

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE MEDICINA

JESSYKA MARIA DE FRANÇA BRAM MONEZI

**Biomarcadores amiloidogênicos na síndrome de Down**

São Paulo

2023

JESSYKA MARIA DE FRANÇA BRAM MONEZI

**Biomarcadores amiloidogênicos na síndrome de Down**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da  
Universidade de São Paulo para obtenção do título de  
Doutor em Ciências

Programa de Psiquiatria

Orientador: Prof. Dr. Orestes Vicente Forlenza

Coorientador: Leda Leme Talib

São Paulo

2023

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

Preparada pela Biblioteca da  
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Monezi, Jessyka Maria de França Bram  
Biomarcadores amiloidogênicos na síndrome de Down  
/ Jessyka Maria de França Bram Monezi. -- São  
Paulo, 2023.  
Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da  
Universidade de São Paulo.  
Programa de Psiquiatria.  
Orientador: Orestes Vicente Forlenza.  
Coorientadora: Leda Leme Talib.

Descritores: 1.Peptídeo beta-amiloide 2.Doença de  
Alzheimer 3.Secretases da proteína precursora do  
amiloide 4.Síndrome de Down 5.Biomarcadores  
6.Plaquetas 7.Plasma

USP/FM/DBD-184/23

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Monezi JMFB. *Biomarcadores amiloidogênicos na síndrome de Down* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2023.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr.

---

Instituição:

---

Julgamento:

---

Prof. Dr.

---

Instituição:

---

Julgamento:

---

Prof. Dr.

---

Instituição:

---

Julgamento:

---

Prof. Dr.

---

Instituição:

---

Julgamento:

---

***Dedico esse trabalho às pessoas com síndrome de Down bem como aos seus familiares que depositaram confiança, esperança e fé nessa pesquisa, visando o bem-estar futuro de seus entes queridos e da sociedade.***

***Dedico também este trabalho a todos os profissionais envolvidos na construção do Ambulatório de Envelhecimento e síndrome de Down do Instituto de Psiquiatria do HCFMUSP, sob a supervisão do nosso querido orientador, o Dr. Orestes Vicente Forlenza.***

***Por fim, dedico esse trabalho à sociedade científica, para que ele se some às demais pesquisas na área, de modo a contribuir para minimizar as lacunas referentes ao desenvolvimento de uma doença que nos tolhe o que temos de mais precioso: nossas memórias.***

## Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus, por estar sempre ao meu lado.

À minha família, pelo apoio incondicional, pela compreensão nos momentos de ausência e pela preocupação com o meu bem-estar físico e mental ao longo dessa trajetória.

Ao Dr. Orestes Vicente Forlenza, pela orientação, pela paciência e dedicação, pelo amor e carinho que tem por esse projeto e por confiar a mim a responsabilidade de desenvolver parte dessa pesquisa, que lhe brilha aos olhos.

À Dra. Leda Leme Talib, por me ajudar assiduamente na elaboração desse trabalho de maneira profissional e materna.

Às funcionárias do LIM-27, por realizarem a coleta dos pacientes do estudo e o preparo das amostras. Agradeço à Dona Edivani pela dedicação, por todo material do laboratório sempre limpo e organizado, pelo companheirismo e pelos deliciosos cafés. Agradeço também pelo carinho, pelas conversas, pelas risadas e por todo o aprendizado.

Agradeço à Sandra pela amizade, pelo companheirismo e pelo apoio durante as fases de desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço às amigas que fiz no laboratório, Lê, Alanina, Mis, Beidê, Rafa, Mariah, Tami Tami, Augustinho, Cír, Monique e Fernando. Pessoas que deixaram os dias mais alegres e divertidos, bem como proporcionaram ótimos *Brainstorms*.

Agradeço também às pessoas que conheci durante essa trajetória e que se tornaram grandes amigas e confidentes. Obrigada Eli, Dani, Chris, Clau, pelo apoio incondicional em todos os aspectos!

Ao Laboratório de Neurociências – LIM-27, como um todo, por confiar em mim e abrir as portas para que eu pudesse desenvolver o Projeto de Doutorado ora proposto.

A todos que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento desse projeto e aos profissionais do Ambulatório de Envelhecimento e Síndrome de Down do LIM-27 do Instituto de Psiquiatria do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (IPq-HCFMUSP), pois sem eles o recrutamento e a realização de avaliações neuropsicológicas, bem como o consenso diagnóstico simplesmente não teriam ocorrido.

Agradeço também à Eliza e Isabel do Programa de Pós-Graduação do Instituto de Psiquiatria, por sempre torcerem por mim, por se preocuparem com os prazos e me alertarem sobre estes, pelo carinho com que me tratam e por estarem sempre presentes durante o desenvolvimento desse Doutorado.

À Zelinda, por ser solícita e estar sempre presente.

À Denise e ao Lucas, por terem sido essenciais no processo de preparação e envio dos documentos necessários para a emissão de um parecer pelo Comitê de Ética, em todas as instâncias. Obrigada pelo carisma, paciência, disponibilidade e preocupação.

Ao Instituto de Psiquiatria (IPq) pela oportunidade de realizar esse doutorado pelo Programa de Pós-Graduação.

À Associação Beneficente Alzira Denize Hertzog da Silva (ABADHS) pelo financiamento e apoio à pesquisa.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), **processo nº 465412/2014-9**, agência de fomento que financiou parte da pesquisa realizada, possibilitando condições propícias para a realização do projeto.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), **processo nº 2018/13398-6**, agência de fomento que disponibilizou recursos para o desenvolvimento desse doutorado e para a divulgação do mesmo por meio de Congressos.



*“Tudo o que pode fazer ou sonha que pode, comece.  
A audácia contém gênio, poder e magia”*

*W.H.Murray, The Scottish Himalayan Expedition, 1951*

## Normalização Adotada

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journal Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Sistema Integrado de Bibliotecas. *Diretrizes para apresentação de dissertações e teses da USP – Parte IV (Vancouver)*. Elaborado por Vânia Martins Bueno de Oliveira Funaro (coordenadora), Maria Cláudia Pestana, Maria Cristina Cavarette Dziabas, Eliana Maria Garcia, Maria Fátima dos Santos, Maria Marta Nascimento e Suely Campos Cardoso. 3ª ed revisada, ampliada e modificada. São Paulo: Sistema Integrado de Bibliotecas; 2016.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com o *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>20</b>
1.1 <i>Síndrome de Down e envelhecimento .....</i>	<i>20</i>
1.2 <i>Síndrome de Down e doença de Alzheimer .....</i>	<i>23</i>
1.3 <i>Potenciais biomarcadores associados à doença de Alzheimer em Síndrome de Down.....</i>	<i>25</i>
1.3.1 APP.....	27
1.3.2 ADAM10 .....	28
1.3.3 BACE1 .....	29
1.3.4 PSEN1 .....	30
1.3.5 Peptídeo A $\beta$ .....	30
1.4 <i>Justificativa .....</i>	<i>31</i>
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>33</b>
2.1 <i>Objetivo geral.....</i>	<i>33</i>
2.2 <i>Objetivos específicos .....</i>	<i>33</i>
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>34</b>
3.1 <i>Desenho do estudo .....</i>	<i>34</i>
3.2 <i>Casuística .....</i>	<i>34</i>
3.3 <i>Matriz plaquetária.....</i>	<i>36</i>
3.3.1 <i>Obtenção e preparo de plaquetas para determinação de APP.....</i>	<i>37</i>
3.3.2 <i>Obtenção e preparo de plaquetas para determinação de BACE1, ADAM10 e PSEN1 .....</i>	<i>37</i>
3.3.3 <i>Western Blotting e immunoblotting.....</i>	<i>38</i>
3.4 <i>Matriz plasmática .....</i>	<i>40</i>
3.4.1 <i>Obtenção e preparo de plasma para determinação de A<math>\beta</math>.....</i>	<i>41</i>

3.4.2 Luminex® xMAP®.....	41
3.5 Análise estatística .....	42
<b>4 RESULTADOS.....</b>	<b>44</b>
<b>5 DISCUSSÃO .....</b>	<b>54</b>
<b>6 LIMITAÇÕES DO ESTUDO .....</b>	<b>61</b>
<b>7 CONCLUSÕES .....</b>	<b>62</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>63</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>80</b>
<b>APÊNDICES .....</b>	<b>92</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Possibilidades de constituições cromossômicas relacionadas à síndrome de Down .....	21
<b>Figura 2.</b> Clivagem proteolítica da proteína precursora amilóide, APP. ....	24
<b>Figura 3.</b> Progressão de biomarcadores relacionados ao desenvolvimento da DA em pessoas com SD, conforme a faixa etária. ....	26
<b>Figura 4.</b> Estratificação da casuística do estudo. ....	35
<b>Figura 5.</b> Método <i>Western Blotting e Immunoblotting</i> .....	39
<b>Figura 6.</b> Princípio da metodologia Luminex. ....	42
<b>Figura 7.</b> Box plot das concentrações de potenciais biomarcadores entre grupos. ...	48
<b>Figura 8.</b> Árvore de decisão referente à classificação quanto a presença de comprometimento cognitivo.....	53

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Perfil demográfico dos indivíduos. ....	44
<b>Tabela 2.</b> Perfil demográfico dos indivíduos estratificados conforme consenso diagnóstico de comprometimento cognitivo entre pessoas com SD. ....	45
<b>Tabela 3.</b> Perfil demográfico e concentrações de potenciais biomarcadores estratificados conforme consenso diagnóstico de comprometimento cognitivo entre pessoas com SD. ....	47
<b>Tabela 4.</b> Concentrações de potenciais biomarcadores estratificados conforme faixa etária e consenso diagnóstico. ....	49
<b>Tabela 5.</b> Correlação das concentrações dos potenciais biomarcadores entre o grupo controle. ....	51
<b>Tabela 6.</b> Correlação das concentrações dos potenciais biomarcadores entre o grupo SDsd. ....	51
<b>Tabela 7.</b> Correlação das concentrações dos potenciais biomarcadores entre o grupo SDcd. ....	52
<b>Tabela 8.</b> Correlação das concentrações dos potenciais biomarcadores entre o grupo DA. ....	52

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>ADAM</b>	<i>A Disintegrin And Metallopeptidase</i>
<b>ADAM10</b>	<i>A Disintegrin And Metallopeptidase 10</i>
<b>ADRDA</b>	Associação da Doença de Alzheimer e Doenças Relacionadas
<b>AICD</b>	Domínio intracelular de APP
<b>ANCOVA</b>	Análise de Covariância
<b>APAE</b>	Associação de Pais e Amigos dos Excepcionais
<b>APH-1</b>	<i>Anterior pharynx-defective</i>
<b>APP</b>	<i>Amyloid Precursor Protein</i>
<b>APPs<math>\beta</math></b>	Fragmento solúvel da Proteína Precursora Amilóide - $\beta$
<b>APPs<math>\alpha</math></b>	Fragmento solúvel da Proteína Precursora Amilóide - $\alpha$
<b>A<math>\beta</math></b>	<i>Amyloid-beta peptide</i>
<b>BACE1</b>	<i><math>\beta</math>-site APP-cleaving enzyme 1</i>
<b>BACE2</b>	<i><math>\beta</math>-site APP-cleaving enzyme 2</i>
<b>CAMDEX</b>	<i>Cambridge Examination for Mental Disorders in the Elderly</i>
<b>CAMDEX-SD</b>	<i>Cambridge Examination for Mental Disorders of Older People with Down's Syndrome and Others with Intellectual Disabilities</i>
<b>CART</b>	<i>Classification And Regression Tree</i>
<b>CID-10</b>	Classificação Internacional de Doenças e Problemas Relacionados com a Saúde
<b>CTF</b>	Fragmento C-terminal
<b>DA</b>	Doença de Alzheimer
<b>EOAD</b>	<i>Early-onset, familial Alzheimer's disease</i>
<b>FMUSP</b>	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
<b>IBGE</b>	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
<b>IPq – HCFMUSP</b>	Instituto de Psiquiatria do Hospital das Clínicas da FMUSP
<b>KPI</b>	Inibidor de protease do tipo Kunitz

<b>LIM-27</b>	Laboratório de Investigação Médica 27 – Laboratório de Neurociências
<b>NCT</b>	<i>Niscastrin</i>
<b>NINCDS</b>	Instituto Nacional de Doenças Neurológicas e Comunicativas e Acidente Vascular Cerebral
<b>PEN-2</b>	<i>Presenilin enhancer 2</i>
<b>PMSF</b>	<i>Phenylmethanesulfonyl fluoride</i>
<b>PRP</b>	Plasma rico em plaquetas
<b>PSEN1</b>	<i>Presenilin 1</i>
<b>PSEN2</b>	<i>Presenilin 2</i>
<b>rAPP</b>	Razão de Proteína Precursora Amilóide
<b>SD</b>	Síndrome de Down
<b>SDcd</b>	Síndrome de Down com evidência de declínio cognitivo
<b>SDsd</b>	Síndrome de Down sem evidência de declínio cognitivo
<b>SOD1</b>	<i>Superoxide dismutase 1</i>
<b>T21</b>	Trissomia do cromossomo 21
<b>TBS-Tween</b>	<i>Tris-buffered saline – Tween</i>
<b>TCLE</b>	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
<b>UNIFESP</b>	Universidade Federal de São Paulo



## RESUMO

Monezi JMFB. *Biomarcadores amiloidogênicos na síndrome de Down* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2023.

Atualmente, estima-se que 1 a cada 1000 nascidos vivos em todo o mundo apresenta síndrome de Down (SD). Devido as características genéticas dessa síndrome, ela apresenta associação direta com um grupo de manifestações clínicas decorrentes do envelhecimento prematuro, podendo apresentar padrões de comorbidades similares àqueles encontrados em idosos. Portanto, adjunto à maior quantidade de anos vividos, há o aumento do risco de desenvolvimento de doença de Alzheimer (DA) em SD, sobretudo no que diz respeito à interação entre os mecanismos patogênicos relacionados à amiloidogênese cerebral e os fatores inerentes ao envelhecimento prematuro. Dessa maneira, este estudo objetivou investigar marcadores biológicos da DA em amostras de sangue periférico de indivíduos adultos e idosos com SD (n=82) e compará-los com indivíduos com cariótipo normal (n=99), estratificando os grupos de acordo com a presença ou ausência de comprometimento cognitivo. O grupo SD foi subclassificado de acordo com a ocorrência de comprometimento cognitivo e/ou demência, ou seja, 55 SD sem evidência de declínio cognitivo (SDsd) e 27 SD com declínio cognitivo (SDcd). Foram constituídos dois grupos comparativos compostos por indivíduos euploides, sendo 23 idosos com DA (DA) e 76 adultos e idosos com cognição normal (Controle). Os biomarcadores de DA foram determinados em plaquetas e plasma, incluindo a razão de Proteína Precursora Amilóide (rAPP), estabelecida pela proporção entre os peptídeos secretados de 130- e 110kDA (sAPP), a expressão proteica de ADAM10, BACE1 e PSEN1, bem como níveis de A $\beta$ <sub>40</sub>, A $\beta$ <sub>42</sub> e razão entre A $\beta$ <sub>42</sub>/ A $\beta$ <sub>40</sub>. Os resultados demonstraram rAPP aumentada para ambos os grupos com SD em relação aos euploides. Em contrapartida, foi observada menor expressão dos fragmentos APP130 e 110kDa tanto em SDsd quanto em SDcd, sendo que ambos os fragmentos demonstraram níveis entre 6 a 7 vezes menores em SDcd em relação ao SDsd. No tocante às secretases, foi observada redução de expressão de ADAM10, BACE1 e PSEN1 nos indivíduos com SD em relação aos euploides, não havendo diferença entre SDsd e SDcd. A respeito dos grupos euploides, o subgrupo DA apresentou maiores níveis de BACE1 quando comparado ao Controle. No que

cerne ao peptídeo A $\beta$ , foi identificado maior nível plasmático de A $\beta$ <sub>40</sub> e menor razão A $\beta$ <sub>42</sub>/ A $\beta$ <sub>40</sub> para ambos os grupos SDsd e SDcd, em relação ao Controle. Quando analisados por um modelo preditivo de árvore de classificação e regressão (CART), a combinação entre os biomarcadores APP130kDa e a razão A $\beta$ <sub>42</sub>/ A $\beta$ <sub>40</sub>, demonstrou-se relevante para separação entre os grupos quanto ao comprometimento cognitivo, por meio da classificação APP130kDa < 0,9, A $\beta$ <sub>42</sub>/A $\beta$ <sub>40</sub>  $\geq$  0,409 e APP130  $\geq$  0,77 ou APP130kDa < 0,9, A $\beta$ <sub>42</sub>/A $\beta$ <sub>40</sub> < 0,409, com acurácia diagnóstica de 79,9% (sensibilidade: 30,6%; especificidade: 98,5%; coeficiente de concordância de Kappa: 0,365). Os resultados deste estudo demonstram que indivíduos com SD podem evidenciar padrões diferentes de expressão das proteínas envolvidas na cascata amiloide, detectáveis mesmo na ausência de declínio cognitivo, sugerindo a SD como um bom modelo preditivo de DA.

Descritores: Peptídeo beta-amiloide; Doença de Alzheimer; Secretases da proteína precursora do amiloide; Síndrome de Down; Biomarcadores; Plaquetas; Plasma.

## ABSTRACT

Monezi JMFB. *Amyloidogenic biomarkers in Down syndrome* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2023.

Currently, it is estimated that 1 in every 1000 live births worldwide has Down syndrome (DS). Due to the genetic characteristics of this syndrome, it is directly associated with a group of clinical manifestations resulting from premature aging and may present patterns of comorbidities similar to those found in the elderly. Therefore, together with the greater number of years lived, there is an increased risk of developing Alzheimer's disease (AD) in DS, especially concerning the interaction between the pathogenic mechanisms related to cerebral amyloidogenesis and the factors inherent to premature aging. Thus, this study aimed to investigate AD biological markers in peripheral blood samples from adults and elderly individuals with DS (n=82) and compare them with individuals with normal karyotype (n=99), stratifying the groups according to the presence or absence of cognitive impairment. The DS group was subclassified according to the occurrence of cognitive impairment and/or dementia, 55 DS without evidence of cognitive decline (DSNC) and 27 DS with cognitive decline (DSAD). Two comparative groups composed of euploid individuals were constituted, 23 elderly with AD (AD) and 76 adults and elderly with normal cognition (Control). AD biomarkers were determined in platelets and plasma, including the Amyloid Precursor Protein ratio (APPr), established by the ratio between secreted 130- and 110kDa peptides (sAPP), the protein expression of ADAM10, BACE1 and PSEN1, as well as levels of A $\beta$ 40, A $\beta$ 42 and between A $\beta$ 42/A $\beta$ 40 ratio. Results demonstrated increased APPr for both DS groups compared to euploids. On the other hand, lower expression of the APP130 and 110kDa fragments was observed in both DSNC and DSAD, and both fragments showed levels between 6 and 7 times lower in DSAD compared to DSNC. About secretases, a reduction in the expression of ADAM10, BACE1 and PSEN1 was observed in individuals with DS compared to euploids, with no difference between DSNC and DSAD. Regarding the euploid groups, the AD subgroup had higher levels of BACE1 when compared to the Control. Regarding the A $\beta$  peptide, a higher plasma level of A $\beta$ 40 and a lower A $\beta$ 42/A $\beta$ 40 ratio were identified for both DSNC and DSAD groups, in relation to the Control. Using a predictive classification tree and regression

model (CART), the combination of APP130kDa biomarkers and the A $\beta$ 42/A $\beta$ 40 ratio proved to be relevant for separating groups in terms of cognitive impairment, through the classification APP130kDa < 0.9, A $\beta$ 42/A $\beta$ 40  $\geq$  0.409 and APP130  $\geq$  0.77 or APP130kDa < 0.9, A $\beta$ 42/A $\beta$ 40 < 0.409, with a diagnostic accuracy of 79.9% (sensitivity: 30.6%; specificity: 98.5%; Kappa concordance coefficient: 0.365). The results of this study demonstrate that people with DS can show different patterns of expression of the proteins involved in the amyloid cascade, detectable even in the absence of cognitive decline, suggesting DS as a good predictive model of AD.

Descriptors: Amyloid beta-peptides; Alzheimer disease; Amyloid precursor protein secretases; Down syndrome; Biomarkers; Blood platelets; Plasma.

## 1 INTRODUÇÃO

Como consequência do avanço da medicina, de novas tecnologias na área da saúde, de melhorias no saneamento básico e nas condições de vida, a expectativa de vida bem como o ritmo do envelhecimento populacional tem aumentado drasticamente no mundo [1]. Para o ano de 2050 já se prevê que o número de pessoas com 60 anos ou mais passe a representar 22% da população mundial [2]. Com relação à expectativa de vida média global, houve um aumento considerável entre os anos de 2000 e 2015, passando de 66,4 para 71,4 anos [3]. Já em 2019, segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), a expectativa da população brasileira superou os 76 anos de idade [4].

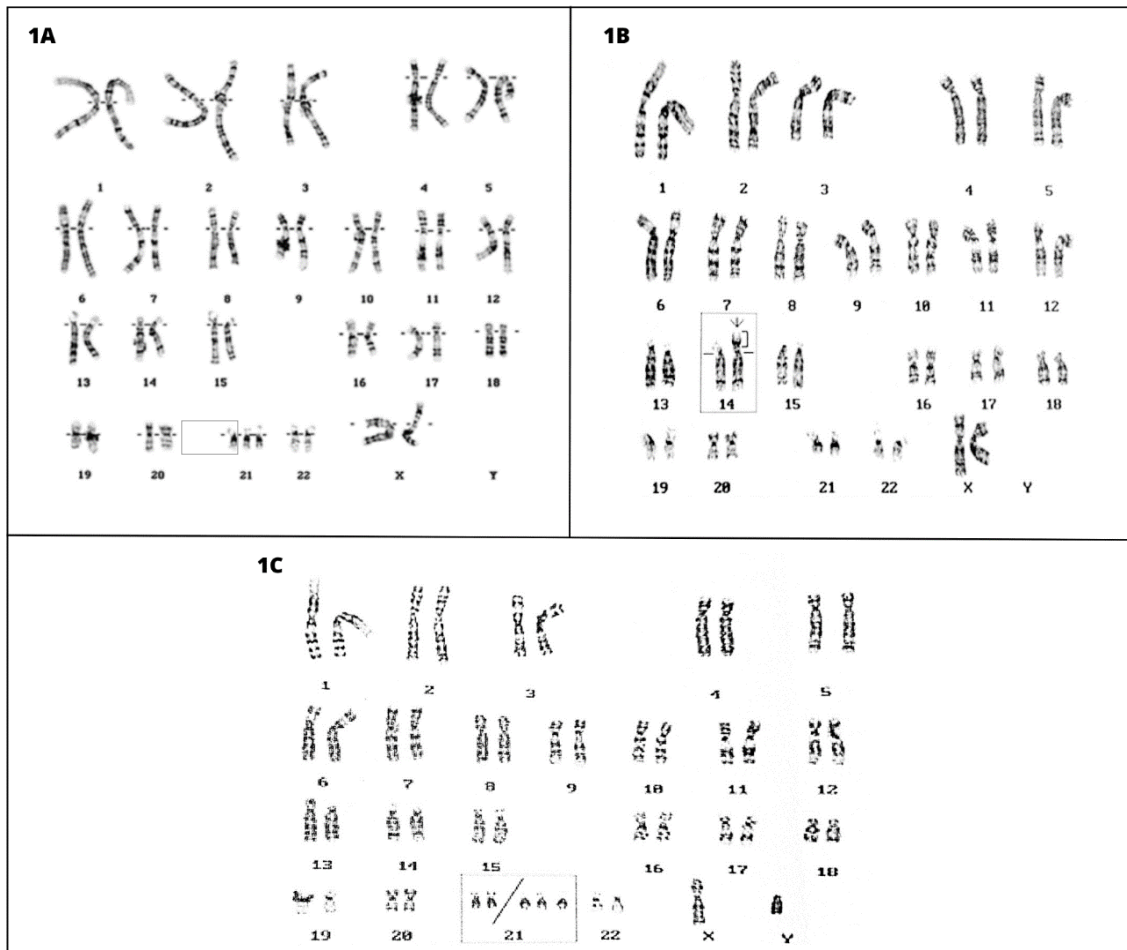
Esse cenário não se distancia da realidade de adultos com síndrome de Down (SD). Atualmente, estima-se que 1 a cada 1000 nascidos vivos em todo o mundo apresenta SD [5]. No Brasil, segundo o Ministério da Saúde, cerca de 300 mil pessoas possuem a síndrome [6]. A média de expectativa de vida para esses indivíduos praticamente duplicou nos últimos 30 anos, correspondendo atualmente a 55-60 anos de idade [7,8]. Além disso, hoje, cerca de 80% das pessoas com SD atingem seu quinquagésimo aniversário [5].

### 1.1 Síndrome de Down e envelhecimento

A SD, cujas características físicas típicas da síndrome foram descritas pela primeira vez por J. Langdon Down em 1866 [9], é um tipo de aneuploidia determinada pela trissomia do cromossomo 21 (T21) e considerada uma das causas mais comuns de deficiência intelectual [10,11]. A T21 foi a primeira anomalia cromossômica identificada na espécie humana (síndrome da gênese casual), cuja etiologia foi retratada pelos pesquisadores Lejeune, Gautier e Turpin no final da década de 50. Sua confirmação diagnóstica é possível a partir de estudo cromossômico, a cariotipagem, capaz de identificar o tipo de T21 por meio da análise do cariógrama [12].

Dentre as condições cromossômicas de SD, a trissomia simples do cromossomo 21, também conhecida como não-disjunção (figura 1A), é a responsável por 95% dos casos. Ademais, o desenvolvimento da síndrome pode ocorrer por meio da translocação robertsoniana envolvendo o cromossomo 21 de forma não equilibrada - geralmente ocorre com um cromossomo 21 ligado ao cromossomo 14, 21 ou 22 (figura 1B); e do mosaïcismo (figura 1C), no qual ocorrem duas populações de células, uma típica e a outra com trissomia simples do cromossomo 21. No entanto, essas últimas são consideradas alterações cromossômicas menos comuns, uma vez que representam, respectivamente, aproximadamente 4% e 1% de todos os casos de SD [11–13].

**Figura 1.** Possibilidades de constituições cromossômicas relacionadas à síndrome de Down.



1A: cariograma de uma criança do gênero feminino com SD e cariótipo 47, XX, +21. 1B: cariograma de uma criança do gênero feminino com SD e cariótipo 46, XX, rob (14:21)(q10;q10), +21. No presente caso ocorreu uma translocação robertsoniana entre os cromossomos 14 e 21. 1C: cariograma de uma criança do sexo masculino com SD e cariótipo 47, XY, +21/46, XY. Fonte: Pilotto [12].

As consequências clínicas e fenotípicas relacionadas à SD advêm da cópia extra, parcial ou total, do cromossomo 21. Estima-se que esse cromossomo represente de 1 a 1,5% do genoma humano, contemplando mais de 500 genes, dos quais aproximadamente 240 codificam proteínas [14–19]. Há estudos demonstrando que as regiões críticas relacionadas às alterações fenotípicas se localizam na extensão do braço longo do cromossomo 21, em especial entre 21q22.11 e 21q22.2, abrangendo de 3,8 a 6,5 Mb [20–22]. No entanto, outras regiões já foram reveladas como importantes contribuintes para essas características [23–28], o que leva alguns autores a questionarem o fato de haver mais regiões do cromossomo 21, para além daquelas ditas como críticas, responsáveis pelas especificidades da pessoa com SD [22,29–32].

Um dos maiores desafios relacionados aos estudos sobre SD é compreender as correlações entre o desequilíbrio de dosagem genética com os fenótipos oriundos dessa síndrome. Conjectura-se que a T21 resulta em expressão gênica aumentada em torno de 1,5 vezes nos diversos tecidos da pessoa com SD, levando ao desequilíbrio da homeostase do organismo [18]. Atualmente, tanto estudos científicos quanto a prática clínica demonstram que além da estreita relação com a deficiência intelectual, comumente moderada entre os indivíduos com T21 [13], a SD tem associação direta com um grupo de manifestações clínicas que ocorrem com maior frequência em comparação às pessoas típicas, afetando a saúde, o desenvolvimento e a funcionalidade. São comuns as doenças cardíacas congênitas, apneia obstrutiva do sono, alterações na tireoide, epilepsia, doença gastrointestinal, problemas de audição e visão, disfunção imunológica, transtornos mentais, distúrbios hematológicos, problemas musculoesqueléticos, dentre outras [33].

Além disso, a SD foi descrita por George Martin, desde 1978, como uma síndrome progeróide [34], pois estão presentes alterações decorrentes do envelhecimento prematuro [18,35–37]. Dessa forma, pessoas com SD podem apresentar padrões de comorbidades, mecanismos moleculares de envelhecimento e marcadores de idade biológica similares àqueles encontrados em idosos euplóides [34,36]. Assim sendo, sob o prisma das características clínico patológicas adjunto à maior quantidade de anos vividos, há o aumento do risco de desenvolvimento de doença de Alzheimer (DA) em SD, sobretudo no que diz respeito à interação entre os

mecanismos patogênicos relacionados à amiloidogênese cerebral e os fatores inerentes ao envelhecimento prematuro na SD [37–39].

## 1.2 Síndrome de Down e doença de Alzheimer

Tendo em vista que a prevalência de demência em indivíduos com SD também aumenta com a progressão da idade, acometendo 10-25% das pessoas com 40-50 anos; 20-50% daquelas com 50-60 anos e 60-75% dos indivíduos com mais de 60 anos de idade [40–44] e que o gatilho do processo patogênico da DA se dá por meio da formação de placas senis, a detecção de potenciais biomarcadores com alta sensibilidade e especificidade pode contribuir para o diagnóstico precoce, com implicações sobre a abordagem terapêutica [45–47].

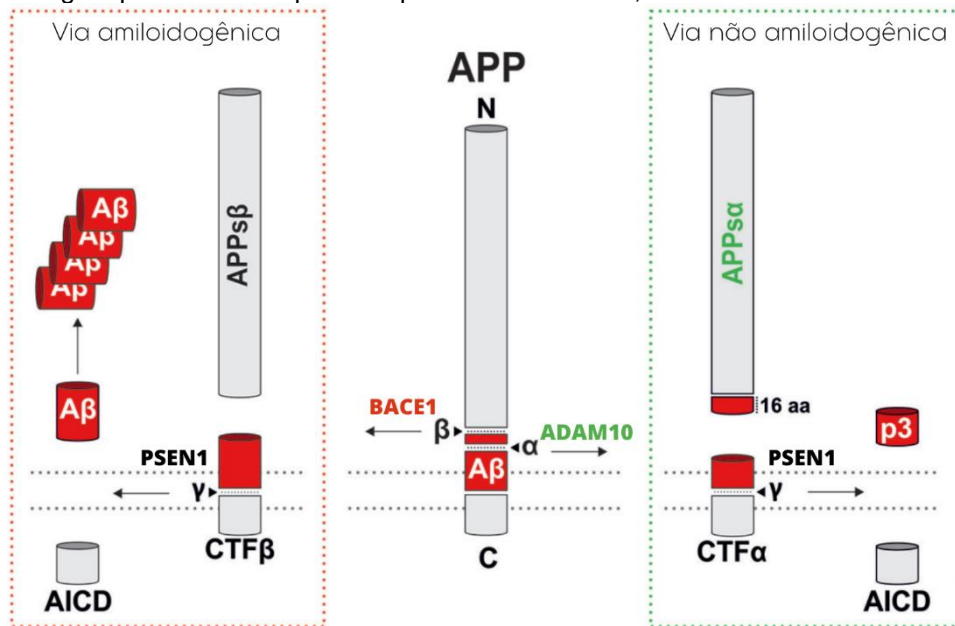
Pessoas com SD representam uma das maiores coortes em risco de início precoce da doença de Alzheimer [48]. À semelhança das formas de DA, onde há um mecanismo genético dominante, a demência na SD acomete indivíduos em fase pré-senil [49]. Do ponto de vista patológico pode-se admitir que a demência na SD se assemelha muito mais às formas familiares da DA pré-senil (*'early-onset, familial Alzheimer's disease'*, EOAD) do que às formas esporádicas de DA com início tardio. As diversas formas de EOAD são causadas por mutações dos genes que codificam a proteína precursora do amiloide (APP) e as presenilinas 1 e 2 (PSEN1 e PSEN2), localizados respectivamente nos cromossomos 21, 14 e 1 [50,51]. Essas mutações são transmitidas por padrão de herança autossômica dominante e determinam anormalidades metabólicas que levam à formação excessiva e subsequentemente ao acúmulo de amiloide nos tecidos cerebrais. Existe, portanto, uma associação causal entre a presença dessas mutações e o desenvolvimento de DA [52].

Já do ponto de vista molecular, o gatilho do processo patogênico da demência na SD é o acúmulo do peptídeo  $\beta$ -amilóide ( $A\beta$ ) nos tecidos cerebrais [40,42,53,54]. A presença de polímeros de  $A\beta$  desencadeia uma sequência de eventos citotóxicos que provocam a deterioração e a morte neuronal [55,56]. Este processo determina posteriormente a hiperfosforilação da proteína Tau, comprometendo a estabilidade dos microtúbulos e causando o ulterior colapso do citoesqueleto neuronal [57].



O A $\beta$  é formado a partir da clivagem anormal da proteína APP (figura 2) [58], proteína transmembrana expressa em diversos tecidos e principalmente no cérebro. O metabolismo da APP pode seguir duas vias principais: a via secretória (ou não-amiloidogênica) e a via amiloidogênica. Em condições fisiológicas, o processamento proteolítico pela via secretória ocorre pela ação sucessiva da  $\alpha$ - e da  $\gamma$ -secretase. Alternativamente, na via amiloidogênica, a APP é clivada pela  $\beta$ - e pela  $\gamma$ -secretase, dando origem a fragmentos tóxicos de A $\beta$ , sendo os mais usuais os peptídeos de 40 e 42 aminoácidos (A $\beta$ <sub>1-40</sub> e A $\beta$ <sub>1-42</sub>) [59,60]. O A $\beta$  é liberado para o espaço extracelular do tecido nervoso, sofrendo processo de polimerização e acúmulo na forma de agregados tóxicos e insolúveis, formando as chamadas placas senis [61,62].

**Figura 2.** Clivagem proteolítica da proteína precursora amiloide, APP.



ADAM10: A *Desintegrin And Metallopeptidase 10*; BACE1:  *$\beta$ -site APP- cleaving enzyme 1*; PSEN1: Presenilina 1; APP $\alpha$ : APP solúvel  $\alpha$ ; APP $\beta$ : APP solúvel  $\beta$ ; A $\beta$ : peptídeo  $\beta$ -amilóide; CTF: fragmento C-terminal ( $\alpha$  e  $\beta$ ); AICD: fragmento intracelular envolvido na regulação transcrricional. Fonte: Adaptado de Mockett et al., 2017 [63].

A produção excessiva deste peptídeo é tóxica às células adjacentes, podendo causar distrofia e morte neuronal, com repercussões sobre as funções cognitivas e a memória [64]. Estudos anatomopatológicos indicam que acúmulos significativos de amiloide cerebral são observados em indivíduos com SD a partir dos 35-40 anos de idade [47,48]. Os eventos neurotóxicos decorrentes do acúmulo deste peptídeo nos tecidos cerebrais desencadeiam a 'cascata do amiloide', que ocupa posição central

na fisiopatologia da DA e que também é observada na demência associada à SD [48,61,65,66].

Acredita-se que a T21, além de favorecer a amiloidogênese cerebral pela expressão aumentada do gene da APP, devido à cópia extra do cromossomo 21 [67], também determina outras alterações da homeostase, tais como a redução da neurogênese e a indução de mecanismos de morte celular programada (apoptose) [68] – fenômenos também presentes na DA. Em indivíduos com SD, a expressão aumentada da APP provoca alteração dos mecanismos que regulam a sua clivagem pelas secretases, em favor da produção de formas insolúveis do peptídeo A $\beta$  e subsequente ativação da cascata do amiloide [67,69,70].

Outros mecanismos podem acelerar o processo patogênico, tais como: a ativação da resposta inflamatória e de mecanismos relacionados ao estresse oxidativo; o favorecimento de apoptose; o comprometimento da homeostase de membranas; a perda do suporte neurotrófico; e alterações neuroquímicas relacionadas à depleção colinérgica e à excitotoxicidade [71]. Esses mecanismos são considerados secundários na cascata do amiloide – porém, não menos importantes – e ilustram a complexidade da fisiopatologia da demência na DA e na SD.

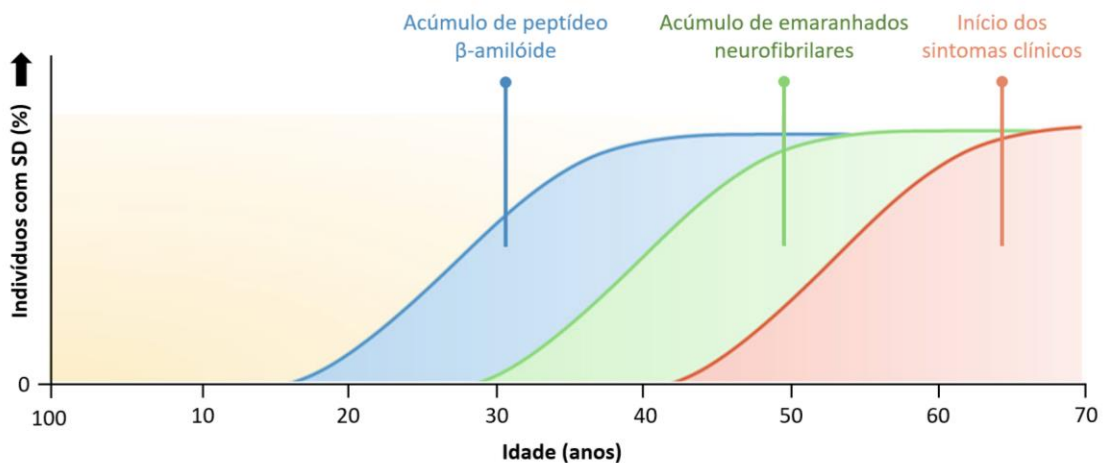
### **1.3 Potenciais biomarcadores associados à doença de Alzheimer em Síndrome de Down**

Todas as evidências até o momento demonstram que estudos com SD podem trazer à luz alterações biológicas presentes na DA, tanto esporádica quanto familiar, devido ao desequilíbrio de dosagem genética relacionada ao T21 e das consequências por ele geradas [48,72]. O ponto de partida para essa relação baseia-se na superexpressão do gene *APP*, visto que a inativação de uma das cópias desse gene parece reduzir os níveis proteicos de APP e resgatar os fenótipos de A $\beta$  e da proteína Tau em células neuronais [73]. Além disso, já foi observado que em casos raros de T21, nos quais o *locus APP* é excluído, os indivíduos com SD não desenvolvem DA [74,75].

