

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS - UFSCar
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE - CCBS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GERONTOLOGIA - PPGGERO
DEPARTAMENTO DE GERONTOLOGIA - DGERO
LABORATÓRIO DE BIOLOGIA DO ENVELHECIMENTO - LABEN

DANIELLE DOS SANTOS MAIA SALHEB DE OLIVEIRA

**NÍVEIS DA SECRETASE ADAM10 EM IDOSOS COM DIABETES MELLITUS
TIPO 2 E DOENÇA DE ALZHEIMER**

SÃO CARLOS
2022

DANIELLE DOS SANTOS MAIA SALHEB DE OLIVEIRA

**NÍVEIS DA SECRETASE ADAM10 EM IDOSOS COM DIABETES MELLITUS
TIPO 2 E DOENÇA DE ALZHEIMER**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Gerontologia do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos, para obtenção do título de mestre em Gerontologia.

Orientadora: Prof.^a Dra. Márcia Regina Cominetti

SÃO CARLOS
2022



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

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

Folha de Aprovação

Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Danielle dos Santos Maia Salheb de Oliveira, realizada em 17/02/2022.

Comissão Julgadora:

Profa. Dra. Márcia Regina Cominetti (UFSCar)

Profa. Dra. Patricia Regina Manzine Moralles (UFSCar)

Prof. Dr. Spencer Luiz Marques Payão (Famema)

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

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

Dedico este trabalho a uma pessoa especial para quem tive o privilégio de trabalhar e partiu pelo agravamento da doença de Alzheimer.

AGRADECIMENTO

Agradeço primeiramente a Deus, pela dádiva de abrir os olhos todas as manhãs envolta de Seu amor e fidelidade que me sustentam nessa jornada.

A meus pais Alan e Conceição e minha irmã Camila, por todo alicerce, dedicação, incentivo e amparo sem medidas na minha construção pessoal e profissional em todos esses anos. À minha avó Olinda, minha amiga e inspiração de vida, por sensibilizar minha percepção sobre o envelhecimento e a importância da intergeracionalidade. À toda minha família, por todo apoio sempre. À minha amiga Ariela por me encorajar desde o início do processo de mestrado, partilhar cada momento dessa etapa, e acalantar o caminho que se mostrou tão árduo, mas também muito prazeroso.

Agradeço à minha orientadora Marcia, pela oportunidade e por dividir seu conhecimento em uma área tão desafiadora e complexa, foi uma honra trabalhar com uma pesquisadora excepcional como você. Também agradeço a todo grupo de pesquisa do LABEN, especialmente à Marina, pela ajuda, carinho e doação tão singela em todos os momentos e por compartilhar e propagar todo seu amor no que faz com tanta dedicação. Também agradeço a Paloma por todo apoio, incentivo e trocas nesse período.

Agradeço ainda as amizades construídas nesse caminho, aos professores do Programa de Pós-Graduação em Gerontologia e aos membros da banca pela disposição e contribuição nesse trabalho.

AGRADECIMENTO À AGÊNCIA DE FOMENTO

Agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pelo apoio e financiamento do presente trabalho (processo n° 2019/26709-2, FAPESP), viabilizando sua concretização e o avanço da ciência.

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

“A ciência não conhece os países, porque o conhecimento pertence à humanidade e é a tocha que ilumina o mundo. A ciência é a alma da prosperidade das nações e a fonte de todo progresso.”

(Louis Pasteur)

RESUMO

A doença de Alzheimer (DA) é uma doença neurodegenerativa gradual e progressiva, caracterizada microscopicamente pela formação de depósitos denominados placas senis e emaranhados neurofibrilares, que geram toxicidade e colapso neural, resultando em perdas neuronais extensas e atrofia cortical predominante no lobo temporal medial. Desde os resultados do estudo de Rotterdam em 1992, sabe-se que o *diabetes mellitus* tipo 2 (DM2) aumenta o risco de demência. Pacientes com DM2 apresentam alterações cerebrais estruturais e comprometimento cognitivo, com elevado risco de desenvolver DA. Estes dados sugerem que a insulina pode desempenhar um papel fundamental com relação a atividade cerebral e com a formação da memória. Nosso grupo vem estudando biomarcadores periféricos para a DA desde 2010. Nossos resultados indicam que a ADAM10 (*A Disintegrin And Metalloprotease*), a α -secretase que inibe a formação das placas senis e, portanto, é protetora contra a DA, está ativa e tem seus níveis diminuídos em plaquetas. De modo contrário, a ADAM10 está inativa e com níveis aumentados no plasma de idosos com esta demência, quando comparado a idosos cognitivamente saudáveis. Neste sentido, o objetivo deste estudo foi verificar os níveis da ADAM10 no plasma de idosos cognitivamente saudáveis e sem alteração dos níveis glicêmicos, de idosos com DA, de idosos com DM2 e de idosos com a presença concomitante de DA e DM2. Os resultados mostraram diferença significativa entre os níveis de ADAM10 plasmática entre todos os grupos quando comparado ao grupo de idosos com DA+DM2. Portanto, alterações na via insulínica podem causar mudanças dos níveis de ADAM10 e contribuir na piora do quadro da DA.

Palavras-chave: ADAM10, biomarcador, doença de Alzheimer, *diabetes mellitus*.

ABSTRACT

Alzheimer's disease (AD) is a gradual and progressive neurodegenerative disease characterized by predominant cortical atrophy in the medial temporal lobe and microscopically extensive neuronal losses and deposits called neurofibrillary tangles and senile plaques. From the results of the Rotterdam study in 1992, it is known that type 2 diabetes mellitus (T2DM) increases the risk of dementia. Patients with T2DM have structural brain changes and cognitive impairment, with a high risk of developing AD. These data suggest that insulin may play a key role in brain activity and memory formation. Our group has been studying peripheral AD biomarkers since 2010. Our results indicate that ADAM10 (A Disintegrin And Metalloprotease), the α -secretase that inhibits the formation of senile plaques and, therefore, is protective against AD, is active and decreased on platelets. Conversely, ADAM10 is inactive and increased in older adults with this dementia than cognitively healthy older adults. In this sense, this study aimed to verify the plasma ADAM10 levels among cognitively healthy older adults without glycemic alteration, older adults with AD, older adults with T2DM and older adults with the concomitant presence of AD and T2DM. The results showed a significant difference between plasma ADAM10 levels between all groups compared to older adults with AD+T2DM. Therefore, alterations in the insulin pathway can cause changes in ADAM10 levels and contribute to the worsening of AD.

Keywords: ADAM10, biomarker, Alzheimer's disease, diabetes mellitus.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Clivagem da proteína precursora amiloide (APP) pelas α e γ -secretases (via não-amiloidogênica) e pelas β e γ -secretases (via amiloidogênica) com formação do peptídeo beta-amiloide ($A\beta$). 18
- Figura 2.** Estrutura multimodular da ADAM10. A partir da região N-terminal observa-se o pro-domínio (verde), domínio metaloprotease (azul), domínio desintegrina (marinho), domínio rico em cisteína (laranja), hélice transmembrana (roxo) e região citoplasmática (cinza). 24
- Figura 3.** Representação das etapas de seleção dos participantes e execução da pesquisa. 29
- Figura 4.** Gráfico de dispersão representativo dos níveis de ADAM10 em indivíduos saudáveis (controle), com doença de Alzheimer (DA), com diabetes mellitus tipo 2 (DM2) e com presença concomitante de doença de Alzheimer e diabetes mellitus tipo 2 (DA+DM2).....40
- Figura 5.** Imagens referentes as membranas representativas resultantes dos experimentos de western blotting e respectivo gráfico de dispersão com a quantificação das bandas correspondentes à ADAM10 plasmática.....42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Critérios de exclusão estabelecidos para a pesquisa.....	31
Tabela 2. Dados de caracterização sócio demográficos e clínicos dos participantes. Doença de Alzheimer (DA); Diabetes mellitus tipo 2 (DM2); Doença de Alzheimer e diabetes mellitus tipo 2 (DA+DM2).....	37
Tabela 3. Análise descritiva dos valores obtidos a partir da quantificação de ADAM10 plasmática por ELISA, entre os grupos avaliados.	39
Tabela 4. Análise descritiva dos valores obtidos a partir da quantificação das bandas de ADAM10 plasmática por western blotting, entre os grupos avaliados.	41

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ADAM - A disintegrin and metalloprotease
ATP - Adenosina trifosfato
A β - Beta-amiloide
APP - Proteína precursora amiloide
BHE – Barreira hematoencefálica
CCL - Comprometimento cognitivo leve
CCLa - Comprometimento cognitivo leve amnésico
CDR - *Clinical dementia rating*
CEME - Centro de especialidades médicas
DA - Doença de Alzheimer
DM2 - *Diabetes mellitus* tipo 2
DM3 - *Diabetes mellitus* tipo 3
DSM-V - Manual diagnóstico e estatístico de transtornos mentais
ELISA – *Enzyme-linked immunosorbent assay*
GABA - Ácido gama-aminobutírico
HA - Hipertensão arterial
HbA1c - Hemoglobina glicada
IDE - *Insulin-degrading enzyme*
IRS – Substrato do receptor de insulina
LABEN - Laboratório de biologia do envelhecimento
LCR - Líquido cefalorraquidiano
MEEM - Mini-exame do estado mental
NMDA - N-metil D-Aspartato
PET - Tomografia por emissão de pósitrons
PPP - Plasma pobre em plaquetas
RM - Ressonância magnética
RNA - Ácido ribonucleico
SNC - Sistema nervoso central
TCLE - Termo de consentimento livre e esclarecido
TNCL - Transtorno neurocognitivo leve
TOGT- Teste oral de tolerância à glicose
USE - Unidade saúde escola
USF - Unidade saúde da família

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
1.1 Envelhecimento populacional	15
1.2 Demência e doença de Alzheimer	16
1.3 Metabolismo da insulina e diabetes mellitus tipo 2	19
1.4 Diabetes mellitus tipo 2 e doença de Alzheimer	21
1.5 Biomarcadores periféricos para diabetes mellitus tipo 2 e doença de Alzheimer	22
1.6 ADAM10	23
2. OBJETIVOS	27
3. MATERIAL E MÉTODOS	28
3.1 Aspectos éticos	28
3.2 Participantes	28
3.3 Critério de Inclusão e Exclusão	29
3.3.1 <i>Critérios de Inclusão dos Participantes para o Grupo Controle</i>	29
3.3.2 <i>Critérios de Inclusão dos Participantes para o Grupo Doença de Alzheimer</i>	29
3.3.3 <i>Critérios de Inclusão dos Participantes para o Grupo Diabetes mellitus</i>	30
3.3.4 <i>Critérios de Inclusão dos Participantes para o Grupo com Presença Concomitante de Doença de Alzheimer e Diabetes mellitus</i>	30
3.3.5 <i>Critérios de Exclusão</i>	30
3.4 Protocolo de avaliação socioeconômica	31
3.5 Protocolo das avaliações de rastreio cognitivo	31
3.5.1 <i>Mini-Exame do Estado Mental (MEEM)</i>	31
3.5.2 <i>Clinical Dementia Rating (CDR)</i>	32
3.6 Coleta e processamento do sangue	32
3.7 Determinação dos níveis plasmáticos da ADAM10 por ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)	33
3.8 Quantificação de proteínas totais e da ADAM10	33
3.9 SDS-PAGE e Western Blotting	34
3.10 Densitometria das bandas	35
3.11 Análise Estatística	35
4. RESULTADOS	36
4.1 Dados socioeconômicos, clínicos e avaliação cognitiva	36
4.2 Níveis da ADAM10 plasmática em idosos dos grupos controle, doença de Alzheimer, diabetes mellitus tipo 2 e presença concomitante de doença de Alzheimer e diabetes mellitus tipo 2.	39
4.2.1 <i>Determinação por Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay (ELISA)</i>	39

4.2.2 Determinação por <i>western blotting</i>	40
5. DISCUSSÃO	43
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	46
REFERÊNCIAS	47
APÊNDICES	53
APÊNDICE 1 – Artigo publicado durante o período do estudo	53
APÊNDICE 2 – Artigo publicado durante o período do estudo	54
APÊNDICE 3 – Artigo publicado durante o período do estudo	55
APÊNDICE 4 – Imagens representativas das membranas referentes aos experimentos de <i>western blotting</i>	56
ANEXOS	60
ANEXO 1 – Protocolo de Avaliação Socioeconômico	60
ANEXO 2 – Clinical Dementia Rating (CDR)	61
ANEXO 3 – Mini Exame do Estado Mental (MEEM)	62

1. INTRODUÇÃO

1.1 Envelhecimento populacional

O envelhecimento populacional é uma realidade vivenciada desde o século 19 e atualmente reflete um fenômeno mundial, experimentado principalmente em países em desenvolvimento (NATIONS, 2020). Projeções futuras indicam que a população brasileira com 60 anos ou mais triplicará, passando para 66,5 milhões em 2050, uma das taxas de envelhecimento mais rápidas observadas em todo mundo (IBGE, 2016; LIMA-COSTA, 2018). A redução expressiva na taxa de fecundidade, associada à forte redução da taxa de mortalidade e o aumento da expectativa de vida, correspondem aos principais determinantes dessa acelerada transição demográfica (NATIONS, 2020).

No processo de envelhecimento, há uma redução gradativa da homeostase do organismo, levando ao maior risco de doenças. Desse modo, o Brasil caminha rapidamente para um perfil demográfico mais envelhecido, caracterizado por uma transição epidemiológica, em que as doenças crônico-degenerativas ocupam lugar de destaque, representando as principais causas de morbidade e mortalidade no país e no mundo (ISAEV; STELMASHOOK; GENRIKHS, 2019; SZYBIŃSKA; LEŚNIAK, 2017).

Uma das alterações observadas no processo do envelhecimento acomete o sistema neurológico. Normalmente não há perda significativa de neurônios, porém, a quantidade e características estruturais como diâmetro, comprimento e ramificações dendríticas podem diminuir no envelhecimento normal (ISAEV; STELMASHOOK; GENRIKHS, 2019). Isso ocorre de forma muito diversificada nas regiões cerebrais, entretanto, é característico a atrofia do córtex frontal e temporal, dentre outras regiões. Portanto, apesar da heterogeneidade ao envelhecer, o avanço da idade pode implicar em doenças relacionadas ao declínio cognitivo e neurodegeneração, as quais apresentam grande impacto na independência e qualidade de vida das pessoas idosas (ISAEV; STELMASHOOK; GENRIKHS, 2019).

Ainda, as altas taxas de envelhecimento, associadas às suas alterações fisiológicas e mudanças no estilo de vida que podem levar ao sedentarismo e à obesidade são alguns dos fatores responsáveis pela incidência de doenças metabólicas em todo o mundo (STRAIN; HOPE; GREEN; KAR *et al.*, 2018). Dentre tais doenças, destaca-se o *diabetes mellitus* que é atualmente uma das prioridades na área da saúde, com ações mundiais voltadas para sua prevenção e controle. A epidemiologia dessa doença mudou drasticamente em pessoas acima de 60 anos, assim como a presença de comorbidades associadas em indivíduos com *diabetes mellitus*, fatores que conjuntamente apresentam risco para o declínio funcional e incapacidade

(MARKLE-REID; PLOEG; FRASER; FISHER *et al.*, 2018; STRAIN; HOPE; GREEN; KAR *et al.*, 2018).

Neste cenário, ações preventivas, diagnósticos precisos e intervenções terapêuticas são medidas extremamente necessárias e urgentes, uma vez que as doenças crônico-degenerativas precisam de acompanhamento e tratamento contínuos (LIMA-COSTA, 2018). Atender as demandas do envelhecimento implica em esforços multidisciplinares, dado que se trata de um processo complexo e heterogêneo, influenciado por fatores biológicos, sociais e ambientais, que podem estar relacionados e acelerar o desenvolvimento e progressão de doenças (HOU; DAN; BABBAR; WEI *et al.*, 2019).

1.2 Demência e doença de Alzheimer

Dentre as principais enfermidades que ocorrem no envelhecimento, a demência é uma das principais causas de incapacidade e dependência, correspondendo a um importante problema de saúde pública (WHO, 2021). A demência é uma síndrome clínica caracterizada pelo desenvolvimento de déficits cognitivos suficientes para interferir no funcionamento social e ocupacional do indivíduo (QIU; FRATIGLIONI, 2018).

No DSM-5 (*Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*), o termo demência foi atualizado para “Transtorno Neurocognitivo Maior”. O diagnóstico ocorre quando há evidência de declínio cognitivo importante a partir do nível anterior de desempenho em um ou mais domínios cognitivos que englobam atenção, função executiva, aprendizado e memória, linguagem, perceptomotor e cognição social (AMERICAN PSYCHIATRY ASSOCIATION, 2014).

Estimativas atuais indicam mais de 55 milhões de casos, número que deve aumentar em 2050, afetando 139 milhões de pessoas, especialmente as que vivem em países de média e baixa renda. No Brasil o número de mortes por demência aumentou em 55,5 % em 10 anos (FETER; LEITE; CAPUTO; CARDOSO *et al.*, 2021). Dentre os tipos de demência, a doença de Alzheimer (DA) é a mais comum no mundo, correspondendo a cerca de 60% a 80% dos casos e em 2050 poderá afetar 135 milhões de pessoas no mundo (ASSOCIATION, 2021; SHI; BAIRD; WESTWOOD; HYE *et al.*, 2018).

