] □ □
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. Registre o número de tentativas:.....						[Escore 0-3] □ □
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] □ □
MEMÓRIA - Recordação						
> Pergunte quais as palavras que o indivíduo acabara de repetir. Dar um ponto para cada. .....						[Escore 0-3] □ □
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] □
	1ª Tentativa	2ª Tentativa	3ª Tentativa			
Renato Moreira	.....	.....	.....			
Rua Bela Vista 73	.....	.....	.....			
Santarém	.....	.....	.....			
Pará	.....	.....	.....			
MEMÓRIA - Memória Retrógrada						
> Nome do atual presidente da República..... > Nome do presidente que construiu Brasília..... > Nome do presidente dos EUA..... > Nome do presidente dos EUA que foi assassinado nos anos 60.....						[Escore 0-4] □

<b>FLUÊNCIA VERBAL – Letra “P” e Animais</b>																							
<p>➤ <b>Letras</b> <span style="float: right;">[Escore 0-7]</span></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>				<input style="width: 30px; height: 20px;" type="text"/>	A I C N É U L F E M A U S N I L																		
				<table style="width: 100%; border-collapse: collapse; font-size: 10px;"> <tr><td style="border-right: 1px dashed black; padding: 2px;">&gt;17</td><td style="padding: 2px;">7</td></tr> <tr><td style="border-right: 1px dashed black; padding: 2px;">14-17</td><td style="padding: 2px;">6</td></tr> <tr><td style="border-right: 1px dashed black; padding: 2px;">11-13</td><td style="padding: 2px;">5</td></tr> <tr><td style="border-right: 1px dashed black; padding: 2px;">8-10</td><td style="padding: 2px;">4</td></tr> <tr><td style="border-right: 1px dashed black; padding: 2px;">6-7</td><td style="padding: 2px;">3</td></tr> <tr><td style="border-right: 1px dashed black; padding: 2px;">4-5</td><td style="padding: 2px;">2</td></tr> <tr><td style="border-right: 1px dashed black; padding: 2px;">2-3</td><td style="padding: 2px;">1</td></tr> <tr><td style="border-right: 1px dashed black; padding: 2px;">-2</td><td style="padding: 2px;">0</td></tr> <tr><td style="border-right: 1px dashed black; padding: 2px;">total</td><td style="padding: 2px;">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	acertos
>17	7																						
14-17	6																						
11-13	5																						
8-10	4																						
6-7	3																						
4-5	2																						
2-3	1																						
-2	0																						
total	acertos																						
0-15 seg	16-30 seg	31-45 seg	46-60 seg																				
<p>➤ <b>Animais</b> <span style="float: right;">[Escore 0-7]</span></p> <p>Diga: "Agora você poderia dizer o maior número de animais que conseguir, começando com qualquer letra?"</p>				<input style="width: 30px; height: 20px;" type="text"/>																			
				<table style="width: 100%; border-collapse: collapse; font-size: 10px;"> <tr><td style="border-right: 1px dashed black; padding: 2px;">&gt;21</td><td style="padding: 2px;">7</td></tr> <tr><td style="border-right: 1px dashed black; padding: 2px;">17-21</td><td style="padding: 2px;">6</td></tr> <tr><td style="border-right: 1px dashed black; padding: 2px;">14-16</td><td style="padding: 2px;">5</td></tr> <tr><td style="border-right: 1px dashed black; padding: 2px;">11-13</td><td style="padding: 2px;">4</td></tr> <tr><td style="border-right: 1px dashed black; padding: 2px;">9-10</td><td style="padding: 2px;">3</td></tr> <tr><td style="border-right: 1px dashed black; padding: 2px;">7-8</td><td style="padding: 2px;">2</td></tr> <tr><td style="border-right: 1px dashed black; padding: 2px;">5-6</td><td style="padding: 2px;">1</td></tr> <tr><td style="border-right: 1px dashed black; padding: 2px;">&lt;5</td><td style="padding: 2px;">0</td></tr> <tr><td style="border-right: 1px dashed black; padding: 2px;">total</td><td style="padding: 2px;">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	acertos	
>21	7																						
17-21	6																						
14-16	5																						
11-13	4																						
9-10	3																						
7-8	2																						
5-6	1																						
<5	0																						
total	acertos																						
0-15 seg	16-30 seg	31-45 seg	46-60 seg																				
<b>LINGUAGEM - Compreensão</b>																							
<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>				<span style="font-size: 10px;">[Escore 0-1]</span> <input style="width: 20px; height: 15px;" type="text"/> <input style="width: 20px; height: 15px;" 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>				<span style="font-size: 10px;">[Escore 0-3]</span> <input style="width: 20px; height: 15px;" type="text"/> <input style="width: 20px; height: 15px;" type="text"/>																			
<b>LINGUAGEM - Escrita</b>																							
<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>				<span style="font-size: 10px;">[Escore 0-1]</span> <input style="width: 20px; height: 15px;" type="text"/> <input style="width: 20px; height: 15px;" type="text"/>																			

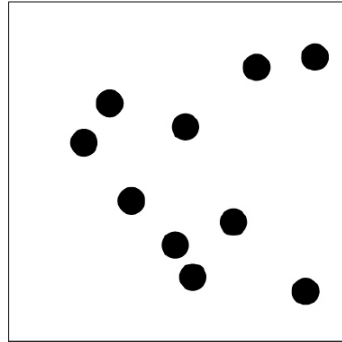
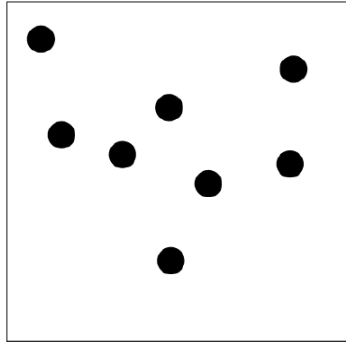
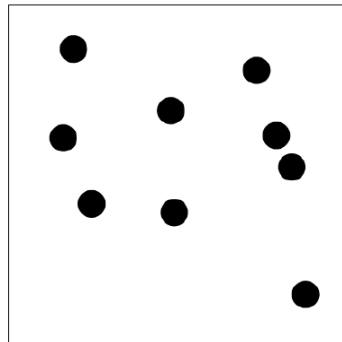
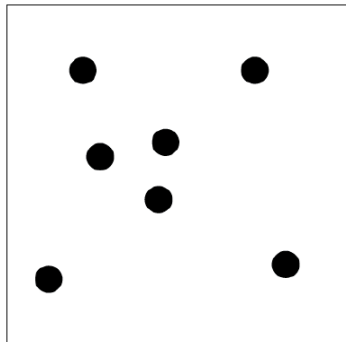
L I N G U A G E M - Repetição				
<p>➤ Peça ao indivíduo para repetir:                      “hipopótamo”; “excentricidade”; “ininteligível”; “estatístico”.                      Diga uma palavra por vez e peça ao indivíduo para repetir imediatamente depois de você.                      Pontue 2, se todas 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"/>			
L I N G U A G E M - 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 E G A U G N I L	
 <input type="text"/>	 <input type="text"/>	 <input type="text"/>		[Escore 0-10] <input type="text"/>
 <input type="text"/>	 <input type="text"/>	 <input type="text"/>		
 <input type="text"/>	 <input type="text"/>	 <input type="text"/>		
L I N G U A G E M - Compreensão				
<p>➤ Utilizando as figuras acima, peça ao indivíduo para:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Apontar para aquela que está associada com a monarquia _____</li> <li>• Apontar para aquela que é encontrada no Pantanal _____</li> <li>• Apontar para aquela que é encontrada na Antártica _____</li> <li>• Apontar para aquela que tem uma relação náutica _____</li> </ul>	[Escore 0-4] <input type="text"/>			

L I N G U A G E M - Leitura		L I N G U A G E M
<p>&gt; Peça ao indivíduo para ler as seguintes palavras: [Pontuar com 1, se todas estiverem corretas]</p> <p style="text-align: center;"><b>táxi</b> <b>testa</b> <b>saxofone</b> <b>fixar</b> <b>ballet</b></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>&gt; <b>Pentágonos sobrepostos:</b> Peça ao indivíduo para copiar o desenho e para fazer o melhor possível.</p>	[Escore 0-1] <input type="text"/>	
		
<p>&gt; <b>Cubo:</b> Peça ao indivíduo para copiar este desenho (para pontuar, veja guia de instruções)</p>	[Escore 0-2] <input type="text"/>	
		
<p>&gt; <b>Relógio:</b> 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**

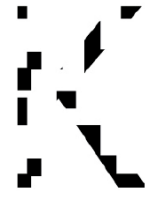


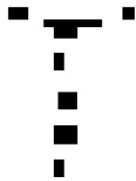
➤ Peça ao indivíduo para contar os pontos sem apontá-los.

[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] <input type="text"/>	
<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
			
<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
			
V I S U A L - E S P A C I A L			
RECORDAÇÃO & RECONHECIMENTO			
> Peça "Agora você vai me dizer o que você se lembra daquele nome e endereço que nós repetimos no começo".			
Renato Moreira Rua Bela Vista 73 Santarém Pará	..... ..... ..... .....	[Escore 0-7] <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] <input type="text"/>	
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 Gerais			
	MEEM	/30	
	ACE-R	/100	
Subtotais			
	Atenção e Orientação	/18	
	Memória	/26	
	Fluência	/14	
	Linguagem	/26	
	Visual-espacial	/16	
M E M Ó R I A			
E S C O R E S			

## ANEXO 3 – Clinical Dementia Rating (CDR)

### CDR

Data: \_\_\_\_\_

Pontuação:

	<b>Nenhuma (0)</b>	<b>Questionável (0,5)</b>	<b>Leve (1)</b>	<b>Moderada (2)</b>	<b>Grave (3)</b>
<b>Azento: Comunitários</b>	Funcionalmente independente ao nível usual de trabalho, compras, atividades voluntárias e grupos sociais	Leve incapacidade nessas atividades.	Incapaz de realizar independentemente essas atividades, ainda que possa se engajar em algumas. Parece normal quando casualmente examinado	Sem pretensão de manter atividades independentes fora do domicílio. Parece suficientemente bem para ser levado a atividades fora do domicílio.	Parece muito doente para ser levado para fora do domicílio.
<b>Atividades Domésticas e Passatempos</b>	Vida doméstica, passatempos e interesse intelectual bem mantidos.	Vida doméstica, passatempos e interesse intelectual levemente comprometidos	Incapacidade leve, porém definitiva, para atividades do lar. Abandono de atividades mais difíceis e passatempos complicados. Outros interesses abandonados.	Somente ações simples estão preservadas. Interesse restrito.	Ausência de atividades significativas no domicílio.
<b>Cuidado Pessoal</b>	Plenamente capaz de manter cuidados consigo mesmo		Necessidade de incentivo	Requer assistência no vestuário, higiene e manejo de itens pessoais.	Requer muita ajuda no cuidado pessoal. Incontinência freqüente.
<b>Julgamento e Resolução de Problemas</b>	Resolve problemas do dia-a-dia, incluindo atividades comerciais e financeiras. Capacidade de julgamento adequado quando comparada ao desempenho anterior	Incapacidade leve para resolver problemas, identificar similaridades e diferenças.	Dificuldade moderada no manejo de problemas, identificação de similaridades e diferenças. Julgamento social usualmente preservado.	Enorme incapacidade para manejar problemas, similaridade e diferenças. Julgamento social comprometido.	Incapacidade de fazer julgamentos ou resolver problemas.
<b>Memória</b>	Sem perda de memória; esquecimento inconstante.	Esquecimento leve consistente; relembra eventos parcialmente. "esquecimento benigno".	Perda moderada da memória, mais intensa para fatos recentes. Interferência nas atividades da vida diária.	Perda grave da memória, com retenção apenas de dados fortemente consolidados; novos dados rapidamente perdidos.	Grave perda da memória; apenas fragmentos permanecem.
<b>Orientação</b>	Orientação plena	Dificuldade branda com datas. Orientação boa.	Dificuldade moderada com datas; orientação quanto ao "espaço" onde se realiza exame; pode apresentar desorientação geográfica.	Dificuldade grave com datas; desorientação usual quanto ao tempo, e permanente quanto ao espaço.	Orientação apenas em relação à pessoa.