Exames em cérebros *post mortem* de SD por volta dos 40 anos de idade já revelam anormalidades neuropatológicas equivalentes àquelas observadas na DA.

Disfunções mitocondriais e aumento do estresse oxidativo encontram-se presentes durante o desenvolvimento fetal; na sequência, durante o período de adolescência, o indivíduo com SD já começa a expressar processos neuroinflamatórios e a formação de placas amilóides, que aumentam conforme a idade; por fim, os emaranhados neurofibrilares aparecem posteriormente às placas e são mais expressos entre as idades de 40 a 50 anos, adjunto ao aumento da incidência de demência nessa população (figura 3); a perda de neurônios hipocampais e corticais também está presente na SD, assim como déficits na memória e linguagem e apresentação de sintomas neuropsiquiátricos [76–82].

**Figura 3.** Progressão de biomarcadores relacionados ao desenvolvimento da DA em pessoas com SD, conforme a faixa etária.



Fonte: Adaptado de Lott et al., 2019 [82].

A detecção de indicadores do processo patogênico da DA antes do desenvolvimento de danos significativos aos tecidos neurais e, conseqüentemente, antes do aparecimento das manifestações clínicas da doença, por meio de biomarcadores com alta sensibilidade e especificidade, podem contribuir para o diagnóstico precoce, com implicações sobre a abordagem terapêutica e até mesmo a eventual prevenção da demência [45,46]. O potencial de aplicação dos biomarcadores tem gerado muita expectativa na área biomédica, sendo que muitos têm sido propostos para avaliar os riscos de desenvolvimento da DA, bem como identificá-la precocemente [83].

Por definição, biomarcadores são características objetivas e quantificáveis dos processos biológicos [84], e para serem considerados ideais devem ser capazes de

detectar uma característica fundamental da doença, ser validado em casos de DA comprovada por autópsia, ser reprodutível, não requerer procedimentos invasivos e de elevado custo financeiro e possuir especificidade superior a 75% e sensibilidade superior a 85% [85].

Muitos alvos que possuem marcadores bioquímicos *ante mortem*, têm sido investigados para possível diagnóstico precoce da doença. Além disso, vêm sendo investigadas proteínas que reflitam *in vivo* os processos que levam a formação de achados histopatológicos e que possam ter seus níveis mensurados em fluidos biológicos [45,46].

Enzimas e produtos de clivagem proteolítica da APP, relacionadas à cascata do amiloide, têm sido amplamente estudadas por serem associadas diretamente às atividades das secretases  $\alpha$ -,  $\beta$ - e  $\gamma$ , respectivamente identificadas como *A Disintegrin And Metallopeptidase 10 (ADAM10)*,  *$\beta$ -site APP-cleaving enzyme 1 (BACE1)*, e *PSEN1*. Considerando, portanto, a importância da ação dessas secretases no desenvolvimento da DA, bem como o papel fundamental da APP e do peptídeo A $\beta$  nesse contexto, os mesmos foram alvo deste estudo e estão descritos na sequência.

### 1.3.1 APP

A APP é uma glicoproteína integral transmembrana tipo 1 com um largo domínio extracelular (N-terminal) e uma cauda citoplasmática curta (C-terminal), oriunda de uma superfamília de APP evolutivamente conservada e encontrada em diversos organismos [86–88]. Apesar de ser codificada por um único gene (*APP*), localizado no braço longo do cromossomo 21 (21q21.3) [86,89,90], a literatura descreve 11 isoformas para essa proteína, produzidas por *splicing* alternativo dos exons 7 e 8 [91], sendo a APP695, a APP751 e a APP770 as mais estudadas [86,92].

Diferentemente da APP695, as isoformas APP751 e APP770 contêm um domínio adicional denominado inibidor de protease do tipo Kunitz (KPI), e esta última apresenta ainda um outro domínio, o OX-2 (com 19 aminoácidos), diferenciando-se das demais [92]. Além de apresentarem diferenciações estruturais, elas também se expressam em proporções diferentes no organismo. Enquanto a APP695 é predominantemente expressa em compartimentos somatodendríticos e axonais dos

neurônios, principalmente no córtex e hipocampo [93,94], as outras duas isoformas são encontradas em abundância em tecidos periféricos e fibroblastos, inclusive em leucócitos e plaquetas [92,95]. Em pessoas com DA, as isoformas expressam-se de maneira diferente conforme a evolução da doença, sugerindo que elas exercem papéis funcionais e metabólicos distintos [96,97], apesar da literatura ainda não detalhar com clareza as especificidades funcionais de cada uma. [86].

A participação da APP no desenvolvimento da DA já é bem elucidada na literatura e tem relação com seu processamento canônico, sendo sua clivagem proteolítica por secretases diretamente influenciada pela distribuição celular. O acúmulo superficial da APP favorece seu processamento fisiológico por  $\alpha$ -secretases, ao passo que sua retenção em compartimentos ácidos favorecem a formação de peptídeos A $\beta$  pela clivagem por  $\beta$ -secretase, contribuindo para o desenvolvimento da DA [92].

Em contraste com esse papel bem estabelecido na patogênese da DA, a APP também apresenta importantes funções fisiológicas. Funções estas relacionadas ao desenvolvimento cerebral, à plasticidade sináptica, à memória e neuroproteção ao longo do processo de envelhecimento cerebral [92]. Além disso, está envolvida na regulação do crescimento de neuritos e na orientação do axônio, com componentes de matriz extracelular, adesão celular, funções sinápticas e potenciação de longo prazo (LTP) [98].

### 1.3.2 ADAM10

Alguns membros das *A Disintegrin And Metallopeptidase* (ADAMs) podem atuar como  $\alpha$ -secretases, sendo eles ADAM9, 10 e 17 [99,100]. ADAM corresponde a uma família de proteínas multi-modulares [101], sendo muitas delas identificadas como proteínas transmembrana do tipo I que se ancoram devido à presença do domínio transmembrana próximo à região C-terminal.

A região N-terminal das ADAMs possui um peptídeo sinal que a direciona à via secretória e um pró-domínio que possui função na maturação, pois sua presença mantém o domínio metalopeptidase inativo bloqueando a atividade proteolítica da

proteína. Após a remoção do pró-domínio o domínio metalopeptidase torna-se ativo e é capaz de realizar suas funções catalíticas [102].

A ADAM10 é codificada pelo gene *ADAM10*, localizado no braço longo do cromossomo 15 (15q21.3) [103]. Ela pertence à superfamília das ADAMs e é expressa em oligodendrócitos, em subconjunto de neurônios em desenvolvimento, em núcleos cerebrais e na diferenciação da massa cinzenta [104]. Também é provável que seja responsável pela clivagem de várias proteínas da superfície das células do cérebro, tais como efrinas [14], APP [105], moléculas de direcionamento axonal como, por exemplo, a molécula de adesão neuronal [106], entre outras.

Essa enzima tem sido associada diretamente com a atividade de  $\alpha$ -secretase [107]. Em estudos com camundongos transgênicos para a DA, observaram que a superexpressão desta proteína, considerada a principal  $\alpha$ -secretase do cérebro [108,109], resultou na diminuição da deposição de peptídeos A $\beta$  e dos déficits cognitivos [110].

### 1.3.3 BACE1

A BACE1 apresenta todas as características previstas para uma  $\beta$ -secretase e está diretamente relacionada à DA [111,112]. Ela é codificada pelo gene *BACE1*, localizado no braço longo do cromossomo 11 (11q23.3) [113], e caracteriza-se por ser uma proteína transmembrana tipo 1, que possui 501 aminoácidos em sua cadeia e tem atividade de protease do tipo aspartil. Oriunda da família da pepsina, é largamente expressa no cérebro e está menos presente em outros órgãos, localizando-se predominantemente em compartimentos intracelulares com pH entre 4,5-6,0, que possibilitam a atividade proteolítica dessa proteína [111,114,115].

Ela apresenta outros substratos além da APP, sugerindo uma variedade de funções fisiológicas, sendo a identificação da BACE1 importante para a concepção de inibidores potentes e seletivos [112], visto que essa proteína tem se mostrado como a principal responsável pela formação de A $\beta$  no cérebro por meio da via amiloidogênica.

Além da BACE1, merece destaque a  *$\beta$ -site APP-cleaving enzyme 2* (BACE2), uma proteína homóloga que compartilha aproximadamente 59% de domínios

estruturais idênticos à BACE1 [116]. Ela é codificada pelo gene *BACE2*, presente no braço longo do cromossomo 21 (21q22.2), região crítica da SD [117]. Interessantemente, apesar de também pertencer à mesma família da BACE1, a BACE2 é mais expressa em tecidos periféricos e há indícios de que essa proteína desempenhe função de  $\theta$ -secretase, similar à  $\alpha$ -secretase, atuando como antagonista à BACE1, prevenindo a formação de A $\beta$  [118–121].

Ainda em relação ao processamento da APP pela BACE2, há estudos evidenciando que essa proteína pode agir como uma  $\beta$ -secretase auxiliar (em prol da formação de A $\beta$ ) ou até como uma protease capaz de degradar A $\beta$  em pH extremamente ácido, no entanto, mais estudos são necessários para evidenciar as principais atividades dessa proteína em relação à DA [122].

#### 1.3.4 PSEN1

A PSEN1 é um dos quatro principais componentes do complexo de multiproteínas  $\gamma$ -secretase: *presenilin* (PSEN), *nicastrin* (NCT), *anterior pharynx-defective* (APH-1) e *presenilin enhancer 2* (PEN-2). Ela confere atividade proteolítica ao complexo, sendo responsável pela geração de fragmentos resultantes da clivagem da APP por  $\alpha$  e  $\beta$ -secretase [123].

A PSEN1 é sintetizada como um polipeptídeo de 50 kDa, mas pode sofrer clivagem endoproteolítica gerando derivados estáveis C e N-terminais de 20 e 29 kDa, respectivamente [124]. Ela localiza-se na membrana plasmática, onde se liga diretamente a complexos de caderina e catenina [125].

Essa proteína é codificada pelo gene *PSEN1*, localizado no braço longo do cromossomo 14 (14q24.2) [89,126]. Determinadas mutações nos genes que codificam a PSEN1, assim como nos que codificam a PSEN2, levam a um aumento da produção/libertação e secreção de A $\beta$ , principalmente do A $\beta$ <sub>42</sub>, sendo responsáveis pelo aumento da razão A $\beta$ <sub>42</sub>/A $\beta$ <sub>40</sub> nas formas familiares de DA [127].

#### 1.3.5 Peptídeo A $\beta$

O peptídeo A $\beta$  é produzido por seres humanos e outros mamíferos, estando presente em fluidos biológicos e parênquima cerebral [128,129]. Na senescência, ele permanece solúvel no cérebro, sendo progressivamente degradado e/ou removido, sugerindo que exista um papel fisiológico para esse peptídeo [130].

Ele resulta da clivagem proteolítica da APP pelas secretases BACE1, na região N-terminal do peptídeo A $\beta$ , e PSEN1, em múltiplas regiões C-terminais, gerando fragmentos entre 38 e 43 aminoácidos [63,82,131]. De maneira geral, são mais comumente secretados, a partir do processamento canônico, os fragmentos A $\beta_{40}$  e A $\beta_{42}$ , respectivamente [98].

Evidências sugerem que a deposição do A $\beta$  no cérebro representa a característica patológica inicial da DA, uma vez que o acúmulo e formação de oligômeros de A $\beta$  levam à prejuízos em sinapses, estruturas neuronais e funções cognitivas, favorecendo a neurodegeneração [92]. Além disso, os efeitos neurotóxicos desse peptídeo comprometem a barreira hematoencefálica e prejudicam o *clearance* de A $\beta$ , contribuindo para sua deposição [132,133]. Nesse sentido, merece destaque o fragmento A $\beta_{42}$ , uma vez que exibe neurotoxicidade aumentada em relação ao A $\beta_{40}$ , visto que a formação de fibrilas ocorre de maneira acelerada e que há predominância desse fragmento nas placas senis [127].

#### 1.4 Justificativa

A pesquisa de marcadores biológicos do processo patogênico relacionado à demência na SD fundamenta-se pelas dificuldades que existem para caracterizar, clinicamente, as fases iniciais deste processo. Pelo fato da T21 trazer um desequilíbrio na expressão dos genes que compõem o cromossomo 21, incluindo o gene *APP*, que codifica a proteína chave no desenvolvimento da DA, bem como por caracterizar-se como uma síndrome progeróide, ela fornece um modelo experimental adequado para a análise das alterações oriundas da patogênese da DA [134], tanto de origem familiar quanto esporádica. Além disso, a relevância e as implicações clínicas dos achados de Di Luca et al. [135] justificam a replicação deste estudo pioneiro em uma casuística maior de indivíduos com SD, com caracterização mais precisa dos casos de demência.



Outrossim, a opção da obtenção dos potenciais biomarcadores deste estudo por meio de matrizes periféricas foi tomada, em primeiro lugar, pelas prerrogativas éticas de causar o menor desconforto possível e minimizar o risco de complicações aos participantes do estudo. Respeitando a fragilidade e a eventual incapacidade decisória destes indivíduos, foi utilizado um procedimento minimamente invasivo (punção venosa), assegurando maior facilidade e segurança na obtenção de amostras, menor custo do procedimento e, portanto, maior aplicabilidade em larga escala. Este poderá ser um ponto de partida para estudos longitudinais agregando outras tecnologias, particularmente os métodos de imagem cerebral, para a validação dos achados periféricos e a efetiva predição de demência.

Assim sendo, este estudo demonstra sua relevância ao contribuir para o preenchimento de lacunas existentes no conhecimento sobre a inter-relação entre os mecanismos patogênicos primários da DA e aqueles decorrentes do envelhecimento biológico. Auxiliando, dessa maneira, na busca por tratamentos mais eficazes e eficientes para a DA tanto em pessoas típicas quanto em pessoas com SD.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Investigar marcadores biológicos da DA, envolvidos na produção do peptídeo A $\beta$ , em amostras de sangue periférico de indivíduos adultos e idosos com SD e compará-los com adultos e idosos típicos sem comprometimento cognitivo e com DA.

### 2.2 Objetivos específicos

- Mensurar a expressão dos peptídeos secretados de APP (sAPP) de 130kDa e 110kDa em plaquetas, possibilitando o cálculo da 'razão de APP', que corresponde à proporção entre essas isoformas de sAPP (130kDa:110kDa);
- Mensurar a expressão proteica das APP-secretases alfa (ADAM-10), beta (BACE-1) e gama (PSEN-1) em plaquetas;
- Quantificar níveis plasmáticos de A $\beta$ <sub>40</sub> e A $\beta$ <sub>42</sub>;
- Analisar a correlação entre os potenciais biomarcadores para determinação de acurácia diagnóstica.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Desenho do estudo

Trata-se de um estudo transversal, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP) – Nº 2.262.321, pela Associação de Pais e Amigos dos Excepcionais (APAE) / Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) – Nº 2.336.095, bem como pela Plataforma Brasil – Parecer Nº 3.217.085 (Anexos A, B e C, respectivamente).

#### 3.2 Casuística

A casuística foi composta por 211 indivíduos, provenientes da APAE da cidade de São Paulo/SP, do Instituto de Psiquiatria do Hospital das Clínicas da FMUSP (IPq – HCFMUSP) e da comunidade por demanda espontânea (com o auxílio de anúncios na mídia). Os sujeitos foram alocados em grupos distintos (figura 4), selecionados conforme os critérios de inclusão:

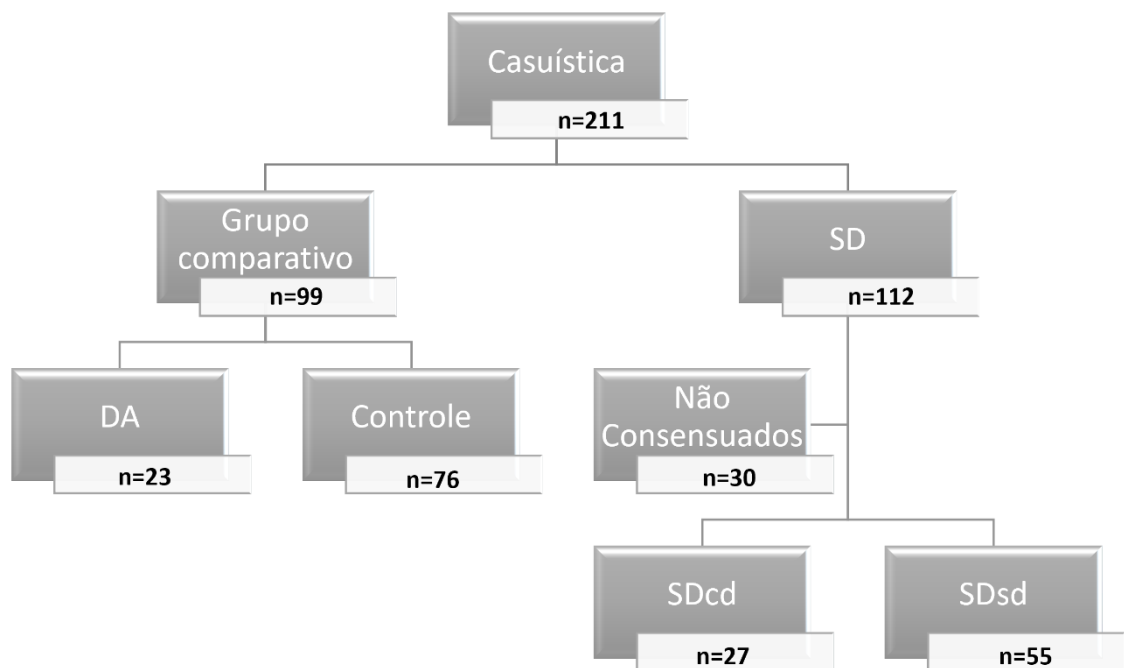
Grupo SD: 112 indivíduos com SD, diagnosticados segundo a décima edição da Classificação Internacional de Doenças e Problemas Relacionados com a Saúde (CID-10) [136]. A alfabetização deste grupo foi definida pelo subteste de leitura e escrita da Bateria Montreal Toulouse de avaliação de linguagem [137]. Convém destacar que esses indivíduos não foram alfabetizados conforme o conteúdo pedagógico usual. Para fins de análise dos padrões biológicos relacionados aos objetivos deste estudo, esses indivíduos foram subclassificados em SD sem declínio cognitivo (SDsd) e SD com declínio cognitivo (SDcd).

Grupo DA (típico): 23 indivíduos com DA leve ou moderada, estabelecido segundo os critérios diagnósticos do NINCDS-ADRDA [138].

Grupo Controle: 76 indivíduos saudáveis com cariótipo normal, avaliados pela equipe médica do LIM-27 do IPq – HCFMUSP, sendo pré-requisito para inclusão a ausência de evidências de transtornos neuropsiquiátricos atuais e/ou pregressos.

Foram excluídos do estudo todos aqueles que: (1) apresentassem deficiências sensoriais que os impedisse de desempenhar adequadamente os testes necessários para avaliação das funções cognitivas; (2) transtornos psiquiátricos maiores ou doenças neurodegenerativas (de natureza distinta da DA); (3) doenças físicas sem controle clínico satisfatório; (4) fragilidade física ou cognitiva no momento da avaliação inicial; (5) evidência atual ou progressa de alcoolismo ou abuso de substâncias depressoras do sistema nervoso central; (6) uso de medicações psicotrópicas (antidepressivos, anticonvulsivantes, antipsicóticos e carbonato de lítio); (7) se recusassem em assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Anexo D) ou em participar de um ou mais procedimentos relacionados ao trabalho.

**Figura 4.** Estratificação da casuística do estudo.



Fonte: Da autora. São Paulo, 2023.

Todos os participantes preencheram questionário para coleta de informações sociodemográficas. A avaliação cognitiva dos indivíduos com SD foi realizada por meio do instrumento *Cambridge Examination for Mental Disorders of Older People with Down's Syndrome and Others with Intellectual Disabilities* (CAMDEX-SD) [139] e a avaliação cognitiva dos controles foi feita segundo a versão brasileira do *Cambridge Examination for Mental Disorders in the Elderly* (CAMDEX) [140,141]. Apesar de todos

terem realizado as devidas avaliações, 30 indivíduos com SD estão em processo de avaliação para consenso diagnóstico pelos clínicos do ambulatório de Envelhecimento e síndrome de Down, portanto, não foram incluídos nas análises proteicas do presente estudo.

Além disso, os participantes de todos os grupos foram submetidos à punção venosa do antebraço para obtenção das amostras de sangue periférico. Vale salientar que as amostras do grupo experimental foram obtidas dentro das instalações clínicas da APAE-SP. Essas alíquotas de sangue total foram mantidas em gelo e transportadas no mesmo dia para o LIM-27, onde foram desenvolvidos os procedimentos laboratoriais. As coletas do grupo controle foram realizadas diretamente nas dependências do IPq – HCFMUSP.

### **3.3 Matriz plaquetária**

O estudo da matriz plaquetária como modelo neurofarmacológico iniciou-se em meados da década de 50 [142]. A partir de então, outros modelos foram propostos para o estudo de processos metabólicos neuronais por meio da análise dos correlatos em plaquetas [143,144].

Destaca-se a capacidade de armazenar e liberar neurotransmissores, a liberação de grânulos dependente de cálcio e a expressão de proteínas de membrana [145–147]. Além disso, a maior parte da APP circulante (95%) está nas plaquetas, sendo a isoforma APP770 a mais abundante. Há evidências que as plaquetas possuem a maquinaria enzimática necessária para o metabolismo da APP, envolvendo a atividade das secretases [148]. Os  $\alpha$ -grânulos das plaquetas contêm tanto a APP intacta (140 e 150 kDa) como também os peptídeos solúveis secretados a partir da sua clivagem (sAPP $\alpha$  e sAPP $\beta$ ), com pesos moleculares de 110 a 130 kDa; esses conteúdos são liberados dos  $\alpha$ -grânulos mediante ativação plaquetária.

Tendo em vista que as plaquetas apresentam semelhanças bioquímicas e biofísicas em relação às células nervosas, permitindo o estudo de processos metabólicos cerebrais em células periféricas [149], essa matriz foi escolhida para determinação, no presente estudo, das proteínas APP (130kDa e 110kDa), BACE1, ADAM10 e PSEN1.

### 3.3.1 Obtenção e preparo de plaquetas para determinação de APP

Para a obtenção da matriz plaquetária, as amostras de sangue periférico foram coletadas em seis tubos a vácuo do tipo *monovet*, cada qual com capacidade para 10mL contendo anticoagulante citrato de sódio 0,106mol/L. Destes, dois tubos foram destinados para preparo e obtenção de plasma rico em plaquetas para posterior determinação de expressão proteica de APP, e quatro para determinação de BACE1, ADAM10 e PSEN1.

Foram adicionados 200µL de EDTA 0,09M para cada 10mL de sangue. O conteúdo dos tubos foi homogeneizado delicadamente por inversão e centrifugado por 10 minutos a 1300 rpm em temperatura ambiente. Em seguida, 5mL do plasma rico em plaquetas (PRP) – sobrenadante – foi transferido para um tubo Falcon com capacidade para 15mL, e este centrifugado por 15 minutos a 2400rpm em temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o pellet ressuscitado com 800µL de tampão de lise (TRIS-HCL 10Mm [pH=7,4] + EGTA 1mM + água miliQ) e 8µL de *phenylmethylsulfonyl fluoride* (PMSF). Após os procedimentos supracitados, as plaquetas foram congeladas e descongeladas para facilitar a lise, armazenadas em criotubos e depositadas em freezer -80°C para posterior análise.

### 3.3.2 Obtenção e preparo de plaquetas para determinação de BACE1, ADAM10 e PSEN1

Primeiramente foi adicionado, em cada tubo de citrato de sódio 0,106mol/L, 1mL de ACD-NH-Formol-A. Seguidamente, a solução foi homogeneizada delicadamente por inversão e centrifugada a 1600rpm durante 15 minutos, sob temperatura de 20°C. O sobrenadante obtido foi transferido para um tubo Falcon com capacidade de 50ml, e o pH foi ajustado para 6,5 com ACD-NH-Formol-A.

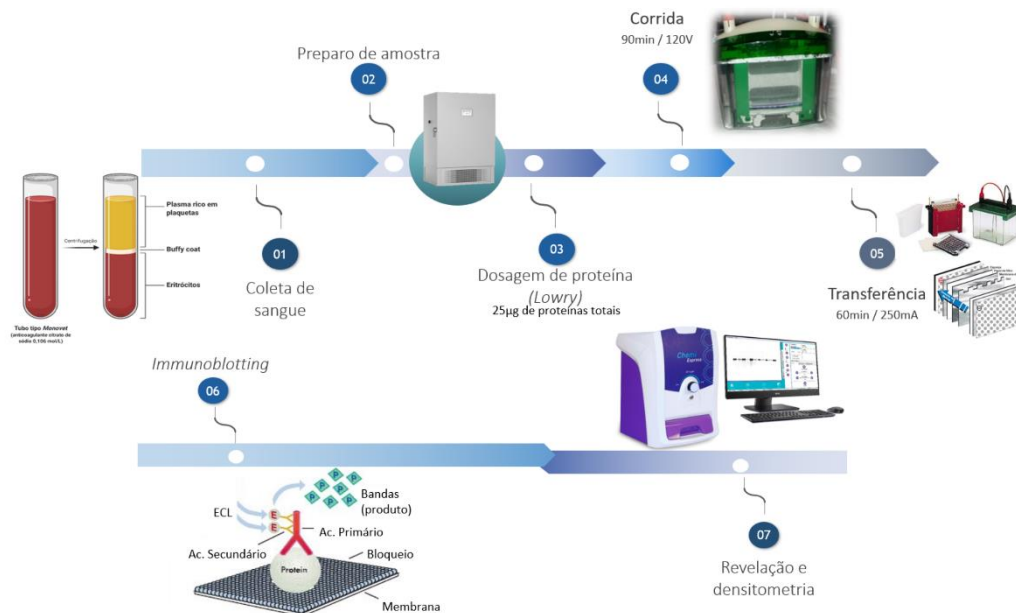
Após as etapas acima, o PRP foi transferido para 4 tubos de poliestireno com capacidade para 5mL cada e centrifugado durante 10 minutos a 2400rpm a 20°C. O sobrenadante foi removido delicadamente por inversão e 5mL de solução de lavagem

(citrato de sódio 0,1M – pH 6,5; cloreto de potássio 0,1555M; cloreto de magnésio 0,1M; glicose 0,33M; apyrase; albumina; cloreto de cálcio 0,1M e cloreto de sódio a 0,9%) foram adicionados em cada tubo, respectivamente, com posterior homogeneização e descanso da diluição por 10 minutos. Seguidamente, o sobrenadante foi cuidadosamente removido por inversão depois da solução ser centrifugada por 10 minutos a 2400rpm. Por fim, o pellet foi ressuspendido com 500µL de Tris-sacarose, homogeneizando com pipeta, aliquoteado em quatro criotubos (500µL/tubo) e armazenado em freezer -80°C.

### **3.3.3 *Western Blotting e immunoblotting***

Para a separação das proteínas APP (130 e 110kDa), ADAM10 (84kDa), BACE1 (56kDa) e PSEN1 (53kDa) por peso molecular foi utilizado o método semi-quantitativo *Western Blotting* (figura 5). Esta técnica tem como objetivo separar as proteínas presentes nos concentrados de plaquetas desnaturadas, por meio da eletroforese em gel de poliacrilamida. A eletroforese proporciona a migração das proteínas no gel, separando-as conforme a massa molecular. Já a transferência, outra etapa constituinte do método, permite a migração das proteínas do gel de poliacrilamida para uma membrana de nitrocelulose, a partir da indução por corrente elétrica, para posterior realização do *immunoblotting* e das análises semiquantitativas por densitometria.

**Figura 5.** Método *Western Blotting* e *Immunoblotting*.



Fonte: Da autora. São Paulo, 2023.

As amostras foram diluídas em tampão de amostra [tris 0,8M, *dodecil sulfato de sódio* 8%, glicerol 10%,  $\beta$ -mercaptoetanol 12%, azul de bromofenol 0,02%] [150], e aquecidas a 100°C por 5 minutos em banho seco (DRI-BLOCK DB-3, Techne), desnaturando as proteínas, desenovelando-as completamente, a fim de facilitar a separação durante a corrida eletroforética. No gel de poliacrilamida foram aplicados 25µg de proteínas totais/amostra, além do marcador padrão de massa molecular *Precision Plus Protein™ Dual Xtra Standards* (Bio-Rad).

A corrida eletroforética se desenvolveu em meio de tampão de corrida [tris 25mM, glicina 160mM, *dodecil sulfato de sódio* 0,1%, água destilada], por 90 minutos a 170V. Logo em seguida, o gel foi submetido à transferência das proteínas para membrana de nitrocelulose *Amersham Hybond ECL Nitrocellulose Membrane* (GE Healthcare). A transferência se deu no sistema *Mini-Protean® II Cell* (Bio-Rad) em meio a tampão de transferência [tris 25mM, glicina 192mM, metanol 20%, água destilada], à amperagem de 250mA, por 60 minutos.

A transferência das proteínas para membrana de nitrocelulose possibilitou posterior ensaio imunoenzimático (*immunoblotting*), por meio da reação com anticorpos específicos. Para a realização do *immunoblotting*, as membranas foram bloqueadas com leite desnatado 5% em *Tris-buffered saline – Tween* (*TBS-Tween*) 0,2% [tris 250mM, cloreto de sódio 1,4M, cloreto de potássio 50mM, *Tween* 20, água destilada], a fim de evitar interações inespecíficas do anticorpo primário. Após o



bloqueio, a membrana foi incubada com anticorpo primário e em seguida com o anticorpo secundário. Entre o bloqueio e as incubações com os anticorpos, as membranas foram lavadas quatro vezes, por 5 minutos cada, com *TBS-Tween* 0,2%.

Vale salientar que, para corrigir possíveis variações analíticas inerentes à técnica, foi utilizada a  $\beta$ -actina (Abcam) como controle endógeno. O protocolo para análise desta seguiu a mesma lógica de padronização daquela utilizada para as demais proteínas (apêndice A). A média das densitometrias das amostras foi dividida pela média da densitometria da  $\beta$ -actina correspondente à membrana em análise.

Tanto o bloqueio com leite quanto as incubações com anticorpos foram realizados sobre o agitador *Platform Vari Mix* (Barnstead/Thermolyne). Já as lavagens foram realizadas à temperatura ambiente em agitadores *Roto Mix-50800* (Barnstead/Thermolyne).

Em seguida à reação com anticorpo secundário e lavagem, foi adicionado sobre a membrana, em local escuro, o reagente *Amersham™ ECL™ Select Western Blotting Detection Reagent* (GE Healthcare - Life Sciences), que ao reagir com a peroxidase conjugada ao anticorpo secundário por, no mínimo 5 minutos, emite luz, sendo esta captada por equipamento específico. Para adquirir a imagem da membrana, foi utilizado o Fotodocumentador L-Pix Chemi Express (Loccus).

Após a aquisição da imagem, foi realizada a densitometria das bandas (apêndice B), bem como a análise estatística por meio de *softwares* adequados.

### **3.4 Matriz plasmática**

A utilização da matriz plasmática para análise de A $\beta$  já vem sendo realizada e incentivada por diversos grupos científicos para investigação de potenciais marcadores da DA [151,152]. Isto pelo fato da fácil obtenção e por advir de um procedimento de baixo custo que pode ser replicado em larga escala. Com o advento tecnológico, atualmente tornou-se possível a análise mais consistente dos níveis plasmáticos desse peptídeo, uma vez que o A $\beta$  apresenta concentrações de 50 a 100 vezes menores no plasma e que as diferenças entre grupos (DA vs. Controles) aparentam ser menos expressivas quando comparadas aos níveis desse fragmento observados no liquor [153–156].

Para além das análises isoladas dos peptídeos A $\beta$ <sub>40</sub> e A $\beta$ <sub>42</sub>, estudos recentes validaram a utilização da razão dos níveis plasmáticos de A $\beta$ <sub>42</sub>/A $\beta$ <sub>40</sub> como potencial ferramenta, com alta acurácia diagnóstica, na detecção de placas senis relacionadas ao desenvolvimento da DA [151,157–159]. Pensando nisso, e em todos os benefícios relativos à obtenção dessa matriz, ela foi escolhida para a pesquisa de padrões desses fragmentos nos indivíduos com SD do presente estudo.

### 3.4.1 Obtenção e preparo de plasma para determinação de A $\beta$

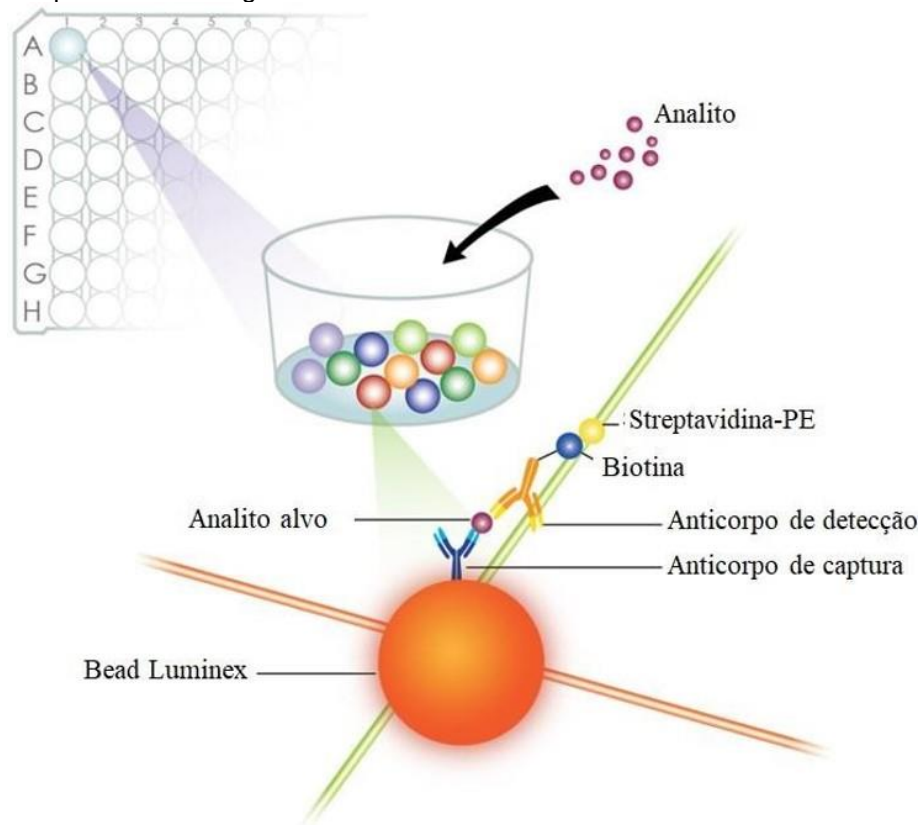
Para a obtenção da matriz plasmática, as amostras de sangue periférico foram coletadas em seis tubos a vácuo do tipo *monovet*, cada qual com capacidade para 10mL contendo anticoagulante citrato de sódio 0,106 mol/L. A separação do plasma foi obtida por meio de centrifugação por 15 minutos, a 3000 rpm. Na sequência, essa matriz foi aliquoteada em quatro criotubos (500 $\mu$ L/tubo) e armazenada em freezer - 80°C, para posterior análise das amostras.

### 3.4.2 Luminex® xMAP®

As concentrações dos peptídeos A $\beta$ <sub>40</sub> e A $\beta$ <sub>42</sub> foram determinadas pelo imunoenensaio fluorimétrico *MILLIPLEX®* (Milipore – Sigma Aldrich) e mensuradas pela plataforma Luminex® xMAP® (apêndice C). A tecnologia Luminex xMAP® (*MAP: Multiple Analyte Profiling*) envolve microesferas de látex com dois fluoróforos. Utilizando proporções precisas de dois fluoróforos, podem ser criados 100 conjuntos diferentes de microesferas – cada uma delas com uma assinatura baseada em “códigos de cores” e que podem ser identificadas pelo instrumento Luminex [160].

Os kits *MILLIPLEX®* utilizam estas microesferas como base do imunoenensaio ligando anticorpos diferentes a esferas de cores diferentes. Os ensaios se fundamentam na metodologia “sanduíche” convencional de dois sítios. Anticorpos de captura específicos para cada analito estão imobilizados às microesferas por ligações covalentes não reversíveis (figura 6).

**Figura 6 .** Princípio da metodologia Luminex.



Fonte: Retirado de WhiteSci, 2023.

A próxima etapa é a adição do anticorpo de detecção biotilado. Depois que o analito (proteína de interesse) se liga aos anticorpos de captura localizados na superfície das microesferas, a detecção final é feita através de um terceiro marcador fluorescente ligado ao anticorpo de detecção. O equipamento Luminex movimenta estas esferas em uma fila única através de feixes de dois lasers diferentes em um citômetro de fluxo. O primeiro feixe de laser classifica o código de cor para o ensaio e o segundo laser quantifica o sinal de reporte em cada microesfera.

### 3.5 Análise estatística

Os resultados foram analisados por meio do teste *Kolmogorov-Smirnov* para análise da verificação da normalidade dos resíduos; *Kruskal-Wallis*, teste não paramétrico utilizado para comparar três ou mais populações; *Dwass-Steel-Critchlow-Fligner* como teste *post-hoc* para análise comparativa e descritiva das variáveis numéricas para comparação entre dois grupos; teste *Chi-quadrado*, que se destina a encontrar um valor de dispersão para duas variáveis nominais, avaliando a associação

existente entre elas; Análise de Covariância (ANCOVA), a fim de avaliar o potencial de interação entre diferentes fatores nos grupos de estudo; teste de correlação de *Spearman*, para análise de correlação entre as variáveis.

O outro método utilizado foi *Classification And Regression Tree* (CART), um modelo de árvore de decisão que classifica os grupos segundo as variáveis estudadas e os separa de acordo com o diagnóstico, encontrando valores de referência para cada um deles [161]. Este é um modelo preditivo que utiliza um conjunto de dados quantitativos para calcular um valor alvo, sendo os nós terminais representantes das classificações mais relevantes das variáveis.

Os testes foram realizados por meio dos softwares Jamovi – versão 2.2 [162] e pacote R – versão 4.0 [163]. A significância estatística para as análises realizadas foi estabelecida com o valor de  $p \leq 0,05$  ( $\alpha = 95\%$ ).

## 4 RESULTADOS

Foi analisado o perfil demográfico de 211 indivíduos (tabela 1), havendo maior representatividade do gênero feminino tanto para o grupo DA quanto controle. O grupo SD foi considerado mais jovem em relação aos demais grupos, havendo também diferença de idade entre DA e controles. No quesito anos de estudo, foi possível observar que o grupo SD possui menor escolaridade em relação aos demais grupos, assim como o grupo DA quando comparado aos controles.