Apesar dos números alarmantes, segundo um estudo com dados do ELSI-Brasil, a prevalência da DA por diagnóstico médico relatado é em torno de 0,75%, porém as investigações epidemiológicas relacionadas à demência não estão atualizadas, indicando que no Brasil indivíduos com DA são sub-diagnosticados e sub-tratados (FETER; LEITE; CAPUTO; CARDOSO *et al.*, 2021; NAKAMURA; OPALEYE; TANI; FERRI, 2015).

Observou-se ainda que a prevalência de DA é maior em idosos com 80 anos ou mais e com baixa escolaridade, porém adultos acima de 50 anos possuem chance de um diagnóstico de DA aumentada em 11% a cada ano (FETER; LEITE; CAPUTO; CARDOSO *et al.*, 2021).

A DA possui um estágio prodrômico identificado como transtorno neurocognitivo leve (TNCL) anteriormente denominado como comprometimento cognitivo leve (CCL), o qual se refere ao comprometimento cognitivo, porém com a independência preservada (AMERICAN PSYCHIATRY ASSOCIATION, 2014). O TNCL é reconhecido como uma fase intermediária entre o envelhecimento cerebral normal e o patológico e é visto como um ponto de conversão para a doença de Alzheimer, podendo ser revertido para cognição normal (BRETON; CASEY; ARNAOUTOGLU, 2019).

A DA é uma doença neurodegenerativa caracterizada por um declínio progressivo na capacidade cognitiva, comportamental e física a ponto de gerar incapacidade (ASSOCIATION, 2021). A etiologia ainda é incerta, porém alguns fatores de risco estão associados à doença, como idade avançada, mutações genéticas - presença de alelo APOE $\epsilon 4$, mutações no gene para a proteína precursora amiloide (APP), mutações nos genes para as presenilinas 1 e 2 e trissomia do cromossomo 21, *diabetes mellitus*, obesidade, tabagismo, hipertensão arterial (HA) e lesão traumática cerebral (KUMAR; SIDHU; GOYAL; TSAO, 2021).

A atrofia cortical predominante no lobo temporal medial é resultante dos dois principais marcos patológicos da DA, que compreendem em depósitos fibrilares anormais intra e extracelulares, denominados emaranhados neurofibrilares e placas senis respectivamente, resultando em toxicidade e colapso neural (ZHAO; LIU; XIA; ZHANG *et al.*, 2020).

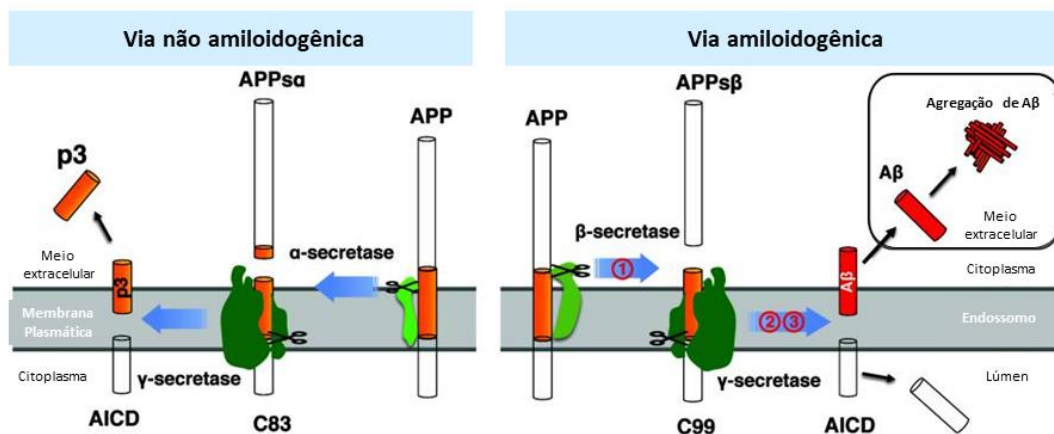
Os emaranhados neurofibrilares são decorrentes da hiperfosforilação da proteína Tau, a qual é responsável pela estabilização de microtúbulos axonais, que são essenciais para o transporte intracelular (KUMAR; SIDHU; GOYAL; TSAO, 2021). Devido a fatores ainda não muito bem compreendidos, ocorre a hiperfosforilação desta proteína, levando a formação de filamentos helicoidais que se agregam em emaranhados neurofibrilares, os quais são altamente insolúveis no citoplasma, causando prejuízo na comunicação entre os neurônios e gerando apoptose (KUMAR; SIDHU; GOYAL; TSAO, 2021; TIWARI; ATLURI; KAUSHIK; YNDART *et al.*, 2019).

As placas senis são resultado do acúmulo e agregação do peptídeo β -amiloide ($A\beta$), o qual é gerado a partir da clivagem da APP, de modo consecutivo por β - e γ -secretases. Esse evento tem papel chave na patogênese da DA e é fundamentado pela hipótese da cascata amiloide, que é investigada há mais de 3 décadas (ZHAO; LIU; XIA; ZHANG *et al.*, 2020).

A APP é uma proteína transmembrana do tipo I com funções ainda pouco conhecidas, mas sua ação pode estar relacionada a sobrevivência, ao crescimento e a motilidade celular (TIWARI; ATLURI; KAUSHIK; YNDART *et al.*, 2019). A APP é clivada pela ação de proteases por duas vias (Figura 1). A via não-amiloidogênica ocorre pela clivagem de α -secretase dentro do domínio A β entre Lys16 e Leu17, criando o fragmento sAPP α , seguido de clivagem por γ -secretases, o que produz o fragmento C83. Essa via impede a formação de A β e produz fatores neuroprotetores (ZHAO; LIU; XIA; ZHANG *et al.*, 2020).

Por outro lado, pelo processamento na via amiloidogênica, a clivagem se dá por β -secretases, principalmente pela BACE-1, seguida da clivagem por γ -secretases, gerando sAPP β e C99 respectivamente. O resultado são fragmentos A β insolúveis e neurotóxicos, como A β 40 e A β 42, destes, a espécie A β 42 tem maior poder de agregação levando a formação de oligômeros, fibrilas e de placas senis (KUMAR; SIDHU; GOYAL; TSAO, 2021; ZHAO; LIU; XIA; ZHANG *et al.*, 2020). Além de formar as placas senis, os oligômeros de A β causam disfunção sináptica e podem elevar os níveis de BACE-1, gerando um ciclo vicioso e agravamento da DA (YUAN; SUN; TAN; YU *et al.*, 2017).

Figura 1 - Clivagem da proteína precursora amiloide (APP) pelas α e γ -secretases (via não-amiloidogênica) e pelas β e γ -secretases (via amiloidogênica) com formação do peptídeo beta-amiloide (A β).



Extraído e modificado de ZHAO *et al.*, 2020.

Apesar das evidências genéticas e neuroquímicas sustentarem as hipóteses apresentadas, outros mecanismos também estão relacionados a DA, o que a torna uma doença muito mais complexa para compreensão da patogênese e conseqüentemente da conclusão diagnóstica e tratamento.

1.3 Metabolismo da insulina e diabetes mellitus tipo 2

O envelhecimento também está fortemente associado ao aumento de doenças metabólicas, incluindo obesidade, resistência sistêmica à insulina, síndrome metabólica e *diabetes mellitus* tipo 2 (DM2) (DE FELICE; LOURENCO, 2015). Em 2019, aproximadamente 136 milhões de pessoas com 65 anos ou mais tinham *diabetes mellitus* e é previsto um aumento de 140 milhões de casos até 2045 (SINCLAIR; SAEEDI; KAUNDAL; KARURANGA *et al.*, 2020). Nesse contexto, o DM2 será responsável por mais de 90% dos casos, com maiores proporções em países de média e baixa renda, como o Brasil, um dos epicentros de maior prevalência na última década (SINCLAIR; SAEEDI; KAUNDAL; KARURANGA *et al.*, 2020; WHO, 2019).

A idade avançada pode favorecer a ocorrência de DM2, chegando a 25% entre pessoas com mais de 65 anos, portanto, a maior prevalência do DM2 é observada em adultos mais velhos (HWANG; LIM; YOO; KIM *et al.*, 2019; MARKLE-REID; PLOEG; FRASER; FISHER *et al.*, 2018). Embora alarmante, os números podem ser ainda mais drásticos, pois os casos podem ser sub-diagnosticados, principalmente na população idosa pelo fator de confusão dos sintomas que muitas vezes podem ser associados à idade (DOS SANTOS; MÁXIMO; DE ANDRADE; DE OLIVEIRA *et al.*, 2021). Geralmente, não há presença de sintomas no estágio inicial ou estes podem ser imperceptíveis. Mas quando há presença dos sintomas, observa-se poliúria, polidipsia, polifagia, emagrecimento, fadiga, visão embaçada, alteração cicatricial e parestesia ou dor nas mãos e pés (ARTASENSI; PEDRETTI; VISTOLI; FUMAGALLI, 2020).

Diabetes mellitus refere-se a um distúrbio metabólico oriundo de defeitos na secreção ou ação da insulina, bem como os dois eventos de forma conjunta (WHO, 2019). A etiologia pode refletir diferentes mecanismos resultante da interação entre genes e ambiente, que levam a eventos subjacentes de disfunção ou destruição de células β -pancreáticas localizadas nas ilhotas pancreáticas, que são responsáveis pela formação de insulina (WHO, 2019). No caso do DM2, ocorre a disfunção de forma progressiva das células β -pancreáticas, portanto são predominantemente observados defeitos na secreção da insulina e um estado de resistência à insulina, que pode preceder uma década do surgimento da doença (WHO, 2019).

A resistência insulínica é denominada como a incapacidade dos tecidos alvos responderem normalmente a insulina, o que leva ao aumento dos níveis glicêmicos e estimula as células β -pancreáticas a produzirem mais insulina, levando ao estado de hiperinsulinemia. Esse ciclo vicioso ocorre de tal forma que ocasiona o distúrbio que é observado no DM2, levando a hiperglicemia (PETERSEN; SHULMAN, 2018; WHO, 2019).

A insulina é um hormônio peptídico endócrino conhecido como principal hormônio responsável pela homeostase de glicose na circulação sanguínea, metabolizando-a no músculo esquelético, fígado e tecido adiposo (PETERSEN; SHULMAN, 2018). O principal sinal metabólico é dado pelo aumento da concentração de glicose no sangue, que acessa as células β -pancreáticas através dos transportadores de glicose (GLUTs). Inserida na célula, a glicose é oxidada pela via glicolítica gerando ATP (adenosina trifosfato), que por sua vez despolariza a membrana, convertendo a sinalização química em elétrica atuando tanto na sinalização das células β -pancreáticas como na secreção da insulina (TOKARZ; MACDONALD; KLIP, 2018).

Quando liberada no espaço intersticial do pâncreas, a insulina tem acesso a circulação endotelial e chega ao fígado, onde grande parte da porção secretada é depurada pelos hepatócitos. A porção de insulina que não é degradada, atinge a circulação arterial, provocando vasodilatação e estimulando a entrega deste hormônio nos tecidos alvos e consequentemente a captação de glicose, principalmente no tecido muscular e adiposo, pelos miócitos e adipócitos respectivamente. Por fim, a insulina é depurada também pelo rim, através de mecanismos de internalização, e é encerrada sua ação no organismo para assegurar a homeostase metabólica ideal (TOKARZ; MACDONALD; KLIP, 2018).

Porém sua ação é muito mais abrangente. Quando ligada aos receptores da membrana plasmática das células-alvo, gera uma cascata de sinalização intracelular que exerce papéis fundamentais, como crescimento e diferenciação celular (ARNOLD; ARVANITAKIS; MACAULEY-RAMBACH; KOENIG *et al.*, 2018; PETERSEN; SHULMAN, 2018). O receptor de insulina é ativado dada sua ligação as subunidade α no meio extracelular, permitindo que as subunidades β que estão inseridas na membrana plasmática, adquiram atividade quinase gerando alteração conformacional e autofosforilação, seguido do recrutamento de proteínas adaptadoras moleculares das família IRS (substrato do receptor de insulina) e da família de proteínas transformadoras de Shc. Estas por sua vez, ativam duas vias de sinalização: PI3K/Akt (*Phosphoinositide 3-kinase-Protein kinase B*, PKB) e a MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinase*) (ARNOLD; ARVANITAKIS; MACAULEY-RAMBACH; KOENIG *et al.*, 2018; SALTIEL, 2021).

A primeira é uma importante via para o transporte intracelular de glicose, bem como para a regulação da proliferação e diferenciação celular, angiogênese, síntese proteica e síntese lipídica. Já a segunda via está relacionada a proliferação e diferenciação celular, sem efeitos nas ações metabólicas deste hormônio (PETERSEN; SHULMAN, 2018). Além da ação periférica, a insulina é captada pela barreira hematoencefálica (BHE) por difusão facilitada e acessa o sistema nervoso central (SNC), apresentando funções importantes relacionadas a

sobrevivência e manutenção deste sistema, dada sua relação com a homeostase de glicose, integridade neuronal e a cognição. Por outro lado, o comprometimento das vias de sinalização insulínicas no cérebro podem ocasionar processos neurodegenerativos e morte de células neuronais (NGUYEN; TA; NGUYEN; LE *et al.*, 2020).

1.4 Diabetes mellitus tipo 2 e doença de Alzheimer

A conexão entre DM2 e demências foi primeiramente observada no estudo de Rotterdam, que mostrou que a *diabetes mellitus* aumenta o risco de demência (BRETELER; VAN DEN OUWELAND; GROBBEE; HOFMAN, 1992). Desde então, alterações na via insulínica têm sido associadas a distúrbios cerebrais, como a DA (ZHANG; CHEN; HUA; LIAO *et al.*, 2017), uma vez que indivíduos com DM2 apresentam maiores alterações estruturais no cérebro, bem como maiores índices de casos de comprometimento cognitivo, e assim, elevado risco de desenvolver DA, notadamente a forma de início tardio (BEDSE; DI DOMENICO; SERVIDDIO; CASSANO, 2015; NGUYEN; TA; NGUYEN; LE *et al.*, 2020).

Embora o cérebro já tenha sido considerado um órgão insensível à insulina, vários estudos *in vivo* e *in vitro* mostraram que a insulina tem a capacidade de regular a sobrevivência neuronal, a plasticidade e também atuar como um fator de crescimento cerebral (BIESSELS; REAGAN, 2015; SPINELLI; FUSCO; GRASSI, 2019). Além disso, o hipocampo, uma região do cérebro importante para os processos de memória e aprendizado, possui altos níveis de receptores de insulina e foi identificado como um alvo importante deste hormônio (BEDSE; DI DOMENICO; SERVIDDIO; CASSANO, 2015).

Estes dados sugerem, portanto, que a insulina pode desempenhar um papel em mecanismos relacionados com a atividade cerebral e, especificamente, com a formação da memória (FORMIGA; PEREZ-MARAVAR, 2014). A resistência insulínica periférica, uma fase que antecede o DM2, diminui a sinalização de insulina no SNC e altera o metabolismo cerebral, o que pode ser a base de ligação desta doença com a DA (NGUYEN; TA; NGUYEN; LE *et al.*, 2020). Desta forma, a partir destes achados, a DA tem sido chamada por alguns pesquisadores de “*diabetes mellitus* tipo 3” (DM3) ou “*diabetes cerebral*” (FORMIGA; PEREZ-MARAVAR, 2014).

Dentre os achados patológicos da DA e a resistência insulínica, observa-se que alterações no metabolismo cerebral contribuem para a formação de A β e também podem levar a hiperfosforilação da proteína tau, a disfunção mitocondrial e conseqüentemente ao estresse oxidativo, bem como a ativação de citocinas inflamatórias, eventos que resultam em morte neuronal (NGUYEN; NGUYEN; NGUYEN; GIAU, 2020).

Por outro lado, a toxicidade de A β pode levar a resistência à insulina, uma vez que níveis aumentados de A β competem com a insulina pelos seus receptores, levando a uma redução da sinalização destes, causando uma desregulação das vias citadas anteriormente, as quais são essenciais para a manutenção neuronal. Ainda, há falha na depuração de A β , uma vez que a enzima que degrada a insulina (IDE) que é altamente expressa no cérebro, também desempenha papel fundamental na degradação do A β (NGUYEN; NGUYEN; NGUYEN; GIAU, 2020).

1.5 Biomarcadores periféricos para diabetes mellitus tipo 2 e doença de Alzheimer

Biomarcadores são características biológicas e fisiológicas que podem ser especificamente medidas ou avaliadas como indicadores de algum processo normal ou patológico, ou como uma resposta à terapia (GROUP, 2001). A pesquisa dos biomarcadores é relevante para o conhecimento da fisiopatologia da doença e sua aplicação é atualmente difundida em muitos ensaios clínicos, bem como na prática clínica (KRAUS, 2018).