## ANEXO 4 – Mini Exame do Estado Mental (MEEM)

### MINI EXAME DO ESTADO MENTAL

**Orientação Temporal Espacial** – questão 2.a até 2.j pontuando 1 para cada resposta correta, máximo de 10 pontos.

**Registros** – questão 3.1 até 3.d pontuação máxima de 3 pontos.

**Atenção e cálculo** – questão 4.1 até 4.f pontuação máxima 5 pontos.

**Lembrança ou memória de evocação** – 5.a até 5.d pontuação máxima 3 pontos.

**Linguagem** – questão 5 até questão 10, pontuação máxima 9 pontos.


#### Identificação do cliente

Nome: \_\_\_\_\_

Data de nascimento/idade: \_\_\_\_\_ Sexo: \_\_\_\_\_

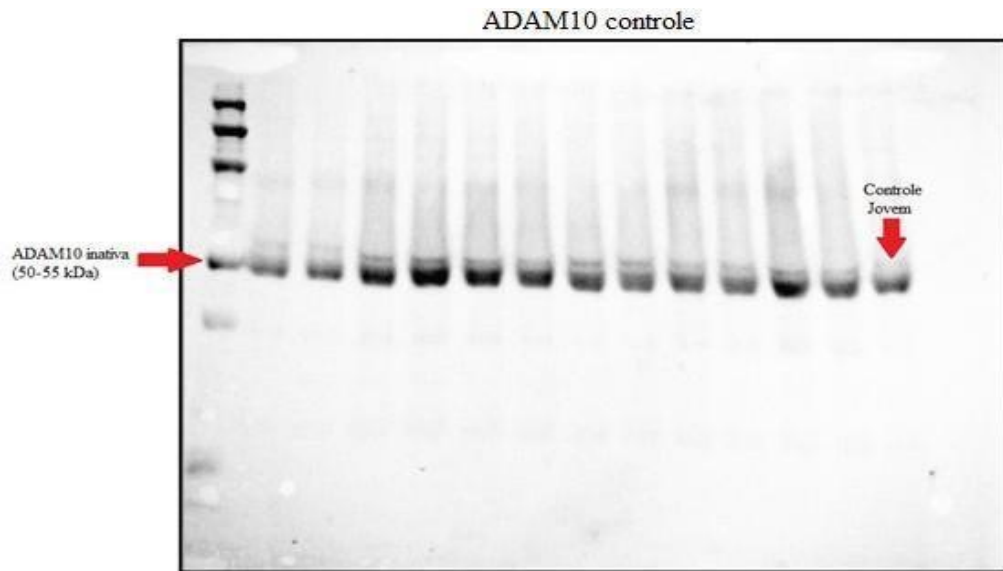
Escolaridade: Analfabeto ( ) 0 à 3 anos ( ) 4 à 8 anos ( ) mais de 8 anos ( )

Avaliação em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ Avaliador: \_\_\_\_\_.

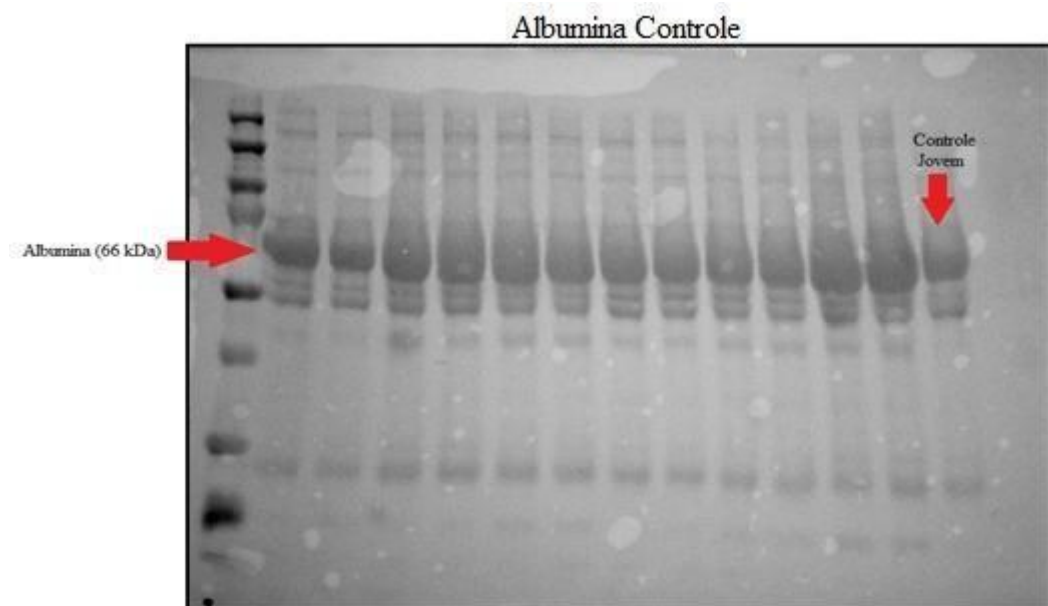
Pontuações máximas	Pontuações máximas
<b>Orientação Temporal Espacial</b> 1. Qual é o (a) Dia da semana?__ 1 Dia do mês? _____ 1 Mês? _____ 1 Ano? _____ 1 Hora aproximada? ___ 1 2. Onde estamos? Local? _____ 1 Instituição (casa, rua)? ___ 1 Bairro? _____ 1 Cidade? _____ 1 Estado? _____ 1	<b>Linguagem</b> 5. Aponte para um lápis e um relógio. Faça o paciente dizer o nome desses objetos conforme você os aponta _____ 2 6. Faça o paciente. Repetir “nem aqui, nem ali, nem lá”. _____ 1 7. Faça o paciente seguir o comando de 3 estágios. “Pegue o papel com a mão direita. Dobre o papel ao meio. Coloque o papel na mesa”. _____ 3 8. Faça o paciente ler e obedecer ao seguinte: <b>FECHE OS OLHOS.</b> _____ 1 09. Faça o paciente escrever uma frase de sua própria autoria. (A frase deve conter um sujeito e um objeto e fazer sentido). <b>(Ignore erros de ortografia ao marcar o ponto)</b> _____ 1
<b>Registros</b> 1. Mencione 3 palavras levando 1 segundo para cada uma. Peça ao paciente para repetir as 3 palavras que você mencionou. Estabeleça um ponto para cada resposta correta. -Vaso, carro, tijolo _____ 3	10. Copie o desenho abaixo. Estabeleça um ponto se todos os lados e ângulos forem preservados e se os lados da interseção formarem um quadrilátero. _____ 1
<b>3. Atenção e cálculo</b> Sete seriado (100-7=93-7=86-7=79-7=72-7=65). Estabeleça um ponto para cada resposta correta. Interrompa a cada cinco respostas. Ou so letrar a palavra MUNDO de trás para frente. _____ 5	
<b>4. Lembranças (memória de evocação)</b> Pergunte o nome das 3 palavras aprendidas na questão 2. Estabeleça um ponto para cada resposta correta. _____ 3	

**ANEXO 5-** Imagens das membranas referentes aos experimentos de *western blotting* realizados durante o período do estudo.

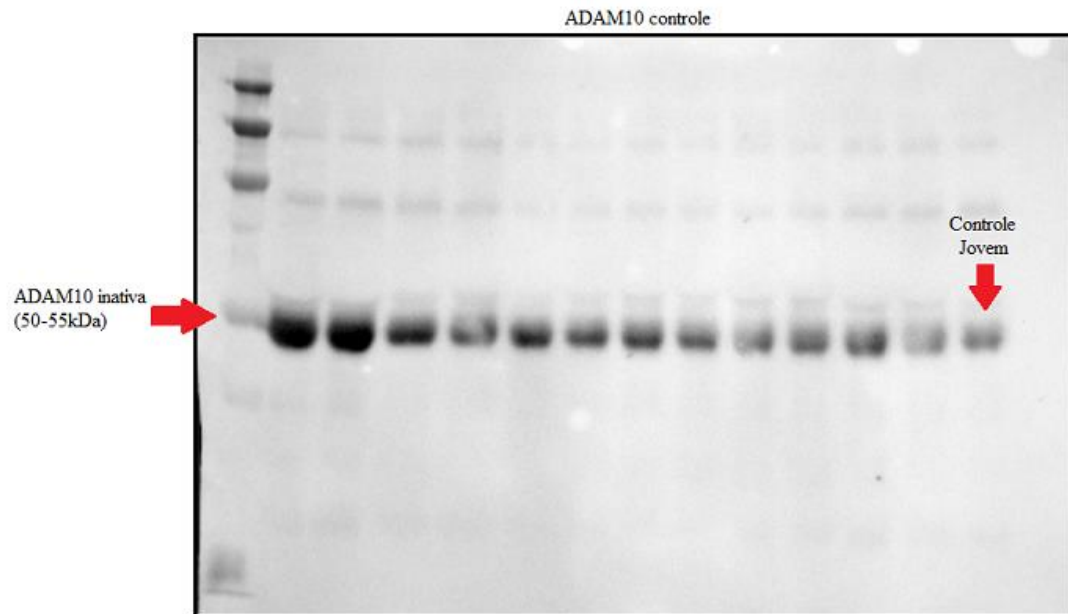
**Figura S1 a.** Imagem da membrana referente à expressão da ADAM10 na condição controle.



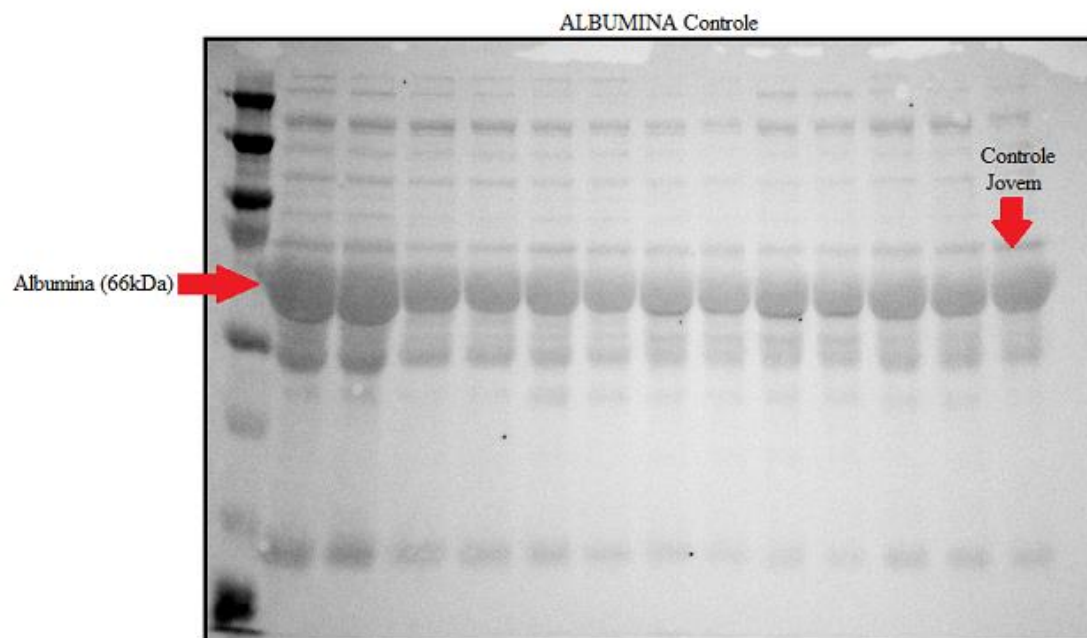
**Figura S1 b.** Imagem da membrana referente ao controle endógeno (Albumina) da figura S1 a.