Quanto aos valores do teste cognitivo CAMCOG, SD e DA apresentaram menores escores quando comparados a controles, respectivamente. No entanto, não houve diferença entre as pontuações obtidas de SD e DA. Uma questão importante referente ao CAMCOG é que este possui pontuações diferentes para pessoas típicas (escore máximo – alta escolaridade: 63; baixa escolaridade: 75) e com SD (escore máximo: 109). Assim sendo, os valores brutos foram transformados em porcentagem para efeitos comparativos.

**Tabela 1.** Perfil demográfico dos indivíduos.

	Grupos			p	$\chi^2$	post hoc <sup>c</sup>
	SD (n=112)	DA (n=23)	Controle (n=76)			
<b>Gênero (M/F)</b>	58/54	6/17	25/51	<b>0,009<sup>a</sup></b>	9,37 <sup>a</sup>	-
<b>Idade (anos)</b>	37,4 ± 11,0	73,1 ± 6,9	58,6 ± 18,9	<b>&lt;0,001<sup>b</sup></b>	-	<b>SD vs Controle, p&lt;0,001</b> <b>SD vs DA, p&lt;0,001</b> <b>DA vs Controle, p=0,001</b>
<b>Escolaridade (anos)</b>	0,6 ± 1,0	6,0 ± 3,80	14,6 ± 4,22	<b>&lt;0,001<sup>b</sup></b>	-	<b>SD vs Controle, p&lt;0,001</b> <b>SD vs DA, p&lt;0,001</b> <b>DA vs Controle, p&lt;0,001</b>
<b>CAMCOG (%)</b>	54,5 ± 20,3	53,4 ± 17,7	86,7 ± 8,6	<b>&lt;0,001<sup>b</sup></b>	-	<b>SD vs Controle, p&lt;0,001</b> <b>SD vs DA, p=0,900</b> <b>DA vs Controle, p&lt;0,001</b>

Os dados estão descritos como média ± desvio padrão. M: masculino; F: feminino; SD: síndrome de Down; CAMCOG: Teste Cognitivo de *Cambridge*; CAMCOG-SD: Teste Cognitivo de *Cambridge* para pessoas com síndrome de Down. <sup>a</sup>Teste Chi-quadrado de Pearson; <sup>b</sup>Teste *Kruskal-Wallis*; <sup>c</sup>*Dwass-Steel-Critchlow-Fligner*. São Paulo, 2023.

Foi realizada a cariotipagem de 51 indivíduos com SD. Destas, 94,1% dos indivíduos apresentaram a trissomia livre do cromossomo 21; 3,9% demonstraram T21 devido a translocação robertsoniana envolvendo braço curto e longo do cromossomo 21, demonstrando compatibilidade com a síndrome; e 1,9%

demonstraram T21 em mosaicismo. Ainda sobre a casuística com SD, 3,57% dos indivíduos apresentaram obesidade, 4,45% diabetes mellitus tipo II, 17% hipotireoidismo e 5,35% dislipidemia.

A fim de melhor compreender o padrão de expressão proteica de APP, ADAM10, BACE1 e PSEN1 entre grupos, bem como dos peptídeos A $\beta$ <sub>40</sub> e A $\beta$ <sub>42</sub>, o grupo SD foi subclassificado em SDsd e SDcd, conforme consenso diagnóstico realizado por clínicos do LIM-27. O perfil demográfico estratificado pelos subgrupos pode ser observado abaixo (tabela 2).

Ambos os grupos de SD apresentam-se mais jovens em relação aos demais e, quando comparados entre si (SDcd vs. SDsd), SDcd demonstrou maior média de idade. Para as demais variáveis, as diferenças encontradas seguem os mesmos padrões em relação àqueles encontrados entre grupos sem estratificação das pessoas com SD por comprometimento cognitivo.

**Tabela 2.** Perfil demográfico dos indivíduos estratificados conforme consenso diagnóstico de comprometimento cognitivo entre pessoas com SD.

	Grupos				p	$\chi^2$	post hoc <sup>c</sup>
	SDcd (n=27)	SDsd (n=55)	DA (n=23)	Controle (n=76)			
<b>Gênero (M/F)</b>	14/13	33/22	6/17	25/51	<b>0,004<sup>a</sup></b>	13,2 <sup>a</sup>	-
<b>Idade (anos)</b>	45,0 ± 10,7	36,0 ± 10,1	73,1 ± 6,9	58,6 ± 18,9	<b>&lt;0,001<sup>b</sup></b>	-	SDcd vs SDsd, <i>p</i> =0,003 SDcd vs DA, <i>p</i> <0,001 SDcd vs Controle, <i>p</i> <0,001 SDsd vs DA, <i>p</i> <0,001 SDsd vs Controle, <i>p</i> <0,001
<b>Escolaridade (anos)</b>	0,36 ± 0,92	0,70 ± 1,03	6,0 ± 3,80	14,6 ± 4,22	<b>&lt;0,001<sup>b</sup></b>	-	SDcd vs SDsd, <i>p</i> =0,660 SDcd vs DA, <i>p</i> <0,001 SDcd vs Controle, <i>p</i> <0,001 SDsd vs DA, <i>p</i> <0,001 SDsd vs Controle, <i>p</i> <0,001
<b>CAMCOG (%)</b>	42,0 ± 17,9	58,8 ± 19,3	53,4 ± 17,7	86,7 ± 8,6	<b>&lt;0,001<sup>b</sup></b>	-	SDcd vs SDsd, <i>p</i> =0,004 SDcd vs DA, <i>p</i> =0,290 SDcd vs Controle, <i>p</i> <0,001 SDsd vs DA, <i>p</i> =0,580 SDsd vs Controle, <i>p</i> <0,001

Os dados estão descritos como média ± desvio padrão. M: masculino; F: feminino; SD: síndrome de Down; CAMCOG: Teste Cognitivo de *Cambridge*; CAMCOG-SD: Teste Cognitivo de *Cambridge* para pessoas com síndrome de Down. <sup>a</sup>Teste Chi-quadrado de Pearson; <sup>b</sup>Teste *Kruskal-Wallis*; <sup>c</sup>*Dwass-Steel-Critchlow-Fligner*. São Paulo, 2023.

Com relação aos potenciais biomarcadores em análise, foram encontradas diferenças estatisticamente significantes entre grupos para todas as proteínas (tabela 3, figura 4). Foi observada maior rAPP para ambos os grupos de SD em relação aos demais, não havendo diferença entre SDcd vs. SDsd, bem como menor rAPP em DA quando comparada a controles. Ao observar os fragmentos da APP de maneira isolada, notou-se menor expressão proteica tanto de APP130 e APP110 em SDcd em relação à SDsd; quanto de APP110 em SDcd em relação aos demais grupos. O oposto foi observado no grupo DA que apresentou maiores níveis de APP110 em relação aos controles típicos.

No tocante às secretases, foi encontrada menor expressão de ADAM10 em SDsd em comparação aos controles; menor expressão de BACE1 para ambos os subgrupos SDcd e SDsd quando comparados aos DA e controles; maior expressão de BACE1 nos DA em comparação aos controles; bem como menor expressão de PSEN1 em SDcd e SDsd em relação aos DA e controles.

Já em relação ao peptídeo A $\beta$  foi possível observar maiores níveis plasmáticos de A $\beta$ <sub>40</sub> tanto em SDcd quanto em SDsd quando comparados a controles típicos. Resultados inversos foram encontrados em relação à razão A $\beta$ <sub>42</sub>/A $\beta$ <sub>40</sub>, nos quais os grupos SDcd e SDsd apresentaram razão diminuída em relação aos controles. Não foi observada diferença estatística entre grupos em relação aos níveis de A $\beta$ <sub>42</sub>. Além disso, vale salientar que não foram mensurados níveis de A $\beta$  em indivíduos pertencentes ao grupo DA.

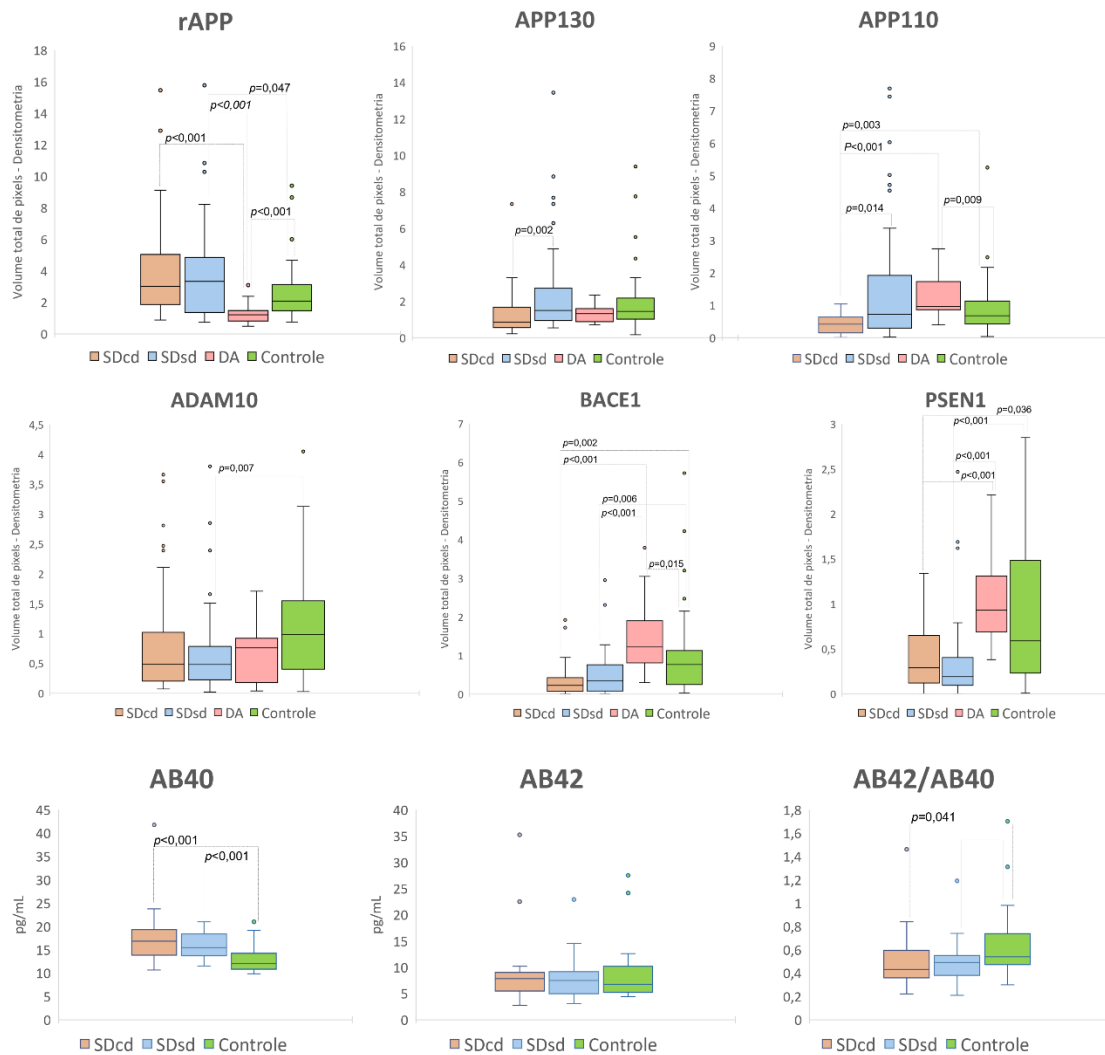
**Tabela 3.** Perfil demográfico e concentrações de potenciais biomarcadores estratificados conforme consenso diagnóstico de comprometimento cognitivo entre pessoas com SD.

Proteínas <sup>a</sup>	Grupos				p <sup>c</sup>	ε <sup>d</sup>	Post hoc <sup>e</sup>
	SDcd (n=27)	SDsd (n=53)	DA (n=23)	Controles (n=76)			
rAPP	4,19 ± 3,53	6,11 ± 13,9	1,27 ± 0,57	3,07 ± 4,85	<b>&lt;0,001</b>	0,22	SDcd vs SDsd, <i>p</i> =0,999 <b>SDcd vs DA, <i>p</i>&lt;0,001</b> SDcd vs Controle, <i>p</i> =0,069 <b>SDsd vs DA, <i>p</i>&lt;0,001</b> <b>SDsd vs Controle, <i>p</i>=0,047</b> <b>DA vs Controle, <i>p</i>&lt;0,001</b>
APP130	1,36 ± 1,44	8,59 ± 15,4	1,33 ± 0,48	1,83 ± 1,55	<b>0,001</b>	0,09	<b>SDcd vs SDsd, <i>p</i>=0,002</b> SDcd vs DA, <i>p</i> =0,327 SDcd vs Controle, <i>p</i> =0,080 SDsd vs DA, <i>p</i> =0,134 SDsd vs Controle, <i>p</i> =0,167 DA vs Controle, <i>p</i> =0,639
APP110	0,42 ± 0,28	3,14 ± 9,02	1,22 ± 0,59	0,85 ± 0,75	<b>&lt;0,001</b>	0,15	<b>SDcd vs SDsd, <i>p</i>=0,014</b> <b>SDcd vs DA, <i>p</i>&lt;0,001</b> <b>SDcd vs Controle, <i>p</i>=0,003</b> SDsd vs DA, <i>p</i> =0,712 SDsd vs Controle, <i>p</i> =0,713 <b>DA vs Controle, <i>p</i>=0,009</b>
ADAM10	1,06 ± 1,06	0,69 ± 0,74	0,67 ± 0,44	1,13 ± 0,87	<b>0,008</b>	0,07	SDcd vs SDsd, <i>p</i> =0,459 SDcd vs DA, <i>p</i> =0,817 SDcd vs Controle, <i>p</i> =0,766 SDsd vs DA, <i>p</i> =0,817 <b>SDsd vs Controle, <i>p</i>=0,007</b> DA vs Controle, <i>p</i> =0,146
BACE1	0,39 ± 0,49	0,49 ± 0,57	1,41 ± 0,88	0,90 ± 0,93	<b>&lt;0,001</b>	0,22	SDcd vs SDsd, <i>p</i> =0,705 <b>SDcd vs DA, <i>p</i>&lt;0,001</b> <b>SDcd vs Controle, <i>p</i>=0,002</b> SDsd vs DA, <i>p</i> <0,001 <b>SDsd vs Controle, <i>p</i>=0,006</b> <b>DA vs Controle, <i>p</i>=0,015</b>
PSEN1	0,44 ± 0,42	0,35 ± 0,49	1,05 ± 0,49	0,93 ± 0,81	<b>&lt;0,001</b>	0,22	SDcd vs SDsd, <i>p</i> =0,656 <b>SDcd vs DA, <i>p</i>&lt;0,001</b> <b>SDcd vs Controle, <i>p</i>=0,036</b> <b>SDsd vs DA, <i>p</i>&lt;0,001</b> <b>SDsd vs Controle, <i>p</i>&lt;0,001</b> DA vs Controle, <i>p</i> =0,511
<b>Peptídeos<sup>b</sup></b>	<b>SDcd (n=21)</b>	<b>SDsd (n=25)</b>	<b>-</b>	<b>Controles (n=30)</b>			
Aβ <sub>40</sub>	32,9 ± 70,1	15,8 ± 2,76	-	13,0 ± 2,99	<b>&lt;0,001</b>	0,25	SDcd vs SDsd, <i>p</i> =0,553 <b>SDcd vs Controle, <i>p</i>&lt;0,001</b> <b>SDsd vs Controle, <i>p</i>=0,001</b>
Aβ <sub>42</sub>	15,7 ± 30,6	8,01 ± 4,09	-	8,51 ± 5,36	0,793	0,01	SDcd vs SDsd, <i>p</i> =0,857 SDcd vs Controle, <i>p</i> =0,786 SDsd vs Controle, <i>p</i> =0,999
Aβ <sub>42</sub> / Aβ <sub>40</sub>	0,50 ± 0,26	0,49 ± 0,19	-	0,64 ± 0,29	<b>&lt;0,019</b>	0,10	SDcd vs SDsd, <i>p</i> =0,921 <b>SDcd vs Controle, <i>p</i>=0,041</b> <b>SDsd vs Controle, <i>p</i>&lt;0,055</b>

Os dados estão descritos como média ± desvio padrão. SD: síndrome de Down; APP130: Proteína Precursora Amilóide – 130kDa; APP110: Proteína Precursora Amilóide – 110kDa; rAPP: razão entre os fragmentos 130/110kDa da Proteína Precursora Amilóide; ADAM10: A *desintegrin metaloproteinase 10*; BACE1: *beta-site APP cleaving enzyme 1*; PSEN1: *presenilina 1*; Aβ: peptídeo β-amilóide; <sup>a</sup>Valores quantificados a partir do volume total de pixels obtidos por densitometria; <sup>b</sup>Valores em pg/ml. <sup>c</sup>Teste *Kruskal-Wallis*; <sup>d</sup>Tamanho de efeito; <sup>e</sup>*Dwass-Steel-Critchlow-Fligner*. São Paulo, 2023.



**Figura 7.** Box plot das concentrações de potenciais biomarcadores entre grupos.



SD: síndrome de Down; APP130: Proteína Precursora Amilóide – 130kDa; APP110: Proteína Precursora Amilóide – 110kDa; rAPP: razão entre os fragmentos 130/110kDa da Proteína Precursora Amilóide; ADAM10: *A disintegrin metalloproteinase 10*; BACE1: *beta-site APP cleaving enzyme 1*; PSEN1: presenilina 1; A $\beta$ : peptídeo  $\beta$ -amilóide; Valores quantificados a partir do volume total de pixels obtidos por densitometria. Fonte: Da autora. São Paulo, 2023.

Considerando que a análise de covariância revelou interação entre idade com as APP-secreases, os dados também foram observados em relação à estratificação etária (tabela 4). É possível observar alteração dos níveis proteicos entre grupos, principalmente, nas faixas etárias de 35 a 49 anos e entre aqueles com 50 anos ou mais.

**Tabela 4.** Concentrações de potenciais biomarcadores estratificados conforme faixa etária e consenso diagnóstico.

Proteína	Grupos	Faixa Etária (anos)						p <sup>a</sup>	ε <sup>b</sup>	Post hoc <sup>c</sup>
		N	20-34	N	35-49	N	≥50			
rAPP	SDsd	2	3,46 ± 1,40	18	3,33 ± 2,02	6	5,59 ± 5,15	0,898	0,01	-
	SDcd	4	7,40 ± 18,8	13	3,78 ± 3,62	10	7,48 ± 8,10	0,407	0,03	-
	DA	-	-	-	-	23	1,27 ± 0,57	-	-	-
	Controle	13	2,05 ± 0,98	6	2,96 ± 1,74	56	3,33 ± 5,60	0,358	0,02	-
	p <sup>a</sup> ε <sup>b</sup> Post hoc <sup>c</sup>		0,039 0,15 SDsd vs. Controle*		0,911 0,00 -		<0,001 0,31 SDsd vs. DA* SDcd vs. DA** DA vs. Controle***			
APP130	SDsd	2	1,63 ± 0,72	18	1,30 ± 0,95	6	1,34 ± 2,14	0,140	0,15	-
	SDcd	4	5,48 ± 11,9	13	13,1 ± 19,5	10	8,38 ± 14,5	0,476	0,03	-
	DA	-	-	-	-	23	1,33 ± 0,48	-	-	-
	Controle	13	1,76 ± 1,64	6	1,08 ± 0,86	56	1,93 ± 1,59	0,084	0,06	-
	p <sup>a</sup> ε <sup>b</sup> Post hoc <sup>c</sup>		0,360 0,04 -		0,009 0,26 SDcd vs. SDsd*		0,007 0,13 SDcd vs. Controle*			
APP110	SDsd	2	0,53 ± 0,25	18	0,43 ± 0,27	6	0,33 ± 0,30	0,394	0,07	-
	SDcd	4	3,33 ± 12,2	13	2,97 ± 3,16	10	2,83 ± 4,71	0,088	0,09	-
	DA	-	-	-	-	23	1,22 ± 0,44	-	-	-
	Controle	13	0,98 ± 0,85	6	0,42 ± 0,23	56	0,87 ± 0,75	0,147	0,05	-
	p <sup>a</sup> ε <sup>b</sup> Post hoc <sup>c</sup>		0,811 0,01 -		0,003 0,31 SDcd vs. SDsd** SDsd vs. Controle*		<0,001 0,22 SDcd vs. Controle* SDcd vs. DA*** DA vs. Controle*			
ADAM10	SDsd	27	0,58 ± 0,52	19	1,37 ± 1,05	7	0,85 ± 1,19	0,091	0,18	-
	SDcd	4	0,65 ± 0,61	13	0,56 ± 0,68	10	1,18 ± 1,20	0,070	0,10	-
	DA	-	-	-	-	23	0,67 ± 0,44	-	-	-
	Controle	13	0,62 ± 0,74	6	0,73 ± 0,48	57	1,29 ± 0,89	0,011	0,11	20-34 vs. ≥50*
	p <sup>a</sup> ε <sup>b</sup> Post hoc <sup>c</sup>		0,907 0,00 -		0,011 0,24 SDcd vs. SDsd**		0,012 0,11 DA vs. Controle*			
BACE1	SDsd	26	0,14 ± 0,09	16	0,34 ± 0,49	7	0,54 ± 0,54	0,120	0,16	-
	SDcd	4	0,41 ± 0,50	13	0,74 ± 0,68	10	0,25 ± 0,32	0,031	0,14	35-49 vs. ≥50*
	DA	-	-	-	-	23	1,41 ± 0,88	-	-	-
	Controle	13	0,59 ± 1,54	6	1,02 ± 0,61	56	0,96 ± 0,77	<0,001	0,19	20-34 vs. 35-49* 20-34 vs. ≥50***
	p <sup>a</sup> ε <sup>b</sup> Post hoc <sup>c</sup>		0,704 0,01 -		0,008 0,28 SDcd vs. SDsd*		<0,001 0,22 SDsd vs. Controle* SDsd vs. DA** SDcd vs. DA**			
PSEN1	SDsd	19	0,74 ± 0,59	15	0,32 ± 0,33	7	0,48 ± 0,40	0,363	0,09	-
	SDcd	4	0,55 ± 0,66	13	0,19 ± 0,13	6	0,16 ± 0,22	0,05	0,14	-
	DA	-	-	-	-	23	1,05 ± 0,49	-	-	-
	Controle	12	0,35 ± 0,46	6	0,37 ± 0,14	55	1,13 ± 0,82	0,001	0,18	20-34 vs. ≥50**
	p <sup>a</sup> ε <sup>b</sup> Post hoc <sup>c</sup>		0,540 0,03 -		0,070 0,16 -		0,001 0,18 SDsd vs. Controle** SDsd vs. DA**			

Valores quantificados a partir do volume total de pixels obtidos por densitometria, descritos como média ± desvio padrão. N: número de indivíduos; SD: síndrome de Down; APP130: Proteína Precursora Amilóide – 130kDa; APP110: Proteína Precursora Amilóide – 110kDa; rAPP: razão entre os fragmentos 130/110kDa da Proteína Precursora Amilóide; ADAM10: *A disintegrin metalloproteinase 10*; BACE1: *beta-site APP cleaving enzyme 1*; PSEN1: presenilina 1; Aβ: peptídeo β-amilóide; <sup>a</sup>Teste *Kruskal-Wallis*; <sup>b</sup>Tamanho de efeito; <sup>c</sup>*Dwass-Steel-Critchlow-Fligner*. \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001. São Paulo, 2023.

Foi realizada a correlação das concentrações dos potenciais biomarcadores entre os grupos do estudo (tabelas 5 a 8). Em relação ao grupo controle, observou-se correlação positiva ( $\rho \geq 0,3$  e  $p \leq 0,05$ ) entre: (i) secretases e pontuações obtidas na avaliação de rastreio cognitivo CAMCOG, bem como com a idade; (ii) fragmentos de APP (130 e 110kDa); (iii) APP110, ADAM10 e BACE1 com PSEN1; (iv) PSEN1,  $A\beta_{40}$  e  $A\beta_{42}$ ; e (v)  $A\beta_{42}$  e razão  $A\beta_{42}/A\beta_{40}$ . Correlação negativa ( $\rho \leq -0,3$  e  $p \leq 0,05$ ), foi observada apenas entre APP110 e rAPP.

Para o grupo SDsd observou-se correlação positiva ( $\rho \geq 0,3$  e  $p \leq 0,05$ ) entre: (i) fragmentos de APP (130 e 110kDa); (ii)  $A\beta_{40}$  e  $A\beta_{42}$ ; (iii)  $A\beta_{40}$  e razão  $A\beta_{42}/A\beta_{40}$ ; e (iv)  $A\beta_{42}$  e razão  $A\beta_{42}/A\beta_{40}$ . Em relação às correlações negativas ( $\rho \leq -0,3$  e  $p \leq 0,05$ ), foi possível observá-las entre: (i) APP110 e ADAM10 e (ii) PSEN1 e idade.

O grupo SDcd demonstrou correlações positivas ( $\rho \geq 0,3$  e  $p \leq 0,05$ ) entre: (i) idade e BACE1; (ii) fragmentos de APP (130 e 110kDa); (iii)  $A\beta_{40}$  e  $A\beta_{42}$ ; e (iv)  $A\beta_{42}$  e razão  $A\beta_{42}/A\beta_{40}$ . Já as correlações negativas ( $\rho \leq -0,3$  e  $p \leq 0,05$ ) foram identificadas entre: (i) APP130 e BACE1; (ii) APP110 e PSEN1; e (iii) APP110 e rAPP.

Em relação ao grupo DA foram observadas correlações positivas ( $\rho \geq 0,3$  e  $p \leq 0,05$ ) entre: (i) fragmentos de APP (130 e 110kDa); (ii) BACE1 e PSEN1; e (iii) PSEN1 e rAPP. Correlações negativas ( $\rho \leq -0,3$  e  $p \leq 0,05$ ) foram expressas entre: (i) APP110 e rAPP; e (ii) CAMCOG e PSEN1.

**Tabela 5.** Correlação das concentrações dos potenciais biomarcadores entre o grupo controle.

	APP130	APP110	ADAM10	BACE1	PSEN1	A $\beta$ <sub>40</sub>	A $\beta$ <sub>42</sub>	A $\beta$ <sub>42</sub> /A $\beta$ <sub>40</sub>	rAPP
<b>CAMCOG</b>	-0,022 (0,857)	0,090 (0,090)	0,401 (<0,001)*	0,337 (0,003)*	0,530 (<0,001)*	0,076 (0,695)	0,055 (0,778)	0,015 (0,938)	-0,063 (0,601)
<b>Idade</b>	0,231 (0,051)*	0,265 (0,025)*	0,506 (<0,001)*	0,510 (<0,001)*	0,653 (<0,001)*	0,080 (0,675)	0,109 (0,567)	0,135 (0,478)	-0,103 (0,387)
<b>APP130</b>	-	0,702 (<0,001)*	0,076 (0,525)	-0,130 (0,275)	0,282 (0,019)*	0,138 (0,483)	-0,025 (0,900)	-0,129 (0,514)	0,169 (0,156)
<b>APP110</b>	-	-	0,075 (0,532)	0,022 (0,856)	0,432 (<0,001)*	0,270 (0,164)	-0,005 (0,979)	-0,202 (0,302)	-0,481 (<0,001)*
<b>ADAM10</b>	-	-	-	0,321 (0,005)*	0,549 (<0,001)*	0,265 (0,158)	0,109 (0,566)	-0,051 (0,790)	-0,074 (0,536)
<b>BACE1</b>	-	-	-	-	0,423 (<0,001)*	-0,018 (0,924)	0,230 (0,222)	0,312 (0,094)	-0,120 (0,314)
<b>PSEN1</b>	-	-	-	-	-	0,254 (0,202)	0,388 (0,046)*	0,250 (0,208)	-0,168 (0,167)
<b>A<math>\beta</math><sub>40</sub></b>	-	-	-	-	-	-	0,548 (0,002)*	0,104 (0,583)	-0,166 (0,400)
<b>A<math>\beta</math><sub>42</sub></b>	-	-	-	-	-	-	-	0,853 (<0,001)*	0,101 (0,607)
<b>A<math>\beta</math><sub>42</sub>/A<math>\beta</math><sub>40</sub></b>	-	-	-	-	-	-	-	-	0,264 (0,174)
<b>Força da correlação observada (<math>\rho</math>)</b>			<-0,7	<-0,5	<-0,3	>0,3	>0,5	>0,7	

Valores referentes ao coeficiente de correlação de *Spearman* ( $p$ -valor). APP130: Proteína Precursora Amilóide – 130kDa; APP110: Proteína Precursora Amilóide – 110kDa; rAPP: razão entre os fragmentos 130/110kDa da Proteína Precursora Amilóide; ADAM10: *A desintegrin metaloproteinase 10*; BACE1: *beta-site APP cleaving enzyme 1*; PSEN1: presenilina 1; A $\beta$ : peptídeo  $\beta$ -amilóide; CAMCOG: Teste Cognitivo de *Cambridge*; Correlação forte: <-0,7 e >0,7; Correlação moderada: <-0,5 e >0,5; Correlação fraca: <-0,3 e >0,3; \*significância estatística  $p \leq 0,05$ . São Paulo, 2023.

**Tabela 6.** Correlação das concentrações dos potenciais biomarcadores entre o grupo SDsd.

	APP130	APP110	ADAM10	BACE1	PSEN1	A $\beta$ <sub>40</sub>	A $\beta$ <sub>42</sub>	A $\beta$ <sub>42</sub> /A $\beta$ <sub>40</sub>	rAPP
<b>CAMCOG</b>	-0,044 (0,775)	-0,005 (0,977)	-0,071 (0,634)	0,130 (0,390)	0,044 (0,792)	0,102 (0,635)	-0,110 (0,610)	-0,196 (0,359)	-0,232 (0,129)
<b>Idade</b>	0,044 (0,761)	0,135 (0,351)	0,023 (0,868)	0,165 (0,165)	-0,442 (0,004)*	0,158 (0,450)	0,202 (0,332)	0,101 (0,631)	-0,035 (0,810)
<b>APP130</b>	-	0,840 (<0,001)*	-0,281 (0,048)*	0,193 (0,199)	-0,216 (0,193)	-0,055 (0,807)	-0,096 (0,672)	-0,096 (0,672)	0,145 (0,316)
<b>APP110</b>	-	-	-0,330 (0,019)*	0,222 (0,138)	-0,266 (0,107)	-0,017 (0,940)	-0,122 (0,589)	-0,127 (0,573)	-0,287 (0,043)*
<b>ADAM10</b>	-	-	-	-0,149 (0,307)	-0,109 (0,499)	0,236 (0,256)	0,151 (0,470)	0,055 (0,794)	0,028 (0,845)
<b>BACE1</b>	-	-	-	-	-0,082 (0,621)	0,245 (0,238)	0,326 (0,112)	0,298 (0,148)	-0,172 (0,254)
<b>PSEN1</b>	-	-	-	-	-	0,107 (0,617)	-0,033 (0,878)	-0,199 (0,352)	0,051 (0,759)
<b>A<math>\beta</math><sub>40</sub></b>	-	-	-	-	-	-	0,785 (<0,001)*	0,470 (0,018)*	-0,059 (0,793)
<b>A<math>\beta</math><sub>42</sub></b>	-	-	-	-	-	-	-	0,897 (<0,001)*	0,175 (0,437)
<b>A<math>\beta</math><sub>42</sub>/A<math>\beta</math><sub>40</sub></b>	-	-	-	-	-	-	-	-	0,242 (0,278)
<b>Força da correlação observada (<math>\rho</math>)</b>			<-0,7	<-0,5	<-0,3	>0,3	>0,5	>0,7	

Valores referentes ao coeficiente de correlação de *Spearman* ( $p$ -valor). APP130: Proteína Precursora Amilóide – 130kDa; APP110: Proteína Precursora Amilóide – 110kDa; rAPP: razão entre os fragmentos 130/110kDa da Proteína Precursora Amilóide; ADAM10: *A desintegrin metaloproteinase 10*; BACE1: *beta-site APP cleaving enzyme 1*; PSEN1: presenilina 1; A $\beta$ : peptídeo  $\beta$ -amilóide; CAMCOG: Teste Cognitivo de *Cambridge*; Correlação forte: <-0,7 e >0,7; Correlação moderada: <-0,5 e >0,5; Correlação fraca: <-0,3 e >0,3; \*significância estatística  $p \leq 0,05$ . São Paulo, 2023.

**Tabela 7.** Correlação das concentrações dos potenciais biomarcadores entre o grupo SDcd.

	APP130	APP110	ADAM10	BACE1	PSEN1	A $\beta$ <sub>40</sub>	A $\beta$ <sub>42</sub>	A $\beta$ <sub>42</sub> /A $\beta$ <sub>40</sub>	rAPP
<b>CAMCOG</b>	-0,042 (0,846)	0,216 (0,311)	-0,065 (0,763)	-0,080 (0,709)	-0,264 (0,261)	0,027 (0,916)	-0,013 (0,958)	0,083 (0,744)	-0,382 (0,066)
<b>Idade</b>	-0,355 (0,069)	-0,278 (0,160)	-0,276 (0,164)	0,396 (0,041)*	-0,030 (0,892)	0,192 (0,404)	0,033 (0,887)	-0,260 (0,255)	0,036 (0,857)
<b>APP130</b>	-	0,730 ( $<0,001$ )*	0,114 (0,573)	-0,428 (0,026)*	-0,241 (0,267)	-0,021 (0,927)	0,108 (0,641)	0,256 (0,262)	0,194 (0,333)
<b>APP110</b>	-	-	0,311 (0,114)	-0,189 (0,344)	-0,447 (0,032)*	-0,142 (0,538)	-0,061 (0,791)	0,171 (0,458)	-0,442 (0,021)*
<b>ADAM10</b>	-	-	-	-0,132 (0,512)	-0,101 (0,647)	-0,016 (0,944)	0,166 (0,471)	0,203 (0,376)	-0,321 (0,102)
<b>BACE1</b>	-	-	-	-	0,213 (0,328)	0,151 (0,515)	0,015 (0,949)	-0,166 (0,473)	-0,241 (0,225)
<b>PSEN1</b>	-	-	-	-	-	0,367 (0,134)	0,171 (0,498)	-0,043 (0,864)	0,340 (0,113)
<b>A<math>\beta</math><sub>40</sub></b>	-	-	-	-	-	-	0,597 (0,004)*	-0,065 (0,779)	0,071 (0,760)
<b>A<math>\beta</math><sub>42</sub></b>	-	-	-	-	-	-	-	0,695 ( $<0,001$ )*	0,049 (0,833)
<b>A<math>\beta</math><sub>42</sub>/A<math>\beta</math><sub>40</sub></b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-0,100 (0,666)

Força da correlação observada ( $\rho$ )

&lt;-0,7

&lt;-0,5

&lt;-0,3

&gt;0,3

&gt;0,5

&gt;0,7

Valores referentes ao coeficiente de correlação de *Spearman* ( $p$ -valor). APP130: Proteína Precursora Amilóide – 130kDa; APP110: Proteína Precursora Amilóide – 110kDa; rAPP: razão entre os fragmentos 130/110kDa da Proteína Precursora Amilóide; ADAM10: *A desintegrin metaloproteinase 10*; BACE1: *beta-site APP cleaving enzyme 1*; PSEN1: presenilina 1; A $\beta$ : peptídeo  $\beta$ -amilóide; CAMCOG: Teste Cognitivo de *Cambridge*; Correlação forte:  $<-0,7$  e  $>0,7$ ; Correlação moderada:  $<-0,5$  e  $>0,5$ ; Correlação fraca:  $<-0,3$  e  $>0,3$ ; \*significância estatística  $p \leq 0,05$ . São Paulo, 2023.

**Tabela 8.** Correlação das concentrações dos potenciais biomarcadores entre o grupo DA.

	APP130	APP110	ADAM10	BACE1	PSEN1	rAPP
<b>CAMCOG</b>	0,147 (0,502)	0,157 (0,474)	0,006 (0,979)	-0,292 (0,176)	-0,420 (0,046)*	-0,180 (0,411)
<b>Idade</b>	0,137 (0,532)	0,066 (0,765)	-0,034 (0,878)	-0,028 (0,901)	-0,173 (0,429)	0,007 (0,974)
<b>APP130</b>	-	0,570 (0,004)*	-0,248 (0,254)	0,200 (0,361)	0,150 (0,495)	0,074 (0,737)
<b>APP110</b>	-	-	0,298 (0,168)	0,018 (0,934)	-0,296 (0,170)	-0,663 ( $<0,001$ )*
<b>ADAM10</b>	-	-	-	0,031 (0,890)	0,008 (0,971)	-0,378 (0,075)
<b>BACE1</b>	-	-	-	-	0,495 (0,016)*	0,255 (0,241)
<b>PSEN1</b>	-	-	-	-	-	0,450 (0,031)*

Força da correlação observada ( $\rho$ )

&lt;-0,7

&lt;-0,5

&lt;-0,3

&gt;0,3

&gt;0,5

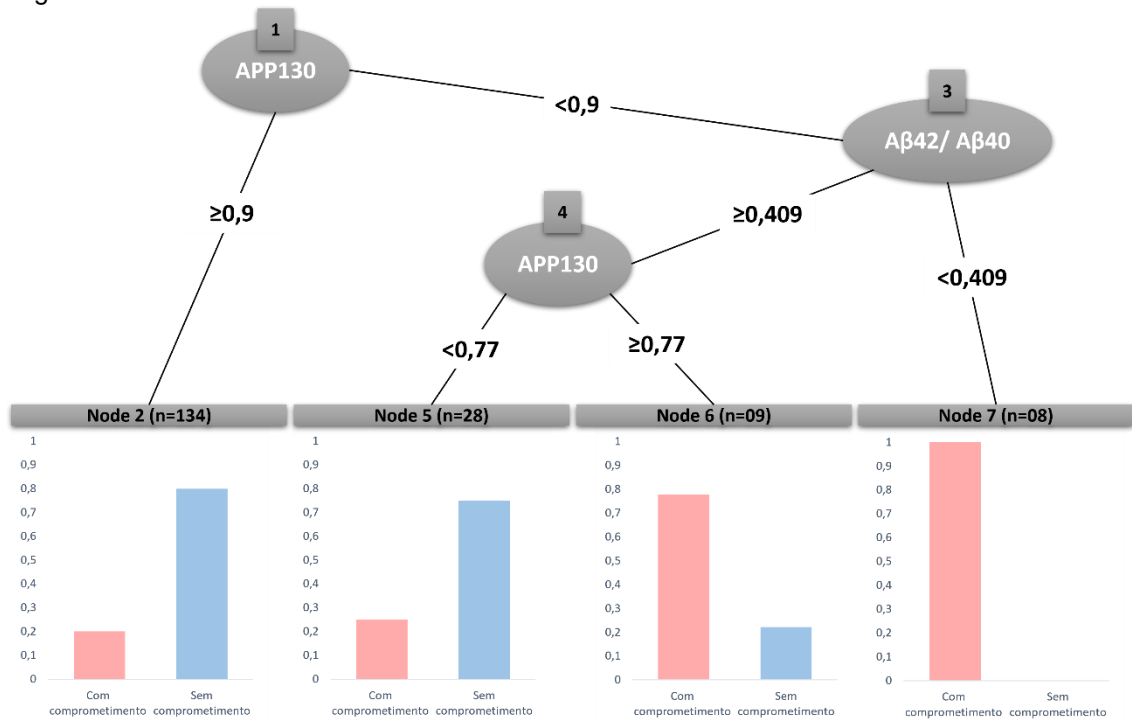
&gt;0,7

Valores referentes ao coeficiente de correlação de *Spearman* ( $p$ -valor). APP130: Proteína Precursora Amilóide – 130kDa; APP110: Proteína Precursora Amilóide – 110kDa; rAPP: razão entre os fragmentos 130/110kDa da Proteína Precursora Amilóide; ADAM10: *A desintegrin metaloproteinase 10*; BACE1: *beta-site APP cleaving enzyme 1*; PSEN1: presenilina 1; CAMCOG: Teste Cognitivo de *Cambridge*; Correlação forte:  $<-0,7$  e  $>0,7$ ; Correlação moderada:  $<-0,5$  e  $>0,5$ ; Correlação fraca:  $<-0,3$  e  $>0,3$ ; \*significância estatística  $p \leq 0,05$ . São Paulo, 2023.