No caso do DM2 a maioria dos biomarcadores já estabelecidos e amplamente utilizados provém de tecido periférico através de análises sanguíneas dos níveis glicêmicos. Na ausência de sintomas, o diagnóstico é verificado através da repetição dos testes que incluem a medida de glicose plasmática em estado de jejum com valor maior ou igual a 126 mg/dl, do teste oral de tolerância à glicose (TOGT) maior ou igual a 200 mg/dl ou quando a hemoglobina glicada (HbA1c) é maior ou igual a 48 mmol/mol (6,5%), destes, a HbA1c é o exame que deve ser padronizado. Já quando há presença de sintomas, a dosagem de glicemia deve ser ao acaso e independente de jejum e o DM2 é diagnosticado caso a glicemia apresente valor maior ou igual a 200 mg/dl (ARTASENSI; PEDRETTI; VISTOLI; FUMAGALLI, 2020).

Em contrapartida, os biomarcadores para DA são mais escassos, porém, desde a introdução em pesquisas relacionadas a esta demência, os biomarcadores proporcionaram melhor entendimento sobre alterações bioquímicas, comprovação da presença de estágios pré-clínicos, iniciais e tardios e auxiliaram no desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas (ASSOCIATION, 2021). Especificamente para a DA, os biomarcadores de imagem incluem medidas moleculares de deposição de amiloide e tau usando tomografia por emissão de pósitrons (PET), verificação do metabolismo da glicose cerebral também por imagens de PET, bem como medidas de volume cerebral através de ressonância magnética (RM) ou tomografia computadorizada (TC) (BLENNOW, 2017).

A combinação da redução do peptídeo A β 42, o aumento da tau fosforilada (p-tau) e de tau total (t-tau) no líquido cefalorraquidiano (LCR) são achados típicos de identificação para DA (ZETTERBERG, 2017). Entretanto, o uso destes biomarcadores ainda é limitado pelo alto

custo e acesso restrito para estudos de RM e PET e a relativa invasividade da coleta de amostras de LCR (SHI; BAIRD; WESTWOOD; HYE *et al.*, 2018).

Em decorrência destas restrições e na incessante busca de aprimorar as ferramentas diagnósticas, um crescente número de estudos busca por biomarcadores em tecidos periféricos, como o sangue, dado seu fácil acesso, baixo custo e poder de aplicação em larga escala (SHI; BAIRD; WESTWOOD; HYE *et al.*, 2018). Essa possibilidade é estabelecida devido ao dano à barreira hematoencefálica, um evento característico que ocorre na DA em casos graves, que pode ser capaz de aumentar o movimento bidirecional de proteínas cerebrais e o sangue, uma vez que aproximadamente cerca de 500 ml de LCR entram em contato com o plasma sanguíneo diariamente, e assim, o sangue representa uma fonte rica para a prospecção de biomarcadores para a DA (ZIPSER; JOHANSON; GONZALEZ; BERZIN *et al.*, 2007).

Porém, ensaios clínicos mostram que a identificação de moléculas do SNC no tecido sanguíneo, apesar de ser um desafio, é possível mesmo em estágios iniciais da demência (ZETTERBERG; BURNHAM, 2019). Nos últimos anos o progresso na pesquisa em biomarcadores sanguíneos se deu pelos avanços tecnológicos que permitiram detecções moleculares mais sensíveis e precisas, além da rápida aplicabilidade na prática clínica. (ZETTERBERG; BURNHAM, 2019). Dentre os tecidos periféricos, as plaquetas e o plasma são fontes ricas de prospecção, uma vez que compartilham múltiplas semelhanças com as células neuronais (COLCIAGHI; BORRONI; PASTORINO; MARCELLO *et al.*, 2002; ZIPSER; JOHANSON; GONZALEZ; BERZIN *et al.*, 2007).

Nosso grupo vem estudando biomarcadores periféricos para a DA com foco na ADAM10 (*A Disintegrin And Metallopeptidase*), desde 2010. Verificamos os níveis e atividade da protease no LCR, em plaquetas e plasma, com resultados que indicam o potencial uso da ADAM10 como possível molécula biomarcadora periférica para DA (DE OLIVEIRA; ERBERELI; MANZINE; MAGALHÃES *et al.*, 2020; MANZINE; BARHAM; VALE; SELISTRE-DE-ARAÚJO *et al.*, 2014; MANZINE; BARHAM; VALE FDE; SELISTRE-DE-ARAÚJO *et al.*, 2013; MANZINE; DE FRANCA BRAM; BARHAM; DO VALE FDE *et al.*, 2013; PEREIRA VATANABE; PERON; MANTELLATTO GRIGOLI; PELUCCHI *et al.*, 2021).

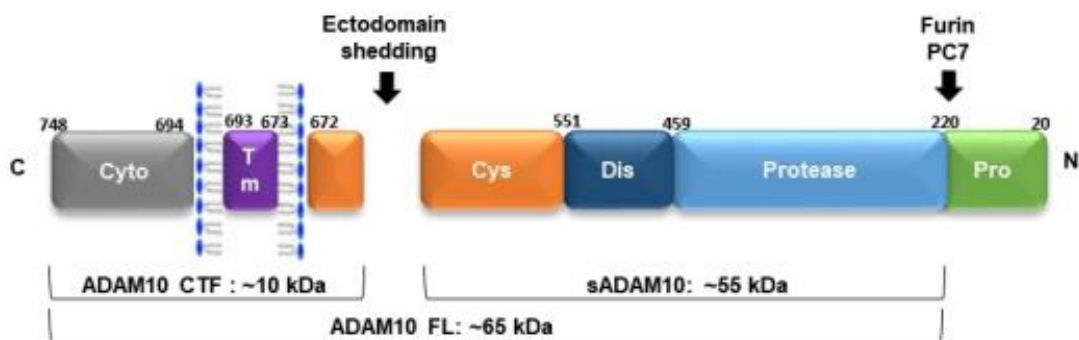
1.6 ADAM10

As ADAMs são membros da superfamília das proteases dependentes de zinco (HOOPER; TURNER, 2002). Dentre essas, a ADAM10 foi identificada como a principal α -secretase envolvida no processamento da APP (LAMMICH; KOJRO; POSTINA; GILBERT

et al., 1999). A ADAM10 é uma protease de membrana que atua na regulação da estrutura e dos níveis de muitas proteínas transmembranas, clivando mais de 90 substratos e consequentemente é intermediária de funções fisiológicas, como diferenciação, proliferação e adesão celular (YUAN; SUN; TAN; YU *et al.*, 2017). É composta por 748 aminoácidos e contém a partir da região N-terminal, um pro-domínio, um domínio metaloprotease, um domínio desintegrina, um domínio rico em cisteína, uma hélice transmembrana e uma região citoplasmática (Figura 2) (PERON; VATANABE; MANZINE; CAMINS *et al.*, 2018).

Essa proteína é produzida como um zimogênico no retículo endoplasmático e seu pro-domínio a mantém inativa. Posteriormente durante a passagem pelo complexo de Golgi, o pro-domínio é removido por furinas e por enzimas convertases (PC 7), então a ADAM10 torna-se ativa e madura (WONG; MARETZKY; PELEG; BLOBEL *et al.*, 2015). A pró-ADAM10 possui massa molecular de ~ 85 kDa e após remoção do pro-domínio a ADAM10 adquire uma massa de ~ 65 kDa. Já quando ocorre a eliminação do ectodomínio, o fragmento citoplasmático fica ancorado a membrana, e é liberada a forma solúvel de ~ 55 kDa (sADAM10) (Figura 2) (PERON; VATANABE; MANZINE; CAMINS *et al.*, 2018). A clivagem mediada por ADAM10 é regulada nos níveis transcricionais, translacionais e de pós-tradução por vários fatores e de maneira complexa a qual há necessidade de melhor entendimento dos mecanismos, porém o tráfego intracelular o qual faz parte do nível de pós-tradução é apontado como o regulador mais importante (YUAN; SUN; TAN; YU *et al.*, 2017).

Figura 2. Estrutura multimodular da ADAM10. A partir da região N-terminal observa-se o pro-domínio (verde), domínio metaloprotease (azul), domínio desintegrina (marinho), domínio rico em cisteína (laranja), hélice transmembrana (roxo) e região citoplasmática (cinza).



Extraído de PERON *et al.* 2018.

A ADAM10 foi descrita como a principal α -secretase em neurônios, atuando no processo de clivagem de APP, prevenindo geração de A β e liberando o fragmento sAPP α , o

qual apresenta características neuroprotetoras e neurotróficas (YUAN; SUN; TAN; YU *et al.*, 2017). Além disso, a atividade de ADAM10 também está relacionada na regulação e morfologia de estruturas pós-sinápticas (MARCELLO; BORRONI; PELUCCHI; GARDONI *et al.*, 2017; YUAN; SUN; TAN; YU *et al.*, 2017).

Por essa questão, o uso terapêutico visando aumentar os níveis ou estimular a atividade da ADAM10 têm ganhado destaque, uma vez que seus benefícios podem atrasar o processo patológico da DA, porém, por sua ampla ação proteolítica e por ainda serem desconhecido todos mecanismos da sua ação, é necessário que se avalie meticulosamente os efeitos da sua ativação (PERON; VATANABE; MANZINE; CAMINS *et al.*, 2018; YUAN; SUN; TAN; YU *et al.*, 2017).

Contudo, a utilização da ADAM10 como potencial biomarcadora para a DA é recorrente na literatura. Estudos relataram níveis de ADAM10 diminuídos em plaquetas de pacientes com DA em comparação a idosos cognitivamente saudáveis (COLCIAGHI; BORRONI; PASTORINO; MARCELLO *et al.*, 2002; MANZINE; DE FRANCA BRAM; BARHAM; DO VALE FDE *et al.*, 2013) e foi verificada uma correlação positiva entre os níveis de ADAM10 plaquetária e testes de rastreio cognitivo (MANZINE; BARHAM; VALE; SELISTRE-DE-ARAÚJO *et al.*, 2014; MANZINE; BARHAM; VALE FDE; SELISTRE-DE-ARAÚJO *et al.*, 2013).

Ainda, observou-se que esta diminuição não ocorre via expressão gênica, uma vez que os níveis de mRNA para esta proteína não estão alterados entre idosos cognitivamente saudáveis, com TNCL ou com DA (MANZINE; MARCELLO; BORRONI; KAMPHUIS *et al.*, 2015). Entretanto, diferenças nos níveis do miRNA 221 foram observados entre sujeitos cognitivamente saudáveis e com DA, verificando-se que o miRNA 221 está relacionado com a regulação a nível translacional da proteína ADAM10 (MANZINE; PELUCCHI; HORST; VALE *et al.*, 2018).

De modo contrário, pesquisadores investigaram os níveis e atividade da ADAM10 no envelhecimento cognitivo normal e constataram um aumento desta proteína em idosos saudáveis, indicando que níveis aumentados de ADAM10 plaquetária podem ser importantes para o envelhecimento cognitivamente saudável (SCHUCK; WOLF; FELLGIEBEL; ENDRES, 2016). Recentemente, nosso grupo investigou a proteína no plasma sanguíneo e diferente do que foi observado nas plaquetas, os níveis de ADAM10 estavam aumentados no plasma de idosos com TNCL e DA, quando comparado a idosos controles (DE OLIVEIRA; ERBERELI; MANZINE; MAGALHÃES *et al.*, 2020).

Após análise em diferentes meios biológicos, constatou-se que tanto no plasma, assim como no LCR, a ADAM10 está inativa, ou seja, não exerce sua função de protease, uma vez que se encontra na forma solúvel (~ 55 kDa). Essa isoforma não está mais ancorada a membrana plasmática, condição que é essencial para ADAM10 exercer sua atividade como protease (PEREIRA VATANABE; PERON; MANTELLATTO GRIGOLI; PELUCCHI *et al.*, 2021).

Estes resultados reforçam o potencial da ADAM10 como possível molécula biomarcadora periférica para DA e ainda evidenciam um meio de análise de mais fácil acesso e menor custo para os sistemas de saúde. Contudo, e muito importante para a razão do estudo aqui proposto, observamos uma grande variação dos níveis de ADAM10 entre idosos com DA que também eram diabéticos (em tratamento ou não), dados ainda não publicados. Por outro lado, ainda não existem estudos que verifiquem os níveis plasmáticos de ADAM10 entre idosos com DA e com DM2 de forma concomitante. Uma vez comparados esses níveis, a inclusão de novas terapias farmacológicas combinadas entre o DM2 e a DA poderia ser proposta.

2. OBJETIVOS

Verificar os níveis de ADAM10 em amostras de plasma de idosos com DA, idosos com DM2 e idosos com a presença concomitante de DA e DM2 e comparar com os achados obtidos em idosos cognitivamente saudáveis e sem alteração dos níveis glicêmicos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Trata-se de um estudo descritivo e transversal desenvolvido no Laboratório de Biologia do Envelhecimento – LABEN, localizado na Universidade Federal de São Carlos – UFSCar. A amostra foi composta por 36 sujeitos (controles, n=9; DA, n=9; DM2, n=9; DA + DM2, n=9;), com idade igual ou superior a 60 anos. Os sujeitos que compõem o estudo fazem parte do banco de dados de pesquisa do LABEN, que fizeram parte de outros estudos desenvolvidos pelo grupo de pesquisa (Processos FAPESP 2012/08654-7; 2015/26084-1; 2016/06226-9).

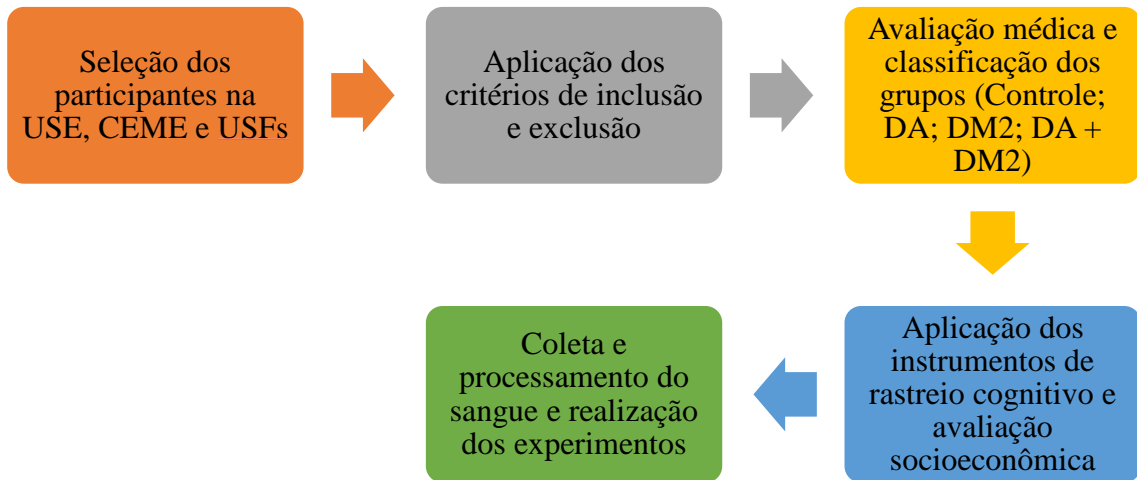
3.1 Aspectos éticos

Inicialmente o projeto de pesquisa e o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) foram submetidos e aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de São Carlos. Todas as etapas obedeceram às diretrizes da resolução 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde. O parecer deste estudo foi registrado com o número CAAE: 31634720.9.0000.5504. Entretanto, devido ao cenário mundial da pandemia por COVID-19, as coletas de sangue que seriam realizadas foram interrompidas. Devido a isso, conforme descrito no item anterior, as amostras utilizadas para execução desse trabalho fazem parte do banco de dados de projetos anteriores, também realizados no LABEN e que seguiram todas as diretrizes da resolução CNS 466/2012 e CNS 510/2016 que tratam sobre a ética de pesquisa com seres humanos. Os estudos 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 participantes desta pesquisa são pessoas com idade igual a 60 anos ou mais, usuários dos serviços de referência e contra referência em demência do município de São Carlos, a Unidade Saúde Escola (USE), Centro de Especialidades Médicas (CEME) e Unidades Saúde da Família (USFs). As coletas de sangue aconteceram nos anos de 2012, 2016 e 2017.

Figura 3. Representação das etapas de seleção dos participantes e execução da pesquisa.



3.3 Critérios de Inclusão e Exclusão

Os critérios de inclusão e exclusão descritos nesse trabalho, seguem os que foram aplicados para a execução dos trabalhos referentes as amostras analisadas nesse estudo.

3.3.1 Critérios de Inclusão dos Participantes para o Grupo Controle

1. Ser residente do município de São Carlos;
2. Ser usuário de uma USF;
3. Fazer parte do banco de dados do Grupo de Pesquisa “Biologia e Envelhecimento”;

3.3.2 Critérios de Inclusão dos Participantes para o Grupo Doença de Alzheimer

1. Ser residente do município de São Carlos;
2. Ser cadastrado nas instituições de referência a saúde, USE e/ou CEME;
3. Ter sido acompanhado ou ter acompanhamento por médicos da USE ou do CEME;

4. Apresentar diagnóstico de provável doença de Alzheimer¹ leve, moderada ou avançada de acordo com o *Clinical Dementia Rating* (CDR);
5. Fazer uso de medicações para a doença de Alzheimer (Donepezila, Rivastigma, Galantamina e/ou Memantina).