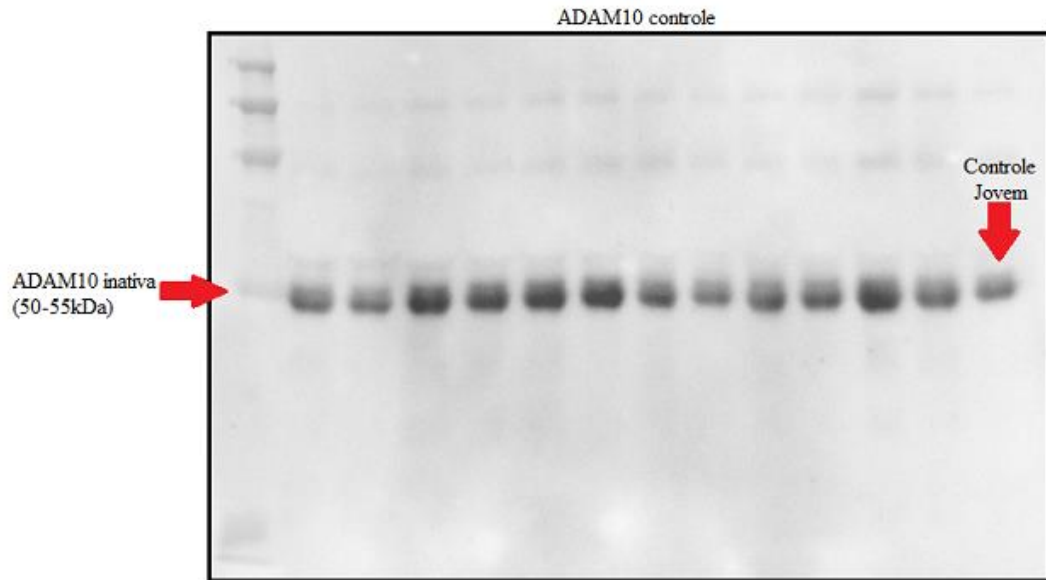
**Figura S2 a.** Imagem da membrana referente à expressão da ADAM10 na condição controle.



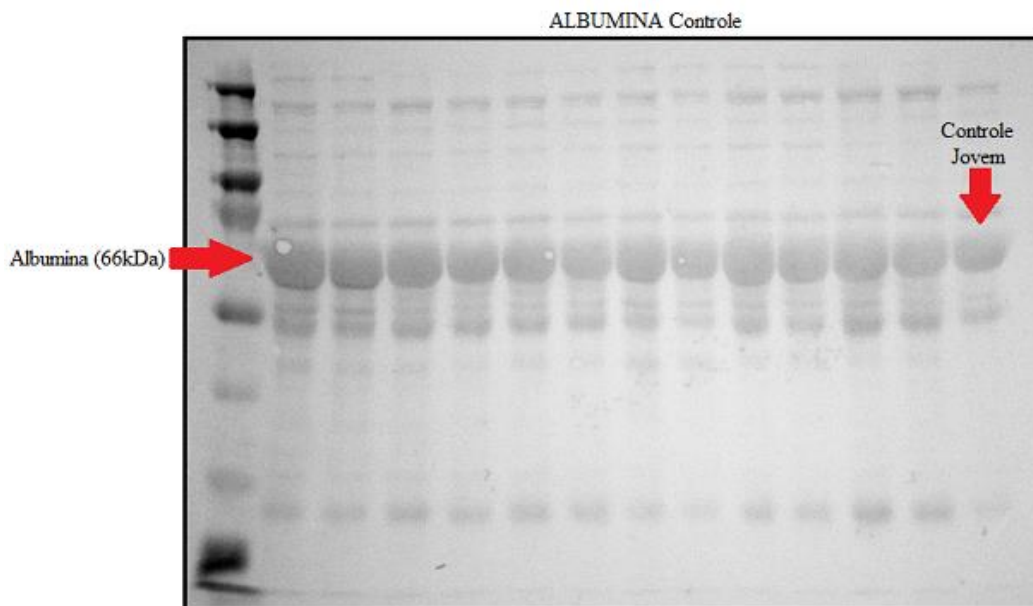
**Figura S2 b.** Imagem da membrana referente ao controle endógeno (Albumina) da figura S2 a



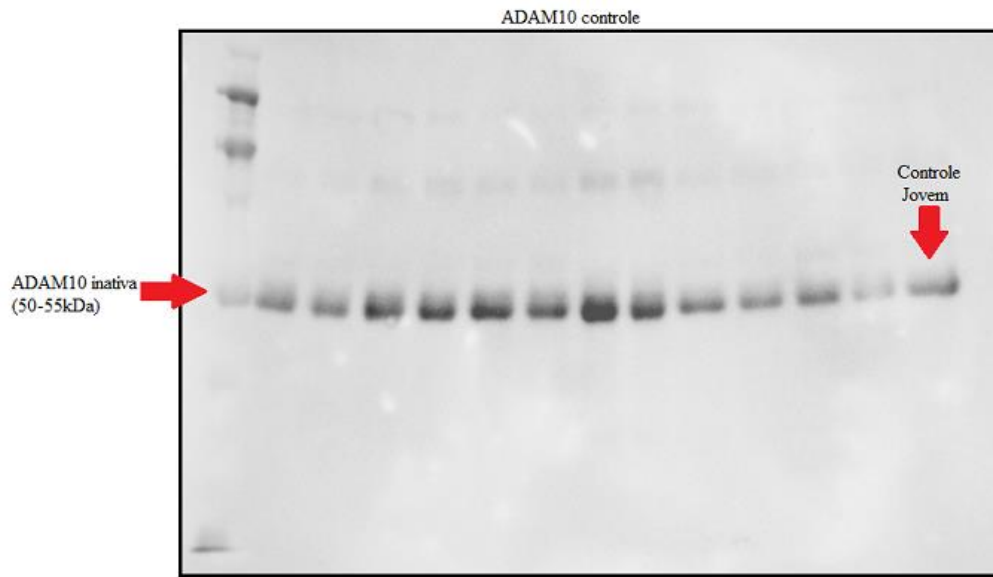
**Figura S3 a.** Imagem da membrana referente à expressão da ADAM10 na condição controle.



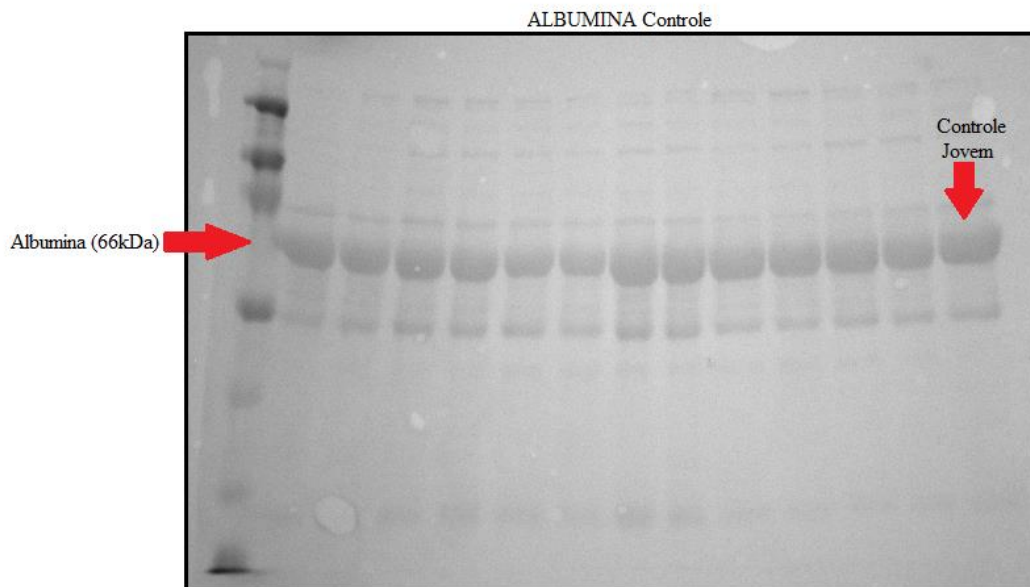
**Figura S3 b.** Imagem da membrana referente ao controle endógeno (Albumina) da figura S3 a



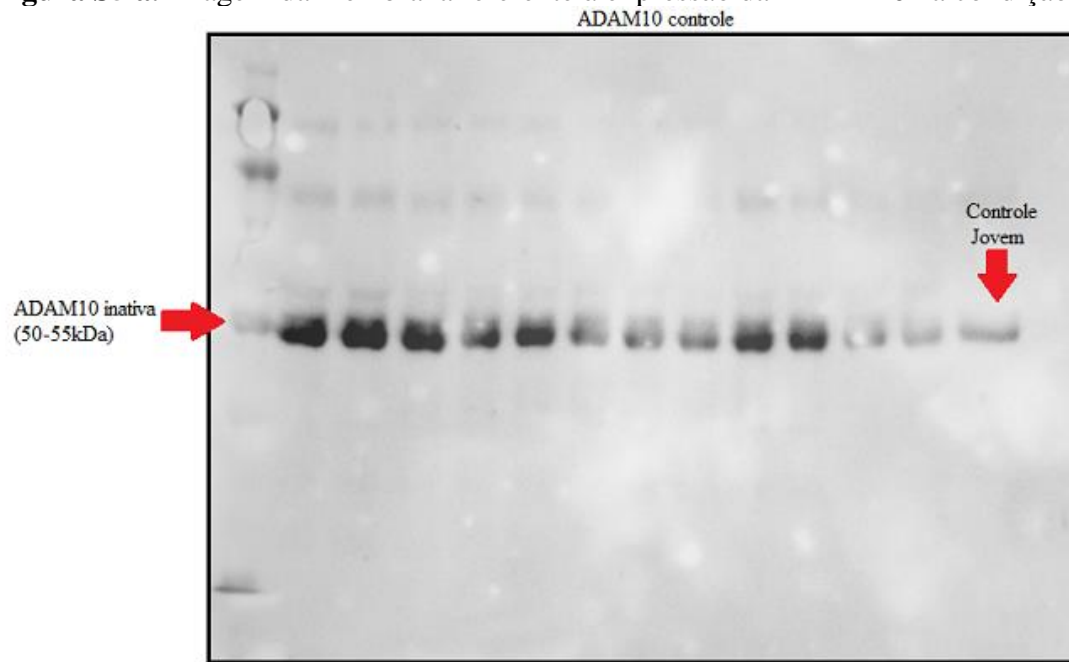
**Figura S4 a.** Imagem da membrana referente à expressão da ADAM10 na condição controle.