Com o modelo de árvore de decisão observou-se que casos nos quais há comprometimento cognitivo, independentemente se existe ou não a presença da T21, podem ser preditos como APP130kDa  $< 0,9$ , A $\beta$ <sub>42</sub>/A $\beta$ <sub>40</sub>  $\geq 0,409$  e APP130  $\geq 0,77$  ou

APP130kDa < 0,9, A $\beta$ <sub>42</sub>/A $\beta$ <sub>40</sub> < 0,409, com acurácia diagnóstica de 79,9% (sensibilidade: 30,6%; especificidade: 98,5%; coeficiente de concordância de Kappa: 0,365) (figura 8).

**Figura 8.** Árvore de decisão referente à classificação quanto a presença de comprometimento cognitivo.



Sem comprometimento: grupos controle e SDsd; Com comprometimento: grupos SDcd e DA. Modelo preditivo com árvore de classificação e regressão - *Classification And Regression Tree (CART)*. Fonte: Da autora. São Paulo, 2023.

## 5 DISCUSSÃO

Este estudo objetivou analisar os padrões de potenciais marcadores biológicos envolvidos no desenvolvimento de placas senis na DA em indivíduos com SD. Para tanto foram determinadas as expressões das proteínas APP (peptídeos secretados), ADAM10, BACE1 e PSEN1 em plaquetas de sangue periférico, entre indivíduos com SD (com e sem declínio cognitivo), DA e controles típicos cognitivamente saudáveis. Os níveis plasmáticos de A $\beta$  também foram mensurados.

No tocante à APP, observou-se razão aumentada para ambos os subgrupos SD em comparação aos demais, não havendo diferença entre SDcd vs. SDsd. Já o grupo DA apresentou razão 2,5 vezes menor de APP em relação aos controles. Vários são os estudos que já identificaram menor razão entre os fragmentos APP130kDa e APP110kDa em pacientes com DA [135,146,148,164–173]. No entanto, as pesquisas que se destinam a observar os mecanismos fisiopatológicos da DA, por meio da análise de possíveis biomarcadores periféricos em SD, têm sido desenvolvidas em menor escala [174]. O primeiro estudo que se propôs a analisar a expressão de APPs por meio de *Western Blotting* entre pessoas com SD, comparando-as com DA e controles, foi realizado por um grupo italiano, em 1996 [135]. Como resultado, identificou-se menor rAPP em DA, assim como em nossos achados.

No que se refere à rAPP aumentada em SDcd, quando comparada ao DA, tais achados podem ter relação direta com a T21, uma vez que essa síndrome apresenta um desbalanço da dosagem gênica de *BACE2*, cuja proteína codificada, apesar de análoga à *BACE1*, apresenta função de  $\theta$ -secretase (similar à  $\alpha$ -secretase). Partindo do pressuposto que o processamento proteolítico da APP por  $\alpha$  e  $\beta$  gera, respectivamente, os fragmentos APP130kDa (fragmento solúvel de APP $\alpha$  – sAPP $\alpha$ ) e APP110kDa (fragmento solúvel de APP $\beta$  – sAPP $\beta$ ), representados como as formas madura e imatura da APP [172,175,176], e que a rAPP é tida pela fração APP130/APP110kDa, o racional de que a *BACE2* esteja interferindo na rAPP não deve ser descartado. Além disso, sugere-se que ação da *BACE2* possa estar envolvida na busca da homeostase em relação ao desequilíbrio na produção de A $\beta$  nos indivíduos SDcd. Isso pelo fato da *BACE2* clivar o produto da  $\beta$ -secretase (APP  $\beta$ -CTF) em sítios catalíticos específicos de modo a impedir a formação de A $\beta$ , implicando na redução da toxicidade neuronal e no comprometimento de várias

funções neuronais [122,177–181]. Esse fato, somado às correlações negativas da rAPP com o fragmento de APP110kDa observadas para todos os grupos deste estudo, poder fortalecer a ideia de que outras proteínas, como a BACE2, estejam envolvidas tanto no processamento fisiológico da APP quanto em mecanismos compensatórios na presença da desregulação homeostática envolvendo essa cascata.

Outro ponto importante relacionado ao aumento da rAPP na casuística com SD, pode ter ligação direta com o aumento do gene *ETS2* (localizado no braço longo do cromossomo 21; 21q22.2), responsável pela codificação do fator de transcrição que promove a expressão do *APP* [182,183]. Não obstante, há ainda o aumento da expressão gênica de *DNMT3L* (localização: 21q22.3) nas células progenitoras neurais, que induz o aumento do *APP* na diferenciação de neurônios [18,184].

Ao observar os fragmentos da APP de maneira isolada, o grupo SDcd demonstrou expressões diminuídas de APP130- e APP110kDa em relação aos demais grupos. Um estudo prévio realizado por Ehrlich et al. [176], que analisou o efeito do peróxido de hidrogênio sobre a expressão dos fragmentos da APP (130, 110 e 106kDa), em plaquetas tanto de modelo animal quanto de humanos, evidenciou diminuição expressiva desses fragmentos quando expostos a maiores níveis de estresse oxidativo. Isto posto, e considerando que a cópia extra do gene *da superoxide dismutase 1 (SOD-1)* eleva a atividade enzimática em diferentes tipos celulares em pessoas com SD [185,186], incluindo as plaquetas, a redução expressiva dos fragmentos da APP (130 e 110kDa) pode estar relacionada não só ao processo demencial [40,42–44,49,187], mas também aos danos oxidativos oriundos da T21.

Além das alterações supracitadas, foi observado aumento da expressão de APP110kDa em DA, resultado este condizente com a menor rAPP neste grupo. À luz da literatura, já foram desenvolvidos estudos reportando aumento da expressão proteica de sAPP $\beta$  no liquor [188–191], plasma [192] e plaquetas [193] tanto de pessoas com comprometimento cognitivo leve (CCL, quadro clínico em que ocorre declínio em um ou mais domínios cognitivos, sendo considerado fator de risco para desenvolvimento de DA), quanto com DA. Apesar disso, a diminuição desse fragmento também já foi relatada em matrizes distintas [194,195], revelando que ainda há incongruências na literatura acerca dos níveis proteicos da sAPP $\beta$  em DA.



Em relação à ADAM10, SDsd apresentou menor expressão proteica quando comparado aos controles. Considerando-se a hipótese de que as alterações oriundas da DA na periferia reflitam diretamente àquelas ocorridas no sistema nervoso central (SNC), esses achados corroboram um estudo que demonstrou níveis de expressão proteica de ADAM10 reduzidos tanto em cérebro de adultos com SD quanto naqueles com DA [196].

A ADAM10 é uma  $\alpha$ -secretase que possui a APP como um de seus substratos de clivagem, mediante via não amiloidogênica. Em plaquetas já foi apontada diminuição significativa dos níveis de ADAM10 em DA quando comparado a controles [171,197,198], bem como uma diminuição dos níveis de  $\alpha$ APPs [197]. Resultados semelhantes, referentes aos níveis de  $\alpha$ APPs, também foram identificados no liquor [199–201], o que provavelmente ocorre como resultado de uma redução de expressão ou atividade dessa enzima [202].

Além das análises supracitadas, estudos já foram realizados acerca do mRNA da ADAM10, demonstrando altos níveis de mRNA e expressão proteica em cérebro de pessoas com demência pré-senil e baixos níveis naqueles com DA [115,203]. Esses dados talvez justifiquem, ainda que não tenha havido diferença significativa, o porquê a ADAM10 apresentou-se aumentada em SDcd em relação ao DA no presente estudo e, adjunto à hipótese da ação da BACE2, pode trazer à luz mais respostas sobre o aumento da rAPP neste grupo. Vale considerar também dados na literatura que demonstram que níveis plaquetários de ADAM10 não possuem relação direta com a expressão do seu mRNA codificante [204]. Portanto, há a necessidade de mais pesquisas sobre a temática a fim de minimizar as lacunas existentes em relação à análise desses possíveis biomarcadores na SD.

A expressão proteica de BACE1 também foi analisada. De maneira geral os grupos SD (cd;sd) apresentaram BACE1 diminuída em relação aos DA e controles, mas não apresentaram diferença entre aqueles com e sem comprometimento cognitivo. Em contrapartida, o grupo DA apresentou maior expressão dessa proteína, indo ao encontro do que é postulado sobre o mecanismo patológico da doença relacionado à formação de placas senis. Isto pelo fato da BACE1 representar a principal  $\beta$ -secretase que possui a APP como um de seus substratos, atuando na via amiloidogênica do processamento proteolítico dessa proteína transmembrana.

Ao olhar para os níveis proteicos de BACE1 em cérebro de adultos com SD, Cheon et al. [205] não observaram diferença na expressão dessa proteína ao compará-los com controles típicos. Resultados semelhantes foram encontrados para a BACE2. Não obstante, alguns estudos revelaram um aumento da atividade de BACE1 em pessoas com SD [206,207]. No tocante aos níveis de BACE1 em DA, há na literatura pesquisas que já descreveram um aumento dos seus níveis nas regiões corticais [208–211], em plaquetas [193], bem como aumento da atividade e expressão dessa proteína em liquor de pacientes com DA e até mesmo CCL [212–215].

Conforme supracitado, dados crescentes na literatura apontam para níveis aumentados de BACE1 em pessoas com DA, o que justifica maior deposição de peptídeos A $\beta$  nos espaços interneurais e consequente toxicidade nessa região. Partindo do pressuposto que pessoas com SD apresentam pré-disposição genética para desenvolvimento de DA [37–39,216], seria esperado que os níveis proteicos de BACE1 nessa casuística apresentassem-se aumentados, apesar do gene *BACE1* estar localizado no cromossomo 11 (11q23.3) e não no 21 [217]. Entretanto, os estudos com SD demonstraram divergência quanto à expressão e atividade dessa proteína, sugerindo a necessidade de maior investigação sobre a via amiloidogênica em matrizes periféricas nessa casuística, dado que o presente estudo tem sido pioneiro nesse contexto.

Interessantemente, foi observada correlação positiva e significativa entre níveis de BACE1 e idade tanto para o grupo controle quanto para o grupo SDcd. Isto posto e agregando ao fato que a idade pode ser considerada um fator de risco para o desenvolvimento de transtornos neurocognitivos maiores, sugere-se que quadros demenciais não são inerentes ao processo de envelhecimento humano, mas sim resultantes de desregulação homeostática durante a longevidade. Tais fatos podem ser reafirmados pelas correlações positivas entre idade e expressão de ADAM10 em plaquetas para os grupos controle e SDsd, adjunto a estudos que demonstram um aumento contínuo dos níveis de expressão e atividade de ADAM10 plaquetária ao longo do envelhecimento sem comprometimento cognitivo [218].

No que diz respeito à expressão proteica de PSEN1, enzima responsável pela liberação do produto da clivagem da APP por  $\alpha$ - ou  $\beta$ - secretase [123,164,219], foram encontrados níveis diminuídos no grupo SDcd e SDsd em comparação aos DA e controles. Dados referentes à expressão proteica e atividade de PSEN1 já foram

descritos na literatura [129,220–226]. Em plaquetas já foi descrito um aumento da expressão proteica de PSEN1 em pacientes com DA [227]. Já em tecido cerebral de pessoas com DA, os estudos têm mostrado níveis de PSEN1 aumentados [223,224], diminuídos [221,222] e até mesmo inalterados [220], corroborando os achados do presente estudo acerca da comparação entre DA e controles.

Há uma corrente teórica que defende a ideia de que o desenvolvimento da DA em SD apresenta cunho genético [152,228]. Considerando as formas autossômicas da DA, tem-se que esta é resultante de mutações que podem ocorrer nos genes *PSEN1*, *PSEN2* e *APP*, sendo mais frequentes as mutações no primeiro gene (cerca de 69% dos casos) [229]. Tais mutações comprometem a atividade de  $\gamma$ -secretase e são capazes de aumentar a razão  $A\beta_{42}/A\beta_{40}$  [230]. O fato de não haver diferença entre os níveis de PSEN1 entre SDsd e SDcd, tendo em vista que o primeiro se constitui num grupo de risco para desenvolvimento de EOAD, reforça a hipótese de que a relação causal entre SD e possíveis desdobramentos para um quadro demencial devido à DA decorre da superexpressão gênica de *APP* [52,231].

A PSEN1 localiza-se no cromossomo 14 (14q24.2), dado importante visto que uma das formas de SD ocorre devido à translocação, sendo a t(14q21q) uma das mais comuns [232]. Portanto, apesar do presente achado, tais prerrogativas devem ser colocadas em questão até que se ampliem os estudos acerca dos tipos de SD, sobretudo àqueles relacionados à translocação robertsoniana, e a sua relação com as variadas formas de DA.

Essa secretase também revelou níveis dependentes da idade, apresentando correlação positiva entre o grupo controle, corroborando estudo prévio [233]. Curiosamente, ela apresentou correlação negativa com a idade tanto para o grupo SDsd quanto para os grupos SDcd e DA, apesar de não haver significância estatística para estes dois últimos. Tais achados divergem daqueles já demonstrados pelos autores Sogorb-Esteve et al. [233], cujos níveis de PSEN1 apresentam-se elevados no quor de indivíduos com DA autossômica dominante (com a presença de mutações no gene *PSEN1*) e em SD com e sem declínio cognitivo, quando comparados a controles pareados por idade.

Em relação aos achados conforme estratificação etária vale destacar, principalmente, os achados de APP130 relacionados à faixa etária de 35 a 49 anos. Contrariamente ao aumento de ADAM10 observado no grupo SDcd quando

comparado ao SDsd, há uma diminuição significativa do fragmento APP130 nessa mesma casuística, alterações estas que se perpetuam para aqueles com 50 anos ou mais. Tais achados sugerem que esse fragmento possa ser um potencial biomarcador de predisposição à conversão para DA entre pessoas com SD.

Para além das secretases e da própria APP, foram observados também os níveis plasmáticos de A $\beta$  na presente casuística. De maneira geral, o grupo SD (cd;sd) demonstrou elevada expressão de A $\beta$ <sub>40</sub> em detrimento dos controles. Em relação ao A $\beta$ <sub>42</sub>, embora não tenha havido significância estatística, o grupo SDcd apresentou níveis 2 vezes maiores desse peptídeo que SDsd. Quanto à A $\beta$ <sub>42</sub>/A $\beta$ <sub>40</sub>, o grupo SD também revelou alterações quando comparado aos controles, demonstrando valores diminuídos dessa razão. Esses resultados são congruentes àqueles encontrados recentemente por um grupo de pesquisadores da área [234].

Apesar de ser observado na presente casuística com SD (cd;sd) a subexpressão das secretases plaquetárias envolvidas no processamento canônico da APP, esse fato não interfere nos elevados níveis plasmáticos de A $\beta$  encontrados em relação aos controles. Fora os genes já citados anteriormente, outros localizados no cromossomo 21 também produzem efeitos, mesmo que de maneira indireta, na APP. Já foi demonstrado que aumento do gene *DYRK1A* eleva a expressão da proteína DYRK1A no tecido cerebral de camundongos e de indivíduos com SD, culminando na fosforilação da APP, facilitando sua clivagem pelas secretases  $\beta$  e  $\gamma$  e, conseqüentemente, aumentando os níveis cerebrais de A $\beta$ <sub>42</sub> [18]. Isso sugere que talvez os elevados níveis de A $\beta$  no plasma de SD estejam relacionados ao seu *clearance*, numa tentativa de minimizar os danos oriundos da cascata amilóide nas regiões cerebrais. Seguindo essa mesma linha de raciocínio, os baixos níveis plaquetários das secretases pode tanto estar relacionados às baixas expressões dos fragmentos da APP devido ao estresse oxidativo, quanto ao esforço do organismo em reestabelecer a homeostase.

Outro achado interessante e pioneiro desse estudo diz respeito à possibilidade de associação entre os possíveis biomarcadores para aplicações clínicas futuras. Diante de um modelo de árvore de decisão, observou-se que valores específicos de APP130 e de A $\beta$ <sub>42</sub>/A $\beta$ <sub>40</sub>, quando combinados, podem prever comprometimento cognitivo. Esses resultados demonstram boa acurácia diagnóstica, mesmo na ausência da análise de A $\beta$ <sub>42</sub>/A $\beta$ <sub>40</sub> entre indivíduos com DA. Além disso, tais dados

reforçam a hipótese de que o fragmento APP130 seja um potencial marcador de predisposição ao desenvolvimento de quadros demenciais devido à DA.

Ao correlacionar os resultados obtidos no CAMCOG com as expressões proteicas, observou-se correlação positiva, entre o grupo controle, com todas as secretases analisadas. Em contrapartida, houve correlação negativa entre os escores desse instrumento com a rAPP de grupos SDcd, com tendência à significância estatística. Correlação negativa também foi encontrada entre PSEN1 para o grupo DA.

Comparações semelhantes entre biomarcadores e avaliações cognitivas já foram realizadas na literatura. Rafii et al. [235] encontraram correlação negativa entre níveis plasmáticos de neurofilamentos de cadeia leve (NF-L) – uma das proteínas do citoesqueleto dos axônios subcorticais mielinizados que pode refletir danos axonais na neurodegeneração, incluindo DA familiar e esporádica [236–239] – e desempenho de pessoas com SD na realização do CAMCOG- SD.

Apesar de não ter sido realizada essa análise no presente estudo, o que ambos apresentam em comum é o reflexo clínico das alterações biológicas que ocorrem no organismo humano na presença de quadros demenciais. Mesmo com o aumento da rAPP na periferia de pessoas com SD e mesmo diante da subexpressão das secretases que, sabidamente, estão envolvidas no processamento proteolítico da APP, há a predominância de níveis plasmáticos de A $\beta$  nesse grupo. Isso sugere que as alterações encontradas na periferia, apesar de não refletirem diretamente o que ocorre no SNC, podem ser utilizadas como modelo de inferência para aplicações clínicas futuras.

## 6 LIMITAÇÕES DO ESTUDO

Este trabalho é um dos braços de um estudo maior com pessoas com síndrome de Down que vem sendo desenvolvido pelo ambulatório de Envelhecimento e síndrome de Down do IPq-HC FMUSP. É notória a relevância do presente estudo para a literatura científica, uma vez que ele revela os padrões periféricos de secretases diretamente relacionadas na clivagem proteolítica da APP, antes não observadas na casuística com SD. Entretanto, para trazer mais respostas à luz dos questionamentos que cercam o desenvolvimento da DA, seja ela de origem familiar ou esporádica, em indivíduos com SD ou típicos, as análises não devem se limitar àquelas que foram realizadas nesta pesquisa.

A ausência da análise dos fragmentos de A $\beta$  nos indivíduos com DA, pertencentes à casuística proposta, deixam lacunas não só em relação aos padrões proteicos que podem ser identificados na periferia como também trazem questionamentos acerca do modelo de árvore decisão sugerido. Além disso, se tivesse sido realizada a análise correlacional dos achados com as comorbidades comuns às pessoas com SD, tais resultados poderiam trazer respostas mais expressivas sobre as expressões proteicas encontradas.

Ademais, apesar da casuística ser numericamente relevante, nem todas as análises foram realizadas com a casuística total, por razões metodológicas e orçamentárias, caracterizando uma limitação do estudo e deixando como sugestão a continuidade da pesquisa. Além disso, apesar de ter sido proposta a análise dos níveis plaquetários de BACE2, a mesma não foi realizada em tempo hábil para a inclusão no manuscrito, diante da interrupção momentânea do desenvolvimento desse doutorado devido à pandemia. Tais resultados poderiam fornecer mais subsídios para a elaboração do raciocínio científico referente ao aumento da rAPP em pessoas com SD.

## 7 CONCLUSÕES

Este trabalho evidencia, a partir das análises das secretases e dos peptídeos diretamente envolvidos na cascata amilóide, que as alterações do metabolismo da APP são biomarcadores da demência na SD, não correspondendo apenas a um endofenótipo da SD, tampouco inerentes ao processo de envelhecimento humano. À sua maneira, as secretases revelam-se subexpressas na periferia, demonstrando padrões específicos para a SD, ainda assim, trazendo um racional semelhante àqueles quadros de DA em pessoas típicas, ora relacionado ao subtipo familiar, ora relacionado à DA esporádica.

Ainda é recente a pesquisa de biomarcadores periféricos representativos da formação de placas senis na DA em plaquetas de pessoas com SD. Um dos primeiros estudos sobre o tema data de 1996, realizado por Di Luca et al. [135], que avaliou a rAPP, bem como os fragmentos APP130/110kDa nesse grupo seletivo. No entanto, devido ao acelerado processo de envelhecimento populacional, um fenômeno mundial, há uma preocupação crescente com estudos desse teor para prover melhor qualidade de vida àqueles que envelhecem, principalmente com morbidades como a DA. Dessa forma, os resultados do presente estudo são de extrema importância para se somar ao que já existe na comunidade acadêmica acerca das características fisiopatológicas da DA em pessoas com SD.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Bertoldi K. Caracterização de artigos sobre o tema envelhecimento no Brasil nos últimos dez anos. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2009.
- [2] World Health Organization. Ageing and health. WHO 2015.
- [3] World Health Organization. Life expectancy. WHO 2016.
- [4] IBGE. Em 2019, expectativa de vida era de 76,6 anos. Estatísticas Sociais 2020.
- [5] World Health Organization. Genes and human disease: Down Syndrome. WHO 2017. <http://www.who.int/genomics/public/geneticdiseases/en/index1.html> (accessed July 3, 2017).
- [6] MS. “Não deixe ninguém para trás”: Dia Internacional da Síndrome de Down 2019. Biblioteca Virtual Em Saúde 2019.
- [7] National Down Syndrome Society. Aging and down syndrome: a health & well-being guidebook. New York: National Down Syndrome Society; 2013.
- [8] Hartley D, Blumenthal T, Carrillo M, DiPaolo G, Esralew L, Gardiner K, et al. Down syndrome and Alzheimer’s disease: Common pathways, common goals. *Alzheimer’s & Dementia* 2015;11:700–9. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2014.10.007>.
- [9] Langdon J, Down H. Observations on an ethnic classification of idiots. *Heredity (Edinb)* 1966;21:695–7. <https://doi.org/10.1038/hdy.1966.69>.
- [10] Head E, Lott IT, Wilcock DM, Lemere CA. Aging in Down syndrome and the Development of Alzheimer’s disease Neuropathology HHS Public Access. *Curr Alzheimer Res* 2016;13:18–29.
- [11] National Down Syndrome Society. What is Down Syndrome? | National Down Syndrome Society 2018. <https://www.ndss.org/about-down-syndrome/down-syndrome/> (accessed March 5, 2018).
- [12] Pilotto RF. Aspectos Genéticos da Síndrome de Down. In: Minetto M de FJ, Bermudez BEBV, editors. *Bioecologia do desenvolvimento da síndrome de Down*. 22ed ed., Curitiba: Íthala; 2017, p. 123–34.
- [13] Bull MJ. Down Syndrome. *N Engl J Med* 2020;382:2344–52. <https://doi.org/10.1056/NEJMRA1706537>.
- [14] Hattori M, Fujiyama A, Taylor TD, Watanabe H, Yada T, Park HS, et al. The DNA sequence of human chromosome 21. *Nature* 2000 405:6784 2000;405:311–9. <https://doi.org/10.1038/35012518>.
- [15] Antonarakis SE, Lyle R, Dermitzakis ET, Reymond A, Deutsch S. Chromosome 21 and down syndrome: from genomics to pathophysiology. *Nat Rev Genet* 2004;5:725–38. <https://doi.org/10.1038/NRG1448>.
- [16] Moyer AJ, Gardiner K, Reeves RH. All Creatures Great and Small: New Approaches for Understanding Down Syndrome Genetics. *Trends Genet* 2021;37:444–59. <https://doi.org/10.1016/J.TIG.2020.09.017>.



- [17] Pritchard M, Reeves RH, Dierssen M, Patterson D, Gardiner KJ. Down syndrome and the genes of human chromosome 21: current knowledge and future potentials. Report on the Expert workshop on the biology of chromosome 21 genes: towards gene-phenotype correlations in Down syndrome. Washington D.C., September 28-October 1, 2007. *Cytogenet Genome Res* 2008;121:67–77. <https://doi.org/10.1159/000124384>.
- [18] Antonarakis SE, Skotko BG, Rafii MS, Strydom A, Pape SE, Bianchi DW, et al. Down syndrome. *Nature Reviews Disease Primers* 2020 6:1 2020;6:1–20. <https://doi.org/10.1038/s41572-019-0143-7>.
- [19] Rafii MS, Kleschevnikov AM, Sawa M, Mobley WC. Down syndrome. *Handb Clin Neurol* 2019;167:321–36. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804766-8.00017-0>.
- [20] Poissonnier M, Saint-Paul B, Chassaigne M, Gruyer P, Bligni eres-Strouk G. Partial trisomy 21 (21q21 - 21q22.2). *Ann Genet* 1976;19:69–73.
- [21] Gomes F de C, Mattos MF, Goloni-Bertollo EM, Pavarino  C. Alzheimer’s Disease in the Down Syndrome: An Overview of Genetics and Molecular Aspects. *Neurol India* 2021;69:32–41. <https://doi.org/10.4103/0028-3886.310062>.
- [22] Antonarakis SE, Lyle R, Dermitzakis ET, Reymond A, Deutsch S. Chromosome 21 and down syndrome: from genomics to pathophysiology. *Nat Rev Genet* 2004;5:725–38. <https://doi.org/10.1038/NRG1448>.
- [23] Rahmani Z, Blouin JL, Creau-Goldberg N, Watkins PC, Mattei JF, Poissonnier M, et al. Critical role of the D21S55 region on chromosome 21 in the pathogenesis of Down syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989;86:5958–62. <https://doi.org/10.1073/PNAS.86.15.5958>.
- [24] Chabert C, Cherfouh A, Delabar JM, Duquenne V. Assessing implications between genotypic and phenotypic variables through lattice analysis. *Behav Genet* 2001;31:125–39. <https://doi.org/10.1023/A:1010270211671>.
- [25] Lyle R, B ena F, Gagos S, Gehrig C, Lopez G, Schinzel A, et al. Genotype-phenotype correlations in Down syndrome identified by array CGH in 30 cases of partial trisomy and partial monosomy chromosome 21. *Eur J Hum Genet* 2009;17:454–66. <https://doi.org/10.1038/EJHG.2008.214>.
- [26] Korenberg JR, Chen XN, Schipper R, Sun Z, Gonsky R, Gerwehr S, et al. Down syndrome phenotypes: the consequences of chromosomal imbalance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:4997. <https://doi.org/10.1073/PNAS.91.11.4997>.
- [27] Asim A, Kumar A, Muthuswamy S, Jain S, Agarwal S. “down syndrome: An insight of the disease.” *J Biomed Sci* 2015;22:1–9. <https://doi.org/10.1186/S12929-015-0138-Y/TABLES/2>.
- [28] Pelleri MC, Cicchini E, Locatelli C, Vitale L, Caracausi M, Piovesan A, et al. Systematic reanalysis of partial trisomy 21 cases with or without Down syndrome suggests a small region on 21q22.13 as critical to the phenotype. *Hum Mol Genet* 2016;25:2525–38. <https://doi.org/10.1093/HMG/DDW116>.
- [29] Barlow GM, Chen XN, Shi ZY, Lyons GE, Kurnit DM, Celle L, et al. Down syndrome congenital heart disease: a narrowed region and a candidate gene. *Genet Med* 2001;3:91–101. <https://doi.org/10.1097/00125817-200103000-00002>.
- [30] Korenberg JR, Chen XN, Schipper R, Sun Z, Gonsky R, Gerwehr S, et al. Down syndrome phenotypes: the consequences of chromosomal imbalance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:4997. <https://doi.org/10.1073/PNAS.91.11.4997>.

- [31] Delabar JM, Theophile D, Rahmani Z, Chettouh Z, Blouin JL, Prieur M, et al. Molecular mapping of twenty-four features of Down syndrome on chromosome 21. *Eur J Hum Genet* 1993;1:114–24. <https://doi.org/10.1159/000472398>.
- [32] Lyle R, Béna F, Gagos S, Gehrig C, Lopez G, Schinzel A, et al. Genotype-phenotype correlations in Down syndrome identified by array CGH in 30 cases of partial trisomy and partial monosomy chromosome 21. *Eur J Hum Genet* 2009;17:454–66. <https://doi.org/10.1038/EJHG.2008.214>.
- [33] Bull MJ. Down Syndrome. *N Engl J Med* 2020;382:2344–52. <https://doi.org/10.1056/NEJMRA1706537>.
- [34] Franceschi C, Garagnani P, Gensous N, Giulia Bacalini M, Conte | Maria, Salvioli S. Accelerated bio-cognitive aging in Down syndrome: State of the art and possible deceleration strategies 2019. <https://doi.org/10.1111/accel.12903>.
- [35] Horvath S, Garagnani P, Bacalini MG, Pirazzini C, Salvioli S, Gentilini D, et al. Accelerated epigenetic aging in Down syndrome. *Aging Cell* 2015;14:491–5. <https://doi.org/10.1111/accel.12325>.
- [36] Carfi A, Antocicco M, Brandi V, Cipriani C, Fiore F, Mascia D, et al. Characteristics of adults with down syndrome: prevalence of age-related conditions. *Front Med (Lausanne)* 2014;1:51. <https://doi.org/10.3389/fmed.2014.00051>.
- [37] Glasson EJ, Dye DE, Bittles AH. The triple challenges associated with age-related comorbidities in Down syndrome. *Journal of Intellectual Disability Research* 2014;58:393–8. <https://doi.org/10.1111/jir.12026>.
- [38] Malamud N. *Neuropathology of Organic Brain Syndromes Associated with Aging*, Springer US; 1972, p. 63–87. [https://doi.org/10.1007/978-1-4684-8503-5\\_6](https://doi.org/10.1007/978-1-4684-8503-5_6).
- [39] Coppus A, Evenhuis H, Verberne G-J, Visser F, van Gool P, Eikelenboom P, et al. Dementia and mortality in persons with Down's syndrome. *Journal of Intellectual Disability Research* 2006;50:768–77. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2788.2006.00842.x>.
- [40] Mann DM, Yates PO, Marcyniuk B. Alzheimer's presenile dementia, senile dementia of Alzheimer type and Down's syndrome in middle age form an age related continuum of pathological changes. *Neuropathol Appl Neurobiol* 1984;10:185–207.
- [41] Mann DM, Esiri MM. The pattern of acquisition of plaques and tangles in the brains of patients under 50 years of age with Down's syndrome. *J Neurol Sci* 1989;89:169–79.
- [42] Mann DM, Jones D, Prinja D, Purkiss MS. The prevalence of amyloid (A4) protein deposits within the cerebral and cerebellar cortex in Down's syndrome and Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* 1990;80:318–27.
- [43] Zigman WB, Lott IT. Alzheimer's disease in Down syndrome: Neurobiology and risk. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev* 2007;13:237–46. <https://doi.org/10.1002/mrdd.20163>.
- [44] Wisniewski KE, Dalton AJ, McLachlan C, Wen GY, Wisniewski HM. Alzheimer's disease in Down's syndrome: clinicopathologic studies. *Neurology* 1985;35:957–61.
- [45] Ravid R. Biobanks for biomarkers in neurological disorders. *J Neurol Sci* 2009;283:119–26. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2009.02.364>.

- [46] Hampel H, Bürger K, Teipel SJ, Bokde ALW, Zetterberg H, Blennow K. Core candidate neurochemical and imaging biomarkers of Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia* 2008;4:38–48. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2007.08.006>.
- [47] Hartley D, Blumenthal T, Carrillo M, Dipaolo G, Esralew L, Gardiner K, et al. Down syndrome and Alzheimer's disease: Common pathways, common goals HHS Public Access. *Alzheimers Dement* 2015;11:700–9. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2014.10.007>.
- [48] Head E, Ances B. Biomarkers in Down syndrome can help us understand Alzheimer's disease. *The Lancet* 2020;395:1951–3. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30916-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30916-8).
- [49] Wiseman FK, Al-Janabi T, Hardy J, Karmiloff-Smith A, Nizetic D, Tybulewicz VLJ, et al. A genetic cause of Alzheimer disease: mechanistic insights from Down syndrome. *Nat Rev Neurosci* 2015;16:564–74. <https://doi.org/10.1038/nrn3983>.
- [50] Goate AM, Haynes AR, Owen MJ, Farrall M, James LA, Lai LY, et al. Predisposing locus for Alzheimer's disease on chromosome 21. *Lancet* 1989;1:352–5.
- [51] Tanzi RE, Kovacs DM, Kim TW, Moir RD, Guenette SY, Wasco W. The gene defects responsible for familial Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis* 1996;3:159–68.
- [52] Pericak-Vance MA, Yamaoka LH, Haynes CS, Speer MC, Haines JL, Gaskell PC, et al. Genetic linkage studies in Alzheimer's disease families. *Exp Neurol* 1988;102:271–9.
- [53] Annus T, Wilson LR, Hong YT, Acosta-Cabronero J, Fryer TD, Cardenas-Blanco A, et al. The pattern of amyloid accumulation in the brains of adults with Down syndrome. *Alzheimer's & Dementia* 2016;12:538–45. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2015.07.490>.
- [54] Lee N-C, Yang S-Y, Chieh J-J, Huang P-T, Chang L-M, Chiu Y-N, et al. Blood Beta-Amyloid and Tau in Down Syndrome: A Comparison with Alzheimer's Disease. *Front Aging Neurosci* 2016;8:316. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2016.00316>.
- [55] Hane F, Tran G, Attwood SJ, Leonenko Z. Cu(2+) affects amyloid- $\beta$  (1-42) aggregation by increasing peptide-peptide binding forces. *PLoS One* 2013;8:e59005. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0059005>.
- [56] Hane F, Leonenko Z. Effect of metals on kinetic pathways of amyloid- $\beta$  aggregation. *Biomolecules* 2014;4:101–16. <https://doi.org/10.3390/biom4010101>.
- [57] Forlenza OV, Gattaz WF. Influência de mecanismos colinérgicos nos processos degenerativos relacionados à formação de amiloide e fosforilação da proteína Tau. *Rev Psiquiatr Clín (São Paulo)* 1998;25:114–7.
- [58] Haass C. Take five? BACE and the  $\gamma$ -secretase quartet conduct Alzheimer's amyloid  $\beta$ -peptide generation. *EMBO J* 2004;23:483–8. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600061>.
- [59] Hardy JA, Higgins GA. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science* 1992;256:184–5.
- [60] Haass C, Kaether C, Thinakaran G, Sisodia S. Trafficking and proteolytic processing of APP. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2012;2:a006270. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006270>.
- [61] Rodgers A. Alzheimer's disease : unraveling the mystery. Silver Spring MD: Alzheimer's Disease Education and Referral (ADEAR) Center; 2008.

- [62] Zinser EG, Hartmann T, Grimm MOW. Amyloid beta-protein and lipid metabolism. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 2007;1768:1991–2001. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2007.02.014>.
- [63] Mockett BG, Richter M, Abraham WC, Müller UC, Wirths O, Nalivaeva NN, et al. Therapeutic Potential of Secreted Amyloid Precursor Protein APP $\alpha$  2017. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2017.00030>.
- [64] Fridman C, Gregório SP, Dias E, Élide N, Benquique Ojopi P. Alterações genéticas na doença de Alzheimer Artigo Original. *E Rev Psiq Clín* 2004;31:19–25.
- [65] Bussièrè T, Giannakopoulos P, Bouras C, Perl DP, Morrison JH, Hof PR. Progressive degeneration of nonphosphorylated neurofilament protein-enriched pyramidal neurons predicts cognitive impairment in Alzheimer's disease: Stereologic analysis of prefrontal cortex area 9. *Journal of Comparative Neurology* 2003;463:281–302. <https://doi.org/10.1002/cne.10760>.
- [66] Qin W, Ho L, Wang J, Peskind E, Pasinetti GM. S100A7, a Novel Alzheimer's Disease Biomarker with Non-Amyloidogenic  $\gamma$ -Secretase Activity Acts via Selective Promotion of ADAM-10. *PLoS One* 2009;4:e4183. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004183>.
- [67] Zigman WB. Atypical aging in down syndrome. *Dev Disabil Res Rev* 2013;18:51–67. <https://doi.org/10.1002/ddrr.1128>.
- [68] Kusters MA, Verstegen RH, de Vries E. Down syndrome: is it really characterized by precocious immunosenescence? *Aging Dis* 2011;2:538–45.
- [69] Handen BL, Cohen AD, Channamalappa U, Bulova P, Cannon SA, Cohen WI, et al. Imaging brain amyloid in nondemented young adults with Down syndrome using Pittsburgh compound B. *Alzheimers Dement* 2012;8:496–501. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2011.09.229>.
- [70] Royston MC, McKenzie JE, Gentleman SM, Sheng JG, Mann DM, Griffin WS, et al. Overexpression of s100beta in Down's syndrome: correlation with patient age and with beta-amyloid deposition. *Neuropathol Appl Neurobiol* 1999;25:387–93.
- [71] De-Paula VJ, Radanovic M, Diniz BS, Forlenza O V. Alzheimer's Disease. *Subcell Biochem*, vol. 65, 2012, p. 329–52. [https://doi.org/10.1007/978-94-007-5416-4\\_14](https://doi.org/10.1007/978-94-007-5416-4_14).
- [72] Fortea J, Vilaplana E, Carmona-Iragui M, Benejam B, Videla L, Barroeta I, et al. Clinical and biomarker changes of Alzheimer's disease in adults with Down syndrome: a cross-sectional study. *The Lancet* 2020;395:1988–97. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30689-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30689-9).
- [73] Wu CI, Vinton EA, Pearse R V., Heo K, Aylward AJ, Hsieh YC, et al. APP and DYRK1A regulate axonal and synaptic vesicle protein networks and mediate Alzheimer's pathology in trisomy 21 neurons. *Mol Psychiatry* 2022;27:1970–89. <https://doi.org/10.1038/S41380-022-01454-5>.
- [74] Korbel JO, Tirosh-Wagner T, Urban AE, Chen XN, Kasowski M, Dai L, et al. The genetic architecture of Down syndrome phenotypes revealed by high-resolution analysis of human segmental trisomies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106:12031–6. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0813248106>.
- [75] Prasher VP, Farrer MJ, Kessling AM, Fisher EMC, West RJ, Barber PC, et al. Molecular mapping of Alzheimer-type dementia in Down's syndrome. *Ann Neurol* 1998;43:380–3. <https://doi.org/10.1002/ANA.410430316>.