3.3.3 Critérios de Inclusão dos Participantes para o Grupo Diabetes mellitus tipo 2

1. Ser residente do município de São Carlos;
2. Ser cadastrado nas instituições de referência a saúde, USE e/ou CEME;
3. Ter acompanhamento ou ter sido acompanhado por médicos da USE ou do CEME;
4. Ter diagnóstico autorrelatado de DM2 e/ou estar em uso das medicações específicas para DM2.

3.3.4 Critérios de Inclusão dos Participantes para o Grupo com Presença Concomitante de Doença de Alzheimer e Diabetes mellitus tipo 2

1. Ser residente do município de São Carlos;
2. Ser cadastrado nas instituições de referência a saúde, USE e/ou CEME;
3. Ter acompanhamento ou ter sido acompanhado por médicos da USE ou do CEME;
4. Apresentar diagnóstico de doença de Alzheimer e DM2, segundo os critérios descritos acima.

3.3.5 Critérios de Exclusão

Aplicado a todos os grupos, os participantes não poderiam manifestar alterações cognitivas e/ou metabólicas, de acordo com os critérios descritos na tabela 1.

¹ De acordo com o critério NINCDS-ADRDA (McKhann et al., 1984).

Tabela 1. Critérios de exclusão estabelecidos para a pesquisa.

CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO²
Transtorno Depressivo Maior ³ Transtorno Bipolar ³ Esquizofrenia ³ Retardo Mental ³ Transtorno por uso de substância ³ Hidrocefalia ⁴ Massa intracraniana ⁴ 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);

3.4 Protocolo de avaliação socioeconômica

A caracterização socioeconômica da amostra foi obtida através de um protocolo avaliativo de acordo com os critérios da faixa etária, sexo, escolaridade em anos e renda dos participantes.

3.5 Protocolo das avaliações de rastreio cognitivo

3.5.1 Mini-Exame do Estado Mental (MEEM)

O Mini-Exame do Estado Mental (MEEM) foi utilizado para detectar possíveis alterações cognitivas. O MEEM foi criado em 1975 e desde então é o teste de rastreio cognitivo mais usado na prática clínica para avaliação cognitiva em todo mundo. Por ser um instrumento de fácil aplicação e rápida execução, é utilizado tanto na prática clínica, para identificar déficits cognitivos, acompanhar a progressão da doença e verificar a resposta ao tratamento, como no âmbito das pesquisas de avaliações neuropsicológicas (DE MELO; BARBOSA, 2015). Esse teste compreende a avaliação de múltiplos domínios cognitivos, como: orientação espacial e temporal, (cinco pontos cada), memória imediata e de evocação (três pontos cada), cálculo (cinco pontos), linguagem-nomeação (2 pontos), linguagem-repetição (1 ponto), linguagem-compreensão (4 pontos), linguagem-escrita (1 ponto) e capacidade visuoespacial (1 ponto). A somatória total corresponde a 30 pontos e notas abaixo das notas de corte indicam déficits

² Extraído de Colciaghi, F. et al., Platelet APP, ADAM10 and BACE alterations in the early stages of Alzheimer disease. *Neurology*, 2004.

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

⁴ Por tomografia Computadorizada ou Ressonância Magnética nos últimos 18 anos.

cognitivos. A nota de corte adotada para esse estudo, seguiu as pontuações de acordo com os anos de escolaridade conforme a validação do teste para população brasileira (BRUCKI; NITRINI; CARAMELLI; BERTOLUCCI *et al.*, 2003)

3.5.2 Clinical Dementia Rating (CDR)

A escala *Clinical Dementia Rating* (CDR) foi desenvolvida em 1982 e adaptada 11 anos depois, com o aprimoramento das informações contidas no teste. Trata-se de um instrumento que permite classificar os diferentes graus de demência e auxiliar na identificação de casos questionáveis, como os casos de TCNL (MONTAÑO; RAMOS, 2005). É aplicado em forma de uma entrevista estruturada, que avalia os aspectos cognitivos e comportamentais em 6 categorias: orientação, memória, julgamento ou resolução de problemas, lar e passatempos, assuntos comunitários, e cuidados pessoais. Cada categoria é classificada em uma pontuação: 0 (sem alteração); 0,5 (questionável); 1 (demência leve); 2 (demência moderada); e 3 (demência grave), como exceção da categoria de cuidados pessoais, a qual a pontuação igual a 0,5 não é aplicada. Para esse teste não existe notas de corte estabelecida de acordo com a desenvoltura populacional, uma vez que, os indivíduos são comparados com as suas próprias pontuações prévias (MONTAÑO; RAMOS, 2005).

3.6 Coleta e processamento do sangue

Para a realização das coletas de sangue foi realizada uma parceria com as unidades USFs, USE e CEME da cidade de São Carlos/SP. A coleta do material (8,5 ml) foi realizada com auxílio de escalpes (*BD Vacutainer Push Button Blood Collection Set*), garrote de média compressão, álcool 70% e algodão. Os tubos contendo solução de citrato de sódio (3,8%) e glicose (136 mM) foram utilizados para coleta e na sequência foram invertidos 10x e mantidos a temperatura de 4°C durante o período de armazenamento e transporte. O sangue coletado foi transportado até o Laboratório de Biologia do Envelhecimento (LABEN), para processamento do material. Inicialmente foi realizada a centrifugação a 1.200 rpm por 10 minutos para obtenção do plasma rico em plaquetas (PRP), seguido de centrifugação a 2.400 rpm por 10 minutos para separação das plaquetas e obtenção do plasma pobre em plaquetas (PPP). Posteriormente as amostras foram armazenadas no LABEN em biorrepositório (-80°C).

3.7 Determinação dos níveis plasmáticos da ADAM10 por ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)

Os níveis da secretase ADAM10 foram analisados por ELISA utilizando o *kit* comercial da *Life-Span Biosciences* para ADAM10 (catálogo número LS-F23768). Para realização do ensaio, um volume de 100µl das amostras de plasma, padrão e controle negativo (branco) foi plaqueado em placa de 96 poços fornecida pelo *kit*. As amostras do controle negativo e padrão foram fornecidas pelo *kit*. As placas foram incubadas por 90 minutos a 37°C. Na sequência, 100µl de reagente de detecção de anticorpo (*1x Biotinylated detection antibody*) foram adicionados em cada poço e as placas foram incubadas por mais 1 hora a 37°C. Posteriormente, os poços foram lavados cuidadosamente por três vezes com 300µl de tampão de lavagem (*wash buffer*) fornecido pelo *kit*. Logo após, 100µl do reagente *HRP-conjugate* foram adicionados a cada poço e as placas foram novamente incubadas a 37°C por 30 minutos adicionais. A seguir, uma nova etapa de 5 lavagens foi executada seguindo os mesmos passos descritos anteriormente. Após, 90µl do reagente de substrato (*TBM Substrate*) foram adicionados aos poços, seguidos de 15-20 minutos de incubação no escuro a 37°C. Ao final, 50µl de solução de parada (*Stop solution*) foram adicionados e as placas foram lidas em leitora de placas em comprimento de onda de 450nm (Microplaca Labtec - LT4000).

Ainda, seguindo os mesmos passos conforme descrito anteriormente uma curva padrão foi realizada com o reagente (*Standard lyophilized*) usando 4000pg/ml em 1.0 ml de diluente de amostra, ambos provenientes do *kit* (LS-F23768). Foi feita uma diluição em série (4000 pg/ml, 2000 pg/ml, 1000 pg/ml, 500 pg/ml, 250 pg/ml, 125 pg/ml, 62,5 pg/ml) e partir dela foi determinada a concentração da proteína nas amostras de plasma de cada um dos grupos. Ainda, juntamente a essa etapa, também foi preparada uma curva de diluição de uma amostra de plasma como controle para checagem da melhor concentração para ser utilizada no experimento (1:1, 1:10, 1:100, 1:100, 1:1k, 1:10k, 1:100k, 1:1000k e 1:10.000k) e posteriormente o ensaio foi conduzido. No caso, a concentração de amostra que melhor se inseriu na curva padrão foi de 1:100.

3.8 Quantificação de proteínas totais e da ADAM10

A quantificação de proteínas totais foi determinada através do método *Pierce BCA* (*kit Thermo Scientific 23227* | lote TK274305), a partir de 10µl de amostra de plasma pobre em plaquetas aplicados em placa de 96 poços. A leitura da absorbância foi realizada no equipamento *BioTek Synergy™ HI* em 540nm. Em seguida, após a concentração de proteínas

totais das amostras ser determinada, a quantificação dos níveis de ADAM10 foi realizada utilizando a técnica de análise por SDS-PAGE (*Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) seguida por *western blotting*.

3.9 SDS-PAGE e *Western Blotting*

Para obter quantidade proteica de 10µg/µl, as amostras de plasma pobre em plaquetas foram diluídas 10x e então misturadas com 7,5µl de tampão de amostra para SDS-PAGE [950µl Tampão 2x *Laemmli Sample Buffer* e 50µl de Beta-mecaptoetanol]. Em seguida as amostras foram fervidas por 5 minutos a 100°C em banho seco, e posteriormente, 15µl do preparo foram aplicados em gel de poliacrilamida (10%) [Tris 1,5M pH 8.8, SDS 10%, acrilamida 30%, água mili-Q, Temed e PSA 10%]. Um volume de 8µl do marcador padrão (*Precision Plus Protein™ Kaleidoscope*) foi utilizado em todas as corridas para marcação posterior das massas moleculares das proteínas. As corridas de eletroforese foram realizadas com duração média de 90 minutos a 100V (volts) constantes. Em seguida as proteínas presentes nos géis foram transferidas para membranas de nitrocelulose (*BioRad*) através do sistema de transferência úmida em tampão de Tris-base (25mM), glicina (92mM) e metanol (20%) a 70V (volts) a 4°C por 2 horas. Para confirmar a eficácia da transferência e identificação do controle endógeno (albumina plasmática), as membranas de nitrocelulose foram coradas com Ponceau [Ponceau 0,5% (m/v) em ácido acético 0,1% (v/v)]. Em seguida, as membranas foram incubadas por 1 hora e 30 minutos em solução de bloqueio (*1x TBS 1% Casein Blocker*) em temperatura ambiente. Posteriormente, após 3 etapas de lavagens em TBST por 5 minutos cada, as membranas foram incubadas *overnight* em geladeira a 4°C, com o anticorpo primário **anti-ADAM10** (*Ab39180 rabbit, 1:1000 em 1x TBS 1% Casein Blocker*). Na sequência, as membranas passaram pela etapa de incubação com anticorpo secundário (*Ab97051 rabbit, 1:2000 em 1x TBS 1% Casein Blocker*) por 1 hora em temperatura ambiente. As etapas de bloqueio e incubação nos anticorpos ocorreram em plataforma agitadora. Para a revelação das bandas de proteínas foi aplicado o protocolo do *kit Clarity Western ECL Substrate (BioRad)* e o leitor de imagem *ChemiDoc™ MP Imaging System (BioRad)*. O uso da albumina como controle endógeno é recorrente e muito utilizado na literatura e além desta, ainda foi utilizada uma amostra de plasma de um controle jovem (CJ), seguindo as mesmas etapas já descritas, a qual foi aplicada em todos os géis para minimizar as variações analíticas do experimento. Ressalta-se que todas as amostras foram realizadas em duplicata.

3.10 Densitometria das bandas

Ao final da revelação das membranas, as bandas correspondentes à marcação dos anticorpos foram mensuradas com auxílio do software *Image Lab 6.1 (BioRad)*. Foi empregado o volume ajustado das bandas como parâmetro para análise, que expressa o volume total de pixels, reduzindo do *background*. Os valores finais de absorvância das bandas foram obtidos a partir da razão entre as médias da ADAM10 pelas médias da albumina de todos os grupos (Controle, DA, DM2 e DA+DM2), incluindo o CJ. Na sequência os valores obtidos dos grupos foram divididos pelo CJ, para maior normalização dos dados. A quantificação das amostras foi realizada por análise cega dos indivíduos.

3.11 Análise Estatística

Os resultados obtidos na técnica de ELISA e nos experimentos de *western blotting* foram planilhados utilizando o *software Microsoft Excel*. As análises estatísticas e os gráficos referentes aos dois experimentos foram feitos a partir do *software GraphPad Prism 9*. A normalidade dos dados foi verificada por meio do teste de *Kolmogorov-Smirnov*. Os dados foram comparados utilizando o teste ANOVA One-Way, seguido do teste de comparação múltipla de Fisher LSD, para comparação entre os grupos. Do mesmo modo, todos os sujeitos que apresentaram valores anormais, com grandes divergências nos dados dos demais, denominados como *outliers*, após serem identificados pelo *software*, foram excluídos. O nível de significância adotado para os testes estatísticos foi de 5%, ou seja, $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1 Dados socioeconômicos, clínicos e avaliação cognitiva

Os dados socioeconômicos, descritos na Tabela 2, mostram que a amostra do estudo foi composta majoritariamente pelo sexo feminino (58%) com idades entre 73,3 a 83,7 anos, sendo os idosos mais velhos participantes do grupo DA (83.7 ± 5.9), o qual também apresentou tempo de escolaridade maior em relação aos demais (7.2 ± 6.3). Na análise econômica, a maioria dos participantes (28%) se concentrou na faixa de 1 a 2 salários-mínimos, embora uma grande parcela (36%) não tenha declarado qualquer informação sobre essa categoria. O uso de medicações para as doenças foi maior no grupo com presença concomitante de DA e DM2 (100%), porém observa-se números próximos em idosos do grupo DA e idosos do grupo DM2 em comparação ao grupo controle. Em relação as comorbidades associadas, todos os grupos apresentaram HA, com mais casos nos grupos DM2 e DA+DM2 (67% em ambos), já a dislipidemia foi menos relatada e teve a maioria dos casos no grupo DM2 (44%). Como esperado, as pontuações obtidas no MEEM foram menores nos grupos dos idosos com DA e com a presença concomitante de ambas as comorbidades (11 ± 9.47 e 12 ± 8.3 respectivamente), já em relação ao CDR observa-se que no grupo DA a amostra é composta por sujeitos classificados no CDR1, CDR2 e CDR3, ou seja, o grupo é formado por casos de DA leve, moderada e avançada. Curiosamente, o grupo DA+DM2 teve grande presença de indivíduos na classificação CDR1 (Tabela 2).

Tabela 2. Dados de caracterização sócio demográficos e clínicos dos participantes.

Variável	Controle n (%)	DA n (%)	DM2 n (%)	DA+DM2 n (%)	Total n (%)
Sexo					
Total	9 (25)	9 (25)	9 (25)	9 (25)	36 (100)
Feminino	6 (67)	5 (56)	6 (67)	4 (44)	21 (58)
Masculino	3 (33)	4 (44)	3 (33)	5 (56)	15 (42)
Faixa etária					
60-69 anos	1 (11)	0 (0)	3 (33)	2 (22)	6 (17)
70-79 anos	5 (56)	2 (22)	4 (44)	4 (44)	15 (42)
80-89 anos	3 (33)	5 (56)	2 (22)	3 (33)	13 (36)
90 anos ou mais	0 (0)	2 (22)	0 (0)	0 (0)	2 (6)
Escolaridade					
Nenhum	0 (0)	0 (0)	2 (22)	0 (0)	2 (6)
1-4 anos	7 (78)	6 (67)	4 (44)	7 (78)	24 (67)
5-8 anos	1 (11)	1 (11)	1 (11)	1 (11)	4 (11)
9 anos ou mais	1 (11)	2 (22)	2 (22)	1 (11)	6 (17)
Renda do Idoso					
De 1/2 a 1 salário mínimo	1 (11)	1 (11)	0 (0)	2 (22)	4 (11)
De 1 a 2 salários mínimos	5 (56)	1 (11)	3 (33)	1 (11)	10 (28)
De 2 a 3 salários mínimos	1 (11)	3 (33)	0 (0)	0 (0)	4 (11)
De 3 a 4 salários mínimos	1 (11)	1 (11)	1 (11)	0 (0)	3 (8)
Acima de 4 salários mínimos	1 (11)	1 (11)	0 (0)	0 (0)	2 (6)
Não aceitou declarar	0 (0)	2 (22)	5 (56)	6 (67)	13 (36)
Usa medicamentos para diabetes mellitus					
sim	0 (0)	0 (0)	6 (67)	9 (100)	15 (42)
não	9 (100)	9 (100)	3 (33)	0 (0)	21 (58)
Usa medicamentos para doença de Alzheimer					
sim	0 (0)	9 (100)	0 (0)	9 (100)	18 (50)
não	9 (100)	0 (0)	9 (100)	0 (0)	18 (50)
HA					
sim	3 (33)	4 (44)	6 (67)	6 (67)	19 (53)
não	6 (67)	5 (56)	3 (33)	3 (33)	17 (47)
Dislipidemia					
sim	0 (0)	1 (11)	4 (44)	2 (22)	7 (19)
não	9 (100)	8 (89)	5 (56)	7 (78)	29 (81)

Tabela 2. Dados de caracterização sócio demográficos e clínicos dos participantes (continuação).