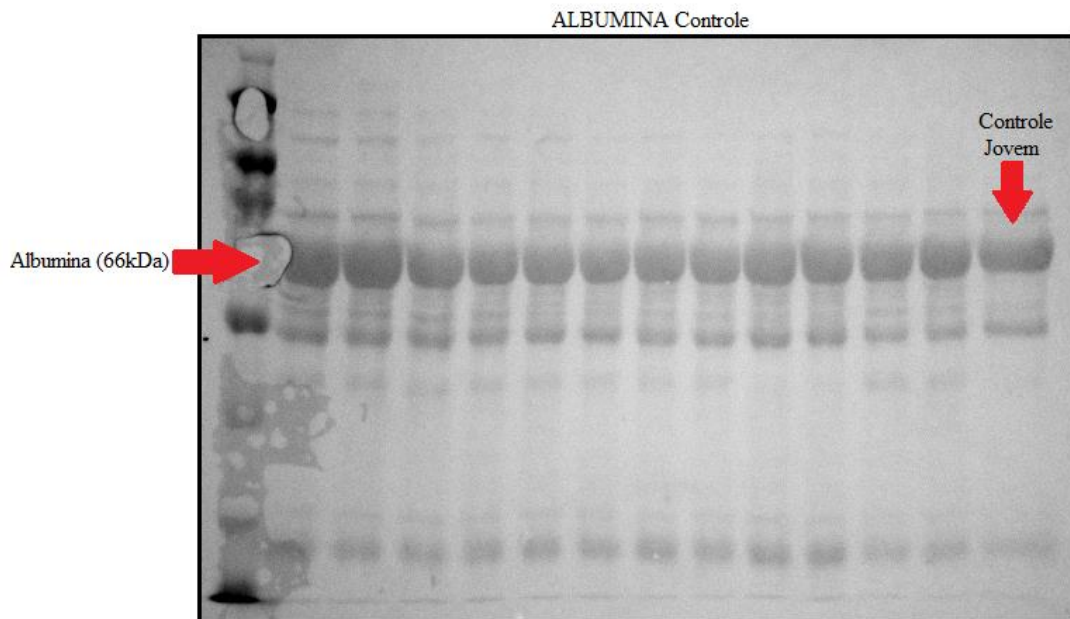
**Figura S4 b.** Imagem da membrana referente ao controle endógeno (Albumina) da figura S4 a.



**Figura S5 a.** Imagem da membrana referente à expressão da ADAM10 na condição controle.

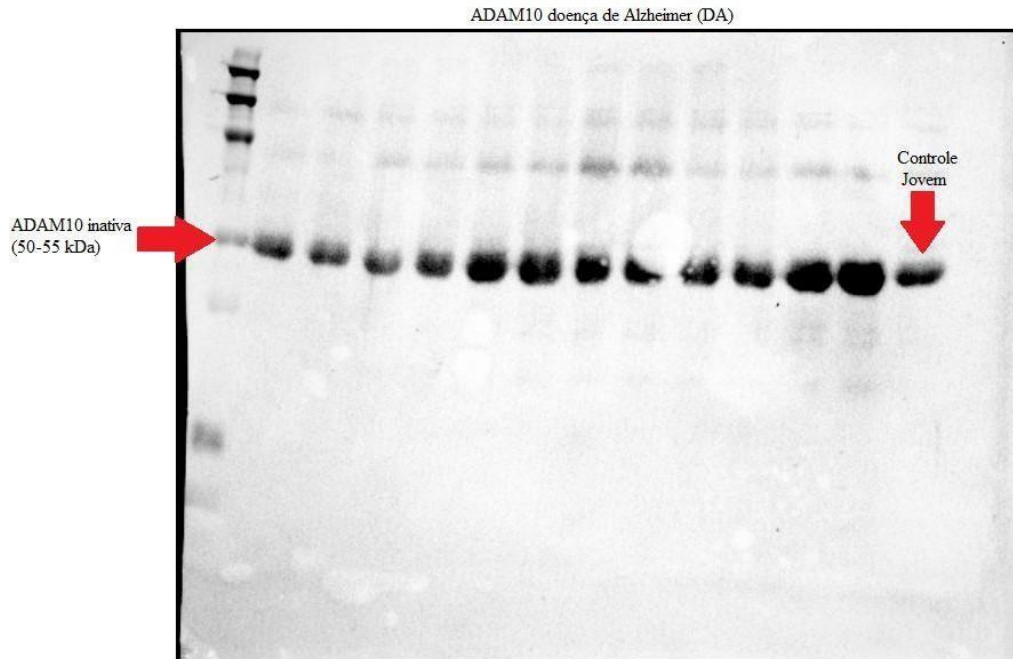


**Figura S5 b.** Imagem da membrana referente ao controle endógeno (Albumina) da figura S5 a.

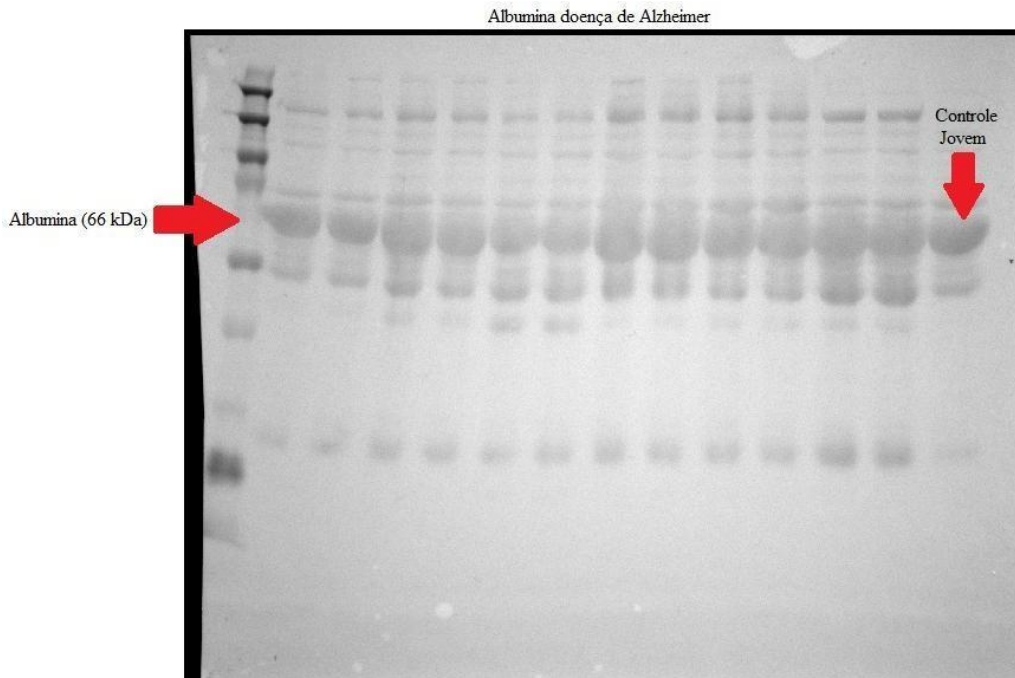




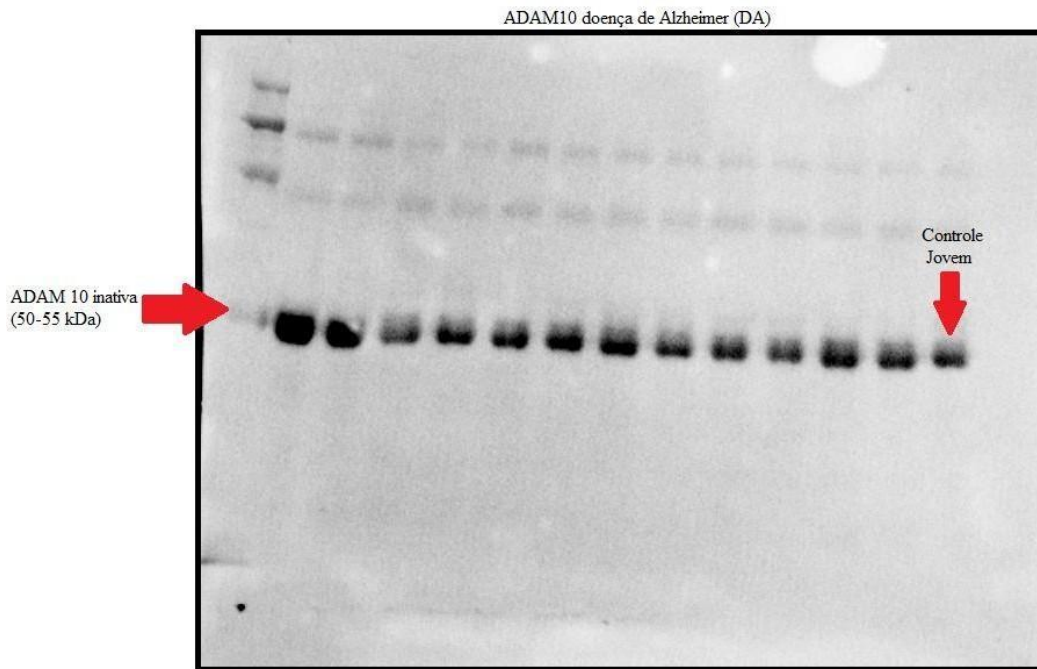
**Figura S6 a.** Imagem da membrana referente à expressão da ADAM10 na condição de doença de Alzheimer (DA).



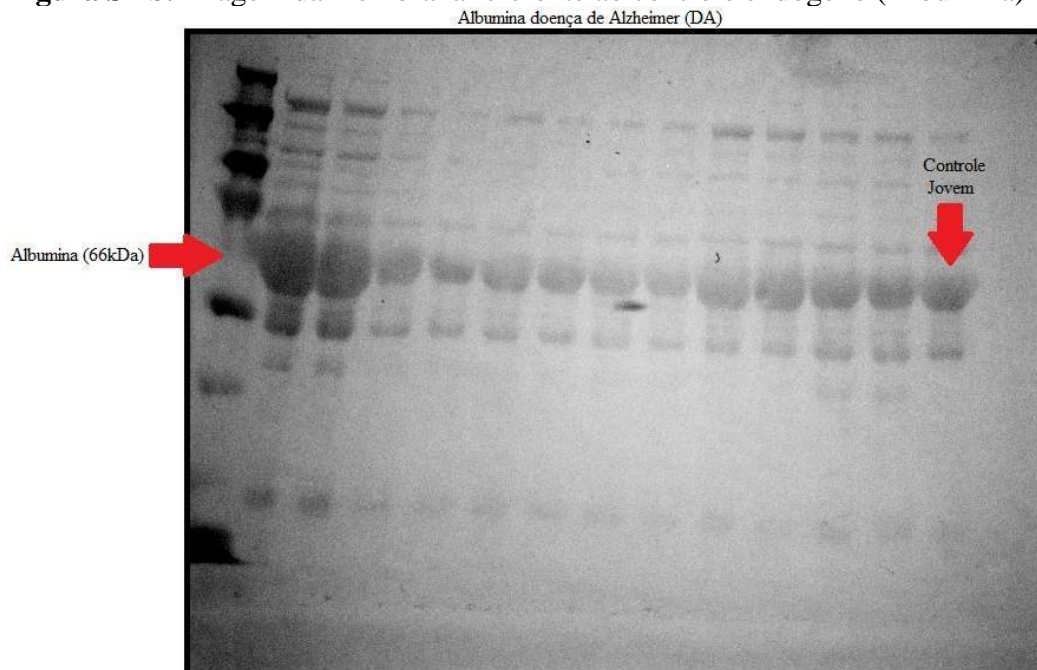
**Figura S6 b.** Imagem da membrana referente ao controle endógeno (Albumina) da figura S6 a.