- [76] Ballard C, Mobley W, Hardy J, Williams G, Corbett A. Dementia in Down's syndrome. *Lancet Neurol* 2016;15:622–36. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(16\)00063-6](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(16)00063-6).
- [77] Devenny DA, Zimmerli EJ, Kittler P, Krinsky-McHale SJ. Cued recall in early-stage dementia in adults with Down's syndrome. *J Intellect Disabil Res* 2002;46:472–83. <https://doi.org/10.1046/J.1365-2788.2002.00417.X>.
- [78] Glenner GG, Wong CW. Alzheimer's disease and Down's syndrome: Sharing of a unique cerebrovascular amyloid fibril protein. *Biochem Biophys Res Commun* 1984;122:1131–5. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(84\)91209-9](https://doi.org/10.1016/0006-291X(84)91209-9).
- [79] Holland AJ, Hon J, Huppert FA, Stevens F. Incidence and course of dementia in people with Down's syndrome: findings from a population-based study. *J Intellect Disabil Res* 2000;44 ( Pt 2):138–46. <https://doi.org/10.1046/J.1365-2788.2000.00263.X>.
- [80] Jennings D, Seibyl J, Sabbagh M, Lai F, Hopkins W, Bullich S, et al. Age dependence of brain  $\beta$ -amyloid deposition in Down syndrome. *Neurology* 2015;84:500–7. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000001212>.
- [81] Wiseman FK, Al-Janabi T, Hardy J, Karmiloff-Smith A, Nizetic D, Tybulewicz VLJ, et al. A genetic cause of Alzheimer disease: mechanistic insights from Down syndrome. *Nature Reviews Neuroscience* 2015 16:9 2015;16:564–74. <https://doi.org/10.1038/nrn3983>.
- [82] Lott IT, Head E. Dementia in Down syndrome: unique insights for Alzheimer disease research. *Nat Rev Neurol* 2019;15:135–47. <https://doi.org/10.1038/s41582-018-0132-6>.
- [83] Di Luca M, Grossi E, Borroni B, Zimmermann M, Marcello E, Colciaghi F, et al. Artificial neural networks allow the use of simultaneous measurements of Alzheimer disease markers for early detection of the disease. *J Transl Med* 2005;3. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-3-30>.
- [84] Strimbu K, Tavel JA. What are biomarkers? *Curr Opin HIV AIDS* 2010;5:463–6. <https://doi.org/10.1097/COH.0B013E32833ED177>.
- [85] Borroni B, Di Luca M, Padovani A. Predicting Alzheimer dementia in mild cognitive impairment patients: Are biomarkers useful? *Eur J Pharmacol* 2006;545:73–80. <https://doi.org/10.1016/J.EJPHAR.2006.06.023>.
- [86] Nalivaeva NN, Turner AJ. The amyloid precursor protein: A biochemical enigma in brain development, function and disease. *FEBS Lett* 2013;587:2046–54. <https://doi.org/10.1016/J.FEBSLET.2013.05.010>.
- [87] Niederwolfgruber E, Schmitt TL, Blasko I, Trieb K, Steger MM, Maczek C, et al. The Production of the Alzheimer Amyloid Precursor Protein (APP) in Extraneuronal Tissue Does Not Increase in Old Age. *The Journals of Gerontology: Series A* 1998;53A:B186–90. <https://doi.org/10.1093/GERONA/53A.3.B186>.
- [88] Hiltunen M, Van Groen T, Jolkkonen J. Functional roles of amyloid-beta protein precursor and amyloid-beta peptides: evidence from experimental studies. *J Alzheimers Dis* 2009;18:401–12. <https://doi.org/10.3233/JAD-2009-1154>.
- [89] UCSC Genome Browser Gateway 2023. [https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway?hgsid=1605845835\\_TPHGgr0uwfQFDtpQOP07XaftTu3P](https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway?hgsid=1605845835_TPHGgr0uwfQFDtpQOP07XaftTu3P) (accessed April 11, 2023).

- [90] Guo Y, Wang Q, Chen S, Xu C. Functions of amyloid precursor protein in metabolic diseases. *Metabolism* 2021;115. <https://doi.org/10.1016/J.METABOL.2020.154454>.
- [91] UniProt 2023. <https://www.uniprot.org/> (accessed April 11, 2023).
- [92] Müller UC, Deller T, Korte M. Not just amyloid: physiological functions of the amyloid precursor protein family. *Nat Rev Neurosci* 2017;18:281–98. <https://doi.org/10.1038/NRN.2017.29>.
- [93] Wang B, Wang Z, Sun L, Yang L, Li H, Cole AL, et al. The Amyloid Precursor Protein Controls Adult Hippocampal Neurogenesis through GABAergic Interneurons. *The Journal of Neuroscience* 2014;34:13314. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2848-14.2014>.
- [94] Hick M, Herrmann U, Weyer SW, Mallm JP, Tschäpe JA, Borgers M, et al. Acute function of secreted amyloid precursor protein fragment APP<sub>sα</sub> in synaptic plasticity. *Acta Neuropathol* 2015;129:21–37. <https://doi.org/10.1007/S00401-014-1368-X>.
- [95] Bram JM de F, Talib LL, Joaquim HPG, Sarno TA, Gattaz WF, Forlenza OV. Protein levels of ADAM10, BACE1, and PSEN1 in platelets and leukocytes of Alzheimer's disease patients. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 2018. <https://doi.org/10.1007/s00406-018-0905-3>.
- [96] Tanaka S, Shiojiri S, Takahashi Y, Kitaguchi N, Ito H, Kameyama M, et al. Tissue-specific expression of three types of β-protein precursor mRNA: Enhancement of protease inhibitor-harboring types in Alzheimer's disease brain. *Biochem Biophys Res Commun* 1989;165:1406–14. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(89\)92760-5](https://doi.org/10.1016/0006-291X(89)92760-5).
- [97] Moir RD, Lynch T, Bush AI, Whyte S, Henry A, Portbury S, et al. Relative Increase in Alzheimer's Disease of Soluble Forms of Cerebral Aβ Amyloid Protein Precursor Containing the Kunitz Protease Inhibitory Domain. *Journal of Biological Chemistry* 1998;273:5013–9. <https://doi.org/10.1074/JBC.273.9.5013>.
- [98] Thinakaran G, Koo EH. Amyloid Precursor Protein Trafficking, Processing, and Function. *J Biol Chem* 2008;283:29615. <https://doi.org/10.1074/JBC.R800019200>.
- [99] Asai M, Hattori C, Szabó B, Sasagawa N, Maruyama K, Tanuma SI, et al. Putative function of ADAM9, ADAM10, and ADAM17 as APP alpha-secretase. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;301:231–5. [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(02\)02999-6](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(02)02999-6).
- [100] Deuss M, Reiss K, Hartmann D. Part-time alpha-secretases: the functional biology of ADAM 9, 10 and 17. *Curr Alzheimer Res* 2008;5:187–201. <https://doi.org/10.2174/156720508783954686>.
- [101] Moss ML, Powell G, Miller MA, Edwards L, Qi B, Sang QXA, et al. ADAM9 Inhibition Increases Membrane Activity of ADAM10 and Controls α-Secretase Processing of Amyloid Precursor Protein. *J Biol Chem* 2011;286:40443. <https://doi.org/10.1074/JBC.M111.280495>.
- [102] Seals DF, Courtneidge SA. The ADAMs family of metalloproteases: multidomain proteins with multiple functions. *Genes Dev* 2003;17:7–30. <https://doi.org/10.1101/gad.1039703>.
- [103] ADAM10 ADAM metallopeptidase domain 10 [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI n.d. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?Db=gene&Cmd=DetailsSearch&Term=102> (accessed April 15, 2023).

- [104] Lin J, Luo J, Redies C. Differential expression of five members of the ADAM family in the developing chicken brain. *Neuroscience* 2008;157:360–75. <https://doi.org/10.1016/J.NEUROSCIENCE.2008.08.053>.
- [105] Hooper NM, Turner AJ. The search for alpha-secretase and its potential as a therapeutic approach to Alzheimer's disease. *Curr Med Chem* 2002;9:1107–19. <https://doi.org/10.2174/0929867023370121>.
- [106] Hinkle CL, Diestel S, Lieberman J, Maness PF. Metalloprotease-induced ectodomain shedding of neural cell adhesion molecule (NCAM). *J Neurobiol* 2006;66:1378–95. <https://doi.org/10.1002/NEU.20257>.
- [107] Vingtdoux V, Marambaud P. Identification and biology of  $\alpha$ -secretase. *J Neurochem* 2012;120:34–45. <https://doi.org/10.1111/J.1471-4159.2011.07477.X>.
- [108] Postina R. A Closer Look at  $\alpha$ -Secretase. *Curr Alzheimer Res* 2008;5:179–86. <https://doi.org/10.2174/156720508783954668>.
- [109] Postina R. Activation of  $\alpha$ -secretase cleavage. *J Neurochem* 2012;120 Suppl 1:46–54. <https://doi.org/10.1111/J.1471-4159.2011.07459.X>.
- [110] Postina R, Schroeder A, Dewachter I, Bohl J, Schmitt U, Kojro E, et al. A disintegrin-metalloproteinase prevents amyloid plaque formation and hippocampal defects in an Alzheimer disease mouse model. *J Clin Invest* 2004;113:1456–64. <https://doi.org/10.1172/JCI20864>.
- [111] Vassar R, Bennett BD, Babu-Khan S, Kahn S, Mendiaz EA, Denis P, et al. Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science* 1999;286:735–41.
- [112] Vassar R, Kandalepas PC. The  $\gamma$ -secretase enzyme BACE1 as a therapeutic target for Alzheimer's disease. *Alzheimers Res Ther* 2011;3:20. <https://doi.org/10.1186/alzrt82>.
- [113] BACE1 beta-secretase 1 [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI n.d. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/23621> (accessed April 15, 2023).
- [114] Yan R, Vassar R. Targeting the  $\beta$  secretase BACE1 for Alzheimer's disease therapy. *Lancet Neurol* 2014;13:319–29. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(13\)70276-X](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(13)70276-X).
- [115] Marcinkiewicz M, Seidah NG. Coordinated expression of  $\beta$ -amyloid precursor protein and the putative  $\beta$ -secretase BACE and  $\alpha$ -secretase ADAM10 in mouse and human brain. *J Neurochem* 2000;75:2133–43. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2000.0752133.x>.
- [116] Hampel H, Vassar R, De Strooper B, Hardy J, Willem M, Singh N, et al. The  $\beta$ -Secretase BACE1 in Alzheimer's Disease. *Biol Psychiatry* 2021;89:745–56. <https://doi.org/10.1016/J.BIOPSYCH.2020.02.001>.
- [117] BACE2 beta-secretase 2 [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI n.d. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/25825> (accessed April 15, 2023).
- [118] Cole S, Vassar R. BACE1 structure and function in health and Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res* 2008;5:100–20. <https://doi.org/10.2174/156720508783954758>.
- [119] Sun X, He G, Song W. BACE2, as a novel APP theta-secretase, is not responsible for the pathogenesis of Alzheimer's disease in Down syndrome. *FASEB J* 2006;20:1369–76. <https://doi.org/10.1096/FJ.05-5632COM>.

- [120] Basi G, Frigon N, Barbour R, Doan T, Gordon G, McConlogue L, et al. Antagonistic effects of beta-site amyloid precursor protein-cleaving enzymes 1 and 2 on beta-amyloid peptide production in cells. *J Biol Chem* 2003;278:31512–20. <https://doi.org/10.1074/JBC.M300169200>.
- [121] Yan R, Munzner JB, Shuck ME, Bienkowski MJ. BACE2 functions as an alternative alpha-secretase in cells. *J Biol Chem* 2001;276:34019–27. <https://doi.org/10.1074/JBC.M105583200>.
- [122] Alić I, Goh PA, Murray A, Portelius E, Gkanatsiou E, Gough G, et al. Patient-specific Alzheimer-like pathology in trisomy 21 cerebral organoids reveals BACE2 as a gene dose-sensitive AD suppressor in human brain. *Mol Psychiatry* 2021;26:5766–88. <https://doi.org/10.1038/S41380-020-0806-5>.
- [123] Capell A, Behr D, Prokop S, Steiner H, Kaether C, Shearman MS, et al.  $\gamma$ -Secretase Complex Assembly within the Early Secretory Pathway\* 2004. <https://doi.org/10.1074/jbc.M409106200>.
- [124] Doan A, Thinakaran G, Borchelt DR, Slunt HH, Ratovitsky T, Podlisny M, et al. Protein Topology of Presenilin 1. *Neuron* 1996;17:1023–30. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80232-9](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80232-9).
- [125] Baki L, Marambaud P, Efthimiopoulos S, Georgakopoulos A, Wen P, Cui W, et al. Presenilin-1 binds cytoplasmic epithelial cadherin, inhibits cadherin/p120 association, and regulates stability and function of the cadherin/catenin adhesion complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:2381–6. <https://doi.org/10.1073/PNAS.041603398>.
- [126] Queralt R, Ezquerra M, Lieó A, Castellví M, Gelpí J, Ferrer I, et al. A novel mutation (V89L) in the presenilin 1 gene in a family with early onset Alzheimer's disease and marked behavioural disturbances. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2002;72:266–9. <https://doi.org/10.1136/JNNP.72.2.266>.
- [127] Bitan G, Kirkitadze MD, Lomakin A, Vollers SS, Benedek GB, Teplow DB. Amyloid beta-protein (A $\beta$ ) assembly: A $\beta$  40 and A $\beta$  42 oligomerize through distinct pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:330–5. <https://doi.org/10.1073/PNAS.222681699>.
- [128] Tabaton M, Tamagno E. The molecular link between  $\beta$ - and  $\gamma$ -secretase activity on the amyloid  $\beta$  precursor protein. *Cellular and Molecular Life Sciences* 2007;64:2211–8. <https://doi.org/10.1007/s00018-007-7219-3>.
- [129] Vidal R, Ghiso J, Wisniewski T, Frangione B. Alzheimer's presenilin 1 gene expression in platelets and megakaryocytes. *FEBS Lett* 1996;393:19–23. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(96\)00845-9](https://doi.org/10.1016/0014-5793(96)00845-9).
- [130] Puzzo D, Privitera L, Fa' M, Staniszewski A, Hashimoto G, Aziz F, et al. Endogenous amyloid- $\beta$  is necessary for hippocampal synaptic plasticity and memory. *Ann Neurol* 2011;69:819–30. <https://doi.org/10.1002/ANA.22313>.
- [131] Selkoe DJ, Wolfe MS. Presenilin: running with scissors in the membrane. *Cell* 2007;131:215–21. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2007.10.012>.
- [132] Wang D, Chen F, Han Z, Yin Z, Ge X, Lei P. Relationship Between Amyloid- $\beta$  Deposition and Blood-Brain Barrier Dysfunction in Alzheimer's Disease. *Front Cell Neurosci* 2021;15. <https://doi.org/10.3389/FNCEL.2021.695479>.
- [133] Huang Z, Wong LW, Su Y, Huang X, Wang N, Chen H, et al. Blood-brain barrier integrity in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Front Neuroendocrinol* 2020;59. <https://doi.org/10.1016/J.YFRNE.2020.100857>.



- [134] Sabbagh MN, Fleisher A, Chen K, Rogers J, Berk C, Reiman E, et al. Positron emission tomography and neuropathologic estimates of fibrillar amyloid- $\beta$  in a patient with Down syndrome and Alzheimer disease. *Arch Neurol* 2011;68:1461–6. <https://doi.org/10.1001/ARCHNEUROL.2011.535>.
- [135] Di Luca M, Pastorino L, Cattabeni F, Zanardi R, Scarone S, Racagni G, et al. Abnormal pattern of platelet APP isoforms in Alzheimer disease and Down syndrome. *Arch Neurol* 1996;53:1162–6.
- [136] Organização Mundial da Saúde O. CID-10 - Classificação Estatística Internacional de Doenças e Problemas Relacionados à Saúde. Edusp; 2008.
- [137] Parente MA de Mattos, Fonseca RP, Pagliarin KC, Barreto S dos S, Soares-Ishigaki ECS, Hubner LC, et al. MTL – Brasil – Bateria Montreal Toulouse de Avaliação da Linguagem. 2016.
- [138] McKhann G, Drachman D, Folstein M, Katzman R, Price D, Stadlan EM. Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease. *Neurology* 1984;34:939–44.
- [139] Ball SL, Holland AJ, Huppert FA, Treppner P, Watson P, Hon J. The modified CAMDEX informant interview is a valid and reliable tool for use in the diagnosis of dementia in adults with Down's syndrome. *Journal of Intellectual Disability Research* 2004;48:611–20. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2788.2004.00630.x>.
- [140] Roth M, Tym E, Mountjoy CQ. CAMDEX. A standardised instrument for the diagnosis of mental disorder in the elderly with special reference to the early detection of dementia. *British Journal of Psychiatry* 1986;149:698–709. <https://doi.org/10.1192/bjp.149.6.698>.
- [141] Bottino C, Almeida O, Tamai S, Forlenza O, Scalco M, Carvalho I. Entrevista estruturada para diagnóstico de transtornos mentais em idosos. PROTER, In. São Paulo: 1999.
- [142] Barradas MA, Mikhailidis DP. The use of platelets as models for neurons: possible applications to the investigation of eating disorders. *Biomed Pharmacother* 1993;47:11–8.
- [143] Pandey GN, Pandey SC, Ren X, Dwivedi Y, Janicak PG. Serotonin receptors in platelets of bipolar and schizoaffective patients: effect of lithium treatment. *Psychopharmacology (Berl)* 2003;170:115–23. <https://doi.org/10.1007/s00213-003-1530-y>.
- [144] Meltzer HY, Arora RC, Baber R, Tricou BJ. Serotonin uptake in blood platelets of psychiatric patients. *Arch Gen Psychiatry* 1981;38:1322–6.
- [145] Bush AI, Tanzi RE. Alzheimer disease-related abnormalities of amyloid beta precursor protein isoforms in the platelet: the brain's delegate in the periphery? *Arch Neurol* 1998;55:1179–80.
- [146] Di Luca M. Differential Level of Platelet Amyloid beta Precursor Protein Isoforms: An Early Marker for Alzheimer Disease. *Arch Neurol* 1998;55:1195–200. <https://doi.org/10.1001/archneur.55.9.1195>.
- [147] Padovani A, Borroni B, Colciaghi F, Pastorino L, Archetti S, Cottini E, et al. Platelet amyloid precursor protein forms in AD: a peripheral diagnostic tool and a pharmacological target. *Mech Ageing Dev* 2001;122:1997–2004.

- [148] Zainaghi IA, Forlenza O V., Gattaz WF. Abnormal APP processing in platelets of patients with Alzheimer's disease: correlations with membrane fluidity and cognitive decline. *Psychopharmacology (Berl)* 2007;192:547–53. <https://doi.org/10.1007/s00213-007-0748-5>.
- [149] Bush AI, Martins RN, Rumble B, Moir R, Fuller S, Milward E, et al. The amyloid precursor protein of Alzheimer's disease is released by human platelets. *J Biol Chem* 1990;265:15977–83.
- [150] Laemmli U. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;227:680–5. <https://doi.org/10.1038/227680A0>.
- [151] Brand AL, Lawler PE, Bollinger JG, Li Y, Schindler SE, Li M, et al. The performance of plasma amyloid beta measurements in identifying amyloid plaques in Alzheimer's disease: a literature review. *Alzheimers Res Ther* 2022;14:1–15. <https://doi.org/10.1186/S13195-022-01117-1/FIGURES/3>.
- [152] Fortea J, Zaman SH, Hartley S, Rafii MS, Head E, Carmona-Iragui M. Alzheimer's disease associated with Down syndrome: a genetic form of dementia. *Lancet Neurol* 2021;20:930–42. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(21\)00245-3](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(21)00245-3).
- [153] Teunissen CE, Verberk IMW, Thijssen EH, Vermunt L, Hansson O, Zetterberg H, et al. Blood-based biomarkers for Alzheimer's disease: towards clinical implementation. *Lancet Neurol* 2022;21:66–77. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(21\)00361-6](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(21)00361-6).
- [154] Ovod V, Ramsey KN, Mawuenyega KG, Bollinger JG, Hicks T, Schneider T, et al. Amyloid  $\beta$  concentrations and stable isotope labeling kinetics of human plasma specific to central nervous system amyloidosis. *Alzheimers Dement* 2017;13:841–9. <https://doi.org/10.1016/J.JALZ.2017.06.2266>.
- [155] Bateman RJ, Munsell LY, Morris JC, Swarm R, Yarasheski KE, Holtzman DM. Human amyloid-beta synthesis and clearance rates as measured in cerebrospinal fluid in vivo. *Nat Med* 2006;12:856–61. <https://doi.org/10.1038/NM1438>.
- [156] Hansson O. Biomarkers for neurodegenerative diseases. *Nat Med* 2021;27:954–63. <https://doi.org/10.1038/S41591-021-01382-X>.
- [157] Janelidze S, Teunissen CE, Zetterberg H, Allué JA, Sarasa L, Eichenlaub U, et al. Head-to-Head Comparison of 8 Plasma Amyloid- $\beta$  42/40 Assays in Alzheimer Disease. *JAMA Neurol* 2021;78:1375–82. <https://doi.org/10.1001/JAMANEUROL.2021.3180>.
- [158] Verberk IMW, Slot RE, Verfaillie SCJ, Heijst H, Prins ND, van Berckel BNM, et al. Plasma Amyloid as Prescreener for the Earliest Alzheimer Pathological Changes. *Ann Neurol* 2018;84:648–58. <https://doi.org/10.1002/ANA.25334>.
- [159] Janelidze S, Palmqvist S, Leuzy A, Stomrud E, Verberk IMW, Zetterberg H, et al. Detecting amyloid positivity in early Alzheimer's disease using combinations of plasma A $\beta$ 42/A $\beta$ 40 and p-tau. *Alzheimers Dement* 2022;18:283–93. <https://doi.org/10.1002/ALZ.12395>.
- [160] Talib L, Joaquim H, de Paula V. Metodologia em neuroquímica. In: Miguel E, Gentil V, Gattaz W, editors. *Clínica Psiquiátrica: a visão do departamento e do Instituto de Psiquiatria do HCFMUSP*, Manole; 2011.
- [161] Breiman L, Friedman JH, Olshen RA, Stone CJ. Classification and regression trees. CRC Press; 2017. <https://doi.org/10.1201/9781315139470/CLASSIFICATION-REGRESSION-TREES-LEO-BREIMAN>.

- [162] Jamovi. The Jamovi Project 2021.
- [163] R Core Team. A Language and environment for statistical computing. 2021.
- [164] De Strooper B, Annaert W, Cupers P, Saftig P, Craessaerts K, Mumm JS, et al. A presenilin-1-dependent  $\gamma$ -secretase-like protease mediates release of notch intracellular domain. *Nature* 1999;398:518–22. <https://doi.org/10.1038/19083>.
- [165] Maltese WA. Posttranslational modification of proteins by isoprenoids in mammalian cells. *FASEB Journal* 1990;4:3319–28. <https://doi.org/10.1096/fasebj.4.15.2123808>.
- [166] Zhao J, O'Connor T, Vassar R. The contribution of activated astrocytes to A $\beta$  production: implications for Alzheimer's disease pathogenesis. *J Neuroinflammation* 2011;8:150. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-8-150>.
- [167] Sarno TA, Talib LL, Joaquim HPG, Bram JM de F, Gattaz WF, Forlenza OV. Protein Expression of BACE1 is Downregulated by Donepezil in Alzheimer's Disease Platelets. *J Alzheimers Dis* 2017;55:1445–51. <https://doi.org/10.3233/JAD-160813>.
- [168] Oltersdorf T, Ward PJ, Henriksson T, Beattie EC, Neve R, Lieberburg I, et al. The Alzheimer amyloid precursor protein. Identification of a stable intermediate in the biosynthetic/degradative pathway. *J Biol Chem* 1990;265:4492–7.
- [169] Dugan JM, deWit C, McConlogue L, Maltese WA. The Ras-related GTP-binding protein, Rab1B, regulates early steps in exocytic transport and processing of beta-amyloid precursor protein. *J Biol Chem* 1995;270:10982–9. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.18.10982>.
- [170] Rosenberg RN, Baskin F, Fosmire JA, Risser R, Adams P, Svetlik D, et al. Altered Amyloid Protein Processing in Platelets of Patients With Alzheimer Disease. *Arch Neurol* 1997;54:139–44. <https://doi.org/10.1001/archneur.1997.00550140019007>.
- [171] Tang K, Hynan LS, Baskin F, Rosenberg RN. Platelet amyloid precursor protein processing: A bio-marker for Alzheimer's disease. *J Neurol Sci* 2006;240:53–8. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2005.09.002>.
- [172] Zainaghi IA, Talib LL, Diniz BS, Gattaz WF, Forlenza O V. Reduced platelet amyloid precursor protein ratio (APP ratio) predicts conversion from mild cognitive impairment to Alzheimer's disease. *J Neural Transm* 2012;119:815–9. <https://doi.org/10.1007/s00702-012-0807-x>.
- [173] Casoli T, Giuli C, Balialetti M, Fabbietti P, Conti F. Effect of a Cognitive Training Program on the Platelet APP Ratio in Patients with Alzheimer's Disease. *Int J Mol Sci* 2020;21:1–12. <https://doi.org/10.3390/IJMS21145110>.
- [174] de França Bram JM, Talib LL, Joaquim HPG, Carvalho CL, Gattaz WF, Forlenza OV. Alzheimer's Disease-related Biomarkers in Aging Adults with Down Syndrome: Systematic Review. *Current Psychiatry Research and Reviews* 2019;15:49–57. <https://doi.org/10.2174/1573400515666190122152855>.
- [175] WM J, M DB, AL S, K R, IS P, M N, et al. Adenosine triphosphate binding cassette subfamily C member 1 (ABCC1) overexpression reduces APP processing and increases alpha- versus beta-secretase activity, in vitro. *Biol Open* 2021;10. <https://doi.org/10.1242/BIO.054627>.

- [176] Ehrlich D, Hochstrasser T, Humpel C. Effects of oxidative stress on amyloid precursor protein processing in rat and human platelets. *Platelets* 2013;24:26–36. <https://doi.org/10.3109/09537104.2012.661104>.
- [177] Salehi A, Delcroix JD, Belichenko P V., Zhan K, Wu C, Valletta JS, et al. Increased App Expression in a Mouse Model of Down's Syndrome Disrupts NGF Transport and Causes Cholinergic Neuron Degeneration. *Neuron* 2006;51:29–42. <https://doi.org/10.1016/J.NEURON.2006.05.022>.
- [178] Shi XP, Tugusheva K, Bruce JE, Lucka A, Wu GX, Chen-Dodson E, et al. Beta-secretase cleavage at amino acid residue 34 in the amyloid beta peptide is dependent upon gamma-secretase activity. *J Biol Chem* 2003;278:21286–94. <https://doi.org/10.1074/JBC.M209859200>.
- [179] Fluhner R, Capell A, Westmeyer G, Willem M, Hartung B, Condrón MM, et al. A non-amyloidogenic function of BACE-2 in the secretory pathway. *J Neurochem* 2002;81:1011–20. <https://doi.org/10.1046/J.1471-4159.2002.00908.X>.
- [180] Sun X, He G, Song W. BACE2, as a novel APP  $\theta$ -secretase, is not responsible for the pathogenesis of Alzheimer's disease in Down syndrome. *The FASEB Journal* 2006;20:1369–76. <https://doi.org/10.1096/FJ.05-5632COM>.
- [181] Abdul-Hay SO, Sahara T, McBride M, Kang D, Leissring MA. Identification of BACE2 as an avid  $\beta$ -amyloid-degrading protease. *Mol Neurodegener* 2012;7. <https://doi.org/10.1186/1750-1326-7-46>.
- [182] W G, R M, V M-C, V P, M N. Down syndrome and Alzheimer's disease: common molecular traits beyond the amyloid precursor protein. *Aging* 2020;12:1011–33. <https://doi.org/10.18632/AGING.102677>.
- [183] L H, T M, R L, A M, M D, RJM R, et al. Methylomic profiling in trisomy 21 identifies cognition- and Alzheimer's disease-related dysregulation. *Clin Epigenetics* 2019;11. <https://doi.org/10.1186/S13148-019-0787-X>.
- [184] Lu J, Mccarter M, Lian G, Esposito G, Capoccia E, Delli-Bovi LC, et al. Global hypermethylation in fetal cortex of Down syndrome due to DNMT3L overexpression. *Hum Mol Genet* 2016;25:1714–27. <https://doi.org/10.1093/HMG/DDW043>.
- [185] Aguilar-da-Silva RH, Moraes TP, Moraes G. Implicações do estresse oxidativo sobre o metabolismo eritrocitário de pessoas com Síndrome de Down. *Rev Bras Hematol Hemoter* 2003;25:231–7. <https://doi.org/10.1590/s1516-84842003000400009>.
- [186] Campos C, Casado Á. Oxidative stress, thyroid dysfunction & Down syndrome. *Indian Journal of Medical Research* 2015;142:113–9. <https://doi.org/10.4103/0971-5916.164218>.
- [187] Busciglio J, Pelsman A, Wong C, Pigino G, Yuan M, Mori H, et al. Altered metabolism of the amyloid  $\beta$  precursor protein is associated with mitochondrial dysfunction in Down's syndrome. *Neuron* 2002;33:677–88. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(02\)00604-9](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(02)00604-9).
- [188] Araki W, Araki YM, Mizusawa H. Potential value of soluble APP $\alpha$  and APP $\beta$  in CSF as biomarkers of dementia disorders: Unresolved issues and perspectives. *Neurol Clin Neurosci* 2018;6:89–93. <https://doi.org/10.1111/NCN3.12195>.
- [189] Lewczuk P, Popp J, Lelental N, Kölsch H, Maier W, Kornhuber J, et al. Cerebrospinal Fluid Soluble Amyloid- $\beta$  Protein Precursor as a Potential Novel Biomarkers of Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's Disease* 2012;28:119–25. <https://doi.org/10.3233/JAD-2011-110857>.

- [190] Perneczky R, Tsolakidou A, Arnold A, Diehl-Schmid J, Grimmer T, Förstl H, et al. CSF soluble amyloid precursor proteins in the diagnosis of incipient Alzheimer disease. *Neurology* 2011;77:35–8. <https://doi.org/10.1212/WNL.0B013E318221AD47>.
- [191] Yun SM, Cho SJ, Jo C, Park MH, Han C, Koh YH. Elevation of plasma soluble amyloid precursor protein beta in Alzheimer's disease. *Arch Gerontol Geriatr* 2020;87. <https://doi.org/10.1016/J.ARCHGER.2019.103995>.
- [192] Wu G, Sankaranarayanan S, Wong J, Tugusheva K, Michener MS, Shi X, et al. Characterization of plasma  $\beta$ -secretase (BACE1) activity and soluble amyloid precursor proteins as potential biomarkers for Alzheimer's disease. *J Neurosci Res* 2012;90:2247–58. <https://doi.org/10.1002/JNR.23122>.
- [193] Marksteiner J, Humpel C. Platelet-derived secreted amyloid-precursor protein- $\beta$  as a marker for diagnosing Alzheimer's disease. *Curr Neurovasc Res* 2013;10:297–303.
- [194] R P, LH G, SM K, L W, A K, J M, et al. Soluble amyloid precursor protein  $\beta$  as blood-based biomarker of Alzheimer's disease. *Transl Psychiatry* 2013;3. <https://doi.org/10.1038/TP.2013.11>.
- [195] Alexopoulos P, Gleixner L-S, Werle L, Buhl F, Thierjung N, Giourou E, et al. Plasma levels of soluble amyloid precursor protein  $\beta$  in symptomatic Alzheimer's disease. *European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience* 2017 268:5 2017;268:519–24. <https://doi.org/10.1007/S00406-017-0815-9>.
- [196] Bernstein H-G, Stricker R, Lendeckel U, Bertram I, Dobrowolny H, Steiner J, et al. Reduced neuronal co-localisation of nardilysin and the putative alpha-secretases ADAM10 and ADAM17 in Alzheimer's disease and Down syndrome brains. *Age (Dordr)* 2009;31:11–25. <https://doi.org/10.1007/s11357-008-9076-x>.
- [197] Colciaghi F, Borroni B, Pastorino L, Marcello E, Zimmermann M, Cattabeni F, et al. [alpha]-Secretase ADAM10 as well as [alpha]APPs is reduced in platelets and CSF of Alzheimer disease patients. *Mol Med* 2002;8:67–74.
- [198] Manzine PR, De França Bram JM, Barham EJ, De Assis Carvalho Do Vale F, Selistre-De-Araújo HS, Cominetti MR, et al. ADAM10 as a biomarker for Alzheimer's disease: A study with Brazilian elderly. *Dement Geriatr Cogn Disord* 2013;35. <https://doi.org/10.1159/000345983>.
- [199] Colciaghi F, Borroni B, Pastorino L, Marcello E, Zimmermann M, Cattabeni F, et al. [alpha]-Secretase ADAM10 as well as [alpha]APPs is reduced in platelets and CSF of Alzheimer disease patients. *Mol Med* 2002;8:67–74. <https://doi.org/S1528365802200671> [pii].
- [200] Sennvik K, Fastbom J, Blomberg M, Wahlund LO, Winblad B, Benedikz E. Levels of alpha- and beta-secretase cleaved amyloid precursor protein in the cerebrospinal fluid of Alzheimer's disease patients. *Neurosci Lett* 2000;278:169–72. [https://doi.org/10.1016/s0304-3940\(99\)00929-5](https://doi.org/10.1016/s0304-3940(99)00929-5).
- [201] Fellgiebel A, Kojro E, Müller MJ, Scheurich A, Schmidt LG, Fahrenholz F. CSF APPs alpha and phosphorylated tau protein levels in mild cognitive impairment and dementia of Alzheimer's type. *J Geriatr Psychiatry Neurol* 2009;22:3–9. <https://doi.org/10.1177/0891988708327810>.
- [202] Endres K, Fahrenholz F. Regulation of  $\alpha$ -secretase ADAM10 expression and activity. *Exp Brain Res* 2012;217:343–52. <https://doi.org/10.1007/s00221-011-2885-7>.

- [203] Bernstein HG, Bukowska A, Krell D, Bogerts B, Ansorge S, Lendeckel U. Comparative localization of ADAMs 10 and 15 in human cerebral cortex normal aging, Alzheimer disease and Down syndrome. *J Neurocytol* 2003;32:153–60. <https://doi.org/10.1023/B:NEUR.0000005600.61844.A6>.
- [204] Manzine PR, Marcello E, Borroni B, Kamphuis W, Hol E, Padovani A, et al. ADAM10 gene expression in the blood cells of Alzheimer's disease patients and mild cognitive impairment subjects. *Biomarkers* 2015;20:196–201. <https://doi.org/10.3109/1354750X.2015.1062554>.
- [205] Cheon MS, Dierssen M, Kim SH, Lubec G. Protein expression of BACE1, BACE2 and APP in Down syndrome brains. *Amino Acids* 2008;35:339–43. <https://doi.org/10.1007/s00726-007-0618-9>.
- [206] Sun X, Tong Y, Qing H, Chen C-H, Song W. Increased BACE1 maturation contributes to the pathogenesis of Alzheimer's disease in Down syndrome. *FASEB J* 2006;20:1361–8. <https://doi.org/10.1096/fj.05-5628com>.
- [207] Miners JS, Morris S, Love S, Kehoe PG. Accumulation of Insoluble Amyloid- $\beta$  in Down's Syndrome is Associated with Increased BACE-1 and Neprilysin Activities. *Journal of Alzheimer's Disease* 2011;23:101–8. <https://doi.org/10.3233/JAD-2010-101395>.
- [208] Holsinger RMD, McLean CA, Beyreuther K, Masters CL, Evin G. Increased expression of the amyloid precursor  $\beta$ -secretase in Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 2002;51:783–6. <https://doi.org/10.1002/ana.10208>.
- [209] Yang L-B, Lindholm K, Yan R, Citron M, Xia W, Yang X-L, et al. Elevated  $\beta$ -secretase expression and enzymatic activity detected in sporadic Alzheimer disease. *Nat Med* 2003;9:3–4. <https://doi.org/10.1038/nm0103-3>.
- [210] Fukumoto H.  $\beta$ -Secretase Protein and Activity Are Increased in the Neocortex in Alzheimer Disease. *Arch Neurol* 2002;59:1381. <https://doi.org/10.1001/archneur.59.9.1381>.
- [211] Ahmed RR, Holler CJ, Webb RL, Li F, Beckett TL, Murphy MP. BACE1 and BACE2 enzymatic activities in Alzheimer's disease. *J Neurochem* 2010;112:1045–53. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2009.06528.x>.
- [212] Holsinger RMD, Lee JS, Boyd A, Masters CL, Collins SJ. CSF BACE1 activity is increased in CJD and Alzheimer disease versus other dementias. *Neurology* 2006;67:710–2. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000229925.52203.4c>.
- [213] Verheijen JH, Huisman LGM, Van Lent N, Neumann U, Paganetti P, Erik Hack C, et al. Detection of a soluble form of BACE-1 in human cerebrospinal fluid by a sensitive activity assay. *Clin Chem* 2006;52:1168–74. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2006.066720>.
- [214] Zhong Z, Ewers M, Teipel S, B?rger K, Wallin A, Blennow K, et al. Levels of  $\beta$ -Secretase (BACE1) in Cerebrospinal Fluid as a Predictor of Risk in Mild Cognitive Impairment. *Arch Gen Psychiatry* 2007;64:718. <https://doi.org/10.1001/archpsyc.64.6.718>.
- [215] Zetterberg H, Andreasson U, Hansson O, Wu G, Sankaranarayanan S, Andersson ME, et al. Elevated Cerebrospinal Fluid BACE1 Activity in Incipient Alzheimer Disease. *Arch Neurol* 2008;65:1102–7. <https://doi.org/10.1001/archneur.65.8.1102>.
- [216] Lott IT, Head E. Down syndrome and Alzheimer's disease: A link between development and aging. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev* 2001;7:172–8. <https://doi.org/10.1002/mrdd.1025>.