MEEM					
Menos que 17 pontos	0 (0)	4 (44)	0 (0)	7 (78)	11 (31)
17 pontos ou mais	0 (0)	2 (22)	0 (0)	0 (0)	2 (6)
22 pontos ou mais	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
24 pontos ou mais	4 (44)	0 (0)	2 (22)	2 (22)	8 (22)
26 pontos ou mais	5 (56)	0 (0)	4 (44)	0 (0)	9 (25)
30 pontos	0 (0)	0 (0)	3 (33)	0 (0)	3 (8)
Não pontuou	0 (0)	3 (33)	0 (0)	0 (0)	3 (8)
CDR					
0 ponto	9 (100)	0 (0)	9 (100)	0 (0)	18 (50)
0,5 ponto	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
1 ponto	0 (0)	4 (44)	0 (0)	7 (78)	11 (31)
2 pontos	0 (0)	2 (22)	0 (0)	2 (22)	4 (11)
3 pontos	0 (0)	3 (33)	0 (0)	0 (0)	3 (8)

Composição dos grupos pelas variáveis: sexo, faixa etária, escolaridade, renda e dados clínicos sobre o uso de medicação, presença de HA (hipertensão arterial), presença de dislipidemia, pontuação MEEM (Mini-Exame do Estado Mental) e CDR (*Clinical Dementia Rating*), para os grupos controle, DA (Doença de Alzheimer), DM2 (Diabetes Mellitus tipo 2) e DA+DM2 (Doença de Alzheimer e Diabetes Mellitus tipo 2).

4.2 Níveis da ADAM10 plasmática em idosos dos grupos controle, doença de Alzheimer, diabetes mellitus tipo 2 e presença concomitante de doença de Alzheimer e diabetes mellitus tipo 2.

4.2.1 Determinação por *Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay* (ELISA)

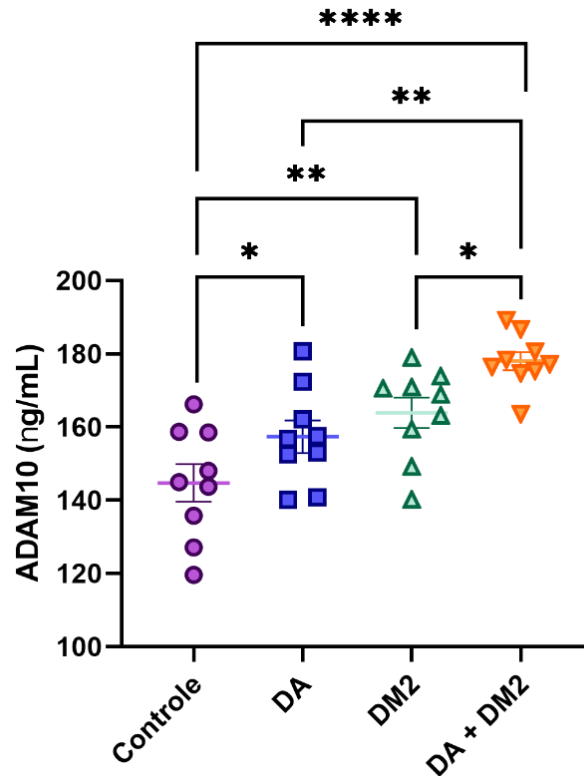
A figura 4 ilustra os resultados obtidos por meio da técnica de ELISA. A tabela 3 apresenta os dados descritivos dos dados obtidos por meio da quantificação de ADAM10 plasmática no ensaio de ELISA nos diferentes grupos.

Tabela 3. Análise descritiva dos valores obtidos a partir da quantificação de ADAM10 plasmática por ELISA, entre os grupos avaliados.

	Controle	DA	DM2	DA+DM2
Valores	9	9	9	9
Mínimo	119.6	140.1	140.2	163.5
Percentil 25%	131.5	146.7	154.3	175.0
Mediana	144.9	156.8	168.9	177.2
Percentil 75%	158.6	167.3	172.4	183.7
Máximo	166.2	180.7	179.0	189.2
Média	144.7	157.3	163.9	178.0
Desvio Padrão	15.34	13.28	12.46	7.408
Erro padrão da média	5.114	4.426	4.153	2.469
Intervalo de confiança (CI 95%) inferior da média	133.0	147.1	154.3	172.3
Intervalo de confiança (CI 95%) superior da média	156.5	167.5	173.5	183.7
Soma	1303	1416	1475	1602

Análise descritiva dos valores de ADAM10 plasmática por ELISA, realizado no programa Graph Pad Prism 9.

Figura 4. Gráfico de dispersão representativo dos níveis de ADAM10 em indivíduos saudáveis (controle), com doença de Alzheimer (DA), com diabetes mellitus (DM2) e com presença concomitante de doença de Alzheimer e diabetes mellitus (DA+DM2). As amostras foram analisadas por ensaio de ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), utilizando o kit descrito na metodologia. Os grupos foram comparados por ANOVA one-way (Controle vs DA* $p = 0,0399$; Controle vs DM2 ** $p = 0,027$; Controle vs DA+DM2 **** $p = 0,0001$; DA vs DA+DM 2** $p = 0,0013$; DM2 vs DA+DM 2* $p = 0,0222$).



Os resultados dos experimentos de ELISA mostraram que os níveis de ADAM10 plasmática estão elevados de forma significativa em idosos com DA+DM2 em comparação aos grupos de idosos controles, idosos com DA e idosos com DM2, com a maior diferença observada entre DA+DM2 em comparação ao controle. Os níveis da proteína também diferiram em idosos com DA e idosos com DM2 em relação ao grupo controle.

4.2.2 Determinação por *western blotting*

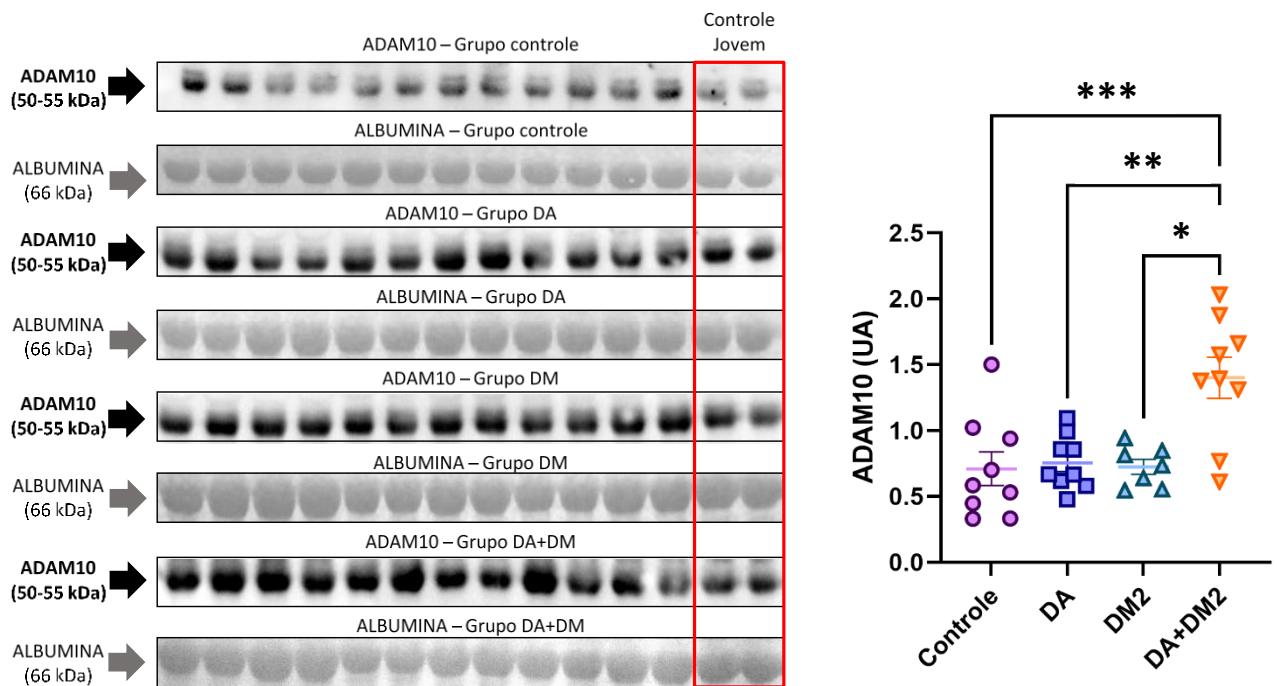
A figura 5 ilustra as imagens referentes as membranas obtidas por meio da técnica de *western blotting*. A ADAM10 plasmática apresenta massa molecular de aproximadamente 50kDa. A albumina correspondente a cada indivíduo está representada com massa molecular superior à da ADAM10 em 66kDa. A tabela 4 apresenta os dados descritivos dos dados obtidos por meio da quantificação das bandas de ADAM10 plasmática nos diferentes grupos.

Tabela 4. Análise descritiva dos valores obtidos a partir da quantificação das bandas de ADAM10 plasmática por *western blotting*, entre os grupos avaliados.

	Controle	DA	DM2	DA+DM2
Valores	9	9	7	9
Mínimo	0,3297	0,4780	0,5445	0,6112
Percentil 25%	0,3895	0,5984	0,5538	1,040
Mediana	0,5853	0,6667	0,7334	1,393
Percentil 75%	0,9804	0,9242	0,8474	1,769
Máximo	1,501	1,093	0,9435	2,033
Média	0,7097	0,7560	0,7247	1,401
Desvio Padrão	0,3841	0,2041	0,1528	0,4686
Erro padrão da média	0,1280	0,06802	0,05774	0,1562
Intervalo de confiança (CI 95%) inferior da média	0,4144	0,5991	0,5834	1,041
Intervalo de confiança (CI 95%) superior da média	1,005	0,9128	0,8660	1,761
Soma	6,387	6,804	5,073	12,61

Análise descritiva dos valores de ADAM10 plasmática por *western blotting*, realizado no programa Graph Pad Prism 9.

Figura 5. Imagens referentes as membranas representativas resultantes dos experimentos de western blotting e respectivo gráfico de dispersão com a quantificação das bandas correspondentes à ADAM10 plasmática. Membranas representativas contendo as amostras de plasma diluídas em 10x dos sujeitos dos grupos controle, doença de Alzheimer (DA), diabetes mellitus tipo 2 (DM2) e presença concomitante de doença de Alzheimer e diabetes mellitus (DA+DM2). Os níveis da ADAM10 estão representados nas bandas de 50-55kDa e albumina (controle endógeno) com 66 kDa. O gráfico mostra a razão da ADAM10/albumina para os grupos avaliados. Teste ANOVA one-way realizado no GraphPad Prism 9 (Controle vs DA+ DM2 *** $p = 0,0001$; DA vs DA+DM2 ** $p = 0,0003$; DM vs DA+DM2 * $p = 0,0004$).



Os resultados mostraram, portanto, que os níveis de ADAM10 plasmática estão aumentados em idosos com DA+DM2 em comparação com os idosos do grupo controle, idosos do grupo DM2 e do grupo DA, de forma que se observou a maior diferença estatística entre o grupo controle quando comparado ao grupo DA+DM2 ($p = 0,0001$).

5. DISCUSSÃO

A busca por biomarcadores periféricos envolvidos nos eventos fisiopatológicos da DA tem ganhado cada vez mais visibilidade entre os pesquisadores da área. Alguns destes biomarcadores já estão estabelecidos no plasma, como a p-tau (KARIKARI; PASCOAL; ASHTON; JANELIDZE *et al.*, 2020; MIELKE; HAGEN; XU; CHAI *et al.*, 2018; PALMQVIST; INSEL; STOMRUD; JANELIDZE *et al.*, 2019; SADALA; RAMOS; OLIVEIRA; FERNANDES *et al.*, 2021), que é capaz de prever a conversão de TNCL para DA em estudos longitudinais (MATTSSON-CARLGREN; JANELIDZE; PALMQVIST; CULLEN *et al.*, 2020; PALMQVIST; TIDEMAN; CULLEN; ZETTERBERG *et al.*, 2021).

Apesar de recente, a investigação no plasma pode ajudar a apoiar o diagnóstico desse tipo de demência, especialmente após o desenvolvimento das plataformas mais sensíveis de detecção que surgiram após 2016, inicialmente para detectar o A β (JANELIDZE; STOMRUD; PALMQVIST; ZETTERBERG *et al.*, 2016), mas que posteriormente identificaram níveis aumentados de diferentes isoformas de p-tau em pessoas com TNCL ou DA (HANSSON, 2021). Diante desses resultados promissores relacionados à p-tau como biomarcadora plasmática para DA, alguns autores preveem que essa proteína será alvo dos primeiros exames de sangue que revolucionarão o diagnóstico da doença, em formato de um teste direto ao consumidor, chamando a atenção para os desafios éticos e sociais associados a estes exames (LARGENT; WEXLER; KARLAWISH, 2021).

Contudo, é improvável que apenas um biomarcador periférico seja utilizado para representar todo o *continuum* da DA. Assim, a ADAM10 se configura como uma biomarcadora complementar plasmática, que poderia compor um conjunto de biomarcadores diagnósticos para a DA, porém observando também o perfil metabólico dos participantes. Os dados obtidos nos experimentos de *western blotting* e principalmente no experimento de ELISA, que apresenta maior sensibilidade, se mostraram de acordo com a hipótese deste estudo, uma vez que assim como o grupo DA, o grupo DM2 também apresentou níveis elevados de ADAM10 plasmática quando comparado com o grupo controle e estes níveis foram ainda maiores quando o plasma de pacientes com ambas as doenças foi analisado. Estes são os primeiros achados relacionados aos níveis desta proteína no plasma sanguíneo de idosos com DA e DM2.

Corroborando com os dados aqui apresentados em relação ao grupo DA, recentemente um estudo do nosso grupo demonstrou que os níveis de ADAM10 estão aumentados tanto no plasma, quanto no LCR de idosos com DA leve em comparação a idosos cognitivamente saudáveis e com comprometimento cognitivo leve amnésico (CCLa) (PEREIRA VATANABE; PERON; MANTELLATTO GRIGOLI; PELUCCHI *et al.*, 2021). Verificou-se

ainda a atividade *in vitro* da proteína em diferentes frações e materiais biológicos, constatando que no plasma a proteína está na forma inativa e solúvel (50 kDa), não atingindo sua principal atividade de protease, que ocorre apenas quando ancorada a membrana plasmática de plaquetas e neurônios (PEREIRA VATANABE; PERON; MANTELLATTO GRIGOLI; PELUCCHI *et al.*, 2021).

Em uma pesquisa que utilizou um sensor eletroquímico para detectar a proteína no plasma, de Oliveira e colaboradores (2020) também encontraram níveis elevados de ADAM10 plasmática em idosos com DA, quando comparado a idosos cognitivamente saudáveis e esses níveis aumentaram de acordo com a progressão da doença. Além de encontrarem diferenças significativas entre os níveis de ADAM10 entre os grupos TNCL e controle, os autores também indicaram ser possível diferenciar idosos saudáveis daqueles com TNCL ou com DA, com 72% de sensibilidade e 100% de especificidade. Em outras palavras, ADAM10 plasmática identificou o estágio inicial de declínio cognitivo antes da manifestação dos sintomas clínicos da DA, bem como foi capaz de monitorar a progressão da doença (DE OLIVEIRA; ERBERELI; MANZINE; MAGALHÃES *et al.*, 2020).

Além de diferenciar os casos de DA, altos níveis de ADAM10 plasmática podem ser um indicativo de declínio cognitivo em idosos inicialmente saudáveis (OLIVEIRA MONTEIRO; SALHEB OLIVEIRA; MANZINE; CRISPIM NASCIMENTO *et al.*, 2021). A partir de dados de um estudo de coorte longitudinal, nosso grupo analisou a nota do MEEM e sua correlação com níveis de ADAM10 no plasma de idosos da comunidade, através de duas avaliações em um período de três anos, com participação de 219 idosos que foram divididos em dois grupos considerando a pontuação do teste em normal ou alterada (OLIVEIRA MONTEIRO; SALHEB OLIVEIRA; MANZINE; CRISPIM NASCIMENTO *et al.*, 2021). Os resultados mostraram que na avaliação de seguimento houve aumento nos níveis da ADAM10, o qual foi acompanhado da diminuição da nota do MEEM no grupo que inicialmente havia apresentado pontuação normal neste questionário. Por outro lado, em idosos com MEEM alterado na linha de base, os níveis da proteína não indicaram mudança na pontuação ao longo do tempo. Portanto, o aumento nos níveis de ADAM10 plasmática pode refletir o início do dano ao sistema cognitivo, uma vez que nesse meio a proteína está inativa e não exerce seu papel de protease (OLIVEIRA MONTEIRO; SALHEB OLIVEIRA; MANZINE; CRISPIM NASCIMENTO *et al.*, 2021).