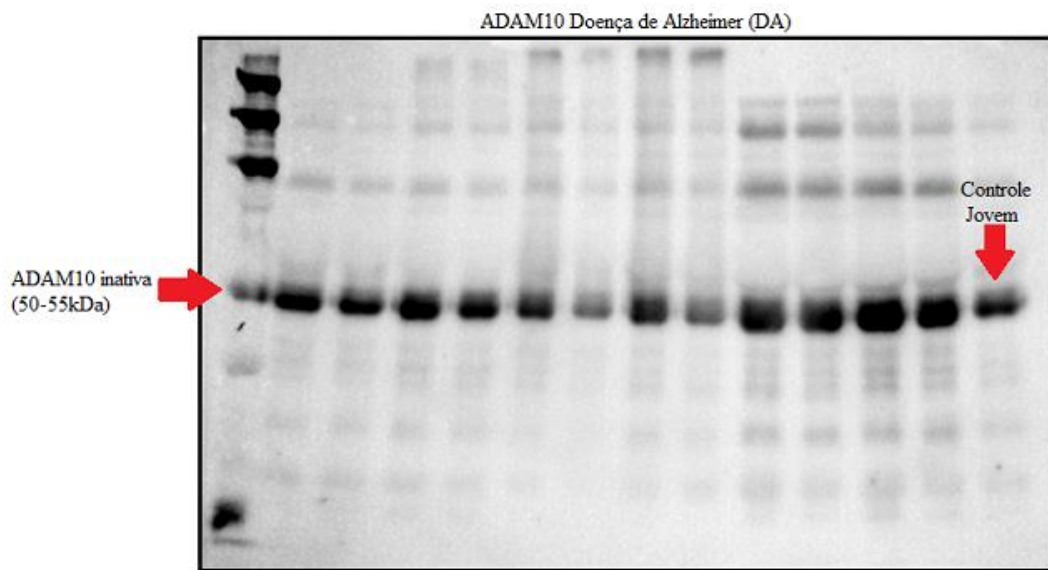
**Figura S7 a.** Imagem da membrana referente à expressão da ADAM10 na condição de doença de Alzheimer (DA).



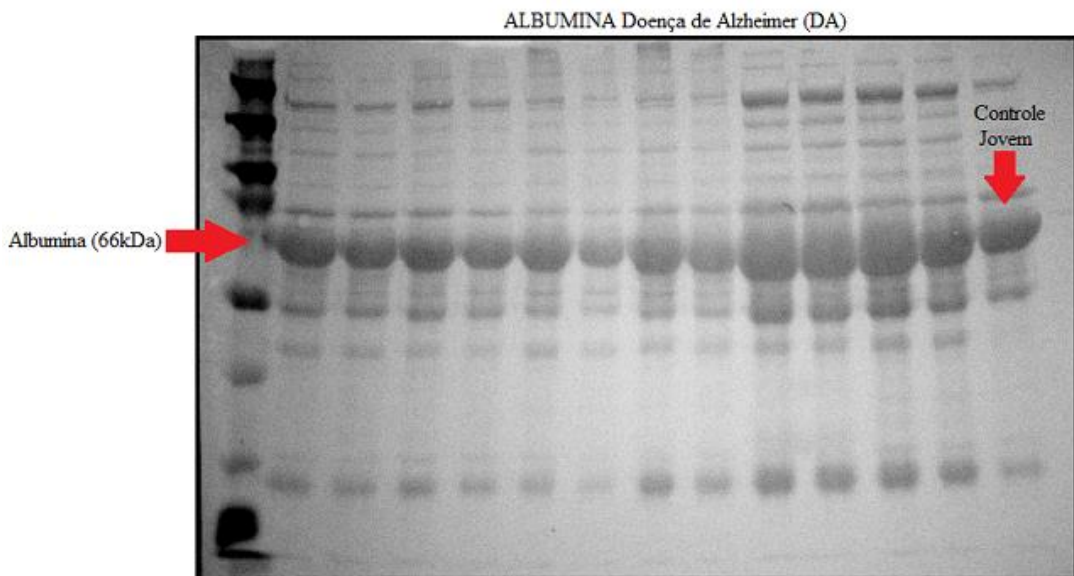
**Figura S7 b.** Imagem da membrana referente ao controle endógeno (Albumina) da figura S7 a.



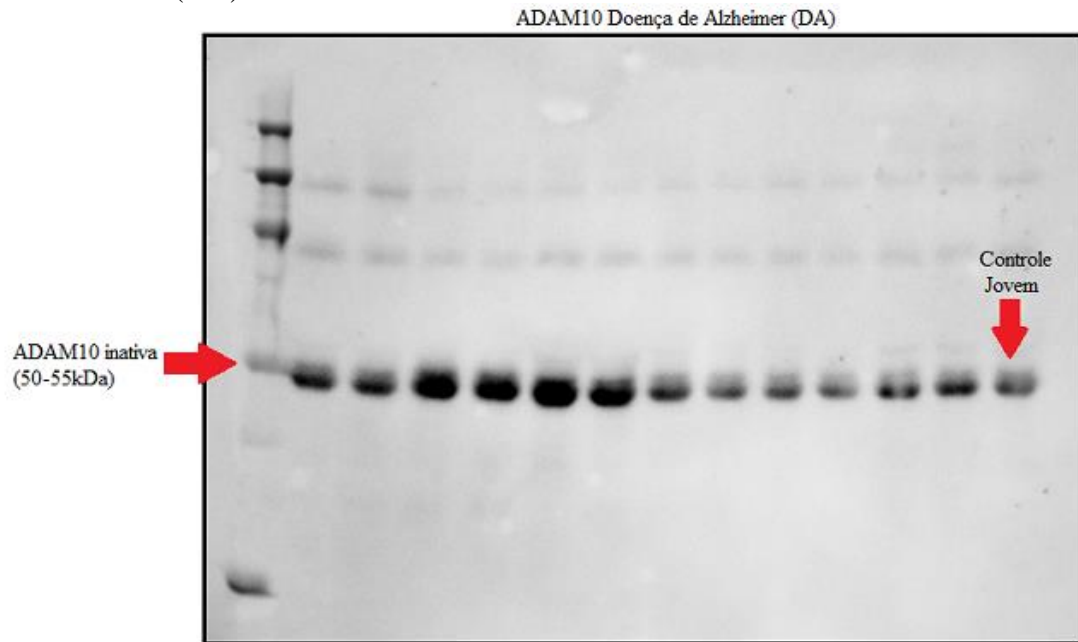
**Figura S8 a.** Imagem da membrana referente à expressão da ADAM10 na condição de doença de Alzheimer (DA).



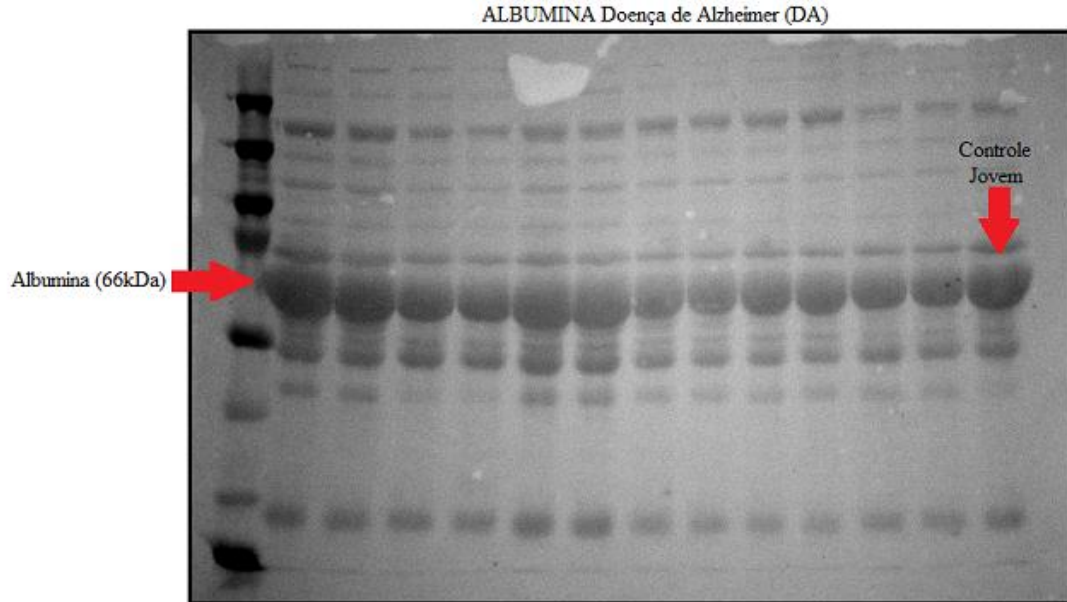
**Figura S8 b.** Imagem da membrana referente ao controle endógeno (Albumina) da figura S8 a.



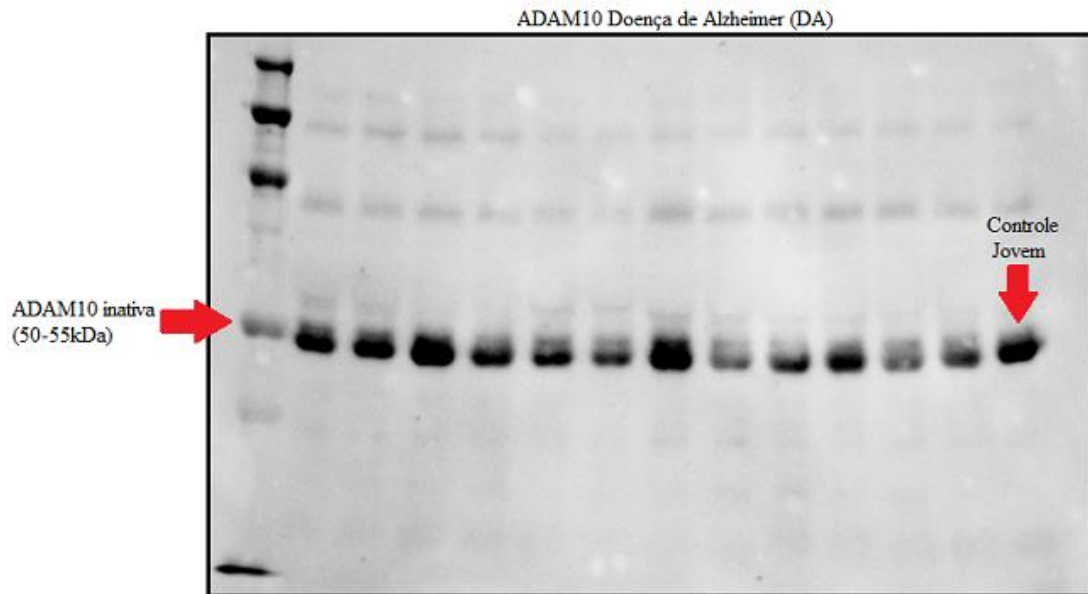
**Figura S9 a.** Imagem da membrana referente à expressão da ADAM10 na condição de doença de Alzheimer (DA).