- [217] Saunders AJ. BACE Maps to Chromosome 11 and a BACE Homolog, BACE2, Reside in the Obligate Down Syndrome Region of Chromosome 21. *Science* (1979) 1999;286:1255a–1255. <https://doi.org/10.1126/science.286.5443.1255a>.
- [218] Schuck F, Wolf D, Fellgiebel A, Endres K. Increase of  $\alpha$ -Secretase ADAM10 in Platelets Along Cognitively Healthy Aging. *Journal of Alzheimer's Disease* 2016;50:817–26. <https://doi.org/10.3233/JAD-150737>.
- [219] B DS, P S, K C, H V, G G, W A, et al. Deficiency of presenilin-1 inhibits the normal cleavage of amyloid precursor protein. *Nature* 1998;391:387–90. <https://doi.org/10.1038/34910>.
- [220] Mathews PM, Cataldo AM, Kao BH, Rudnicki AG, Qin X, Yang JL, et al. Brain expression of presenilins in sporadic and early-onset, familial Alzheimer's disease. *Mol Med* 2000;6:878–91.
- [221] Davidsson P, Bogdanovic N, Lannfelt L, Blennow K. Reduced expression of amyloid precursor protein, presenilin-1 and rab3a in cortical brain regions in Alzheimer's disease. *Dement Geriatr Cogn Disord* 2001;12:243–50. <https://doi.org/51266>.
- [222] Verdile G, Gnjec A, Miklossy J, Fonte J, Veurink G, Bates K, et al. Protein markers for Alzheimer disease in the frontal cortex and cerebellum. *Neurology* 2004;63:1385–92. <https://doi.org/10.1212/01.WNL.0000141848.45315.A6>.
- [223] Borghi R, Piccini A, Barini E, Cirmena G, Guglielmotto M, Tamagno E, et al. Upregulation of Presenilin 1 in Brains of Sporadic, Late-Onset Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's Disease* 2010;22:771–5. <https://doi.org/10.3233/JAD-2010-100729>.
- [224] Kakuda N, Shoji M, Arai H, Furukawa K, Ikeuchi T, Akazawa K, et al. Altered  $\gamma$ -secretase activity in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *EMBO Mol Med* 2012;4:344–52. <https://doi.org/10.1002/emmm.201200214>.
- [225] Sogorb-Esteve A, García-Ayllón M-S, Fortea J, Sánchez-Valle R, Lleó A, Molinuevo J-L, et al. Cerebrospinal fluid Presenilin-1 increases at asymptomatic stage in genetically determined Alzheimer's disease. *Mol Neurodegener* 2016;11:66. <https://doi.org/10.1186/s13024-016-0131-2>.
- [226] Rogaev EI, Sherrington R, Wu C, Levesque G, Liang Y, Rogaeva EA, et al. Analysis of the 5' Sequence, Genomic Structure, and Alternative Splicing of the presenilin-1 Gene (PSEN1) Associated with Early Onset Alzheimer Disease. *Genomics* 1997;40:415–24. <https://doi.org/10.1006/geno.1996.4523>.
- [227] Bermejo-Bescós P, Martínez-Aragón S, Jiménez-Aliaga K, Benedí J, Felici E, Gil P, et al. Processing of the Platelet Amyloid Precursor Protein in the Mild Cognitive Impairment (MCI). *Neurochem Res* 2013;38:1415–23. <https://doi.org/10.1007/s11064-013-1039-7>.
- [228] Drummond E, Kavanagh T, Pires G, Marta-Ariza M, Kanshin E, Nayak S, et al. The amyloid plaque proteome in early onset Alzheimer's disease and Down syndrome. *Acta Neuropathol Commun* 2022;10. <https://doi.org/10.1186/S40478-022-01356-1>.
- [229] Rujeedawa T, Félez EC, Clare ICH, Fortea J, Strydom A, Rebillat AS, et al. The Clinical and Neuropathological Features of Sporadic (Late-Onset) and Genetic Forms of Alzheimer's Disease. *J Clin Med* 2021;10. <https://doi.org/10.3390/JCM10194582>.
- [230] Ryan NS, Rossor MN. Correlating familial Alzheimer's disease gene mutations with clinical phenotype. *Biomark Med* 2010;4:99–112. <https://doi.org/10.2217/BMM.09.92>.

- [231] Tyrrell J, Cosgrave M, McPherson J, Hawi Z, Trulock V, Calvert J, et al. Presenilin 1 and  $\alpha$ -1-antichymotrypsin polymorphisms in Down syndrome: No effect on the presence of dementia. *American Journal of Medical Genetics - Neuropsychiatric Genetics* 1999;88:616–20.
- [232] Shaffer LG, Lupski JR. Molecular mechanisms for constitutional chromosomal rearrangements in humans. *Annu Rev Genet* 2000;34:297–329. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.GENET.34.1.297>.
- [233] Sogorb-Esteve A, García-Ayllón MS, Fortea J, Sánchez-Valle R, Lleó A, Molinuevo JL, et al. Cerebrospinal fluid Presenilin-1 increases at asymptomatic stage in genetically determined Alzheimer's disease. *Mol Neurodegener* 2016;11:1–11. <https://doi.org/10.1186/S13024-016-0131-2>.
- [234] Startin CM, Ashton NJ, Hamburg S, Hithersay R, Wiseman FK, Mok KY, et al. Plasma biomarkers for amyloid, tau, and cytokines in Down syndrome and sporadic Alzheimer's disease. *Alzheimers Res Ther* 2019;11:26. <https://doi.org/10.1186/s13195-019-0477-0>.
- [235] Rafii MS, Donohue MC, Matthews DC, Muranevici G, Ness S, O'Bryant SE, et al. Plasma Neurofilament Light and Alzheimer's Disease Biomarkers in Down Syndrome: Results from the Down Syndrome Biomarker Initiative (DSBI). *J Alzheimers Dis* 2019;70:131–8. <https://doi.org/10.3233/JAD-190322>.
- [236] Mattsson N, Andreasson U, Zetterberg H, Blennow K, Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative. Association of Plasma Neurofilament Light With Neurodegeneration in Patients With Alzheimer Disease. *JAMA Neurol* 2017;74:557. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2016.6117>.
- [237] Weston PSJ, Poole T, Ryan NS, Nair A, Liang Y, Macpherson K, et al. Serum neurofilament light in familial Alzheimer disease. *Neurology* 2017;89:2167–75. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000004667>.
- [238] Portelius E, Hölttä M, Soininen H, Bjerke M, Zetterberg H, Westerlund A, et al. Altered Cerebrospinal Fluid Levels of Amyloid  $\beta$  and Amyloid Precursor-Like Protein 1 Peptides in Down's Syndrome. *Neuromolecular Med* 2014;16:510–6. <https://doi.org/10.1007/s12017-014-8302-1>.
- [239] Zetterberg H. Neurofilament Light: A Dynamic Cross-Disease Fluid Biomarker for Neurodegeneration. *Neuron* 2016;91:1–3. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.06.030>.



## ANEXOS

### ANEXO A – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP) – Nº 2.262.321

USP - FACULDADE DE  
MEDICINA DA UNIVERSIDADE  
DE SÃO PAULO - FMUSP



#### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

##### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Marcadores biológicos do envelhecimento e da doença de Alzheimer em pessoas com síndrome de Down

**Pesquisador:** Orestes Vicente Forlenza

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 72359117.0.0000.0065

**Instituição Proponente:** Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

**Patrocinador Principal:** FUNDACAO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SAO PAULO

##### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 2.262.321

##### Apresentação do Projeto:

Adequada

##### Objetivo da Pesquisa:

Estabelecer a presença de alterações do metabolismo da APP e de sinais de envelhecimento biológico em indivíduos adultos e idosos com SD, estratificados segundo faixa etária e classificados segundo a presença ou ausência de demência; esses parâmetros serão comparados aos de indivíduos com cariótipo normal e saudáveis, nas faixas etárias equivalentes.

##### Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Favoráveis

##### Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Apenas faria a seguinte consideração: o objetivo está como "estabelecer a presença...". Não seria melhor "...avaliar ou pesquisar a presença..."?

##### Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O autor cita TCLE e também Termo de Assentimento. Entendo que está contemplando ambos no seu TCLE solicitando presença de testemunha para o assentimento.

Endereço: DOUTOR ARNALDO 251 21ª andar sala 36  
Bairro: PACAEMBU CEP: 01.246-903  
UF: SP Município: SAO PAULO  
Telefone: (11)3893-4401 E-mail: oep.fm@usp.br

USP - FACULDADE DE  
MEDICINA DA UNIVERSIDADE  
DE SÃO PAULO - FMUSP



Continuação do Parecer: 2.262.321

**Recomendações:**

sem outras recomendações

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

sem pendências

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_922413.pdf	01/08/2017 10:30:13		Aceito
Orçamento	Orcamento.pdf	01/08/2017 10:28:00	Orestes Vicente Forlenza	Aceito
Outros	CartaAnuenciaAPAE.pdf	01/08/2017 10:26:47	Orestes Vicente Forlenza	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	01/08/2017 10:25:43	Orestes Vicente Forlenza	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	BiomarcadoresEnvelhecimentoDAnaSD.pdf	01/08/2017 10:25:10	Orestes Vicente Forlenza	Aceito
Outros	FormularioOnline.pdf	01/08/2017 10:23:37	Orestes Vicente Forlenza	Aceito
Folha de Rosto	FolhaDeRosto.pdf	01/08/2017 10:19:46	Orestes Vicente Forlenza	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

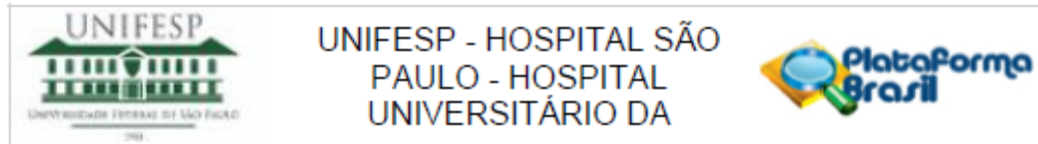
Não

SAO PAULO, 06 de Setembro de 2017

Assinado por:  
Maria Aparecida Azevedo Koike Folgueira  
(Coordenador)

Endereço: DOUTOR ARNALDO 251 21º andar sala 36  
Bairro: PACAEMBU CEP: 01.246-903  
UF: SP Município: SAO PAULO  
Telefone: (11)3893-4401 E-mail: cep.fm@usp.br

**ANEXO B – Aprovação do Comitê de Ética pela Associação de Pais e Amigos dos Excepcionais (APAE) / Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) – Nº 2.336.095**



**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**

Elaborado pela Instituição Coparticipante

**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** Marcadores biológicos do envelhecimento e da doença de Alzheimer em pessoas com síndrome de Down

**Pesquisador:** Orestes Vicente Forlenza

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 72359117.0.3001.5505

**Instituição Proponente:** ASSOCIAÇÃO DE PAIS E AMIGOS DOS EXCEPCIONAIS DE SÃO PAULO

**Patrocinador Principal:** FUNDACAO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SAO PAULO

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 2.336.095

**Apresentação do Projeto:**

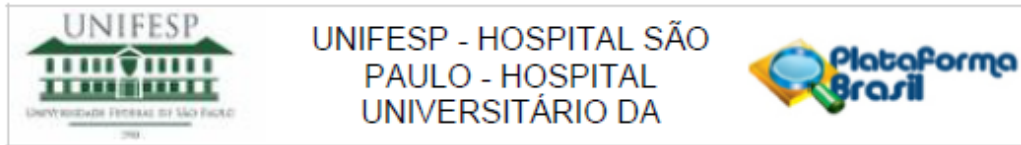
CEP UNIFESP (APAE co-participante)

**Justificativa:** Uma parcela significativa dos indivíduos com síndrome de Down (SD) desenvolve demência na maturidade. O início pré-senil e o acúmulo maciço de amiloide cerebral são características comuns à demência na SD e na doença de Alzheimer (DA), particularmente nas formas familiares desta. A trissomia do cromossomo 21 determina anormalidades na expressão dos genes que codificam a proteína precursora do amiloide (APP) e a enzima superóxido dismutase dependente de cobre e zinco (SOD-1). A superexpressão da APP altera o seu metabolismo proteolítico, favorecendo a clivagem amiloidogênica; e a disfunção da SOD-1 eleva o estresse oxidativo, causando dano mitocondrial e ao DNA. Hipotetizamos que a interação entre estes dois mecanismos na SD leva ao envelhecimento prematuro e acelera o processo patogênico da demência.

**Objetivo da Pesquisa:**

Estabelecer a presença de alterações do metabolismo da APP e de sinais de envelhecimento biológico em indivíduos adultos e idosos com SD, estratificados segundo faixa etária e classificados segundo a presença ou ausência de demência; esses parâmetros serão comparados

<b>Endereço:</b> Rua Francisco de Castro, 55	<b>CEP:</b> 04.020-050
<b>Bairro:</b> VILA CLEMENTINO	
<b>UF:</b> SP	<b>Município:</b> SAO PAULO
<b>Telefone:</b> (11)5571-1062	<b>Fax:</b> (11)5539-7162
	<b>E-mail:</b> cep@unifesp.edu.br



Continuação do Parecer: 2.336.095

aos de indivíduos com cariótipo normal e saudáveis, nas faixas etárias equivalentes. Especificamente, pretendemos determinar:

- (i) A expressão dos peptídeos secretados de APP (sAPP) de 130kDa e 110kDa em plaquetas, possibilitando o cálculo da 'razão de APP', que corresponde à proporção entre essas isoformas de sAPP (130kDa:110kDa);
- (ii) A expressão proteica das APP-secretases alfa (ADAM-10), beta (BACE-1) e gama (PSEN-1) em plaquetas.
- (iii) O comprimento telomérico em leucócitos; (iv) A expressão de componentes de vias apoptóticas (BAX, Bcl-2 e bad) em leucócitos, permitindo inferir a ativação desta via; (v) A expressão de genes de conservação de genoma (p53, CDK1, 2 e 5) em leucócitos.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Segundo o pesquisador: Riscos:

A punção venosa será feita por um profissional qualificado e experiente, utilizando agulha estéril e descartável. Pode haver algum desconforto, principalmente para as pessoas que têm medo de fazer exame de sangue; ocasionalmente pode se formar um pequeno hematoma no local da picada, que geralmente desaparece após alguns dias e não representa qualquer dano à saúde. Portanto, não há maiores riscos associados a este procedimento.

Benefícios:

Não há benefício direto para os participantes da pesquisa, pois se trata de um estudo experimental testando a hipótese de que os biomarcadores da demência podem auxiliar na identificação dos indivíduos com síndrome de Down que desenvolverão demência quando ficarem mais velhos. Ao final do estudo, após concluídas as análises, poderemos tirar conclusões sobre o benefício deste procedimento para fins de antecipação do diagnóstico da demência associada à síndrome de Down. O resultado da avaliação de memória poderá ser informado de imediato, e esta pode ser uma informação relevante para os participantes da pesquisa.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

PESQUISADORES:

Orestes V. Forlenza\* e Laura Guilhoto\*\*

\* Laboratório de Neurociências (LIM-27), Departamento e Instituto de Psiquiatria (Hospital das Clínicas), Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

\*\* Grupo de Envelhecimento/Conselho Científico da APAE

Endereço: Rua Francisco de Castro, 55  
 Bairro: VILA CLEMENTINO CEP: 04.020-050  
 UF: SP Município: SAO PAULO  
 Telefone: (11)5571-1082 Fax: (11)5539-7162 E-mail: oep@unifesp.edu.br



Continuação do Parecer: 2.336.095

**Equipe executante:**

Orestes V. Forlenza, Leda L. Talib, Jessyka F. Bram, Giancarlo M. Cardillo, Márcia Radanovic

A instituição co-participante ASSOCIAÇÃO DE PAIS E AMIGOS DOS EXCEPCIONAIS DE SÃO PAULO - APAE, vinculada ao CEP Unifesp está sob a responsabilidade da pesquisadora Laura Guilhoto na plataforma brasil.

**metodologia**

Serão recrutados 30 indivíduos com SD na Associação de Pais e Amigos dos Excepcionais (APAE) da cidade de São Paulo/SP, estratificados conforme as faixas etárias: 20-34 anos; 35 a 49 anos; e 50 anos de idade ou mais. O grupo comparativo será composto por 30 indivíduos com cariótipo normal, recrutados na comunidade por meio de auxílio de anúncios na mídia. Vale salientar que sujeitos e controles serão pareados conforme a idade cronológica e serão selecionados conforme os critérios de inclusão:

Grupo experimental: 30 indivíduos com SD, diagnosticados segundo a décima edição da Classificação Internacional de Doenças e Problemas Relacionados com a Saúde (CID-10) [141] e avaliados pela Classificação Internacional de Funcionalidade, Incapacidade de Saúde (CIF) [142].

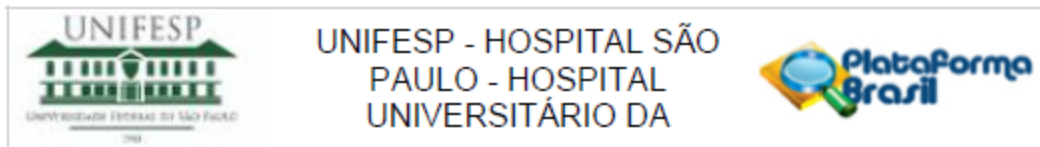
Grupo comparativo: 30 indivíduos saudáveis com cariótipo normal, avaliados pela equipe médica do Laboratório de Neurociências (LIM-27) do Instituto de Psiquiatria do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (IPq – HCFMUSP). Todos os participantes preencherão questionário para coleta de informações sociodemográficas e serão em seguida submetidos a anamnese e exame físico.

Os seguintes biomarcadores da DA serão determinados em plaquetas: (i) 'razão de APP', i.e., proporção entre os peptídeos secretados de 130- e 110kDA (sAPP); (ii) expressão proteica das APP-secretases alfa (ADAM-10), beta (BACE-1) e gama (PSEN-1). Os marcadores do envelhecimento serão determinados em leucócitos: (iii) comprimento telomérico; (iv) expressão de componentes de vias apoptóticas (BAX, Bcl-2 e bad); e (v) expressão de genes de conservação de genoma (p53, CDK1, 2 e 5).

Resultados esperados: A identificação de biomarcadores do processo patogênico da DA fornecerá subsídios ao diagnóstico da demência na SD, com possíveis aplicações clínicas e de pesquisa. Indivíduos com SD apresentarão sinais biológicos de envelhecimento prematuro. Haverá correlação entre os marcadores do envelhecimento e os biomarcadores da DA.

A colaboração com outros laboratórios, serviços e instituições possibilitará ampliar o alcance destas pesquisas. Em particular, a colaboração com a APAE permitirá constituir a casuística de

Endereço: Rua Francisco de Castro, 55  
 Bairro: VILA CLEMENTINO CEP: 04.020-050  
 UF: SP Município: SAO PAULO  
 Telefone: (11)5571-1062 Fax: (11)5539-7162 E-mail: cep@unifesp.edu.br



Continuação do Parecer: 2.336.095

indivíduos com SD, na qual pretendemos investigar os biomarcadores da DA, e a parceria acadêmica que mantemos com o CMN e o LIM-21 do HCFMUSP poderá agregar, futuramente, tecnologias de imagem cerebral a esta linha de pesquisa.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Documentos obrigatórios apresentados e aprovados pelo centro coordenador:

folha de rosto, projeto de pesquisa, TCLE; assim como outros documentos:

CartaAnuenciaAPAE.pdf

Orçamento Orcamento.pdf

O estudo envolverá um orçamento de R\$ 140000,00,e de acordo com as informações do pesquisador na plataforma brasil:

As despesas laboratoriais desta pesquisa serão absorvidas por fomento INCT vigente (INBioN - Instituto Nacional de Biomarcadores em Neuropsiquiatria; CNPq/FAPESP 14/50873-3; coordenador: Wagner Gattaz), no qual o proponente (O.V.F.) é um dos investigadores principais (PIs).

**Recomendações:**

Nada consta

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Sem inadequações

Notas do CEP Unifesp: incluir no TCLE os dados do CEP Unifesp

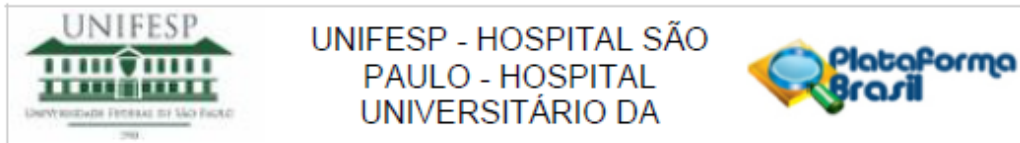
Atenção: o CEP/UNIFESP mudou de endereço: favor corrigir no TCLE. Novo endereço: Rua Prof. Francisco de Castro, n: 55, - 04020-050. O E-mail é: CEP@unifesp.edu.br. Os telefones continuam os mesmos (011-5571-1062; 011-5539-7162)

- O termo "paciente" deve substituído pelo termo "participante da pesquisa", conforme definição disposta no item II.10 da Resolução CNS nº 466 de 2012.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Lembramos que, a partir desta data de aprovação, é necessário o envio de relatórios parciais

Endereço: Rua Francisco de Castro, 55  
 Bairro: VILA CLEMENTINO CEP: 04.020-050  
 UF: SP Município: SAO PAULO  
 Telefone: (11)5571-1062 Fax: (11)5539-7162 E-mail: cep@unifesp.edu.br



Continuação do Parecer: 2.336.095

(anualmente), e o relatório final, quando do término do estudo.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_922413.pdf	01/08/2017 10:30:13		Aceito
Orçamento	Orcamento.pdf	01/08/2017 10:28:00	Orestes Vicente Forlenza	Aceito
Outros	CartaAnuenciaAPAE.pdf	01/08/2017 10:26:47	Orestes Vicente Forlenza	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	01/08/2017 10:25:43	Orestes Vicente Forlenza	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	BiomarcadoresEnvelhecimentoDAnaSD.pdf	01/08/2017 10:25:10	Orestes Vicente Forlenza	Aceito
Outros	FormularioOnline.pdf	01/08/2017 10:23:37	Orestes Vicente Forlenza	Aceito
Folha de Rosto	FolhaDeRosto.pdf	01/08/2017 10:19:46	Orestes Vicente Forlenza	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 18 de Outubro de 2017

---

Assinado por:  
Miguel Roberto Jorge  
(Coordenador)

Endereço: Rua Francisco de Castro, 55  
Bairro: VILA CLEMENTINO CEP: 04.020-050  
UF: SP Município: SAO PAULO  
Telefone: (11)5571-1082 Fax: (11)5539-7162 E-mail: cep@unifesp.edu.br

## ANEXO C – Aprovação pela Plataforma Brasil – Parecer Nº 3.217.085

USP - FACULDADE DE  
MEDICINA DA UNIVERSIDADE  
DE SÃO PAULO - FMUSP



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DA EMENDA

**Título da Pesquisa:** Marcadores biológicos do envelhecimento e da doença de Alzheimer em pessoas com síndrome de Down

**Pesquisador:** Orestes Vicente Forlenza

**Área Temática:**

**Versão:** 3

**CAAE:** 72359117.0.0000.0065

**Instituição Proponente:** Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

**Patrocinador Principal:** FUNDACAO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SAO PAULO

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 3.217.085

**Apresentação do Projeto:**

adequada

**Objetivo da Pesquisa:**

Marcadores biológicos do envelhecimento e da doença de Alzheimer em pessoas com síndrome de Down

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

favoráveis para os benefícios

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

sem outros comentários

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

adequado após as explicações

**Recomendações:**

O pesquisador respondeu os nossos questionamentos de forma adequada

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

sem pendências

**Endereço:** DOUTOR ARNALDO 251 21º andar sala 36

**Bairro:** PACAEMBU

**CEP:** 01.246-903

**UF:** SP

**Município:** SAO PAULO

**Telefone:** (11)3893-4401

**E-mail:** cep.fm@usp.br



USP - FACULDADE DE  
MEDICINA DA UNIVERSIDADE  
DE SÃO PAULO - FMUSP



Continuação do Parecer: 3.217.085

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_123917_7_E1.pdf	20/12/2018 14:28:13		Aceito
Outros	respparecer.pdf	20/12/2018 14:27:30	Orestes Vicente Forlenza	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	tclell.pdf	20/12/2018 14:26:55	Orestes Vicente Forlenza	Aceito
Outros	Carta_Emenda_JMFBM.pdf	16/10/2018 15:25:39	Orestes Vicente Forlenza	Aceito
Outros	Doutorado_JMFBM.pdf	16/10/2018 15:25:24	Orestes Vicente Forlenza	Aceito
Orçamento	Orcamento.pdf	01/08/2017 10:28:00	Orestes Vicente Forlenza	Aceito
Outros	CartaAnuenciaAPAE.pdf	01/08/2017 10:26:47	Orestes Vicente Forlenza	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	01/08/2017 10:25:43	Orestes Vicente Forlenza	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	BiomarcadoresEnvelhecimentoDAnaSD.pdf	01/08/2017 10:25:10	Orestes Vicente Forlenza	Aceito
Outros	FormularioOnline.pdf	01/08/2017 10:23:37	Orestes Vicente Forlenza	Aceito
Folha de Rosto	FolhaDeRosto.pdf	01/08/2017 10:19:46	Orestes Vicente Forlenza	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

Endereço: DOUTOR ARNALDO 251 21º andar sala 36  
Bairro: PACAEMBU CEP: 01.246-903  
UF: SP Município: SAO PAULO  
Telefone: (11)3893-4401 E-mail: cep.fm@usp.br

## ANEXO D – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

1

### FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

#### DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME: .....
- DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº: ..... SEXO: .M  F
- DATA NASCIMENTO: ...../...../.....
- ENDEREÇO ..... Nº ..... APTO: .....
- BAIRRO: ..... CIDADE .....
- CEP:..... TELEFONE: DDD (.....).....
2. RESPONSÁVEL LEGAL .....
- NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.) .....
- DOCUMENTO DE IDENTIDADE : .....SEXO: M  F
- DATA NASCIMENTO: ...../...../.....
- ENDEREÇO: ..... Nº ..... APTO: .....
- BAIRRO: ..... CIDADE:.....
- CEP: ..... TELEFONE: DDD(.....).....

#### DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: **Biomarcadores na síndrome de Down**
2. PESQUISADOR : **Orestes Vicente Forlenza**
- CARGO/FUNÇÃO: **Médico/Docente FMUSP** INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL: **CRM-SP 65.590**
- UNIDADE DO HCFMUSP: **Laboratório de Neurociências (LIM-27), Instituto de Psiquiatria, Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo**
3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:
- RISCO MÍNIMO  RISCO MÉDIO
- RISCO BAIXO  RISCO MAIOR
4. DURAÇÃO DA PESQUISA : **Quatro anos**

1 – Estas informações estão sendo fornecidas para auxiliar a sua decisão sobre a participação voluntária em uma pesquisa científica. Pessoas com síndrome de Down podem apresentar perda progressiva da memória e outras habilidades intelectuais quando ficam mais velhas. Na linguagem médica, estas perdas são denominadas “demência”. A demência que acomete as pessoas com síndrome de Down tem semelhanças com a doença de Alzheimer, que é a principal causa de demência em idosos. Porém, na síndrome de Down, esta demência pode manifestar-se mais cedo, geralmente a partir dos 50 anos de idade. Isso porque as modificações fisiológicas que ocorrem em função da síndrome de Down parecem acelerar o processo de envelhecimento nestas pessoas. Esta pesquisa tem como objetivo investigar a presença de indicadores do risco de demência e de sinais de envelhecimento prematuro em pessoas adultas e idosas com síndrome de Down.

2 – Estes indicadores do envelhecimento e do risco de demência são denominados “biomarcadores”. Os biomarcadores que avaliaremos neste estudo serão determinados em sangue periférico, mais especificamente em leucócitos (glóbulos brancos) e em plaquetas (células responsáveis pela coagulação do sangue). Além disso, faremos uma entrevista com os participantes e um exame de memória, através da aplicação de questionários e testes.

3 – Será retirada uma amostra de sangue por meio da punção de uma veia do antebraço, procedimento idêntico ao que fazemos para realizar exames de sangue de rotina. Destas amostras, separaremos em laboratório os leucócitos e as plaquetas. Os componentes do sangue serão armazenados para que, posteriormente, possamos realizar os procedimentos da pesquisa em nosso laboratório. A retirada desta pequena quantidade de sangue não fará falta para o seu corpo.

4 – A punção venosa envolve uma ‘picada’ por meio de agulha estéril e descartável, que será aplicada por um profissional experiente. De qualquer modo, pode haver algum desconforto, principalmente para as pessoas que têm medo de fazer exame de sangue. Ocasionalmente pode se formar um pequeno hematoma no local da picada (pode ‘ficar roxo’), que geralmente desaparece após alguns dias e não representa qualquer dano à saúde; portanto, não há maiores riscos deste procedimento.

5 – Não há benefício direto para os participantes da pesquisa, pois se trata de um estudo experimental testando a hipótese de que os biomarcadores da demência podem auxiliar na identificação dos indivíduos com síndrome de Down que desenvolverão demência quando ficarem mais velhos. Somente no final do estudo poderemos concluir sobre o real benefício deste procedimento. De qualquer modo, o resultado da avaliação de memória poderá ser informado de imediato, e esta pode ser uma informação relevante para os participantes da pesquisa.

6 – Não existem procedimentos laboratoriais alternativos que possam informar sobre o risco de demência<sup>3</sup> em pessoas com síndrome de Down. Outras técnicas estas sendo estudadas, mas estas também se baseiam em métodos experimentais e não estão disponíveis para uso clínico.

7 – Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é o Dr. Orestes Vicente Forlenza que pode ser encontrado no Instituto de Psiquiatria do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP (Rua Doutor Ovídio Pires de Campos 785, 1º andar, sala 1S07, telefone: 2661-7539, email: forlenza@usp.br. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (CEP-FMUSP): Av. Dr. Amaldo, 251 - Cerqueira César - São Paulo - SP -21º andar – sala 36- CEP: 01246-000 Tel: 3893-4401/4407 E-mail: [cep.fm@usp.br](mailto:cep.fm@usp.br)

8 – É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição

09 – As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgada a identificação de nenhum paciente.

10 – Os participantes desta pesquisa e/ou seus responsáveis legais serão informados sobre o andamento da pesquisa e seus resultados parciais, quando houver.

11 – Os procedimentos e avaliações serão feitos quando da visita dos participantes à APAE-SP. Não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

12 - O investigador principal e seus colaboradores comprometem-se a utilizar os dados desta pesquisa, incluindo as análises do material biológico coletado, somente para atingir os objetivos desta pesquisa em particular. Alternativamente, caso seja desejo do participante e/ou seu responsável legal, as amostras de sangue e seus componentes poderão ser mantidas em um banco de amostras (biorrepositório) possibilitando a realização de outras análises relacionadas a esta pesquisa no futuro próximo.

- Concordo que as amostras do meu sangue obtidas para este estudo sejam utilizadas em outros estudos sobre este assunto, desde que devidamente aprovados por Comitê de Ética.
- Não concordo que as amostras do meu sangue sejam utilizadas em outros estudos.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo "Biomarcadores na síndrome de Down".<sup>4</sup>

Eu discuti com o Dr. Orestes Vicente Forlenza sobre a minha decisão em participar deste estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

\_\_\_\_\_  
Assinatura do paciente/representante legal Data \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Assinatura da testemunha Data \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

Para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva, visual e/ou intelectual.

*(Somente para o responsável do projeto)*

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

\_\_\_\_\_  
Assinatura do responsável pelo estudo Data \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

## ANEXO E – Premiação no Congress on Brain, Behavior and Emotions 2022



Prezado(a) autor(a) JESSYKA BRAM,

Parabéns! É com grande satisfação que lhe parabenizamos pelo Prêmio CCM de Incentivo à Pesquisa, recebido pelo trabalho aprovado para o *Congress on Brain, Behavior and Emotions 2022* que será realizado de 01 a 04 de junho de 2022 em Gramado/RS.

**108221 - NÍVEIS PLAQUETÁRIOS DE BIOMARCADORES AMILOIDOGÊNICOS EM ADULTOS E IDOSOS COM SÍNDROME DE DOWN**

Jessyka Maria de França Bram; Augusto Magno Tranquezi Cordeiro; Leda Leme Talib; Wagner Farid Gattaz; Orestes Vicente Forlenza;

O prêmio consiste em um certificado de premiação e pacote completo para participação no *Congress on Brain, Behavior and Emotions 2023*, que ocorrerá de 07 a 10 de junho de 2023 – em Florianópolis/SC.

A premiação inclui uma (01) Inscrição cortesia, passagem aérea para uma pessoa (ida e volta) e hospedagem em apartamento single durante o período do Congresso.

Condições gerais para recebimento da premiação:

- ✓ Todos os custos extras serão de responsabilidade do premiado.
- ✓ A definição de quem será o premiado do grupo de autores/coautores caberá exclusivamente ao autor principal do trabalho científico.
- ✓ O prêmio não poderá ser substituído por dinheiro ou por qualquer outra finalidade que não seja a participação no congresso.
- ✓ O responsável deverá entrar em contato com a empresa organizadora do evento (CCM GROUP – (51) 99335-1242) a partir de janeiro de 2023 para maiores informações sobre recebimento da premiação.

A divulgação dos premiados ocorrerá durante a Cerimônia de Abertura, **dia 1º de junho – a partir das 17h40 – na sala 1**. Solicitamos que ao menos um dos autores esteja presente no local do evento para a solenidade de entrega do certificado e do voucher de premiação.

Por gentileza confirmar recebimento. Em caso de dúvidas, contate pelo e-mail [trabalhos@ccmew.com](mailto:trabalhos@ccmew.com) ou pelo telefone (51) 99335-1242.

Atenciosamente,  
Secretaria do evento  
BRAIN 2022

REALIZAÇÃO



ORGANIZAÇÃO



AGÊNCIA DE TURISMO



SOLUÇÃO DIGITAL



## APÊNDICES

### APÊNDICE A - Padronização - *Immunoblotting*

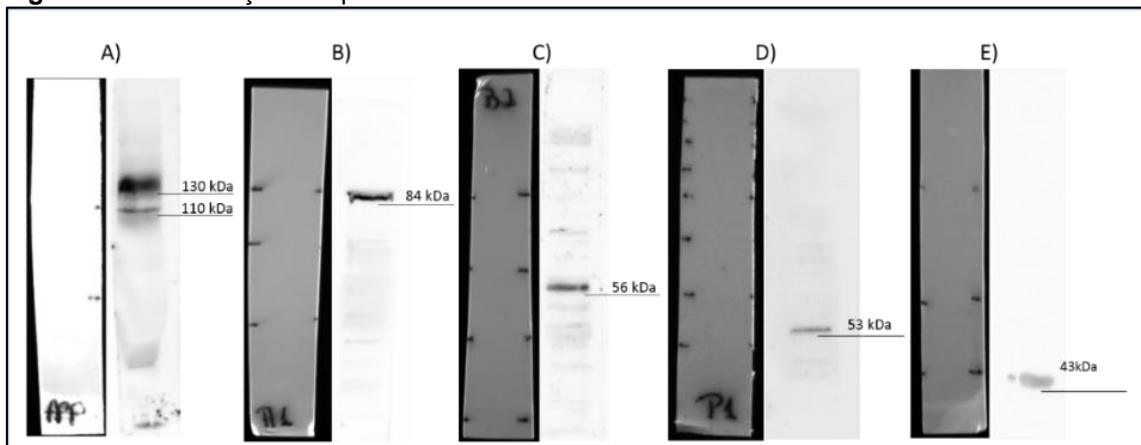
Para efetuar a padronização do método *Western Blotting* para determinação das proteínas APP, ADAM10, BACE1, PSEN1 e  $\beta$ -actina (controle endógeno) utilizou-se um *pool* de plaquetas de indivíduos saudáveis, seguindo o mesmo protocolo do preparo de amostra, já pré-estabelecido no laboratório LIM-27. As imagens das proteínas adquiridas pelo fotodocumentador L-Pix Chemi Express, bem como a tabela referente às diluições utilizadas para a padronização das proteínas supracitadas, encontram-se abaixo (tabela 1; figura 1).

**Tabela 1** – Diluição e tempo de incubação dos anticorpos de APP, ADAM10, BACE1, PSEN1 e  $\beta$ -actina (controle endógeno).

PROTEÍNA	BLOQUEIO	INCUBAÇÃO	
		Anticorpo Primário	Anticorpo Secundário
APP	5% leite <sup>a</sup> ; 1 hora	1:1500 / 2 horas <i>Anti-Alzheimer Precursor Protein A4, clone 22C11</i> (Merckmillipore – MAB348)	1:1500 / 1 hora <i>Anti-Mouse IGG (whole molecule) – Peroxidase Antibody</i> (SIGMA – A4416)
ADAM10	5% leite; 1 hora	1:5000 / <i>Overnight</i> <i>Anti-ADAM10 antibody</i> (Abcam – ab124695)	1:120000 / 1 hora <i>Anti-Rabbit IgG – conjugado à peroxidase</i> (SIGMA – A0545)
BACE1	2%BSA; <i>Overnight</i>	1:10000 / 1 hora <i>Anti-BACE1 antibody</i> (Abcam – ab108394)	1:120000 / 1 hora <i>Anti-Rabbit IgG – conjugado à peroxidase</i> (SIGMA – A0545)
PSEN1	1%BSA; 1 hora	1:7500 / 1 hora <i>Anti-Presenilin 1 antibody</i> (Abcam – ab76083)	1:20000 / 1 hora <i>Anti-Rabbit IgG – conjugado à peroxidase</i> (GE Healthcare Life Sciences)
$\beta$ -ACTINA	-	1:10000/ 1 hora <i>Anti-Beta Actin Antibody</i> (Abcam – ab6276)	1:20000 / 1 hora <i>Anti-Mouse IGG (whole molecule) – Peroxidase Antibody</i> (SIGMA – A4416)

APP: Proteína precursora amilóide; ADAM10: *A Desintegrin and Metallopeptidase – 10*; BACE1:  *$\beta$ -site APP-cleaving enzyme 1*; PSEN1: Presenilina 1; BSA: *Bovine serum albumin*; <sup>a</sup>Leite em pó desnatado Molico Nestlé®.

**Figura 1.** Padronização das proteínas do estudo.



*Western blotting e immunoblotting:* **A)** APP - Gel 8%; **B)** ADAM10 – Gel 10%; **C)** BACE1 – Gel 10%; **D)** PSEN1 – Gel 10%; **E)**  $\beta$ -actina. São Paulo, 2021.



## APÊNDICE B – Densitometrias

Abaixo estão representadas as densitometrias das proteínas APP130kDa, APP110kDa, ADAM10, BACE1, PSEN1 e razão de APP, tanto para o grupo experimental (tabela 1) quanto para o comparativo (tabela 2).