A relação entre demência e DM2 foi descrita inicialmente no estudo de Rotterdam, que forma uma coorte prospectiva desde 1990 (BRETELIER; VAN DEN OUWELAND; GROBBEE; HOFMAN, 1992). Ao longo de 30 anos o estudo continua, e os participantes

passam por uma avaliação criteriosa a cada 1-2 anos. Uma atualização publicada recentemente (até 2020) mostra os resultados dos últimos 3 anos e observa-se que o diabetes continua sendo considerado um fator modificável para o risco de demência (IKRAM; BRUSSELLE; GHANBARI; GOEDEGEBURE *et al.*, 2020). Porém, apesar da recorrente associação entre DM2 e DA, até o momento existem poucos estudos investigando marcadores fisiopatológicos periféricos da DA em indivíduos com DM2.

Alguns estudos mostraram redução dos níveis plasmáticos de A β 40 e A β 42 em adultos com DM2, e tais níveis apresentaram distribuição bimodal distinta em comparação aos indivíduos controles, o que pode indicar correlação com o DM2 devido a alteração da função renal. Por outro lado, a razão A β 40/A β 42 foi maior nos diabéticos, indicando maior risco de desenvolver a DA (PETERS; DAVIS; TADDEI; MARTINS *et al.*, 2017).

Em um estudo com modelo animal, foi induzida a resistência à insulina em camundongos modificados geneticamente para neuropatologia semelhante a DA, através de uma dieta rica em gordura. Foi verificado que a resistência insulínica provocada acelerou a produção e acúmulo de A β e o comprometimento da memória. Em contrapartida a administração de insulina intravenosa reverteu esses efeitos (VANDAL; WHITE; TREMBLAY; ST-AMOUR *et al.*, 2014).

Este achado pode estar relacionado a regulação da α -secretase, uma vez que a proteína 1 de ligação X-BOX (XBP-1) participa do controle transcricional da ADAM10 e a estimula positivamente em células neuronais. A insulina é um moderador fisiológico de XBP-1 e portanto portanto pode aumentar a atividade transcricional da ADAM10, modulando de forma indireta a formação de A β (PERON; VATANABE; MANZINE; CAMINS *et al.*, 2018; REINHARDT; SCHUCK; GRÖSGEN; RIEMENSCHNEIDER *et al.*, 2014).

Devido a inexistência de pesquisas com idosos com DA e DM2 tendo o plasma como fonte de investigação de níveis de ADAM10, essa pesquisa pode preencher algumas lacunas que permeiam as investigações em torno da doença de Alzheimer, bem como apontam junto com estudos anteriores desta proteína no plasma, que a ADAM10 teria uma aplicabilidade mais assertiva como um biomarcador prognóstico de DA que pode ser agravado pela presença de alterações glicêmicas.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O número de participantes relativamente pequeno devido às dificuldades do recrutamento de participantes do estudo pelo surgimento da pandemia da COVID-19 e o diagnóstico de DM2 por autorrelato, sem parâmetro quantitativo para os níveis glicêmicos ou insulínicos, assim como a participação de idosos em uso de medicação habitual, que podem interferir nos níveis de ADAM10 (PERON; VATANABE; MANZINE; CAMINS *et al.*, 2018), representam algumas das limitações deste estudo. Destaca-se também que não há informações sobre o tempo da doença de DA e DM2 dos participantes, bem como o tempo de uso dos medicamentos, dados importantes para melhor entendimento do estado dessas doenças e sua relação com a ADAM10. Outro fator relevante é a escassez dos dados na literatura sobre ADAM10 plasmática, que delimita comparação com nossos achados, porém evidencia a importância da realização de mais estudos com esse material biológico que é promissor, dado seu processo mais simplificado de obtenção, baixo custo e aplicabilidade em larga escala.

Os resultados deste estudo indicam que alterações na via insulínica podem ser responsáveis pelas mudanças dos níveis de ADAM10, contribuindo para a agravamento da DA quando acompanhada por DM2. Nossos dados podem contribuir com o conhecimento básico acerca das proteínas envolvidas na via não amiloidogênica da DA e, portanto, no entendimento da fisiopatologia da doença em si, bem como no tratamento deste tipo de demência, observando também o estado metabólico dos pacientes.

REFERÊNCIAS

- AMERICAN PSYCHIATRY ASSOCIATION, A. **Manual diagnóstico e estatístico de transtornos mentais: DSM-5**. 5 ed. Porto Alegre: 2014.
- ARNOLD, S. E.; ARVANITAKIS, Z.; MACAULEY-RAMBACH, S. L.; KOENIG, A. M. *et al.* Brain insulin resistance in type 2 diabetes and Alzheimer disease: concepts and conundrums. **Nature reviews. Neurology**, 14, n. 3, p. 168-181, 2018.
- ARTASENSI, A.; PEDRETTI, A.; VISTOLI, G.; FUMAGALLI, L. Type 2 Diabetes Mellitus: A Review of Multi-Target Drugs. **Molecules (Basel, Switzerland)**, 25, n. 8, p. 1987, 2020.
- ASSOCIATION, A. s. 2021 Alzheimer's disease facts and figures. **Alzheimers Dement**, 17, n. 3, p. 327-406, Mar 2021.
- BEDSE, G.; DI DOMENICO, F.; SERVIDDIO, G.; CASSANO, T. Aberrant insulin signaling in Alzheimer's disease: current knowledge. **Front Neurosci**, 9, p. 204, 2015.
- BIESSELS, G. J.; REAGAN, L. P. Hippocampal insulin resistance and cognitive dysfunction. **Nat Rev Neurosci**, 16, n. 11, p. 660-671, Nov 2015.
- 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.
- BRETELER, M. M.; VAN DEN OUWELAND, F. A.; GROBBEE, D. E.; HOFMAN, A. A community-based study of dementia: the Rotterdam Elderly Study. **Neuroepidemiology**, 11 Suppl 1, p. 23-28, 1992.
- BRETON, A.; CASEY, D.; ARNAOUTOGLU, N. A. Cognitive tests for the detection of mild cognitive impairment (MCI), the prodromal stage of dementia: Meta-analysis of diagnostic accuracy studies. **Int J Geriatr Psychiatry**, 34, n. 2, p. 233-242, Feb 2019.
- BRUCKI, S. M.; NITRINI, R.; CARAMELLI, P.; BERTOLUCCI, P. H. *et al.* [Suggestions for utilization of the mini-mental state examination in Brazil]. **Arq Neuropsiquiatr**, 61, n. 3b, p. 777-781, Sep 2003.
- 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. **Mol Med**, 8, n. 2, p. 67-74, Feb 2002.
- DE FELICE, F. G.; LOURENCO, M. V. Brain metabolic stress and neuroinflammation at the basis of cognitive impairment in Alzheimer's disease. **Front Aging Neurosci**, 7, p. 94, 2015.
- DE MELO, D. M.; BARBOSA, A. J. [Use of the Mini-Mental State Examination in research on the elderly in Brazil: a systematic review]. **Cien Saude Colet**, 20, n. 12, p. 3865-3876, Dec 2015.
- DE OLIVEIRA, T. R.; ERBERELI, C. R.; MANZINE, P. R.; MAGALHÃES, 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.

- DOS SANTOS, E. S. M.; MÁXIMO, R. O.; DE ANDRADE, F. B.; DE OLIVEIRA, C. *et al.* Differences in the prevalence of prediabetes, undiagnosed diabetes and diagnosed diabetes and associated factors in cohorts of Brazilian and English older adults. **Public Health Nutr**, 24, n. 13, p. 4187-4194, Sep 2021.
- FETER, N.; LEITE, J. S.; CAPUTO, E. L.; CARDOSO, R. K. *et al.* Who are the people with Alzheimer's disease in Brazil? Findings from the Brazilian Longitudinal Study of Aging. **Rev Bras Epidemiol**, 24, p. e210018, 2021.
- FORMIGA, F.; PEREZ-MARAVAR, M. [Diabetes mellitus type 2 in the elderly. It is essential to know how to personalise the management]. **Med Clin (Barc)**, 142, n. 3, p. 114-115, Feb 4 2014.
- GROUP., B. D. W. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. **Clin Pharmacol Ther**, 69, n. 3, p. 89-95, Mar 2001.
- HANSSON, O. Biomarkers for neurodegenerative diseases. **Nature Medicine**, 27, n. 6, p. 954-963, 2021/06/01 2021.
- HOOPER, N. M.; TURNER, A. J. The search for alpha-secretase and its potential as a therapeutic approach to Alzheimer's disease. **Curr Med Chem**, 9, n. 11, p. 1107-1119, Jun 2002.
- HOU, Y.; DAN, X.; BABBAR, M.; WEI, Y. *et al.* Ageing as a risk factor for neurodegenerative disease. **Nat Rev Neurol**, 15, n. 10, p. 565-581, Oct 2019.
- HWANG, C. L.; LIM, J.; YOO, J. K.; KIM, H. K. *et al.* Effect of all-extremity high-intensity interval training vs. moderate-intensity continuous training on aerobic fitness in middle-aged and older adults with type 2 diabetes: A randomized controlled trial. **Exp Gerontol**, 116, p. 46-53, Feb 2019.
- IBGE. **Brasil: uma visão geográfica e ambiental no início do século XXI**. Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2016.
- IKRAM, M. A.; BRUSSELLE, G.; GHANBARI, M.; GOEDEGEBURE, A. *et al.* Objectives, design and main findings until 2020 from the Rotterdam Study. **Eur J Epidemiol**, 35, n. 5, p. 483-517, May 2020.
- ISAEV, N. K.; STELMASHOOK, E. V.; GENRIKHS, E. E. Neurogenesis and brain aging. **Rev Neurosci**, 30, n. 6, p. 573-580, Jul 26 2019.
- JANELIDZE, S.; STOMRUD, E.; PALMQVIST, S.; ZETTERBERG, H. *et al.* Plasma β -amyloid in Alzheimer's disease and vascular disease. **Sci Rep**, 6, p. 26801, May 31 2016.
- KARIKARI, T. K.; PASCOAL, T. A.; ASHTON, N. J.; JANELIDZE, S. *et al.* Blood phosphorylated tau 181 as a biomarker for Alzheimer's disease: a diagnostic performance and prediction modelling study using data from four prospective cohorts. **Lancet Neurol**, 19, n. 5, p. 422-433, May 2020.
- KRAUS, V. B. Biomarkers as drug development tools: discovery, validation, qualification and use. **Nat Rev Rheumatol**, 14, n. 6, p. 354-362, Jun 2018.
- KUMAR, A.; SIDHU, J.; GOYAL, A.; TSAO, J. W. Alzheimer Disease. *In: StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing LLC., 2021.

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. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 96, n. 7, p. 3922-3927, Mar 30 1999.

LARGENT, E. A.; WEXLER, A.; KARLAWISH, J. The Future Is P-Tau-Anticipating Direct-to-Consumer Alzheimer Disease Blood Tests. **JAMA Neurol**, 78, n. 4, p. 379-380, Apr 1 2021.

LIMA-COSTA, M. F. Aging and public health: the Brazilian Longitudinal Study of Aging (ELSI-Brazil). **Rev Saude Publica**, 52Suppl 2, n. Suppl 2, p. 2s, Oct 25 2018.

MANZINE, P. R.; BARHAM, E. J.; VALE, F. A.; SELISTRE-DE-ARAÚJO, H. S. *et al.* Platelet a disintegrin and metalloproteinase 10 expression correlates with clock drawing test scores in Alzheimer's disease. **Int J Geriatr Psychiatry**, 29, n. 4, p. 414-420, Apr 2014.

MANZINE, P. R.; BARHAM, E. J.; VALE FDE, A.; SELISTRE-DE-ARAÚJO, H. S. *et al.* Correlation between mini-mental state examination and platelet ADAM10 expression in Alzheimer's disease. **J Alzheimers Dis**, 36, n. 2, p. 253-260, 2013.

MANZINE, P. R.; DE FRANCA BRAM, J. M.; BARHAM, E. J.; DO VALE FDE, A. *et al.* ADAM10 as a biomarker for Alzheimer's disease: a study with Brazilian elderly. **Dement Geriatr Cogn Disord**, 35, n. 1-2, p. 58-66, 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. **Biomarkers**, 20, n. 3, p. 196-201, 2015.

MANZINE, P. R.; PELUCCHI, S.; HORST, M. A.; VALE, F. A. C. *et al.* microRNA 221 Targets ADAM10 mRNA and is Downregulated in Alzheimer's Disease. **J Alzheimers Dis**, 61, n. 1, p. 113-123, 2018.

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. **Expert Opin Ther Targets**, 21, n. 11, p. 1017-1026, Nov 2017.

MARKLE-REID, M.; PLOEG, J.; FRASER, K. D.; FISHER, K. A. *et al.* Community Program Improves Quality of Life and Self-Management in Older Adults with Diabetes Mellitus and Comorbidity. **J Am Geriatr Soc**, 66, n. 2, p. 263-273, Feb 2018.

MATTSSON-CARLGREN, N.; JANELIDZE, S.; PALMQVIST, S.; CULLEN, N. *et al.* Longitudinal plasma p-tau217 is increased in early stages of Alzheimer's disease. **Brain**, 143, n. 11, p. 3234-3241, Dec 5 2020.

MIELKE, M. M.; HAGEN, C. E.; XU, J.; CHAI, X. *et al.* Plasma phospho-tau181 increases with Alzheimer's disease clinical severity and is associated with tau- and amyloid-positron emission tomography. **Alzheimers Dement**, 14, n. 8, p. 989-997, Aug 2018.

MONTAÑO, M. B.; RAMOS, L. R. [Validity of the Portuguese version of Clinical Dementia Rating]. **Rev Saude Publica**, 39, n. 6, p. 912-917, Dec 2005.

NAKAMURA, A. E.; OPALEYE, D.; TANI, G.; FERRI, C. P. Dementia underdiagnosis in Brazil. **Lancet**, 385, n. 9966, p. 418-419, Jan 31 2015.

- NATIONS, U. World Population Ageing 2019 : Highlights. DEPARTMENT OF ECONOMIC AND SOCIAL AFFAIRS, P. D. New York: United Nations 2020.
- NGUYEN, T. T.; TA, Q. T. H.; NGUYEN, T. T. D.; LE, T. T. *et al.* Role of Insulin Resistance in the Alzheimer's Disease Progression. **Neurochem Res**, 45, n. 7, p. 1481-1491, Jul 2020.
- NGUYEN, T. T. T., Q. T. H.; NGUYEN, T. K. O.; NGUYEN, T. T. D.; GIAU, V. V. Type 3 Diabetes and Its Role Implications in Alzheimer's Disease. **Int J Mol Sci**, 21, n. 9, Apr 30 2020.
- OLIVEIRA MONTEIRO, M. P. A.; SALHEB OLIVEIRA, D. S. M.; MANZINE, P. R.; CRISPIM NASCIMENTO, C. M. *et al.* ADAM10 plasma levels predict worsening in cognition of older adults: a 3-year follow-up study. **Alzheimers Res Ther**, 13, n. 1, p. 18, Jan 8 2021.
- PALMQVIST, S.; INSEL, P. S.; STOMRUD, E.; JANELIDZE, S. *et al.* Cerebrospinal fluid and plasma biomarker trajectories with increasing amyloid deposition in Alzheimer's disease. **EMBO Mol Med**, 11, n. 12, p. e11170, Dec 2019.
- PALMQVIST, S.; TIDEMAN, P.; CULLEN, N.; ZETTERBERG, H. *et al.* Prediction of future Alzheimer's disease dementia using plasma phospho-tau combined with other accessible measures. **Nat Med**, 27, n. 6, p. 1034-1042, Jun 2021.
- PEREIRA VATANABE, I.; PERON, R.; MANTELLATTO GRIGOLI, M.; PELUCCHI, S. *et al.* ADAM10 Plasma and CSF Levels Are Increased in Mild Alzheimer's Disease. **Int J Mol Sci**, 22, n. 5, Feb 28 2021.
- PERON, R.; VATANABE, I. P.; MANZINE, P. R.; CAMINS, A. *et al.* Alpha-Secretase ADAM10 Regulation: Insights into Alzheimer's Disease Treatment. **Pharmaceuticals (Basel)**, 11, n. 1, Jan 29 2018.
- PETERS, K. E.; DAVIS, W. A.; TADDEI, K.; MARTINS, R. N. *et al.* Plasma Amyloid- β Peptides in Type 2 Diabetes: A Matched Case-Control Study. **J Alzheimers Dis**, 56, n. 3, p. 1127-1133, 2017.
- PETERSEN, M. C.; SHULMAN, G. I. Mechanisms of Insulin Action and Insulin Resistance. **Physiol Rev**, 98, n. 4, p. 2133-2223, Oct 1 2018.
- QIU, C.; FRATIGLIONI, L. Aging without Dementia is Achievable: Current Evidence from Epidemiological Research. **J Alzheimers Dis**, 62, n. 3, p. 933-942, 2018.
- REINHARDT, S.; SCHUCK, F.; GRÖSGEN, S.; RIEMENSCHNEIDER, M. *et al.* Unfolded protein response signaling by transcription factor XBP-1 regulates ADAM10 and is affected in Alzheimer's disease. **Faseb j**, 28, n. 2, p. 978-997, Feb 2014.
- SADALA, D.; RAMOS, V.; OLIVEIRA, D. d. S. M. S. d.; FERNANDES, M. J. d. S. *et al.* Progressos recentes em p-tau como um biomarcador de doença de Alzheimer baseado no sangue. **Revista Neurociências**, 29, n. 0, 08/05 2021.
- SALTIEL, A. R. Insulin signaling in health and disease. **The Journal of clinical investigation**, 131, n. 1, p. e142241, 2021.