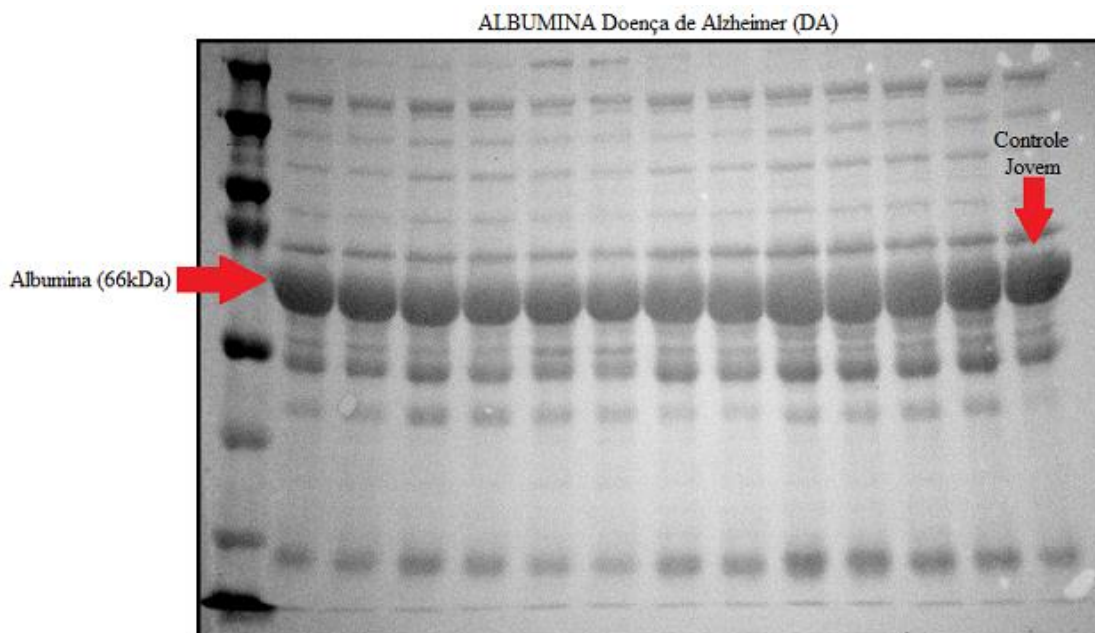
**Figura S9 b.** Imagem da membrana referente ao controle endógeno (Albumina) da figura S9 a.



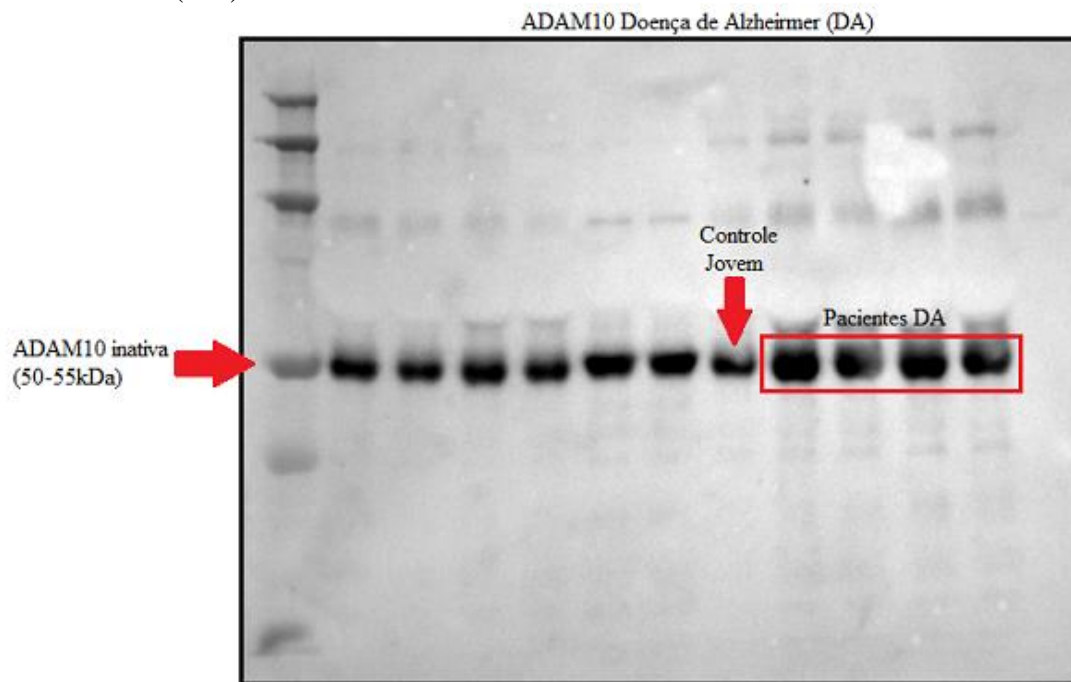
**Figura S10 a.** Imagem da membrana referente à expressão da ADAM10 na condição de doença de Alzheimer (DA).



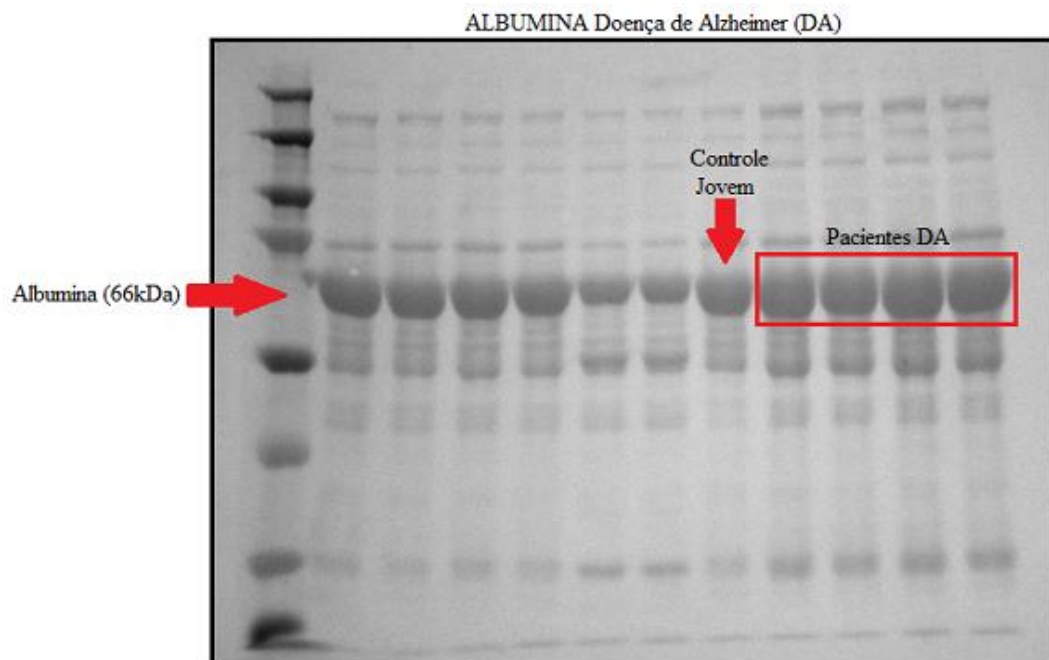
**Figura S10 b.** Imagem da membrana referente ao controle endógeno (Albumina) da figura S10 a.



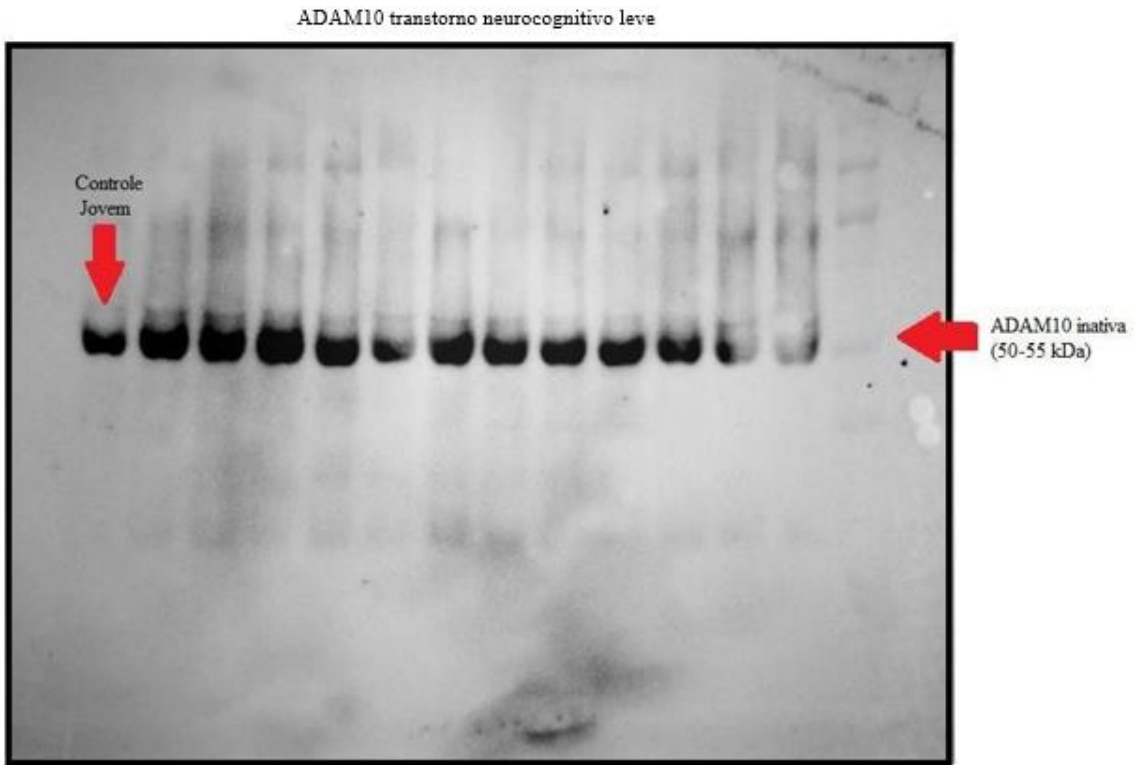
**Figura S11 a.** Imagem da membrana referente à expressão da ADAM10 na condição de doença de Alzheimer (DA).



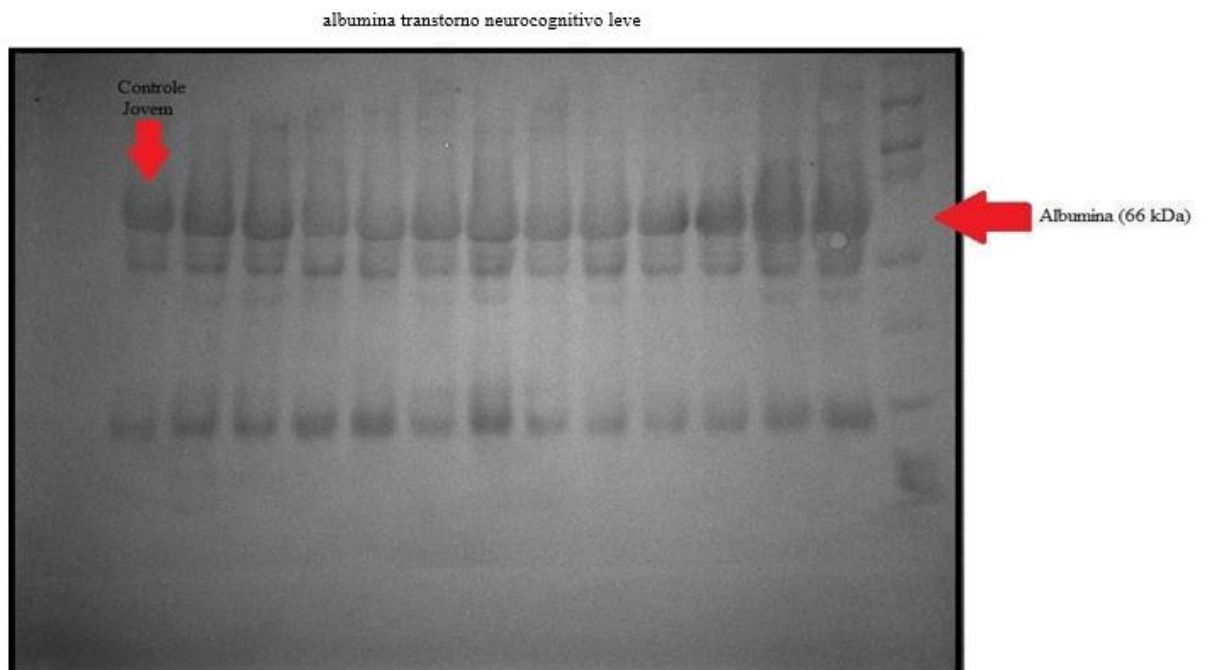
**Figura S11 b.** Imagem da membrana referente ao controle endógeno (Albumina) da figura S11 a.