**Tabela 1.** Valores densitométricos referentes ao grupo experimental do estudo (continua).

Grupo	SD	Gênero	Idade	Valores Densitométricos					
				rAPP	APP130	APP110	ADAM10	BACE1	PSEN1
1	-	Masculino	19	2,99	77,62	26	0,29	0,95	-
2	SDsd	Masculino	20	98,6	1,51	0,02	0,1	0,82	0,25
3	-	Feminino	20	2,78	27,62	9,94	0,15	0,6	-
4	SDcd	Feminino	21	1,83	1,37	0,75	0,07	0,15	0,40
5	SDsd	Masculino	21	2,57	0,71	0,28	0,49	0,02	0,51
6	SDsd	Feminino	21	3,16	0,69	0,22	0,98	0,06	1,69
7	SDsd	Feminino	21	5,35	4,88	0,91	2,39	0,7	-
8	SDcd	Feminino	22	3,85	2,60	0,68	1,04	0,03	0,10
9	SDsd	Masculino	22	4,62	13,44	2,91	0,18	0,84	-
10	SDcd	Masculino	23	5,16	0,87	0,17	0,20	0,13	1,34
11	SDsd	Masculino	23	3,23	4,1	1,27	1,51	0,02	0,10
12	SDsd	Masculino	23	-	-	-	0,81	0,02	0,53
13	-	Masculino	23	2,65	1,55	0,59	0,38	0,15	1,80
14	-	Feminino	23	6,18	5,65	0,91	0,26	-	0,5
15	SDsd	Masculino	24	2,93	2,82	0,96	0,46	0,11	0,24
16	SDsd	Masculino	25	1,68	1,32	0,79	0,27	0,05	0,21
17	-	Masculino	25	7,45	1,29	0,17	0,53	0,02	-
18	SDsd	Masculino	26	3,00	1,21	0,40	2,40	0,91	-
19	-	Masculino	26	1,68	57,49	34,25	0,06	0,72	-
20	SDsd	Feminino	27	5,59	6,28	1,12	0,42	0,01	0,11
21	SDsd	Masculino	27	3,56	2,68	0,75	0,02	0,48	0,32
22	SDsd	Masculino	27	3,44	1,86	0,54	1,28	0,28	-
23	SDsd	Masculino	27	4,73	1,35	0,29	0,49	0,06	-
24	-	Masculino	27	4,1	22,63	5,51	0,11	1,67	-
25	-	Feminino	27	1,65	51,12	30,9	-	0,73	-
26	-	Masculino	28	0,67	2	2,98	0,09	0,79	-

**Tabela 1.** Valores densitométricos referentes ao grupo experimental do estudo (continuação).

Grupo	SD	Gênero	Idade	Valores Densitométricos					
				rAPP	APP130	APP110	ADAM10	BACE1	PSEN1
27	-	Feminino	28	5,85	15,12	2,59	0,16	0,08	-
28	SDsd	Masculino	28	4,26	7,43	1,74	0,11	-	-
29	SDsd	Feminino	29	1,05	1,51	1,43	0,88	2,31	0,02
30	SDsd	Feminino	29	3,98	1,55	0,39	0,19	0,10	2,47
31	-	Feminino	29	7,5	18,74	2,5	0,35	0,9	
32	-	Feminino	29	-	-	-	-	-	-
33	-	Feminino	29	4,2	16,52	3,93	-	0,95	-
34	SDsd	Feminino	30	0,95	59,68	62,87	0,62	0,85	-
35	-	Feminino	30	0,87	2,97	3,4	0,09	0,84	-
36	-	Masculino	30	5,86	12,45	2,12	0,08	0,42	-
37	SDsd	Masculino	31	1,30	0,73	0,56	0,75	0,01	0,79
38	-	Feminino	31	1,97	28,49	14,49	0,26	1,65	-
39	--	Feminino	32	4,74	65,14	13,74	0,21	0,77	-
40	SDsd	Feminino	33	0,98	1,88	1,92	0,56	0,38	0,38
41	SDsd	Masculino	33	4,02	0,82	0,21	0,27	0,40	0,51
42	SDsd	Feminino	33	10,84	0,67	0,06	0,81	0,33	0,16
43	SDsd	Masculino	33	3,01	0,95	0,32	0,36	0,11	0,07
44	SDsd	Feminino	33	1,13	3,26	2,87	0,33	0,97	-
45	SDsd	Feminino	34	10,28	1,09	0,11	0,48	0,45	0,43
46	SDcd	Feminino	34	3,02	1,67	0,55	1,04	0,26	1,14
47	SDsd	Masculino	34	2,55	0,92	0,36	0,20	0,41	1,62
48	SDsd	Feminino	34	5,70	19,25	3,38	0,29	0,05	0,08
49	-	Masculino	34	0,35	10,13	29,02	0,75	-	-
50	-	Feminino	34	16,33	5,28	0,32	0,05	0,76	-
51	SDsd	Masculino	35	5,48	57,78	10,55	0,19	0,4	0,19
52	-	Masculino	35	5,76	8,16	1,42	0,19	0,85	-
53	SDsd	Masculino	36	1,3	0,68	0,52	0,12	0,62	-
54	SDcd	Masculino	37	2,27	0,35	0,15	0,64	0,63	0,48
55	SDsd	Feminino	37	1,13	2,49	2,20	0,47	0,27	0,45
56	SDsd	Feminino	37	4,39	0,66	0,15	1,66	0,99	0,24
57	SDsd	Feminino	37	7,57	56,31	7,44	0,22	0,34	0,37
58	-	Masculino	37	23,48	0,78	0,03	2,82	0,04	0,09
59	-	Feminino	37	2,83	17,21	6,08	0,17	0,85	-
60	-	Feminino	37	0,13	2,26	17,68	0,02	0,65	-

**Tabela 1.** Valores densitométricos referentes ao grupo experimental do estudo (continuação).

Grupo SD	Gênero	Idade	Valores Densitométricos						
			rAPP	APP130	APP110	ADAM10	BACE1	PSEN1	
61	SDsd	Masculino	38	0,84	1,27	1,51	0,05	0,70	0,23
62	SDsd	Feminino	38	6,17	30,95	5,02	0,35	0,66	0,16
63	-	Feminino	38	-	-	-	-	-	-
64	SDcd	Masculino	39	1,65	0,81	0,49	3,66	0,93	0,23
65	SDcd	Feminino	40	9,12	0,58	0,06	1,02	0,37	1,16
66	SDsd	Masculino	40	-	-	-	0,53	2,95	0,36
67	SDcd	Feminino	40	3,15	3,29	1,04	0,45	0,01	0,12
68	SDsd	Feminino	41	2,74	1,97	0,72	1,13	0,27	0,16
69	SDsd	Masculino	41	2,32	1,39	0,60	0,51	0,27	0,06
70	SDsd	Masculino	41	3,68	1,49	0,40	2,85	0,07	0,00
71	SDsd	Masculino	41	3,99	2,1	0,53	0,68	1,17	
72	SDsd	Masculino	42	0,74	2,09	2,82	0,38	0,51	0,10
73	SDcd	Masculino	42	4,48	2,87	0,64	1,18	0,01	0,00
74	SDcd	Masculino	43	3,05	1,26	0,42	0,90	0,07	0,84
75	SDcd	Masculino	43	1,75	0,39	0,22	2,81	0,05	0,02
76	SDsd	Masculino	43	2,98	1,00	0,34	0,64	1,28	0,09
77	SDsd	Feminino	43	15,77	21,55	1,37	0,23	0,54	0,12
78	SDsd	Masculino	43	1,27	7,68	6,03	0,19	-	-
79	SDcd	Feminino	44	3,02	1,72	0,57	0,49	0,08	0,12
80	-	Feminino	44	7,80	15,52	1,99	0,20	0,20	0,12
81	SDsd	Feminino	45	5,06	38,9	7,69	0,29	-	0,36
82	-	Masculino	45	6,02	2,89	0,48	0,06	-	-
83	-	Feminino	45	78,71	3,68	0,05	0,05	0,78	-
84	SDsd	Masculino	46	1,56	7,34	4,71	0,15	0,84	-
85	SDcd	Feminino	47	2,48	0,57	0,23	1,02	0,20	0,20
86	SDcd	Masculino	48	2,03	1,38	0,68	2,47	1,72	0,14
87	SDsd	Masculino	48	-	-	-	-	-	-
88	SDsd	Masculino	49	1,05	0,98	0,94	0,05	-	0,01
89	SDcd	Feminino	49	3,42	2,09	0,61	2,11	0,09	0,29
90	SDcd	Masculino	49	1,86	0,86	0,46	0,77	0,26	0,14
91	SDcd	Feminino	49	5,04	0,69	0,14	0,29	0,03	0,46
92	SDsd	Masculino	51	3,60	1,07	0,30	3,80	0,20	0,66

**Tabela 1.** Valores densitométricos referentes ao grupo experimental do estudo (conclusão).

Grupo SD	Gênero	Idade	Valores Densitométricos						
			rAPP	APP130	APP110	ADAM10	BACE1	PSEN1	
93	SDcd	Masculino	51	1,89	1,63	0,87	2,50	0,13	0,65
94	SDcd	Masculino	51	0,89	0,70	0,78	0,83	0,66	0,04
95	SDcd	Masculino	51	7,52	1,07	0,14	0,21	0,03	0,39
96	SDsd	Feminino	51	8,21	37,33	4,54	0,53	0,10	0,03
97	SDsd	Masculino	51	-	-	-	0,39	0,11	0,03
98	SDsd	Masculino	52	23,27	1,80	0,08	0,66	0,31	0,19
99	SDcd	Masculino	52	2,08	0,55	0,27	3,55	0,23	1,18
100	SDcd	Feminino	52	7,11	0,54	0,08	0,36	0,34	0,49
101	-	Feminino	52	-	-	-	-	-	-
102	SDcd	Feminino	53	15,45	0,22	0,01	0,40	0,43	-
103	SDsd	Feminino	54	4,12	0,72	0,18	0,76	0,07	0,12
104	SDcd	Feminino	55	5,03	0,61	0,12	0,13	0,42	-
105	SDsd	Feminino	57	0,75	8,84	11,76	0,73	0,96	0,02
106	SDsd	Feminino	57	4,90	0,54	0,11	1,39	0,03	0,12
107	SDcd	Feminino	57	12,9	7,33	0,57	0,16	0,95	-
108	-	Feminino	59	12,03	21,31	1,77	0,34	1	-
109	SDcd	Masculino	61	1,28	0,44	0,34	0,23	0,38	-
110	SDcd	Masculino	62	1,77	0,34	0,19	0,18	1,92	0,14
111	-	Feminino	62	2,61	7,97	3,05	0,18	0,55	-
112	SDsd	Masculino	-	-	-	-	-	-	-

**Tabela 2.** Valores densitométricos referentes ao grupo comparativo do estudo (continua).

Grupo Comparativo	Gênero	Idade	Valores Densitométricos						
			rAPP	APP130	APP110	ADAM10	BACE1	PSEN1	
113	Controle	Feminino	19	1,19	0,25	0,21	0,03	0,22	0,12
114	Controle	Masculino	21	1,87	0,94	0,50	0,49	0,03	0,22
115	Controle	Feminino	22	2,71	0,75	0,28	2,88	0,23	0,11
116	Controle	Masculino	24	3,06	1,07	0,35	0,24	0,10	0,10
117	Controle	Masculino	24	3,13	0,71	0,23	0,31	0,28	0,10
118	Controle	Feminino	25	3,64	5,61	1,54	0,32	0,04	0,22
119	Controle	Feminino	25	1,46	1,91	1,31	1,26	0,38	0,54
120	Controle	Feminino	26	1,44	3,12	2,17	0,71	0,06	1,75
121	Controle	Feminino	26	3,27	1,03	0,31	0,37	0,13	0,22

**Tabela 2.** Valores densitométricos referentes ao grupo comparativo do estudo (continuação).

Grupo Comparativo	Gênero	Idade	Valores Densitométricos						
			rAPP	APP130	APP110	ADAM10	BACE1	PSEN1	
122	Controle	Feminino	26	1,45	0,45	0,31	0,57	0,25	0,18
123	Controle	Masculino	29	0,76	0,76	1,00	0,40	5,72	0,55
124	Controle	Feminino	29	0,89	1,94	2,17	0,09	0,07	0,11
125	Controle	Feminino	33	1,75	4,34	2,48	0,41	0,21	-
126	Controle	Masculino	35	6,13	0,28	0,04	0,22	1,69	0,52
127	Controle	Masculino	36	1,24	0,63	0,51	1,24	1,84	0,24
128	Controle	Feminino	37	2,35	1,22	0,52	1,33	0,95	0,24
129	Controle	Masculino	40	2,47	1,06	0,43	0,33	0,78	0,42
130	Controle	Feminino	41	1,92	0,57	0,30	0,90	0,27	0,27
131	Controle	Masculino	42	3,66	2,71	0,74	0,41	0,61	0,55
132	Controle	Feminino	50	1,37	2,90	2,12	0,30	0,11	0,30
133	Controle	Feminino	51	3,76	0,85	0,23	0,56	0,46	-
134	Controle	Masculino	51	9,40	0,68	0,07	2,44	0,14	0,06
135	Controle	Feminino	52	-	-	-	0,30	0,13	0,49
136	Controle	Masculino	52	1,69	0,71	0,42	0,96	0,80	0,25
137	Controle	Feminino	52	41,44	3,29	0,08	4,05	0,07	0,01
138	Controle	Masculino	55	-	-	-	0,53	0,30	0,15
139	Controle	Masculino	57	4,11	1,34	0,33	1,00	0,26	0,08
140	Controle	Feminino	59	1,64	1,74	1,06	0,71	0,06	-
141	DA	Feminino	61	1,52	0,88	0,53	0,62	0,96	1,39
142	Controle	Masculino	62	4,14	2,48	0,6	2,23	0,78	0,89
143	Controle	Feminino	62	4,26	5,52	1,29	0,18	0,03	1,75
144	Controle	Feminino	62	3,68	1,07	0,35	0,27	0,63	0,40
145	Controle	Masculino	62	6,00	1,01	0,17	0,03	3,20	0,12
146	Controle	Masculino	63	2,13	0,30	0,14	0,03	2,47	0,33
147	Controle	Feminino	63	1,41	0,17	0,12	0,40	0,59	0,02
148	Controle	Feminino	65	2,58	2,99	1,15	1,25	1,26	1,62
149	Controle	Feminino	65	1,45	1,31	0,9	0,58	0,54	0,61
150	Controle	Feminino	65	4,67	1,4	0,35	2,65	0,46	2,11
151	DA	Feminino	65	0,57	0,96	1,73	0,45	1,29	0,78
152	Controle	Masculino	65	1,65	1,1	0,7	2,39	0,93	1,95
153	DA	Feminino	65	1,5	1,32	0,86	0,16	1,06	1,51
154	Controle	Feminino	65	8,66	9,39	1,08	0,12	0,07	0,44
155	Controle	Feminino	66	1,57	0,92	0,58	2,03	1	1,93
156	Controle	Feminino	66	1,82	1,76	0,96	0,73	1,81	0,44
157	Controle	Feminino	66	3,34	1,47	0,49	1,11	1,63	1,48
158	Controle	Masculino	66	1,89	2,4	1,26	0,9	0,84	0,84

**Tabela 2.** Valores densitométricos referentes ao grupo comparativo do estudo (continuação).

Grupo Comparativo	Gênero	Idade	Valores Densitométricos						
			rAPP	APP130	APP110	ADAM10	BACE1	PSEN1	
159	Controle	Feminino	66	-	-	-	0,08	-	0,23
160	Controle	Feminino	67	2,16	1,23	0,57	0,44	1,27	0,54
161	DA	Masculino	67	1,21	2,34	1,98	0,83	1,9	1,14
162	DA	Feminino	67	1,18	0,85	0,72	0,89	0,81	0,9
163	Controle	Masculino	67	4,13	2,00	0,48	0,46	0,10	0,19
164	Controle	Masculino	68	2,22	2,67	1,21	1,51	2,15	2,57
165	DA	Feminino	68	1,64	1,5	0,92	0,08	0,67	0,93
166	DA	Feminino	69	0,94	0,78	0,96	1,71	1,6	1,05
167	Controle	Feminino	69	3,02	1,83	0,6	0,88	0,54	2,29
168	DA	Feminino	69	2,38	2,21	0,92	0,15	2,17	1,31
169	DA	Feminino	69	0,73	0,82	1,1	1,24	0,83	0,6
170	Controle	Feminino	70	1,05	1,18	1,13	1,33	1,32	1,17
171	Controle	Feminino	70	-	-	-	0,15	0,25	0,09
172	DA	Feminino	71	1,29	1,67	1,3	0,37	3,79	0,91
173	Controle	Feminino	71	1,28	2,62	2,06	1,96	1,54	1,26
174	Controle	Masculino	71	1,90	2,24	1,18	0,60	0,73	0,23
175	Controle	Masculino	72	1,23	1,33	1,13	1,71	0,54	2,59
176	Controle	Feminino	72	2,34	1,44	0,68	1,99	1,16	1,15
177	DA	Feminino	72	0,49	1,35	2,74	0,79	0,3	0,4
178	Controle	Feminino	72	2,42	2,25	0,91	1,28	1,07	1,04
179	Controle	Feminino	72	1,25	1,44	1,15	2,26	0,67	1,87
180	Controle	Feminino	73	2,09	1,75	0,71	1,2	1	2,41
181	Controle	Feminino	73	1,5	1,72	1,38	1,1	2,11	1,24
182	Controle	Feminino	73	2,74	1,52	0,56	2,39	4,22	1,1
183	Controle	Feminino	73	1,12	1,35	1,22	1,38	1,13	0,97
184	DA	Masculino	73	0,82	0,87	1,09	0,92	0,65	0,48
185	Controle	Feminino	73	1,47	7,75	5,25	0,56	0,46	0,40
186	Controle	Feminino	74	1,68	1,33	0,79	3,13	0,97	2,65
187	DA	Feminino	74	1,16	1,6	1,38	0,93	2,43	1,09
188	Controle	Masculino	74	1,61	2,63	1,69	1,51	1,31	1,07
189	Controle	Masculino	74	1,26	1,12	0,88	2,14	0,67	2,2
190	Controle	Feminino	74	1,78	1,17	0,65	0,96	0,87	0,87
191	DA	Feminino	74	3,09	0,71	0,4	1,19	3,05	2,06
192	DA	Masculino	75	0,72	1,78	2,47	0,68	1,22	0,69
193	Controle	Feminino	75	3,01	1,66	0,55	1,13	1,11	0,59
194	Controle	Feminino	76	0,77	0,5	0,65	1,42	0,77	1,28
195	DA	Feminino	76	1,3	1,2	0,88	0,77	1,43	0,87

**Tabela 2.** Valores densitométricos referentes ao grupo comparativo do estudo (conclusão).

	Grupo Comparativo	Gênero	Idade	Valores Densitométricos					
				rAPP	APP130	APP110	ADAM10	BACE1	PSEN1
<b>196</b>	Controle	Feminino	76	4,39	2,41	0,55	1,29	1,08	1,32
<b>197</b>	DA	Feminino	76	0,79	1,5	1,76	0,76	1,23	1,03
<b>198</b>	DA	Masculino	76	1,18	1,05	0,82	0,18	1,04	1,86
<b>199</b>	DA	Feminino	77	1,43	1,38	0,95	0,12	1,29	0,79
<b>200</b>	Controle	Masculino	79	2,35	1,61	0,68	1,04	1,26	1,24
<b>201</b>	DA	Feminino	80	1,2	2,29	1,78	1,24	0,87	2,21
<b>202</b>	Controle	Masculino	80	1,36	0,97	0,7	1,18	1,07	1,21
<b>203</b>	Controle	Feminino	82	2,34	1,73	0,73	2,8	1,08	1,38
<b>204</b>	Controle	Feminino	82	1,77	1,53	0,87	2,84	1,12	2,85
<b>205</b>	Controle	Feminino	82	3,16	1,58	0,5	1,56	1,5	2,7
<b>206</b>	Controle	Feminino	82	2,23	1,78	0,79	1,34	0,66	1,57
<b>207</b>	Controle	Feminino	82	2,5	1,22	0,51	2,1	0,97	1,98
<b>208</b>	DA	Masculino	82	1,48	1,47	1	0,89	0,74	0,38
<b>209</b>	Controle	Feminino	86	1,87	1,71	0,92	1,81	0,78	1,49
<b>210</b>	DA	Masculino	87	1,32	1,28	0,97	0,43	2,63	1,09
<b>211</b>	DA	Feminino	89	1,23	0,88	0,71	0,04	0,44	0,57

### APÊNDICE C – Concentrações plasmáticas de A $\beta$

Abaixo encontram-se as concentrações plasmáticas dos peptídeos A $\beta$ <sub>40</sub> e A $\beta$ <sub>42</sub> (pg/mL), bem como a razão A $\beta$ <sub>42</sub> / A $\beta$ <sub>40</sub>, entre os grupos experimental (tabela 1) e comparativo (tabela 2).

**Tabela 1.** Concentrações plasmáticas de A $\beta$  referentes ao grupo experimental (continua).

	Grupos	Idade	Gênero	A $\beta$ <sub>42</sub> / A $\beta$ <sub>40</sub>	pg/mL	
					A $\beta$ <sub>40</sub>	A $\beta$ <sub>42</sub>
4	SDcd	Feminino	21	0,49	14,29	6,98
10	SDcd	Masculino	23	0,41	21,00	8,55
11	SDsd	Masculino	23	0,21	14,57	3,05
12	SDsd	Masculino	23	0,37	12,62	4,72
15	SDsd	Masculino	24	0,47	14,21	6,73
16	SDsd	Masculino	25	0,50	12,06	6,05
20	SDsd	Feminino	27	0,40	12,96	5,24
22	SDsd	Masculino	27	1,19	19,32	22,90
29	SDsd	Feminino	29	0,58	21,00	12,15
37	SDsd	Masculino	31	0,42	16,52	6,98
40	SDsd	Feminino	33	0,38	15,76	6,05
42	SDsd	Feminino	33	0,53	11,51	6,05
43	SDsd	Masculino	33	0,74	19,77	14,57
45	SDsd	Feminino	34	0,49	18,54	9,16
46	SDcd	Feminino	34	0,84	41,76	35,22
47	SDsd	Masculino	34	0,33	13,90	4,56
54	SDcd	Masculino	37	0,39	10,67	4,13
55	SDsd	Feminino	37	0,38	19,77	7,48
56	SDsd	Feminino	37	0,55	16,69	9,16
64	SDcd	Masculino	39	0,33	23,73	7,87
66	SDsd	Masculino	40	0,54	15,41	8,27
67	SDcd	Feminino	40	0,35	14,83	5,24
69	SDsd	Masculino	41	0,39	12,06	4,72
72	SDsd	Masculino	42	0,55	15,45	8,55



**Tabela 1.** Concentrações plasmáticas de A $\beta$  referentes ao grupo experimeta (conclusão).

Grupos	Idade	Gênero	A $\beta_{42}$ / A $\beta_{40}$	pg/mL		
				A $\beta_{40}$	A $\beta_{42}$	
74	SDcd	Masculino	43	0,59	14,01	8,27
75	SDcd	Masculino	43	1,46	15,45	22,50
76	SDsd	Masculino	43	0,34	13,73	4,72
77	SDsd	Feminino	43	0,57	17,93	10,17
79	SDcd	Feminino	44	0,61	11,51	6,98
85	SDcd	Feminino	47	0,37	13,73	5,06
86	SDcd	Masculino	48	0,60	17,00	10,17
90	SDcd	Masculino	49	0,66	12,62	8,27
91	SDcd	Feminino	49	0,45	18,85	8,55
92	SDsd	Masculino	51	0,49	18,76	9,16
93	SDcd	Masculino	51	0,52	17,64	9,16
94	SDcd	Masculino	51	0,27	16,69	4,56
95	SDcd	Masculino	51	0,33	18,20	6,05
96	SDsd	Feminino	51	0,53	14,21	7,48
97	SDsd	Masculino	51	0,32	13,73	4,41
99	SDcd	Masculino	52	0,38	20,16	7,74
100	SDcd	Feminino	52	0,22	12,62	2,73
102	SDcd	Feminino	53	0,49	18,54	9,16
103	SDsd	Feminino	54	0,66	15,96	10,53
104	SDcd	Feminino	55	0,43	337,61	145,68
106	SDsd	Feminino	57	0,41	18,23	7,48
109	SDcd	Masculino	61	0,38	19,46	7,48

**Tabela 2.** Concentrações plasmáticas de A $\beta$  referentes ao grupo comparativo (continua).

Grupo Comparativo	Idade	Gênero	A $\beta_{42}$ / A $\beta_{40}$	pg/mL		
				A $\beta_{40}$	A $\beta_{42}$	
113	Controle	Feminino	19	0,48	9,84	4,72
114	Controle	Masculino	21	0,43	12,62	5,43
115	Controle	Feminino	22	0,85	14,29	12,15
116	Controle	Masculino	24	0,71	9,84	6,98
117	Controle	Masculino	24	0,51	9,84	5,06

**Tabela 2.** Concentrações plasmáticas de A $\beta$  referentes ao grupo comparativo (conclusão).

Grupo Comparativo	Idade	Gênero	A $\beta_{42}$ / A $\beta_{40}$	pg/mL		
				A $\beta_{40}$	A $\beta_{42}$	
118	Controle	Feminino	25	0,61	9,84	6,05
119	Controle	Feminino	25	0,59	10,95	6,50
120	Controle	Feminino	26	0,48	17,08	8,27
121	Controle	Feminino	26	0,70	17,92	12,60
122	Controle	Feminino	26	0,45	12,06	5,43
123	Controle	Masculino	29	0,50	12,02	6,05
124	Controle	Feminino	29	0,30	17,31	5,24
125	Controle	Feminino	33	0,30	15,14	4,56
126	Controle	Masculino	35	0,87	13,90	12,15
127	Controle	Masculino	36	0,53	14,21	7,48
128	Controle	Feminino	37	0,50	10,45	5,24
129	Controle	Masculino	40	1,70	14,21	24,14
130	Controle	Feminino	41	1,31	21,00	27,50
131	Controle	Masculino	42	0,67	11,71	7,87
132	Controle	Feminino	50	0,56	13,73	7,74
133	Controle	Feminino	51	0,50	10,12	5,06
134	Controle	Masculino	51	0,43	10,95	4,72
135	Controle	Feminino	52	0,45	9,84	4,41
136	Controle	Masculino	52	0,82	12,34	10,17
138	Controle	Masculino	55	0,98	11,51	11,31
139	Controle	Masculino	57	0,39	12,06	4,72
140	Controle	Feminino	59	0,58	12,96	7,48
142	Controle	Masculino	62	0,53	19,16	10,17
144	Controle	Feminino	62	0,92	11,08	10,17
146	Controle	Masculino	63	0,55	11,08	6,05

## APÊNDICE D – Publicações durante o desenvolvimento do doutorado

**Artigo científico: de França Bram JM, Talib LL, Joaquim HPG, Carvalho CL, Gattaz WF, Forlenza OV. Alzheimer's Disease-related Biomarkers in Aging Adults with Down Syndrome: Systematic Review. Current Psychiatry Research and Reviews 2019;15:49–57. DOI:10.2174/1573400515666190122152855**

Send Orders for Print-Reprints and e-prints to [reprints@benthamscience.net](mailto:reprints@benthamscience.net)

Current Psychiatry Reviews, 2019, 15, 1-9

1

### REVIEW ARTICLE

## Alzheimer's Disease-related Biomarkers in Aging Adults with Down Syndrome: Systematic Review

Jessyka Maria de França Bram<sup>1</sup>, Leda Leme Talib<sup>1</sup>, Helena Passarelli Giroud Joaquim<sup>1</sup>, Cláudia Lopes Carvalho<sup>1,2</sup>, Wagner Farid Gattaz<sup>1</sup> and Orestes Vicente Forlenza<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Neurociências (LIM-27), Departamento e Instituto de Psiquiatria, Hospital das Clínicas HCFMUSP, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil; <sup>2</sup>Associação de Pais e Amigos dos Excepcionais (APAE-SP), São Paulo

**Abstract: Background:** Down syndrome (DS) is associated with a high prevalence of cognitive impairment and dementia in middle age and older adults. Given the presence of common neuropathological findings and similar pathogenic mechanisms, dementia in DS is regarded as a form of genetically determined, early-onset AD. The clinical characterization of cognitive decline in persons with DS is a difficult task, due to the presence intellectual disability and pre-existing cognitive impairment. Subtle changes that occur at early stages of the dementing process may not be perceived clinically, given that most cognitive screening tests are not sensitive enough to detect them. Therefore, biological markers will provide support to the diagnosis of DS-related cognitive impairment and dementia, particularly at early stages of this process.

### ARTICLE HISTORY

Received: October 02, 2018  
Revised: December 18, 2018  
Accepted: December 19, 2018

DOI:  
10.2174/1573400515666190122152855

**Objective:** To perform a systematic review of the literature on AD-related biomarkers in DS.

**Method:** We searched PubMed, Web of Science and Cochrane Library for scientific papers published between 2008 and 2018 using as primary mesh terms 'Down', 'Alzheimer', 'biomarker'.

**Results:** 79 studies were retrieved, and 39 were considered eligible for inclusion in the systematic review: 14 *post-mortem* studies, 10 neuroimaging, 4 addressing cerebrospinal fluid biomarkers, and 11 on peripheral markers.

**Conclusion:** There is consistent growth in the number of publication in this field over the past years. Studies in DS-related dementia tend to incorporate many of the diagnostic technologies that have been more extensively studied and validated in AD. In many instances, the study of CNS and peripheral biomarkers reinforces the presence of AD pathology in DS.

**Keywords:** Down syndrome (DS), Alzheimer's disease (AD), aging, biomarkers, amyloid-beta (A $\beta$ ), amyloid precursor protein (APP).

### 1. INTRODUCTION

There is a high prevalence of dementia among aging individuals with Down syndrome (DS) [1, 2]. The World Health Organization (WHO) estimates that 70% of people with DS will present with dementia in late-life; higher numbers are expected as a consequence of the increasing life expectancy of people with DS [3]. From the early 1980's to the present time, the life expectancy of individuals with DS has risen from 25-30 to >60 years of age. Nowadays, up to 80% of individuals with DS will reach the sixth decade of

life [3], and there is a growing number of septuagenarians in some countries [4]. Cognitive decline in DS has onset in late adulthood, usually by the fourth and fifth decades of life. Dementia in DS is thought to be a variant form of Alzheimer's disease (AD), given the presence of core pathological markers of AD in the brain of demented older adults with DS [5]. Similarly to AD, the prevalence of dementia in DS also increases with population ageing: 10-25% among people with 40-50 years of age; 20-50% among those with 50-60; and 60-75% among those aged 60 years and older [6-11].

There is also evidence of premature aging in people with DS, and for this reason DS can be considered a progeroid syndrome [12, 13]. This process is illustrated by physical changes (for example, bleaching and hair loss, skin wrinkling), functional decline (presbycusis, cataract, sarcopenia, osteopenia, early menopause) and histological characteristics

\*Address correspondence to this author at the Laboratório de Neurociências (LIM-27), Instituto de Psiquiatria, Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP, Rua Doutor Ovidio Pires de Campos 785, 05403-010, São Paulo, SP, Brasil; Tel: +55 11 2661 7283; Fax: +55 11 2661 7535; E-mail: [forlenza@usp.br](mailto:forlenza@usp.br)

(lipofuscin granules in cardiac, nerve, cutaneous and retinal cells), in addition the increased incidence of autoimmune disorders, cancer, vascular disease and dementia [11]. Oxidative stress is regarded as an important underlying factor in aging-related phenotypes in DS [13, 14].

Trisomy of chromosome 21 is related with both premature aging and AD pathology. The extra copy of this chromosome leads to the over-expression and/or abnormal function of at least two relevant genes located on it: amyloid precursor protein (*APP*) [15] and superoxide dismutase-1 (*SOD-1*) [15]. The overexpression of the *APP* gene causes abnormalities in the regulation of *APP* metabolism, leading to the overproduction of the amyloid-beta peptide ( $A\beta$ ) and subsequent effects on the amyloid cascade [13]. Superoxide dismutase [Cu-Zn], also known as *SOD-1*, is centrally involved in the regulation of oxidative stress [16, 17]; thereby, abnormal expression/function of *SOD-1* leading to the chronic and excessive formation of reactive oxygen species affects DNA integrity, impairs mitochondrial function, and deregulates apoptosis [18-20]. These mechanisms are critical to brain homeostasis and have been implicated in premature ageing in DS [13, 14]. Indeed, studies conducted by Jenkins *et al.* indicated an association between shorter telomeres and cognitive impairment or dementia in DS [21-23]. Therefore, the early onset of dementia in DS is presumably not only due to the greater magnitude of the amyloid burden, but also to multiple factors that accelerate the aging process due to chronically increased oxidative stress. Given the well-established pathological similarities, dementia in DS is believed to be a form of genetically-determined, early-onset AD (24). Pathological studies indicate that the overproduction of  $A\beta$  is observed in the DS brain since the age of 35-40 years [25]. The accumulation of  $A\beta$  triggers the amyloid cascade, a sequence of neurotoxic events that ultimately leads to the formation of senile plaques and neurofibrillary tangles [6, 8, 26-28], pathological hallmarks of AD.

The clinical diagnosis of dementia in DS is a complex decision. The first challenge is the variability of cognitive test scores depending on the degree of intellectual disability and the achievements of the person with DS through education, stimulation and development of skills. Upon a cross-sectional assessment, it may be impossible to differentiate non-demented DS subjects with lower IQ from cognitively impaired subjects with higher intellectual/functional capacity, for these two groups of DS subjects may obtain similar overall scores on cognitive screening tests. Better diagnostic perspectives will be achieved upon longitudinal reassessment, in which case the characterization of *change* (rather than *state*) will reflect better the onset of subtle cognitive and functional deficits [29, 30]. Secondly, there is a critical paucity of diagnostic tools and guidelines that have been specifically developed to address this problem [31]. Compared to AD, the characterization of cognitive and behavioural symptoms in persons with DS lacks the support of well-established neuropsychological and neuroimaging patterns and diagnostic guidelines. Therefore, the search for surrogate markers of the pathological process of dementia in DS is justified by the need of subsidiary tools to support the diagnosis and prediction of dementia – as extensively reported in the research of AD biomarkers in the past decades [32-36]. The objective of the present study is to review and summa-

rize the available literature about the use of AD-related biomarkers to support the diagnosis of dementia in DS.

## 2. METHODS

In preparation for the present work, we performed a comprehensive, electronic search of medical literature addressing PubMed, Web of Science and Cochrane Library databases. We searched for scientific papers published between 2008 and 2018, using as key words: [Down] AND [Alzheimer] AND [(bio)marker]. A broader, additional search was conducted using as mesh terms [Down] AND [Alzheimer] AND diagnosis], filtering out clinical studies not based on diagnostic biomarkers. This procedure was repeated in September 2018, prior to the finalization of the manuscript, in order to include papers published on this subject until the submission of the present work. We further performed hand-searches of references cited in eligible studies to identify additional contributions. Inclusion criteria were: (1) prospective or retrospective study reported in a peer-reviewed publication; (2) use of biomarkers (all subtypes) for the diagnostic support of dementia in DS, diagnosed by clinical judgement or formal diagnostic criteria (e.g., DSM-IV); (3) correlation studies using clinical and biological markers. Full papers, short reports and letters to editors published in scientific journals, in addition to published abstracts relative to communications in scientific meetings were taken into account. No restrictions were imposed regarding language or country of publication. Assessment of eligibility was preliminary based on the analysis of title and abstract of selected papers, followed by full-text screening when available. We excluded papers published in duplication, case studies or case series with less than 4 patients, and animal studies. Publications were grouped according to two major types of biomarker studies, *i.e.*, cerebral and humoral markers. The former group included (i) pathological studies of *post-mortem* brain and (ii) neuroimaging studies, *i.e.*, magnetic resonance imaging (MRI); positron-emission tomography (PET); molecular imaging (amyloid-PET); and the latter group included (iii) studies on cerebrospinal fluid (CSF) and (iv) peripheral (blood-based) biomarkers.

## 3. RESULTS

A total of 79 studies addressing AD-related biomarkers in DS were retrieved using the aforementioned search procedures, and 49 were rejected according to exclusion criteria. The 30 studies that were considered eligible for inclusion in the present systematic review were subdivided into four categories: Pathological (*post-mortem*) studies (n=6); neuroimaging studies (n'=9); studies addressing cerebrospinal fluid biomarkers (n''=4); and studies on peripheral markers (n'''=11) (Table 1).

### 3.1. Post Mortem Studies

Downes *et al.* conducted a pathological study of the aging DS brain, addressing the expression of two synaptic proteins, synaptophysin (SYN) and synaptosomal-associated protein 25-kDa (SNAP-25), in six different areas [37]. As compared to cognitively unimpaired subjects, demented DS

Table 1. Studies addressing AD-related biomarkers in DS.

Type of Study	Quantity of Study	Subjects	Method	Biomarkers	Refs.
Pathological (post mortem)	6 studies	25 DS; 25 controls	Immunohistochemistry; Western blot	↑ SYN expression in DS	Arsi <i>et al.</i> (2002)
		10 elderly DS; 9 elderly controls	Immunohistochemistry; Immunostaining	↓ SYN expression in DS ↓ SNAP-25 expression in DS	Downes <i>et al.</i> (2007)
		29 DS; 26 controls	ELISA; Kits for activity assays	↑ soluble A $\beta$ levels in DS ↓ NEP protein concentration and activity in DS NEP and BACE-1 correlated with the level of insoluble A $\beta$ ↑ ACE concentration in DS	Miners <i>et al.</i> (2011)
		41 DS; 29 controls	ELISA; Slot-blot	↑ A $\beta$ 40 and A $\beta$ 42 expression in older DS ↑ HNE-bound proteins expression in DS	Conini <i>et al.</i> (2012)
		13 YC; 15 OC; 8 DS; 31 DSAD; 7 AD	Western blot; ELISA	↓ SYN expression in DSAD and AD ↓ SYNJ1 expression in AD	Martin <i>et al.</i> (2014)
		6 YC; 6 OC; 6 DS; 6 DSAD	Two-dimensional electrophoresis; Nano LC-Mass spectrometry	↓ Rab-3A, GNB1, APO E, TER, ATPase, PLP phosphatase and $\alpha$ -enolase levels in DS vs. YC ↑ MDH2 levels in DS vs. YC ↓ Rho GDI1, DRP-2 and PEA15 levels in DSAD vs. OC ↑ EF-7a, PRDX3 and $\alpha$ -enolase levels in DS vs. DSAD	Conini <i>et al.</i> (2014)
Neuroimaging	10 studies	19 DS; 11 controls	PET; MRI	↑ GMR in DS ↓ GM in DS parahippocampus/hippocampus, thalamus, caudate, and frontal lobe	Haier <i>et al.</i> (2008)
		19 DS; 10 AD; 10 controls	PET	↑ [18F]FDDNP binding values in all DS' brain regions ↑ [18F]FDDNP binding values in DS parietal and frontal regions vs. AD	Nelson <i>et al.</i> (2011)
		4 DS; 5 DSAD; 14 controls	[(11)C]PiB PET	BP <sub>ND</sub> close to zero in all ROIs in controls younger than 60 years ↑ BP <sub>ND</sub> in controls older than 60 years PiB binding in DS 45 years and older in all ROIs except the hippocampus	Landt <i>et al.</i> (2011)
		1 DADS	Florbetapir PET; Immunohistochemistry	Similar pattern of cortical fibrillar amyloid burden between DS and late-onset AD	Sabbagh <i>et al.</i> (2011)
		7 DS	MRI; PiB PET	↑ PiB retention in only two of the seven DS subjects (age: 38 and 44 years)	Handen <i>et al.</i> (2012)
		39 DS	[(18)F]florbetaben PET	↑ brain $\beta$ -amyloid binding with age in DS	Jennings <i>et al.</i> (2015)
		12 DS	MRI; [(18)F]florbetaben PET; FDG PET	↑ hippocampal atrophy with amyloid load Inverse relationship between amyloid load and regional glucose metabolism	Rafii <i>et al.</i> (2015)
		12 DS; 5 DSAD; 9 controls	MRI; [(18)F]florbetaben PET; [18F]FDG PET	↑ DSAD SUVRs for florbetapir ↓ DSAD posterior cingulate rCMRgl ↓ DSAD hippocampal volume	Sabbagh <i>et al.</i> (2015)
Cerebrospinal fluid biomarkers	4 studies	12 DS; 20 controls	ELISA; in-house RIA	↑ A $\beta$ X-40, sAPP $\alpha$ and sAPP $\beta$ expression in DS ↓ Orexin-A expression with age in DS ↑ T-tau and YKL-40 with age in DS	Portelius, Soiminen <i>et al.</i> (2014)
		12 DS; 20 controls	Mass spectrometry; ELISA	↓ A $\beta$ 1-42, APL1b25, APL1b27 and APL1b28 expression in DS ↑ A $\beta$ 1-28 expression in DS	Portelius, Holttä <i>et al.</i> (2014)

(Table 1) cont....