- SCHUCK, F.; WOLF, D.; FELLGIEBEL, A.; ENDRES, K. Increase of α -Secretase ADAM10 in Platelets Along Cognitively Healthy Aging. **J Alzheimers Dis**, 50, n. 3, p. 817-826, 2016.
- SHI, L.; BAIRD, A. L.; WESTWOOD, S.; HYE, A. *et al.* A Decade of Blood Biomarkers for Alzheimer's Disease Research: An Evolving Field, Improving Study Designs, and the Challenge of Replication. **J Alzheimers Dis**, 62, n. 3, p. 1181-1198, 2018.
- SINCLAIR, A.; SAEEDI, P.; KAUNDAL, A.; KARURANGA, S. *et al.* Diabetes and global ageing among 65-99-year-old adults: Findings from the International Diabetes Federation Diabetes Atlas, 9(th) edition. **Diabetes Res Clin Pract**, 162, p. 108078, Apr 2020.
- SPINELLI, M.; FUSCO, S.; GRASSI, C. Brain Insulin Resistance and Hippocampal Plasticity: Mechanisms and Biomarkers of Cognitive Decline. 13, n. 788, 2019-July-31 2019. Review.
- STRAIN, W. D.; HOPE, S. V.; GREEN, A.; KAR, P. *et al.* Type 2 diabetes mellitus in older people: a brief statement of key principles of modern day management including the assessment of frailty. A national collaborative stakeholder initiative. **Diabet Med**, 35, n. 7, p. 838-845, Jul 2018.
- SZYBIŃSKA, A.; LEŚNIAK, W. P53 Dysfunction in Neurodegenerative Diseases - The Cause or Effect of Pathological Changes? **Aging Dis**, 8, n. 4, p. 506-518, Jul 2017.
- TIWARI, S.; ATLURI, V.; KAUSHIK, A.; YNDART, A. *et al.* Alzheimer's disease: pathogenesis, diagnostics, and therapeutics. **Int J Nanomedicine**, 14, p. 5541-5554, 2019.
- TOKARZ, V. L.; MACDONALD, P. E.; KLIP, A. The cell biology of systemic insulin function. **The Journal of cell biology**, 217, n. 7, p. 2273-2289, 2018.
- VANDAL, M.; WHITE, P. J.; TREMBLAY, C.; ST-AMOUR, I. *et al.* Insulin reverses the high-fat diet-induced increase in brain A β and improves memory in an animal model of Alzheimer disease. **Diabetes**, 63, n. 12, p. 4291-4301, Dec 2014.
- WHO, W. H. O. Classification of diabetes mellitus Geneva 2019.
- WHO, W. H. O. Global status report on the public health response to dementia Geneva 2021.
- WONG, E.; MARETZKY, T.; PELEG, Y.; BLOBEL, C. P. *et al.* The Functional Maturation of A Disintegrin and Metalloproteinase (ADAM) 9, 10, and 17 Requires Processing at a Newly Identified Proprotein Convertase (PC) Cleavage Site. **J Biol Chem**, 290, n. 19, p. 12135-12146, May 8 2015.
- YUAN, X. Z.; SUN, S.; TAN, C. C.; YU, J. T. *et al.* The Role of ADAM10 in Alzheimer's Disease. **J Alzheimers Dis**, 58, n. 2, p. 303-322, 2017.
- ZETTERBERG, H. Applying fluid biomarkers to Alzheimer's disease. **Am J Physiol Cell Physiol**, 313, n. 1, p. C3-c10, Jul 1 2017.
- ZETTERBERG, H.; BURNHAM, S. C. Blood-based molecular biomarkers for Alzheimer's disease. **Mol Brain**, 12, n. 1, p. 26, Mar 28 2019.
- ZHANG, J.; CHEN, C.; HUA, S.; LIAO, H. *et al.* An updated meta-analysis of cohort studies: Diabetes and risk of Alzheimer's disease. **Diabetes Res Clin Pract**, 124, p. 41-47, Feb 2017.

ZHAO, J.; LIU, X.; XIA, W.; ZHANG, Y. *et al.* Targeting Amyloidogenic Processing of APP in Alzheimer's Disease. **Front Mol Neurosci**, 13, p. 137, 2020.

ZIPSER, B. D.; JOHANSON, C. E.; GONZALEZ, L.; BERZIN, T. M. *et al.* Microvascular injury and blood-brain barrier leakage in Alzheimer's disease. **Neurobiol Aging**, 28, n. 7, p. 977-986, Jul 2007.

APÊNDICES

APÊNDICE 1 – Artigo publicado durante o período do estudo

Oliveira Monteiro et al. *Alzheimer's Research & Therapy* (2021) 13:18
<https://doi.org/10.1186/s13195-020-00750-y>

Alzheimer's
Research & Therapy

RESEARCH

Open Access

ADAM10 plasma levels predict worsening in cognition of older adults: a 3-year follow-up study



Maria Patrícia A. Oliveira Monteiro¹, Danielle S. M. Salheb Oliveira¹, Patrícia R. Manzi¹,
 Carla M. Crispim Nascimento¹, Ariene A. dos Santos Ofandi², Grace A. de Oliveira Gomes¹,
 Fabiana dos Santos Orlandi¹, Marisa S. Zazzetta¹, Henrique Pott-Junior³ and Marcia R. Cominetti^{1*}

Abstract

Background: Blood-based biomarkers for Alzheimer's disease (AD) are highly needed in clinic practice. So far, the gold standards for AD diagnosis are brain neuroimaging and beta-amyloid peptide, total tau, and phosphorylated tau in cerebrospinal fluid (CSF); however, they are not attractive for large-scale screening. Blood-based biomarkers allow an initial large-scale screening of patients under suspicion that could later be tested for the already established CSF biomarkers. To this regard, in this study, we evaluated whether plasma ADAM10 levels would be predictors of declines in cognition in community-dwelling older adults after a 3-year period follow-up.

Methods: This was a 3-year longitudinal cohort study that included 219 community-dwelling older adults. Sociodemographic, clinical, lifestyle, depressive symptoms (GDS), and cognitive data (Mini-Mental State Examination, MMSE; Clock Drawing test, CDT) were gathered. The measurement of ADAM10 plasma levels was performed using a sandwich ELISA kit. Bivariate comparisons between groups were performed using Wilcoxon-Mann-Whitney for continuous data and Pearson's chi-square tests with Yates continuity correction for categorical data. Longitudinal analyses of changes in the MMSE scores were performed using linear mixed-effects modeling.

Results: Baseline MMSE scores and ADAM10 levels were significantly associated with MMSE scores on the follow-up assessment. When analyzing the interaction with time, normal MMSE scores and the ADAM10 plasma levels at baseline presented a significant and independent negative association with MMSE score values on the follow-up assessment. The analyses also showed that the predictive effect of ADAM10 plasma levels on decreasing MMSE scores on follow-up seems to be more pronounced in participants with normal MMSE, when compared with those with altered MMSE scores at baseline.

Conclusions: Considering that ADAM10 increase in plasma is detected as soon as in mild cognitive impairment (MCI) patients, the results presented here may support the complementary clinical use of this biomarker, in addition to the classical AD biomarkers. Taken together, these results provide the first direct evidence that changes in ADAM10 plasma levels are predictors of cognitive worsening in older adults. Moreover, this work can shed light on the study of blood biomarkers for AD and contribute to the advancement of the area.

Keywords: Alzheimer's disease, ADAM10, Biomarker, Blood, Cognition, Dementia

* Correspondence: mcominetti@fncar.br

¹Department of Gerontology, Federal University of São Carlos (UFSCar), Rodovia Washington Luís, km 235, São Carlos, SP 13565-905, Brazil
 Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s) 2021. **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated in a credit line to the data.

APÊNDICE 2 – Artigo publicado durante o período do estudo



Recent progresses on p-tau as a blood-based Alzheimer's disease biomarker

Progressos recentes em p-tau como um biomarcador de doença de Alzheimer baseado no sangue

Progresos recientes en p-tau como biomarcador de la enfermedad de Alzheimer en sangre

Danyelle Sadala^{1*}, Victoria Ramos^{1*}, Danielle dos Santos Maia Salheb de Oliveira², Maria José da Silva Fernandes¹, Marcia Regina Cominetti²

1.Universidade Federal de São Paulo, Department of Neurology and Neurosurgery, São Paulo-SP, Brazil.
2.Universidade Federal de São Carlos, Department of Gerontology, São Carlos-SP, Brazil.
*Both authors equally contributed to this work

Resumo

Introdução. A hipótese de cascata amiloide propõe que as placas senis extracelulares - em grande parte compostas por peptídeos beta-amiloide (A β) agregados - são responsáveis pelas eventos que levam à morte neuronal que ocorre na doença de Alzheimer (DA). Por outro lado, a proteína tau hiperfosforilada (p-tau) e desestruturada é responsável pelas emaranhadas neurofibrilares intracelulares, também comuns na DA. Os critérios de diagnóstico clínico para DA incluem testes dos biomarcadores A β e p-tau no líquido cefalorraquidiano (LCR), além de medidas de neuroimagem, história clínica e testes psicométricos. No entanto, devido à sua natureza invasiva, efeitos colaterais e necessidade de pessoal treinado em ambiente hospitalar para sua coleta, os biomarcadores de LCR não são adequados para triagem em larga escala. Portanto, biomarcadores alternativos baseados no sangue estão sob intensa investigação. **Objetivos.** Enfoque os avanços recentes em diferentes isoformas de p-tau como biomarcadores para DA baseados no sangue. **Método.** Revisão realizada por buscas nas bases de dados Medline/PubMed. **Resultados.** As isoformas 181 e 217 de p-tau representam moléculas acessíveis e escaláveis para triagem e diagnóstico de DA, principalmente devido à sua capacidade de diferenciar pacientes com a doença de participantes cognitivamente saudáveis. **Esses resultados** devem ser reproduzidos em coortes maiores e mais representativas da diversidade populacional. **Conclusões.** Essa revisão fornece uma exploração mais abrangente de p-tau sanguínea como um biomarcador molecular específico para DA, o que poderia contribuir não apenas para a triagem de pacientes pré-sintomáticos para análise clínica, mas também para monitorar a progressão da doença e avaliar terapias modificadoras de doença.

Unitermos. Doença de Alzheimer; biomarcadores; sangue; plasma; p-tau; tau

Abstract

Introduction. The amyloid cascade hypothesis proposes that extracellular senile plaques - largely composed of aggregated beta-amyloid (A β) peptides - are responsible for the events that lead to neuronal death that occurs in Alzheimer's disease (AD). On the other hand, the hyperphosphorylated (p-tau) and unstructured tau protein is responsible for intracellular neurofibrillary tangles, also common in AD. Clinical diagnostic criteria for AD include A β and p-tau biomarker tests in cerebrospinal fluid (CSF), in addition to neuroimaging measures, clinical history, and psychometric tests. However, due to their invasive nature, side effects and need for trained personnel in a hospital environment for their collection, CSF biomarkers are not suitable for large-scale screening. Therefore, alternative blood-based biomarkers are under intense investigation. **Objective.** Focus on recent advances in different p-tau isoforms as blood-based AD biomarkers. **Method.** Review performed by searches in Medline/PubMed databases. **Results.** The p-tau isoforms 181 and 217 represent accessible and scalable molecules for screening and diagnosing AD, mainly due to their ability to differentiate patients with the disease from cognitively healthy participants. These results should be reproduced in

APÊNDICE 3 – Artigo publicado durante o período do estudo



Poluição do ar e sua relação com a epilepsia

Air pollution and its relationship to epilepsy

La contaminación del aire y su relación con la epilepsia

Constanza Rocha Jaures¹, Danielle dos Santos Maia Salheb de Oliveira², Marcia Regina Cominetti², Maria José da Silva Fernandes¹

1. Universidade Federal de São Paulo, Departamento de Neurologia e Neurocirurgia, Disciplina de Neurociência, São Paulo-SP, Brasil.

2. Universidade Federal de São Carlos, Departamento de Gerontologia, São Carlos-SP, Brasil.

Resumo

Introdução. A epilepsia é considerada uma doença neurológica que afeta mais de 50 milhões de pessoas no mundo. É caracterizada pela manifestação de crises epilépticas que são eventos com atividade transitória, autolimitada, com sinais e sintomas definidos, podendo se expressar de diversas formas e depender do área de início no sistema nervoso central. Há estudos na literatura mostrando que o material particulado (MP) em suspensão na poluição do ar é uma ameaça à saúde, podendo afetar o cérebro além de outros órgãos, e causar alterações moleculares e bioquímicas que promovem a piora de crises epilépticas. **Objetivo.** Apresentar as principais evidências reportadas na literatura sobre os riscos de poluição do ar para a saúde, como afeta o sistema nervoso central, e possíveis riscos para pessoas com epilepsia. **Método.** Revisão não sistemática empregando as palavras-chaves "Poluição do ar", "material particulado", "Epilepsia" e "Doença neurodegenerativa". **Resultados.** Foram utilizadas 24 manuscritos científicos, em inglês e português, para a confecção deste artigo. **Conclusão.** A poluição do ar representa um fator de risco para o aumento de crises em pacientes com epilepsia pelo fato de ativar mecanismos que modulam a excitabilidade neuronal (neuroinflamação) levando a uma piora na expressão das crises.

Unitermos. Poluição do ar; material particulado; epilepsia; doença neurodegenerativa

Abstract

Introduction. Epilepsy is considered a neurological disease that affects more than 50 million people worldwide. It is characterized by the manifestation of epileptic seizures, which are events with transient, self-limited activity, with defined signs and symptoms, and can be expressed in various ways depending on the area of onset in the central nervous system. There are many studies in the literature showing that particulate matter (PM) suspended in air pollution is harmful to health, affecting the brain in addition to other organs, and causing molecular and biochemical changes that promote the worsening of epileptic seizures. **Objective.** To present the main evidence reported in the literature on the health risks of air pollution, how it affects the central nervous system, and possible risks for people with epilepsy. **Method.** Non-systematic review using the keywords "Air pollution", "particulate matter", "Epilepsy" and "Neurodegenerative disease". **Results.** We used 24 scientific reports to prepare this review, in English and Portuguese, and neuroinflammation was one of the mechanisms associated with worsening of seizures. **Conclusion.** Air pollution can be a risk factor for increased seizures in patients with epilepsy because it activates mechanisms that modulate neuronal excitability (neuroinflammation) leading to a worsening in the expression of seizures. **Keywords.** Air pollution; particulate matter; epilepsy; neurodegenerative disease

Resumen

Introducción. La epilepsia se considera una enfermedad neurológica que afecta a más de 50 millones de personas en todo el mundo. Se caracteriza por la manifestación de crisis epilépticas, que son eventos con actividad transitoria, autolimitada, con signos y síntomas definidos, y pueden expresarse de diversas formas dependiendo del área de inicio en el sistema

APÊNDICE 4 – Imagens representativas das membranas referentes aos experimentos de *western blotting*

Imagem 1 a. Imagem representativa da membrana referente aos níveis da ADAM10 de indivíduos do grupo controle.

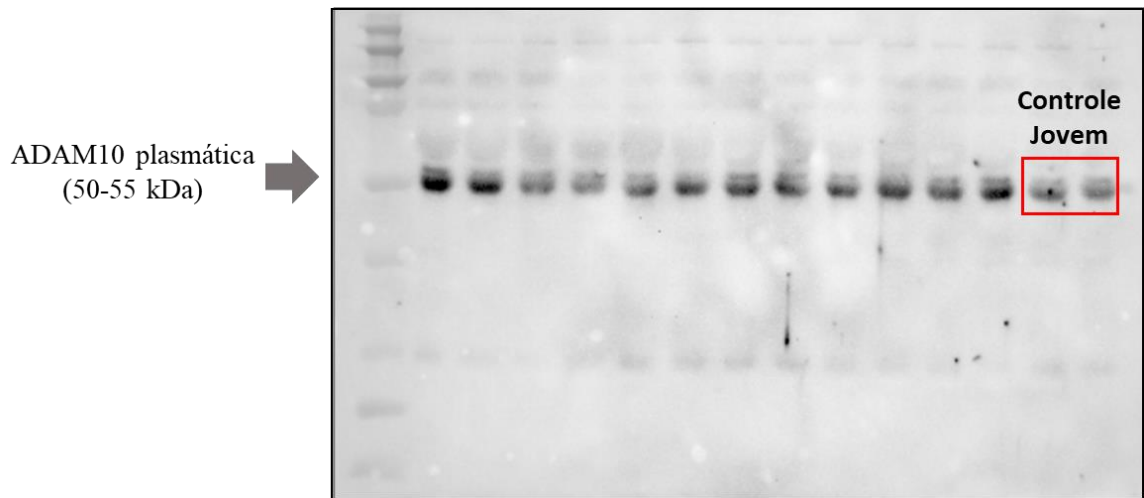


Imagem 1 b. Imagem representativa da membrana referente ao controle endógeno (albumina) da imagem 1 a.