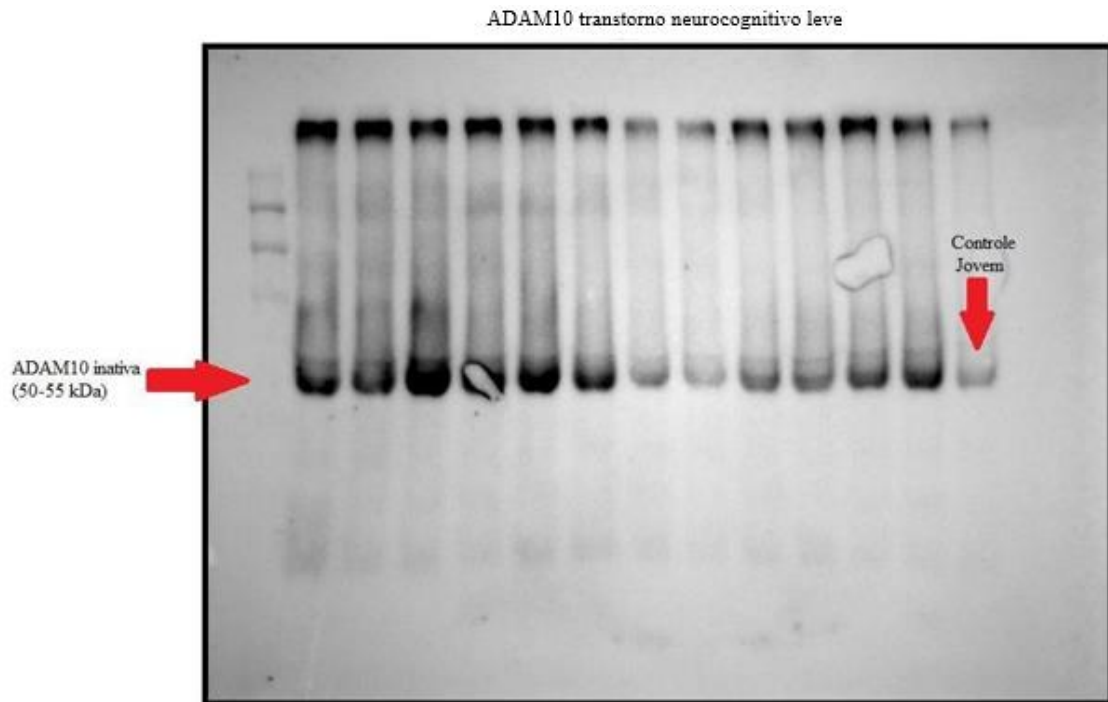
**Figura S12 a.** Imagem da membrana referente à expressão da ADAM10 na condição de Transtorno Neurocognitivo Leve (TNCL)



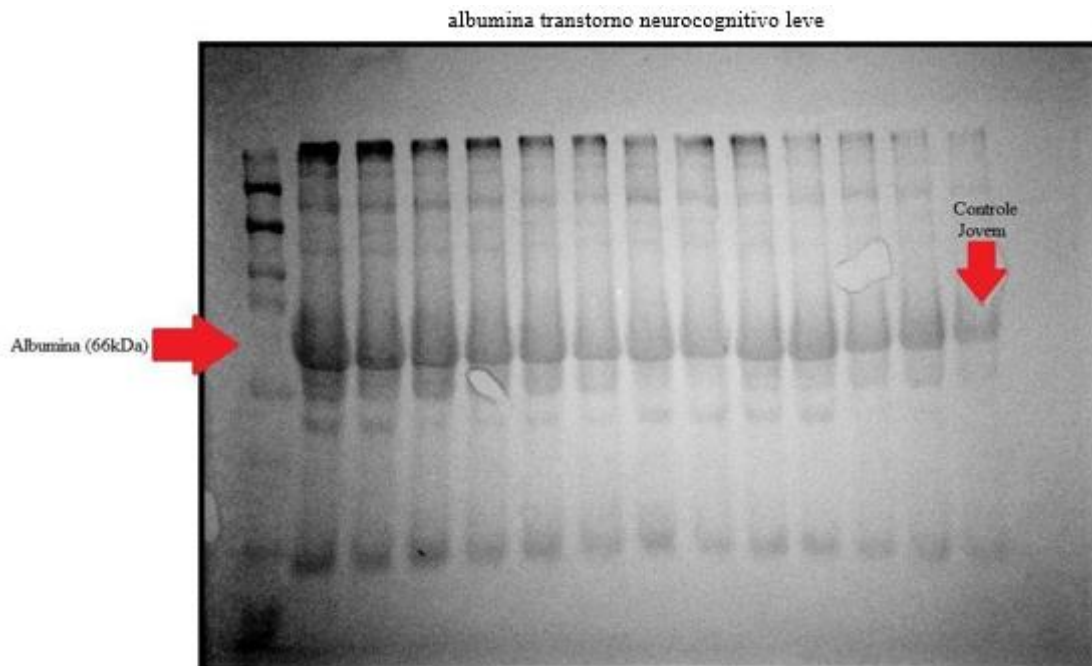
**Figura S12 b.** Imagem da membrana referente ao controle endógeno (Albumina) da figura S12 a.



**Figura S13 a.** Imagem da membrana referente à expressão da ADAM10 na condição de Transtorno Neurocognitivo Leve (TNCL)