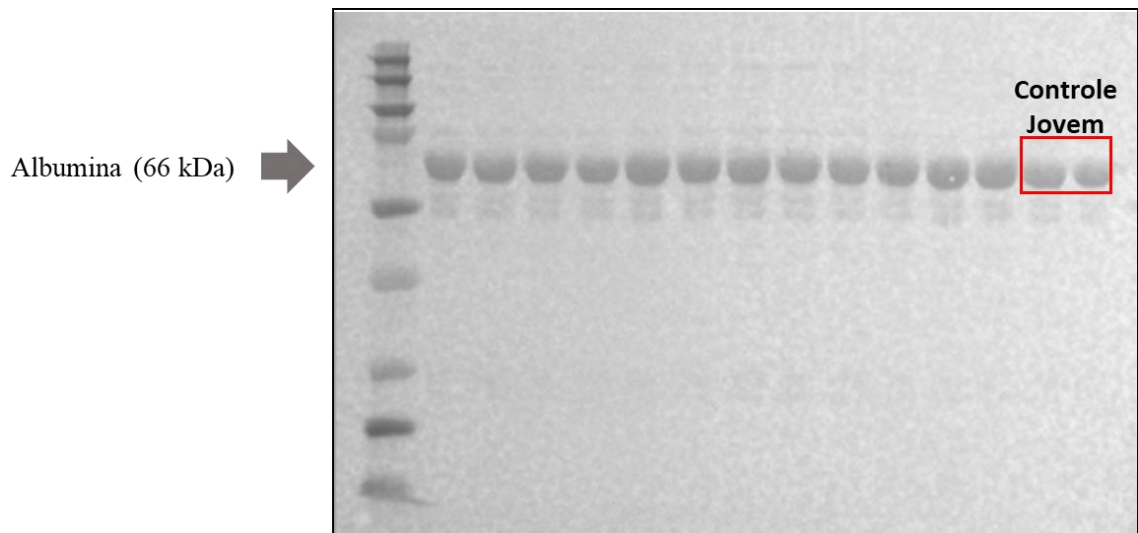


Imagem 2 a. Imagem representativa da membrana referente aos níveis da ADAM10 de indivíduos do grupo doença de Alzheimer.

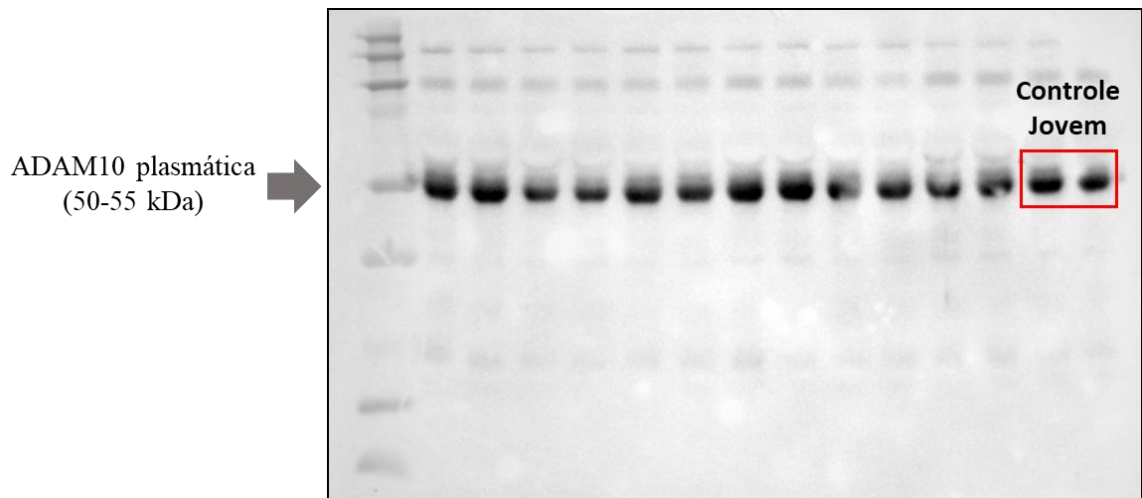


Imagem 2 b. Imagem representativa da membrana referente ao controle endógeno (albumina) da imagem 2 a.

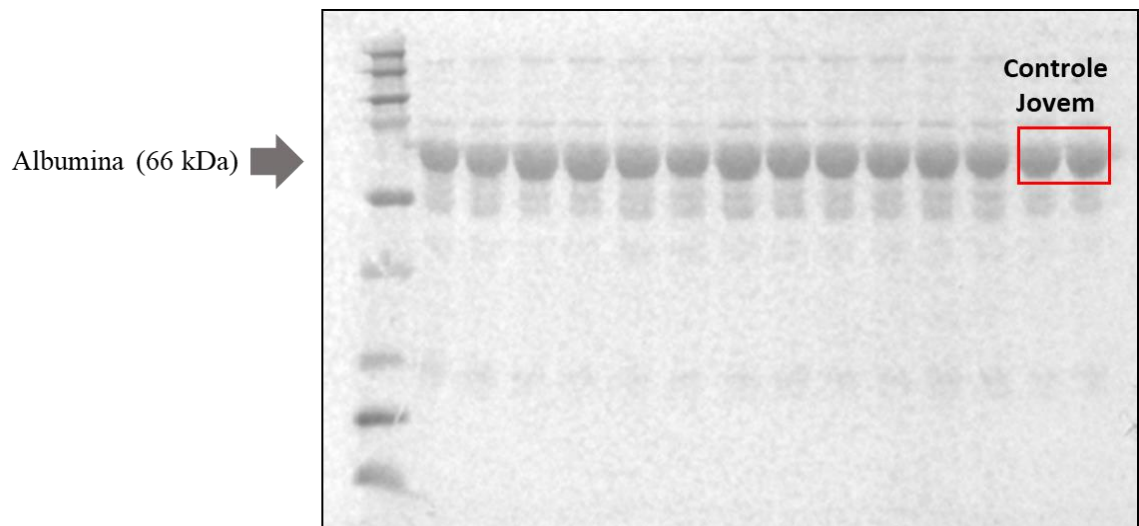


Imagem 3 a. Imagem representativa da membrana referente aos níveis da ADAM10 de indivíduos do grupo diabetes mellitus tipo 2.

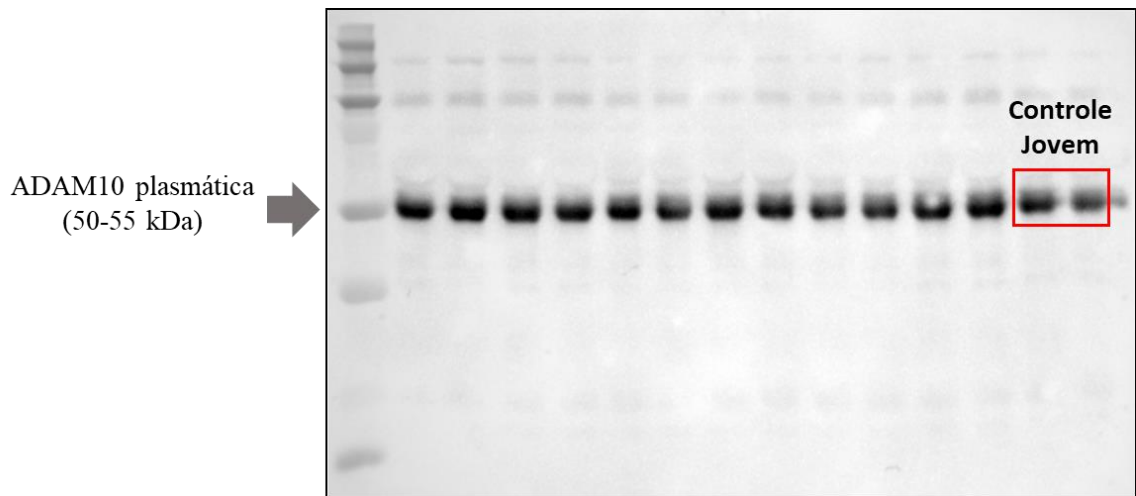


Imagem 3 b. Imagem representativa da membrana referente ao controle endógeno (albumina) da imagem 3 a.

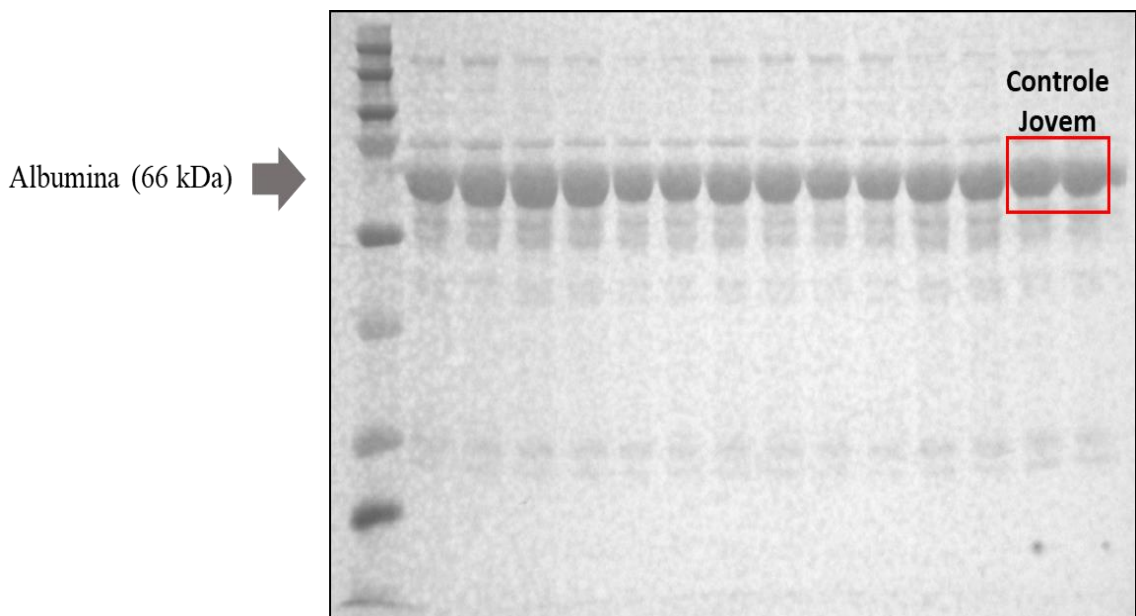


Imagem 4 a. Imagem representativa da membrana referente aos níveis da ADAM10 de indivíduos do grupo com presença concomitante de doença de Alzheimer e diabetes mellitus tipo 2.

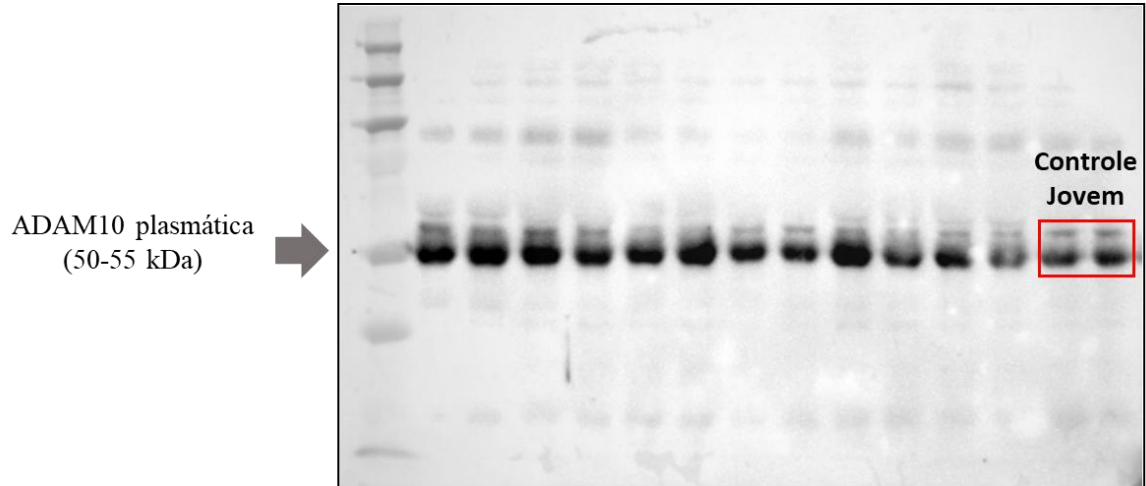
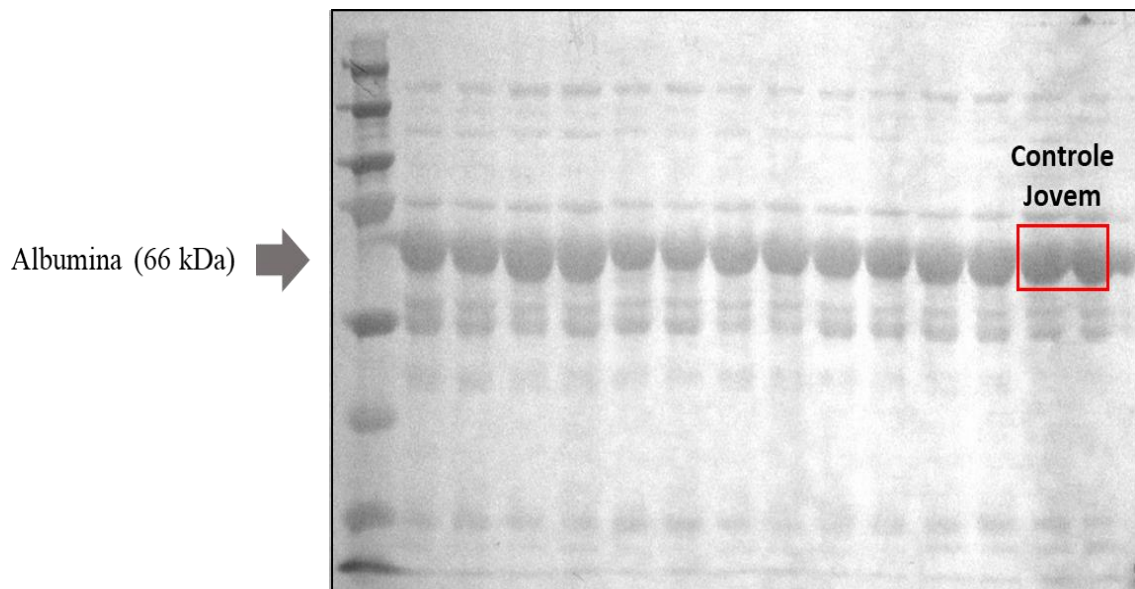


Imagem 4 b. Imagem representativa da membrana referente ao controle endógeno (albumina) da imagem 4 a.



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 ^{1/3} salário mínimo (R\$ 499,00)
 De ^{1/3} 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 – Clinical Dementia Rating (CDR)

CDR

Pontuação:

Data: _____

	Nenhuma (0)	Questionável (0,5)	Leve (1)	Moderada (2)	Grave (3)
Azuntor Comunitários	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.
Atividades Domésticas e Passatempos	Vida doméstica, passatempos e interesse intelectuais 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.
Cuidado Pessoal	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.
Julgamento e Resolução de Problemas	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.
Memória	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.
Orientação	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 3 – 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
<p>Orientação Temporal Espacial</p> <p>1. Qual é o (a) Dia da semana? _____ 1 Dia do mês? _____ 1 Mês? _____ 1 Ano? _____ 1 Hora aproximada? _____ 1</p> <p>2. Onde estamos?</p> <p>Local? _____ 1 Instituição (casa, rua)? _____ 1 Bairro? _____ 1 Cidade? _____ 1 Estado? _____ 1</p>	<p>Linguagem</p> <p>5. Aponte para um lápis e um relógio. Faça o paciente dizer o nome desses objetos conforme você os aponta _____ 2</p> <p>6. Faça o paciente. Repetir “nem aqui, nem ali, nem lá”. _____ 1</p> <p>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</p> <p>8. Faça o paciente ler e obedecer ao seguinte: FECHE OS OLHOS. _____ 1</p> <p>09. Faça o paciente escrever uma frase de sua própria autoria. (A frase deve conter um sujeito e um objeto e fazer sentido). (Ignore erros de ortografia ao marcar o ponto) _____ 1</p>
<p>Registros</p> <p>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</p>	<p>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</p>
<p>3. Atenção e cálculo</p> <p>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 solettrar a palavra MUNDO de trás para frente. _____ 5</p>	<p>4. Lembranças (memória de evocação)</p> <p>Pergunte o nome das 3 palavras aprendidas na questão 2. Estabeleça um ponto para cada resposta correta. _____ 3</p>
	