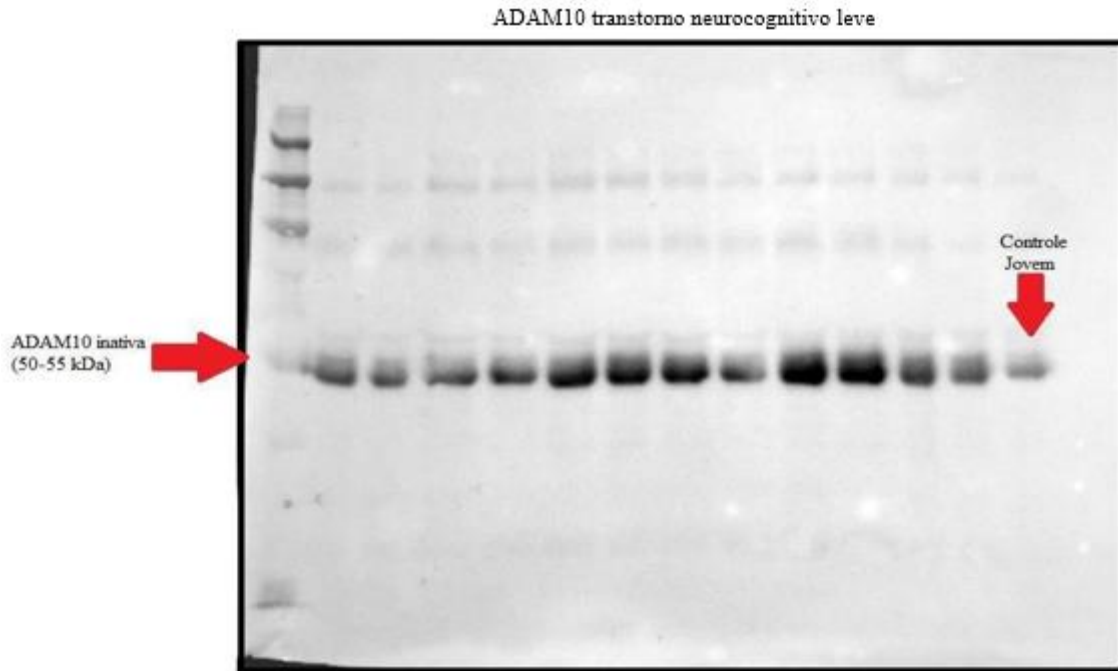


**Figura S13 b.** Imagem da membrana referente ao controle endógeno (Albumina) da figura S13 a.

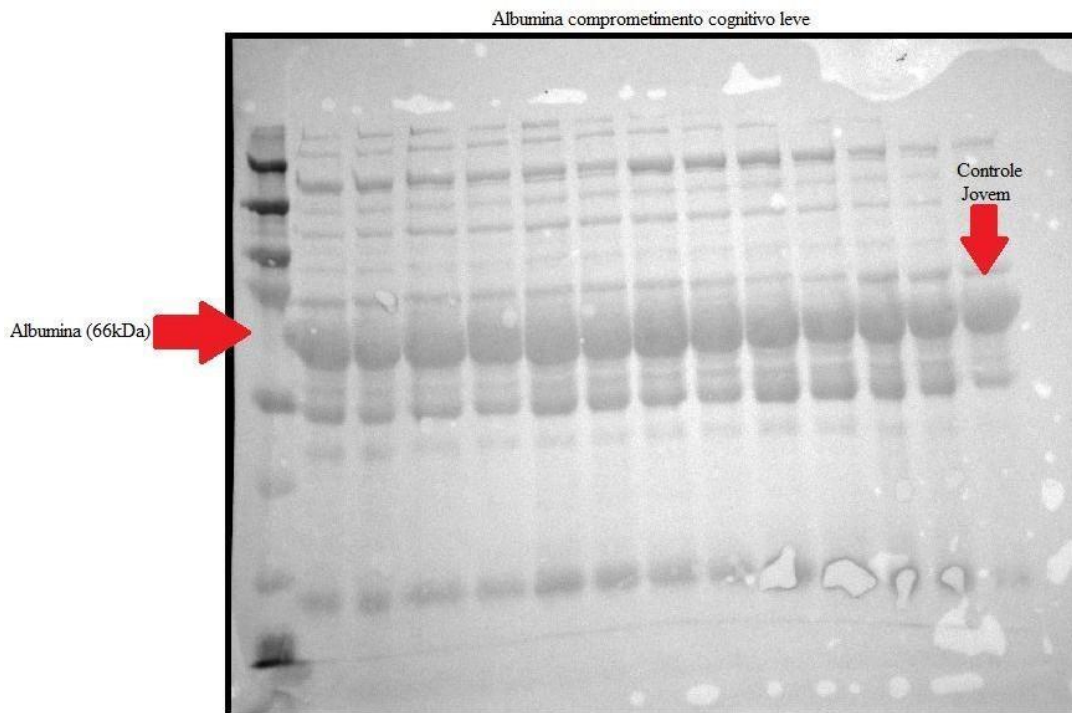




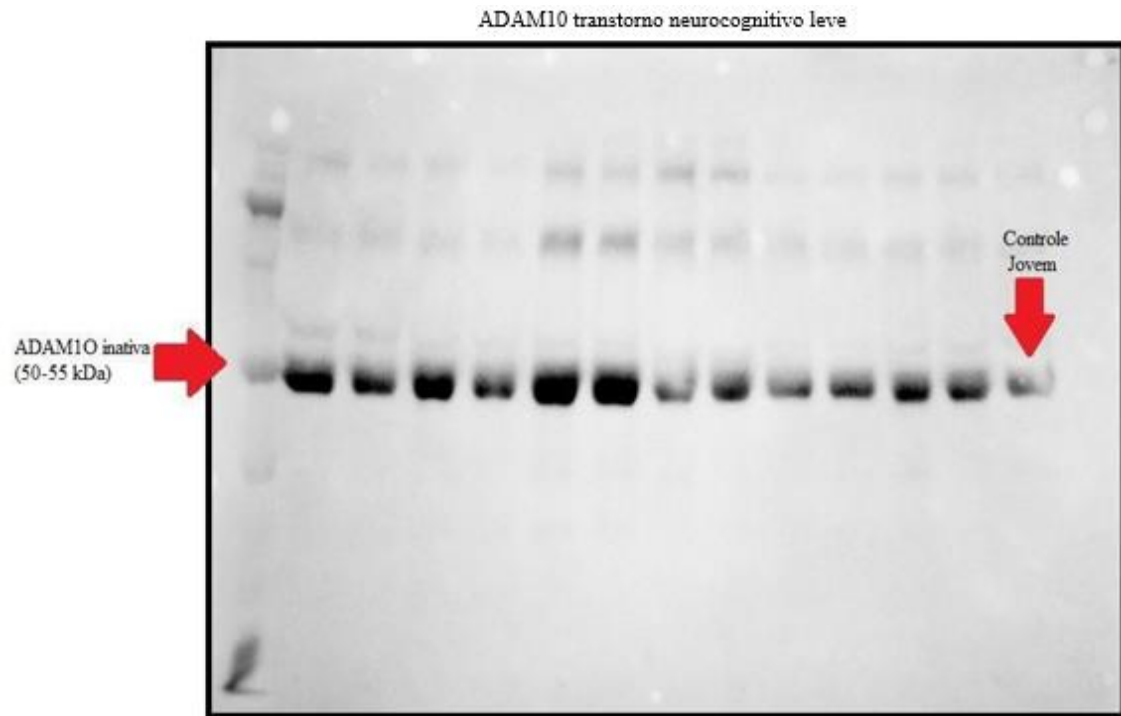
**Figura S14 a.** Imagem da membrana referente à expressão da ADAM10 na condição de Transtorno Neurocognitivo Leve (TNCL)



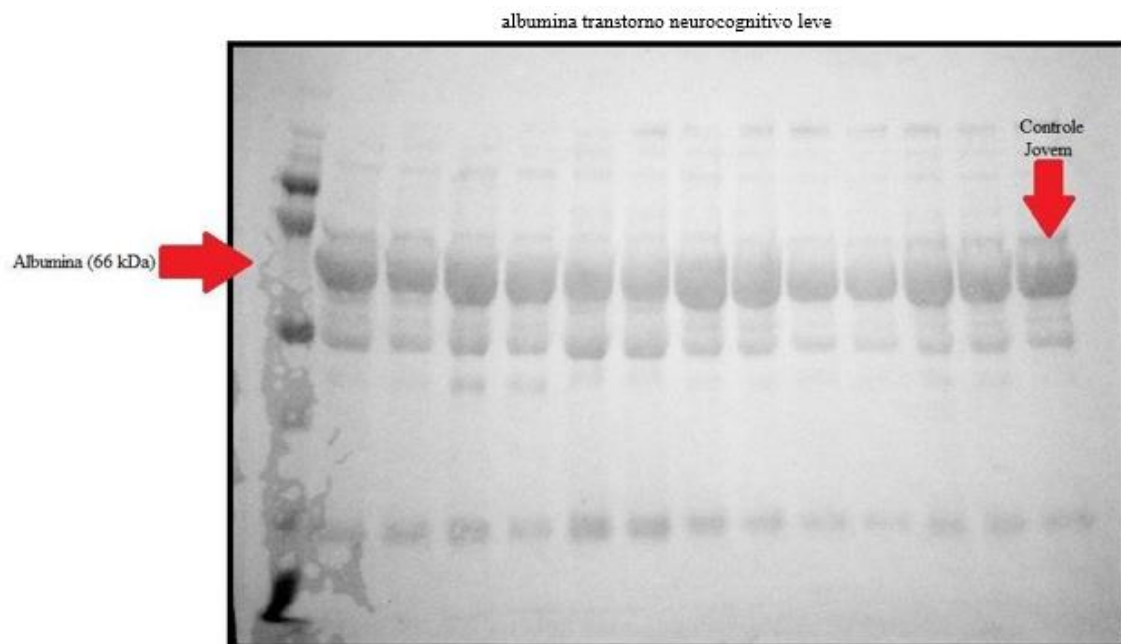
**Figura S14 b.** Imagem da membrana referente ao controle endógeno (Albumina) da figura S14 a.



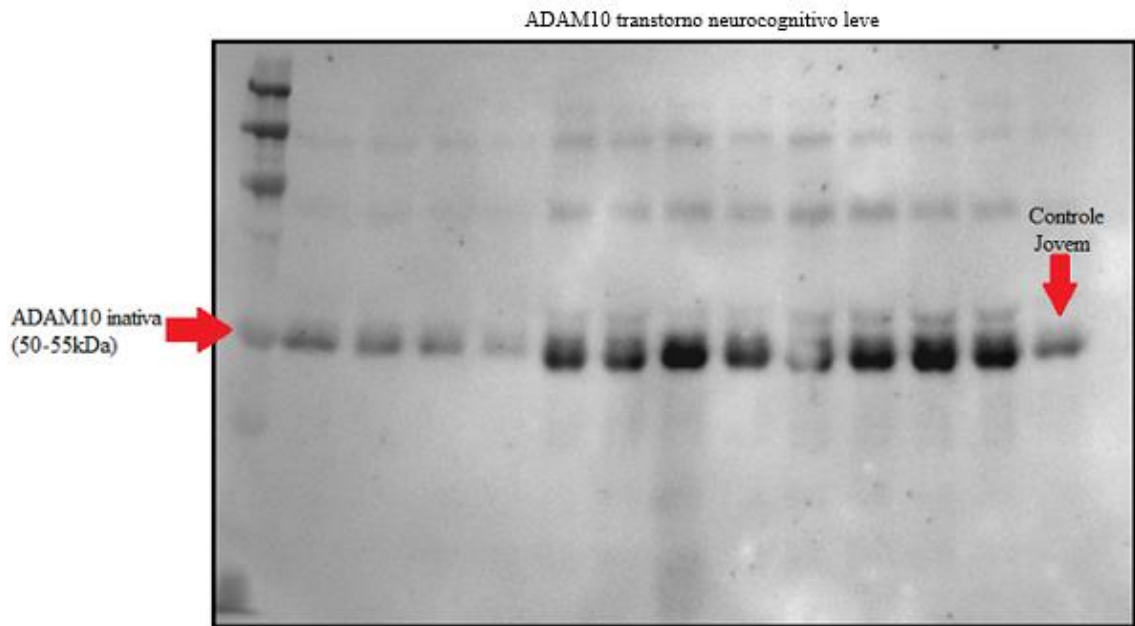
**Figura S15 a.** Imagem da membrana referente à expressão da ADAM10 na condição de Transtorno Neurocognitivo Leve (TNCL)



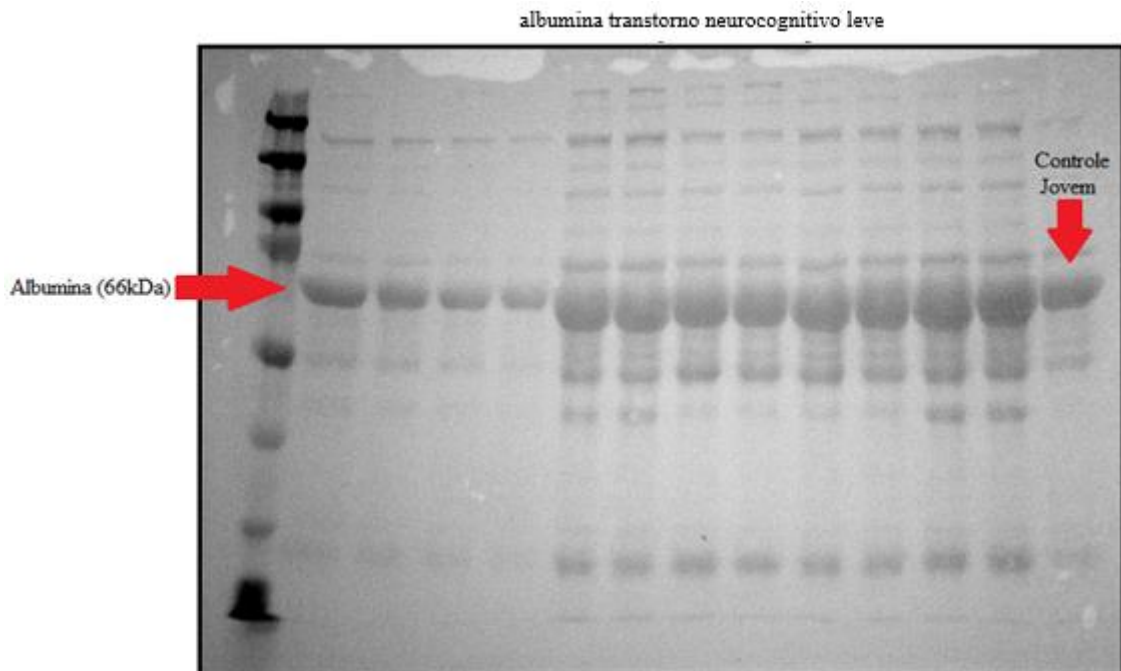
**Figura S15 b.** Imagem da membrana referente ao controle endógeno (Albumina) da figura S15 a.



**Figura S16 a.** Imagem da membrana referente à expressão da ADAM10 na condição de Transtorno Neurocognitivo Leve (TNCL)



**Figura S16 b.** Imagem da membrana referente ao controle endógeno (Albumina) da figura S16 a.



## ANEXO 6 – Avaliação do trabalho de conclusão de curso

### FORMULÁRIO DE AVALIAÇÃO DO TRABALHO DE CONCLUSÃO DO BACHELADO EM GERONTOLOGIA

**Nome do aluno:** *Marina Mantellatto Grigoli*

**Nome do orientador:** *Márcia Regina Comenitti*

**Nome do co-orientador:** *Izabela Pereira Vatanabe*

**Título do trabalho de conclusão do curso:** *Atividade e níveis da ADAM10 plasmática em indivíduos com Transtorno Neurocognitivo Leve e doença de Alzheimer*

DATA: 18/ 12/ 2020

Nome do avaliador	Aprovação (aprovado/reprovado)	Assinatura
Me. Lucas Pelegrini N. de Carvalho	Aprovado	<i>Lucas Pelegrini N. de Carvalho</i>
Profa. Dra. Márcia Regina Cominetti	Aprovado	<i>M. Cominetti</i>

Sugestão de alteração?     Não     Sim