Type of Study	Quantity of Study	Subjects	Method	Biomarkers	Refs.
Cerebrospinal fluid biomarkers	4 studies	10DS; 10 DSAD; 14 ADAD; 13 SAD; 12 MCI; 29 YC; 17 OC	Co-immunoprecipitation; Western blot	↑ PSEN1 expression in DS, ADAD, SAD and MCI	Sogorb-Esteva et al. (2016)
		7 DSAD; 7 ADAD; 20 SAD; 34 controls	Immunoprecipitation; Western blot; ELISA	↑ APP-CTF expression in ADAD, SAD and DSAD	García-Ayllón et al. (2017)
Peripheral markers	11 studies	119 DS; 60 DSAD	ELISA; TaqMan SNP Genotyping Assays	↑ TC levels in DSAD with $\epsilon 4$ vs. $\epsilon 2$ Weak negative correlation between TC levels and $A\beta_{40}$ expression	Prather et al. (2008)
		39 DS; 21 DSAD	ELISA; PCR	No differences in $A\beta_{40}$ , $A\beta_{42}$ and $APOE \epsilon 4$ levels was found between groups	Jones et al. (2009)
		24 DS; 18 controls	ELISA; PCR	↑ sAPP $\alpha$ and $A\beta_{1-42}$ levels in DS $A\beta_{1-42}$ levels were inversely correlated with age in DS	Conti et al. (2010)
		83 DS; 46 dDS	ELISA; TaqMan SNP Genotyping Assays	↓ $A\beta_{1-40}$ levels in dDS ↑ ratio of $A\beta_{1-42}/A\beta_{1-40}$ in dDS with more than 4 years duration of dementia	Prather et al. (2010)
		26 DS; 32 DSAD	PCR-RFLP; ELISA	↑ $A\beta$ expression in DS ↓ $A\beta$ expression in AD ↑ $APOE \epsilon 4$ allele representation in DSAD	Head et al. (2011)
		35 DS; 16 dDS; 62 AD; 78 controls	IMR	↑ $A\beta_{40}$ and tau levels in DS ↓ $A\beta_{42}$ levels and $A\beta_{42}/A\beta_{40}$ ratio in DS ↓ $A\beta_{40}$ in dDS vs. DS ↑ $A\beta_{42}$ levels and $A\beta_{42}/40$ ratios in dDS vs. DS	Lee et al. (2016)
		31 DS; 31 controls	Zymography; ELISA; Multi-Spot/MMP3-Plax Ultra-Sensitive kit; Multi-Spot V-PLEX Pro-inflammatory Panel	↑ $A\beta_{40}$ and $A\beta_{42}$ in DS plasma ↑ ProNGF, MMP-1, MMP-3, MMP-9 activity, TNF- $\alpha$ , IL-6, and IL-10 in DS	Julita et al. (2016)
		47 DS; 37 controls	ELISA	↑ Neuronal exosome levels of $A\beta_{1-42}$ , P-T181-tau, and P-S396-tau in DS	Hamlett et al. (2017)
		21 DS; 22 controls	Ultrasecitive immunoassay; Human Total Tau kit	↑ tau levels in DS	Kasai et al. (2017)
		20 DS; 20 AD; 37 controls	Ultrasecitive immunoassay; ELISA	↑ p-tau181 in DS and AD Positive correlation between p-tau181 and age in DS	Tanabe et al. (2017)
		76 DS; 18 dDS	Simoa NF-L® assays	↑ NF-L concentrations with age in DS	Strydom et al. (2018)

Abbreviations: Down syndrome (DS); Alzheimer's disease (AD); young controls (YC); old controls (OC); Down syndrome with Alzheimer disease neuropathology (DSAD); demented Down syndrome (dDS); autosomal dominant Alzheimer's disease (ADAD); sporadic Alzheimer's disease (SAD); mild-cognitive impaired (MCI); Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA); liquid chromatography mass (LC-mass); immunomagnetic reduction (IMR); positron emission tomography (PET); magnetic resonance imaging (MRI); Pittsburgh compound B (PiB); fluorodeoxyglucose (FDG); radioimmunoassay (RIA); Single Nucleotide Polymorphism (SNP); Polymerase Chain Reaction (PCR); Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP); neurofilament light (NF-L); Synaptophysin (SYN); synaptosomal-associated protein 25 (SNAP-25); amyloid-beta peptide ( $A\beta$ ); neprilysin (NEP); beta-site APP-cleaving enzyme 1 (BACE-1); angiotensin-converting enzyme (ACE); 4-hydroxy-2-trans-nonenal (HNE); synaptotagmin-1 (SYN1); Guanine nucleotide-binding protein (GNB1); apolipoprotein E (APO E); transitional endoplasmic reticulum ATPase (TER ATPase); pyridoxal phosphate phosphatase (PLP phosphatase); malate dehydrogenase mitochondrial 2 (MDH2); rho GDP-dissociation inhibitor 1 (Rho GDI1); dihydropyrimidinase-related protein 2 (DRP-2); astrocytic phosphoprotein PEA-15 (PEA15); thioredoxin-dependent peroxide reductase mitochondrial (PRDX3); elongation factor Tu mitochondrial (EF-Tu); glucose metabolic rate (GMR); gray matter (GM); 2-(1-{6-[(2-fluoroethyl)(methyl)amino]-2-naphthyl}ethylidene)malononitrile (FDDNP); binding potential ( $BP_{ND}$ ); ROI; standard uptake value ratios (SUVr); Regional Cerebral Metabolic Rate of Glucose (rCMRgl); secreted amyloid precursor protein- $\alpha$  (sAPP $\alpha$ ); secreted amyloid precursor protein- $\beta$  (sAPP $\beta$ ); Chitinase-3-like protein 1 (YKL-40); amyloid precursor-like protein 1 (APL); presenilin-1 (PSEN1); amyloid precursor protein C-terminal fragments (APP-CTF); total cholesterol (TC); Nerve growth factor (NGF); Matrix metalloproteinase (MMP); Tumor Necrosis Factor (TNF- $\alpha$ ); Interleukin (IL); Phospho tau - 181 (P-T181-tau); Phospho tau S396 (P-S396-tau).

brains had lower densities of both proteins in frontal, parietal and temporal cortex and in the hippocampus. SNAP-25 density in the occipital lobe was statistically similar in both

groups, and increased in the cerebellum of demented DS subjects. Similarly, Martin et al. showed that demented DS patients had lower levels of SYN in frontal cortex, which

was comparable to AD [38]. Cremona *et al.* assigned the synaptotagmin-1 (SYNJ1) gene to human chromosome 21q22.2, and further showed that SYNJ1 levels were higher in DS, as compared to sporadic AD, irrespective of the dementia status [39]. Other studies indicated that both the overexpression and the absence of this protein can lead to synaptic and cognitive dysfunctions in DS [40–44], with opposite trends in AD and DS – the former group with lower [45] and the latter group with higher levels of SYNJ1 [46, 47] relative to controls. SYN is an integral membrane glycoprotein that occurs in presynaptic vesicles of neurons and in similar vesicles of the adrenal medulla [48]. The progressive loss of SYN is well-established in AD transgenic mice [49], and the presence of the A $\beta$  peptide leads to synaptic dysfunction [50]. SNAP-25 is an important protein involved in formation of neural soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor (SNARE) complexes [51], which has a crucial role in memory formation and learning [52]. Downregulation of these proteins can impair the proper functioning of the brain as well as the process of neurotransmission. In addition, abnormal levels may contribute to the development of neurodegenerative diseases, including AD [53].

Cenini *et al.* showed that oxidative damage may contribute to the onset and progression of AD pathogenesis in SD [54], given that these individuals have higher protein levels of 4-hydroxy-2-trans-nonenal (HNE) – a marker of protein oxidation – in the frontal cortex. In addition, there is a positive correlation between protein carbonyls and A $\beta_{1-40}$  levels in the frontal cortex of DS subjects. In another study, Ling *et al.* found that the expression of the human mitochondrial elongation factor tu (EF-Tu) gene is downregulated in the frontal cortex of demented individuals with DS, as compared to non-demented probands [55]; this finding comes along with decreased expression of thioredoxin-dependent peroxide reductase mitochondrial (PRDX3) and  $\alpha$ -enolase. The authors further found lower levels of apolipoprotein E (APOE), Rab-3A and transitional endoplasmic reticulum ATPase (TER ATPase), and higher levels of malate dehydrogenase mitochondrial (MDH) in people with DS compared to age-matched controls [55]. The EF-Tu gene is related to the synthesis of proteins critically involved in energy and metabolism [55, 56]. The reduced expression of the antioxidant protein PRDX3 and of the glycolytic enzyme  $\alpha$ -enolase in demented individuals with DS further reinforces the role played by oxidative stress in the pathogenesis of AD and DS-related dementia, since the latter enzyme is indirectly involved in A $\beta$  degradation [57]. Low protein levels of APOE and Rab-3A are related to cognitive impairment and neurodegeneration, once they are respectively involved in A $\beta$  clearance and transport of synaptic vesicles [55, 58, 59], whereas ATPase is involved in the regulation of autophagy [60], and MDH and  $\alpha$ -enolase are involved in energy metabolism [61, 62].

Miners *et al.* [63] showed compared post-mortem brain samples obtained from DS subjects and from controls matched for age-at-death; the authors found higher concentrations of insoluble A $\beta$  in the frontal cortex of DS subjects, along with increased expression and activity of the A $\beta$  peptide-degrading enzyme neprilysin (NEP) [64, 65], but no

differences in the activity of BACE1 (beta-site APP-cleaving enzyme). Therefore, beyond oxidative stress, abnormalities in the expression of relevant proteins may contribute to the development of AD pathology in DS people.

### 3.2. Neuroimaging Studies (MRI And PET)

Recent studies using molecular imaging with PET have highlighted the potential of the method for the assessment of intracerebral A $\beta$  load in DS dementia [66–69]. Sabbagh *et al.* [70] used a combination of clinical (neuropsychological) and multiple imaging methods (MRI, <sup>18</sup>F-FDG-PET e <sup>18</sup>F-florbetapir-PET) to assess a cross-section of 17 adults with DS (5 with and 12 without dementia) and 9 matched controls; the authors found positive correlations between the magnitude of cognitive deficits, age, and imaging parameters. However, other authors claimed that the presence of AD-related pathology, as indicated by imaging biomarkers, is not always associated with the presence of dementia in DS [71, 72].

In an elegant correlational study conducted by Annus *et al.* [27] in a test group of 46 adults with DS compared to 30 matched controls, the presence of cerebral A $\beta$  detected by PIB-PET was used to classify participants as amyloid-positive (42%) and amyloid-negative (58% of the DS subjects). The former group displayed structural neuroimaging (MRI) findings compatible to those observed in AD, with hippocampal atrophy and volumetric reductions in thalamus and striatum; a different profile was observed in amyloid-negative, but still distinct from healthy controls [27].

Using amyloid imaging with <sup>18</sup>F-florbetaben, Jennings *et al.* [73] showed in a sample of 39 adults with DS (mean age 46.3 years) a strong correlation between A $\beta$  load and aging: the marker was positive in 7% of DS subjects aged 40–44 years, in 53% of those with 45–49 years of age, and in 90% of those aged 50 and older. However, dementia was only present in 6% of the DS sample. It can be claimed that the presence of A $\beta$  in the DS brain indicates the risk for future conversion to dementia, in which case the biomarker illustrates the presence of AD pathology prior to the clinical onset of dementia. Nonetheless, the lack of a temporal association between intracerebral amyloid and cognitive impairment indicates that the problem is more complex than formerly estimated. That is to say, the presence of A $\beta$  and other pathological mechanisms related to AD may be counterbalanced by protective factors – most of which unknown – so that many individuals with DS may be resilient to the presence of A $\beta$  within the brain.

The resolution of this impasse will require prospective studies in which the cognitive and functional performance in non-demented DS adults are longitudinally assessed in the light of AD-related biomarkers. Accordingly, a Californian research group has recently published the preliminary results of the 'Down Syndrome Biomarker Initiative', a cross-sectional analysis of multiple clinical and biological markers in a sample of 12 adults and elders with DS (age range 30 to 60 years), advocating the need for multicentre, longitudinal trials to determine the biomarkers that best predict dementia in DS [74]. The imaging protocol included structural (MRI) and functional neuroimaging (<sup>18</sup>F-FDG-PET), and amyloid

imaging with PET ( $^{18}\text{F}$ -florbetapir). The authors further assessed the presence of A $\beta$  in the retina, plasma A $\beta$  and polymorphisms of the apolipoprotein E gene (*APOE*). Correlations were found between cerebral A $\beta$ , hippocampal atrophy and reduced regional glucose metabolism. However, cognitive impairment was not associated with A $\beta$  load, but rather with metabolic abnormalities, supporting the notion of a pre-clinical phase in which the pathological markers are positive, but not temporally associated with cognitive impairment.

### 3.3. Cerebrospinal Fluid (CSF) Biomarkers

To our knowledge, in the last ten years few studies involving biological markers related to AD were described in CSF of DS subjects. An exploratory study in this field, conducted by Portelius *et al.* [75], failed to identify the typical 'AD signature' in the CSF of 12 adults with DS (mean age 40 years) compared to 20 controls; however, the authors found significant changes in CSF parameters indicative of abnormalities in APP processing, *i.e.*, increased concentrations of secreted APP peptides (sAPP $\alpha$  e - $\beta$ ) and truncated A $\beta$ <sub>1-40</sub> forms. Besides that, there was an inverse correlation between CSF A $\beta$ <sub>1-42</sub> levels and chronological age in DS, *i.e.*, older adults with DS had lower CSF levels of A $\beta$ <sub>1-42</sub>, and higher levels of YKL-40, a marker of microglial activity. This group also showed, in another study [76], higher CSF levels of amyloid precursor-like protein 1 (APLP1) in DS; APLP1 is a protein with sequence homology to APP and may also undergo cleavage *via* the amyloidogenic pathway [77, 78].

García-Ayllón *et al.* [79] analyzed APP C-terminal fragments (APP-CTF) in the CSF from demented patients with DS, dominantly inherited autosomal AD, and late-onset sporadic AD. APP-CTF is a proteolytic metabolite of APP, which is generated *via* metabolic pathways related to asparagine endopeptidase (AEP) or metalloproteinase ( $\eta$ -secretase) activity. APP-CTF levels were increased in all three groups of AD-related dementia groups compared to healthy controls. Sogorb-Estève [80] showed that individuals with genetically-determined forms of AD, including carriers of PSEN1 mutations and subjects with DS, have higher CSF levels of presenilin-1 (PSEN1) as compared to controls, independently of the presence of cognitive impairment or dementia.

### 3.4. Peripheral Biomarkers

A small number of studies addressed the presence of peripheral biomarkers related to AD in DS samples, usually by determining concentrations of several proteins related to the pathophysiology of AD in samples of peripheral blood or its fractions. In a cross-sectional study with 24 participants with DS, 10 with intellectual deficiencies due to other causes, and 18 age-matched controls, Conti *et al.* [81] showed statistically significant changes in plasma concentrations of APP metabolites in DS, namely a 50% increase in the sAPP $\alpha$  peptide and a six-fold increase in A $\beta$ <sub>1-42</sub>, indicating a metabolic shift in APP metabolism towards the amyloidogenic pathway.

In addition to the analysis of APP metabolites, plasma levels of amyloid peptides A $\beta$ <sub>1-40</sub> and A $\beta$ <sub>1-42</sub> have also been studied among people with DS aged 40-60 years. Two of

these studies [82, 83] showed no significant association between age and plasma concentrations of A $\beta$ <sub>1-40</sub> or A $\beta$ <sub>1-42</sub> in DS irrespective of the dementia status, comparing DS to controls. Also, no statistically significant differences were found comparing demented and non-demented DS subjects with respect to A $\beta$ <sub>1-40</sub> and A $\beta$ <sub>1-42</sub> levels, and the presence of the APOE- $\epsilon$ 4 allele did not affect amyloid peptide levels [82]. Similar findings were presented by Prasher *et al.* [84] in a longitudinal study, with the additional evidence of a positive association between plasma A $\beta$  levels and duration of dementia in DS, *i.e.*, subjects with DS-related dementia had significantly lower mean plasma levels of A $\beta$ <sub>1-40</sub>, and A $\beta$ <sub>1-40</sub>/A $\beta$ <sub>1-42</sub> ratio was significantly higher among those with more than four years of onset of dementia as compared to DS subjects at early stages of the dementing process. Controversial results have been presented by other authors, such as lower A $\beta$ <sub>1-42</sub> levels and A $\beta$ <sub>1-40</sub>/A $\beta$ <sub>1-42</sub> ratio, and higher plasma levels of A $\beta$ <sub>1-40</sub> [85, 86] and tau [85, 87, 88] in DS compared to healthy controls; nonetheless, the pattern of change in these biomarkers in DS were similar to the ones found in AD, *i.e.*, lower A $\beta$ <sub>1-40</sub> and higher A $\beta$ <sub>1-42</sub> levels, and higher A $\beta$ <sub>1-40</sub>/A $\beta$ <sub>1-42</sub> ratio, [85]. Abnormally higher concentrations of other potential biomarkers of neurodegenerative processes, such as nerve growth factor precursor, tissue plasminogen activator, neuroserpin, metalloproteinases and inflammatory cytokines, were also found to be present in DS [86].

A recent cross-sectional study conducted by Strydom *et al.* [89] analysed plasma levels of neurofilament light (NF-L) as a marker of neurodegeneration in a sample of DS with and without dementia, and identified not only a positive correlation of NF-L with increasing age, but also higher levels of NF-L in demented DS subjects. NF-L is one of the scaffolding cytoskeleton proteins of myelinated subcortical axons and may reflect axonal damage in neurodegeneration, including familial and sporadic AD [90-92].

Although many studies have focused on the search for candidate biomarkers of AD in the plasma from people with DS, other biological matrices have also been studied. Prasher *et al.* [93] investigated total serum cholesterol levels in relation to the onset of dementia in DS. There were no statistically significant associations between total serum cholesterol levels across study groups, nor between serum cholesterol and plasma levels of A $\beta$ <sub>1-40</sub> and A $\beta$ <sub>1-42</sub>; nonetheless, DS adults with at least one APOE- $\epsilon$ 4 allele presented with significantly higher serum cholesterol levels.

Neuronal exosome plasma and serum levels of the A $\beta$  peptide and phosphorylated tau protein (P-tau) were analyzed by Hamlett *et al.* [94] across four groups of participants, distributed according to the presence of DS (DS vs. controls) in two age-groups (8-35 years vs. >35 years of age). Higher levels of A $\beta$  and P-tau were observed in both DS groups compared to age-matched controls and, in the subgroup of DS with dementia symptoms, A $\beta$ <sub>1-42</sub> levels were decreased and P-tau increased as compared to non-demented DS subjects.

## CONCLUSION

Dementia due to AD and DS-related dementia share important similarities regarding core pathological findings and



mechanisms of neurodegeneration; for this reason DS is regarded as a form of genetically determined, early-onset AD. The neurodegenerative process in DS is critically related to the overproduction and accumulation of the A $\beta$  peptide in the brain, as a consequence of abnormal expression and regulation of the APP gene, located on chromosome 21. Therefore, laboratorial and neuroimaging methods targeting A $\beta$  have yielded consistent insights in the search for biological markers of the neurodegenerative process in DS. Amyloid imaging with PET indicates that, similarly to AD, the accumulation of the A $\beta$  peptide in the DS brain is age-dependent, but starts in DS much earlier than in AD. However, studies have so far failed to detect a clear association between intracerebral A $\beta$  load and the presence of cognitive symptoms, indicating that there are factors to be elucidated conferring vulnerability or resilience to A $\beta$  toxicity in the DS brain. Biomarker studies in the CSF and peripheral blood also reinforce the central role played by abnormal APP processing and A $\beta$  formation in DS, but studies reporting tau abnormalities in DS have not shown the same consistency as in AD.

The recent rise in the number of publications in the field of AD-related biomarkers in DS indicates a growing interest of clinical scientists in this field. Such contributions converge from research groups primarily dedicated to the study of AD biomarkers, along with researchers from the field of intellectual disability looking into ways to improve the diagnosis and develop better interventions to deal with dementia in DS. Therefore, neurobiological studies in DS can contribute to a better understanding of the pathophysiology of AD, and clinical-laboratorial studies in DS can take advantage of the technological developments that recently emerged from the AD field. These developments may result in the validation of methods to support the early diagnosis of cognitive impairment and dementia in DS, and establish a scientific framework for the development of therapeutic and preventive interventions.

#### FINANCIAL SUPPORT

National Institute for Biomarker Research in Neuropsychiatry (INBION), Grants Nos. 14/50873-3 (FAPESP) and 465412/2014-9 (CNPq); Associação Beneficente Alzira Denise Hertzog da Silva (ABADHS).

#### CONSENT FOR PUBLICATION

Not applicable.

#### CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest, financial or otherwise.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

We are indebted to Dr. Edward Yang, chairman of "Instituto de Ensino e Pesquisa APAE-SP" (APAE-SP Institute for Education and Research) for supporting the development of multidisciplinary research in field.

#### REFERENCES

- [1] Carfi A, Antocicco M, Brandi V, et al. Characteristics of adults with down syndrome: prevalence of age-related conditions. *Front Med* 2014; 1: 51.
- [2] Head E, Lott IT, Wilcock DM, et al. Aging in Down syndrome and the Development of Alzheimer's disease Neuropathology HHS Public Access. *Curr Alzheimer Res* 2016; 13: 18-29.
- [3] World Health Organization. Genes and human disease: Down Syndrome. WHO. <http://www.who.int/genomics/public/geneticdiseases/en/index.html> (2017, accessed 3 July 2017).
- [4] NDSS / Down Syndrome Fact Sheet. *National Down Syndrome Society*. [http://www.ndss.org/PageFiles/1474/NDSS\\_Fact\\_Sheet\\_2015.pdf](http://www.ndss.org/PageFiles/1474/NDSS_Fact_Sheet_2015.pdf) (2015, accessed 19 March 2017).
- [5] Bush A, Beal N. Risk Factors for Dementia in People With Down Syndrome: Issues in Assessment and Diagnosis. *Am Assoc Ment Retard Am J Ment Retard* 2004; 83: 83-97.
- [6] Mann DM, Yates PO, Marcyniuk B. Alzheimer's presenile dementia, senile dementia of Alzheimer type and Down's syndrome in middle age form an age related continuum of pathological changes. *Neuropathol Appl Neurobiol* 1984; 10: 185-207.
- [7] Mann DM, Esiri MM. The pattern of acquisition of plaques and tangles in the brains of patients under 50 years of age with Down's syndrome. *J Neuro Sci* 1989; 89: 169-79.
- [8] Mann DM, Jones D, Prinja D, et al. The prevalence of amyloid (A $\beta$ ) protein deposits within the cerebral and cerebellar cortex in Down's syndrome and Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* 1990; 80: 318-27.
- [9] Wisniewski KE, Dalton AJ, McLachlan C, et al. Alzheimer's disease in Down's syndrome: clinicopathologic studies. *Neurology* 1985; 35: 957-61.
- [10] Zigman WB, Lott IT. Alzheimer's disease in Down syndrome: Neurobiology and risk. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev* 2007; 13: 237-246.
- [11] Covelli V, Raggi A, Meucci P, et al. Ageing of people with Down's syndrome: a systematic literature review from 2000 to 2014. *Int J Rehabil Res* 2016; 39: 20-28.
- [12] Murdoch JC. Ageing in Down's syndrome. *Lancet (London, England)* 1985; 1: 1214.
- [13] Kusters MA, Versteegen RH, de Vries E. Down syndrome: is it really characterized by precocious immunosenescence? *Aging Dis* 2011; 2: 538-45.
- [14] Vaziri H, Schächter F, Uchida I, et al. Loss of telomeric DNA during aging of normal and trisomy 21 human lymphocytes. *Am J Hum Genet* 1993; 52: 661-7.
- [15] Zigman WB. Atypical aging in down syndrome. *Dev Disabil Res Rev* 2013; 18: 51-67.
- [16] Gulesserian T, Seidl R, Hardmeier R, et al. Superoxide Dismutase SOD1, Encoded on Chromosome 21, but Not SOD2 Is Overexpressed in Brains of Patients With Down Syndrome. *J Investig Med* 2001; 49: 41-46.
- [17] Pagano G, Castello G. Oxidative Stress and Mitochondrial Dysfunction in Down Syndrome. In: *Advances in experimental medicine and biology*, pp. 291-299.
- [18] Busciglio J, Yankner BA. Apoptosis and increased generation of reactive oxygen species in Down's syndrome neurons *in vitro*. *Nature* 1995; 378: 776-779.
- [19] Rueda N, Flórez J, Martínez-Cué C. Apoptosis in Down's syndrome: lessons from studies of human and mouse models. *Apoptosis* 2013; 18: 121-134.
- [20] Tramutola A, Pupo G, Di Domenico F, et al. Activation of p53 in Down Syndrome and in the Ts65Dn Mouse Brain is Associated with a Pro-Apoptotic Phenotype. *J Alzheimer's Dis* 2016; 52: 359-371.
- [21] Jenkins EC, Ye L, Gu H, et al. Increased "absence" of telomeres may indicate Alzheimer's disease/dementia status in older individuals with Down syndrome. *Neurosci Lett* 2008; 440: 340-343.
- [22] Jenkins EC, Ye L, Gu H, et al. Shorter telomeres may indicate dementia status in older individuals with Down syndrome. *Neurobiol Aging* 2010; 31: 765-771.
- [23] Jenkins EC, Ye L, Velinov M, et al. Mild cognitive impairment identified in older individuals with Down syndrome by reduced telomere signal numbers and shorter telomeres measured in microns. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2012; 159B: 598-604.

- [24] Royston MC, McKenzie JE, Gentleman SM, et al. Overexpression of  $\beta$ 100 in Down's syndrome: correlation with patient age and with beta-amyloid deposition. *Neuropathol Appl Neurobiol* 1999; 25: 387-93.
- [25] Hartley D, Bhumenthal T, Carrillo M, et al. Down syndrome and Alzheimer's disease: Common pathways, common goals HHS Public Access. *Alzheimers Dement* 2015; 11: 700-709.
- [26] De-Paula VJ, Radanovic M, Dimiz BS, et al. Alzheimer's Disease. In: *Sub-cellular biochemistry*, pp. 329-352.
- [27] Annus T, Wilson LR, Hong YT, et al. The pattern of amyloid accumulation in the brains of adults with Down syndrome. *Alzheimer's Dement* 2016; 12: 538-545.
- [28] Lee N-C, Yang S-Y, Chieh J-J, et al. Blood Beta-Amyloid and Tau in Down Syndrome: A Comparison with Alzheimer's Disease. *Front Aging Neurosci* 2016; 8: 316.
- [29] Fletcher RJ, Barnhill J, McCarthy J, et al. From DSM to DM-ID. *J Ment Health Res Intellect Disabil* 2016; 9: 189-204.
- [30] Sheehan R, Sinai A, Bass N, et al. Dementia diagnostic criteria in Down syndrome. *Int J Geriatr Psychiatry* 2015; 30: 857-863.
- [31] Hithersay R, Hamburg S, Knight B, et al. Cognitive decline and dementia in Down syndrome. *Curr Opin Psychiatry* 2017; 30: 102-107.
- [32] Motter R, Vigo-Pelfrey C, Kholodenko D, et al. Reduction of  $\beta$ -amyloid peptide42 in the cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 1995; 38: 643-648.
- [33] Blennow K, Hampel H. CSF markers for incipient Alzheimer's disease. *Lancet Neurol* 2003; 2: 605-13.
- [34] Buchhave P, Minthon L, Zetterberg H, et al. Cerebrospinal Fluid Levels of  $\beta$ -Amyloid 1-42, but Not of Tau, Are Fully Changed Already 5 to 10 Years Before the Onset of Alzheimer Dementia. *Arch Gen Psychiatry* 2012; 69: 98.
- [35] van Harten AC, Visser PJ, Pijnenburg YAL, et al. Cerebrospinal fluid A $\beta$ 42 is the best predictor of clinical progression in patients with subjective complaints. *Alzheimer's Dement* 2013; 9: 481-487.
- [36] Blennow K, Dubois B, Fagan AM, et al. Clinical utility of cerebrospinal fluid biomarkers in the diagnosis of early Alzheimer's disease. *Alzheimer's Dement* 2015; 11: 58-69.
- [37] Downes EC, Robson J, Grailly E, et al. Loss of synaptophysin and synaptosomal-associated protein 25-kDa (SNAP-25) in elderly Down syndrome individuals. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2007; 0: 071116233359001-???
- [38] Martin SB, Dowling ALS, Lianekhammy J, et al. Synaptophysin and Synaptotagmin-1 in Down Syndrome are Differentially Affected by Alzheimer's Disease. *J Alzheimer's Dis* 2014; 42: 767-775.
- [39] Cremona O, Nimmakayalu M, Haffner C, et al. Assignment 1 of SYNJ1 to human chromosome 21q22.2 and Synj12 to the murine homologous region on chromosome 16C3-4 by in situ hybridization. Request reprints from Dr Rationale and significance. [www.karger.com/www.karger.com/journals/ccg](http://www.karger.com/www.karger.com/journals/ccg) (2000, accessed 3 August 2018).
- [40] Cremona O, Di Paolo G, Wenk MR, et al. Essential role of phosphoinositide metabolism in synaptic vesicle recycling. *Cell* 1999; 99: 179-88.
- [41] Cossec J-C, Lavaur J, Berman DE, et al. Trisomy for Synaptotagmin1 in Down syndrome is functionally linked to the enlargement of early endosomes. *Hum Mol Genet* 2012; 21: 3156-3172.
- [42] McIntire LBJ, Berman DE, Myaeng J, et al. Reduction of Synaptotagmin 1 Ameliorates Synaptic and Behavioral Impairments in a Mouse Model of Alzheimer's Disease. *J Neurosci* 2012; 32: 15271-15276.
- [43] Voronov S V, Frere SG, Giovedi S, et al. Synaptotagmin 1-linked phosphoinositide dyshomeostasis and cognitive deficits in mouse models of Down's syndrome. *Proc Natl Acad Sci* 2008; 105: 9415-9420.
- [44] Chang KT, Min K-T. Upregulation of three Drosophila homologs of human chromosome 21 genes alters synaptic function: Implications for Down syndrome. *Proc Natl Acad Sci* 2009; 106: 17117-17122.
- [45] Miller JA, Oldham MC, Geschwind DH. A Systems Level Analysis of Transcriptional Changes in Alzheimer's Disease and Normal Aging. *J Neurosci* 2008; 28: 1410-1420.
- [46] Cheon MS, Shim KS, Kim SH, et al. Protein levels of genes encoded on chromosome 21 in fetal Down syndrome brain: Challenging the gene dosage effect hypothesis (Part IV). *Amino Acids* 2003; 25: 41-47.
- [47] Arai Y, Ijuin T, Takenawa T, et al. Excessive expression of synaptotagmin in brains with Down syndrome. *Brain Dev* 2002; 24: 67-72.
- [48] Wiedenmann B, Franke WW, Kuhn C, et al. Synaptophysin: A marker protein for neuroendocrine cells and neoplasms (synaptic vesicles/neurosecretory granules/pancreatic islets/carcinoids/tumor diagnosis). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC323544/pdf/pnas00314-0459.pdf> (1986, accessed 31 July 2018).
- [49] Mucke L, Masliah E, Yu GQ, et al. High-level neuronal expression of abeta 1-42 in wild-type human amyloid protein precursor transgenic mice: synaptotoxicity without plaque formation. *J Neurosci* 2000; 20: 4050-8.
- [50] Shankar GM, Walsh DM. Molecular Neurodegeneration Alzheimer's disease: synaptic dysfunction and A $\beta$ . Epub ahead of print 2009. DOI: 10.1186/1750-1326-4-48.
- [51] Noor A, Zahid S. A review of the role of synaptosomal-associated protein 25 (SNAP-25) in neurological disorders. *Int J Neurosci* 2017; 127: 805-811.
- [52] Zheng X, Bobich JA. A sequential view of neurotransmitter release. *Brain Res Bull* 1998; 47: 117-28.
- [53] Clinton J, Blackman SE, Royston MC, et al. Differential synaptic loss in the cortex in Alzheimer's disease: a study using archival material. *Neuroreport* 1994; 5: 497-500.
- [54] Cenini G, Dowling ALS, Beckett TL, et al. Association between frontal cortex oxidative damage and beta-amyloid as a function of age in Down syndrome. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis* 2012; 1822: 130-138.
- [55] Cenini G, Fiorini A, Sultana R, et al. An investigation of the molecular mechanisms engaged before and after the development of Alzheimer disease neuropathology in Down syndrome: a proteomics approach. *Free Radic Biol Med* 2014; 76: 89-95.
- [56] Ling M, Merante F, Chen HS, et al. The human mitochondrial elongation factor tu (EF-Tu) gene: cDNA sequence, genomic localization, genomic structure, and identification of a pseudogene. *Gene* 1997; 197: 325-36.
- [57] Butterfield DA, Lange MLB. Multifunctional roles of enolase in Alzheimer's disease brain: beyond altered glucose metabolism. *J Neurochem* 2009; 111: 915-933.
- [58] Hauser PS, Narayanaswami V, Ryan RO. Apolipoprotein E: From lipid transport to neurobiology. *Prog Lipid Res* 2011; 50: 62-74.
- [59] Reddy PH, Mami G, Park BS, et al. Differential loss of synaptic proteins in Alzheimer's disease: implications for synaptic dysfunction. *J Alzheimer's Dis* 2005; 7: 103-17; discussion 173-80.
- [60] Ju J-S, Fuentealba RA, Miller SE, et al. Valosin-containing protein (VCP) is required for autophagy and is disrupted in VCP disease. *J Cell Biol* 2009; 187: 875-888.
- [61] Butterfield DA, Di Domenico F, Swomley AM, et al. Redox proteomics analysis to decipher the neurobiology of Alzheimer-like neurodegeneration: overlaps in Down's syndrome and Alzheimer's disease brain. *Biochem J* 2014; 463: 177-189.
- [62] Di Domenico F, Pupo G, Tramutola A, et al. Redox proteomics analysis of HNE-modified proteins in Down syndrome brain: clues for understanding the development of Alzheimer disease. *Free Radic Biol Med* 2014; 71: 270-280.
- [63] Miners JS, Morris S, Love S, et al. Accumulation of Insoluble Amyloid- $\beta$  in Down's Syndrome is Associated with Increased BACE-1 and Nephrysin Activities. *J Alzheimer's Dis* 2011; 23: 101-108.
- [64] Kanemitsu H, Tomiyama T, Mori H. Human neprilysin is capable of degrading amyloid beta peptide not only in the monomeric form but also the pathological oligomeric form. *Neurosci Lett* 2003; 350: 113-6.
- [65] El-Amouri SS, Zhu H, Yu J, et al. Neprilysin protects neurons against A $\beta$  peptide toxicity. *Brain Res* 2007; 1152: 191-200.
- [66] Landt J, D'Abbrera JC, Holland AJ, et al. Using Positron Emission Tomography and Carbon 11-Labeled Pittsburgh Compound B to Image Brain Fibrillar  $\beta$ -Amyloid in Adults With Down Syndrome. *Arch Neurol* 2011; 68: 890.
- [67] Sabbagh MN, Fleisher A, Chen K, et al. Positron emission tomography and neuropathologic estimates of fibrillar amyloid- $\beta$  in a patient with Down syndrome and Alzheimer disease. *Arch Neurol* 2011; 68: 1461-6.
- [68] Nelson LD, Siddarth P, Kepe V, et al. Positron Emission Tomography of Brain  $\beta$ -Amyloid and Tau Levels in Adults With Down Syndrome. *Arch Neurol* 2011; 68: 768-74.
- [69] Handen BL, Cohen AD, Channamalappa U, et al. Imaging brain amyloid in nondemented young adults with Down syndrome using Pittsburgh compound B. *Alzheimers Dement* 2012; 8: 496-501.

- [70] Sabbagh MN, Chen K, Rogers J, et al. Florbetapir PET, FDG PET, and MRI in Down syndrome individuals with and without Alzheimer's dementia. *Alzheimer's Dement* 2015; 11: 994-1004.
- [71] Head E, Lott IT, Patterson D, et al. Possible compensatory events in adult Down syndrome brain prior to the development of Alzheimer disease neuropathology: targets for nonpharmacological intervention. *J Alzheimers Dis* 2007; 11: 61-76.
- [72] Haier RJ, Head K, Head E, et al. Neuroimaging of individuals with Down's syndrome at-risk for dementia: Evidence for possible compensatory events. *Neuroimage* 2008; 39: 1324-1332.
- [73] Jennings D, Seibyl J, Sabbagh M, et al. Age dependence of brain -amyloid deposition in Down syndrome: An [<sup>18</sup>F]florbetaben PET study. *Neurology* 2015; 84: 500-507.
- [74] Rafii MS, Wishnek H, Brewer JB, et al. The down syndrome biomarker initiative (DSBI) pilot: proof of concept for deep phenotyping of Alzheimer's disease biomarkers in down syndrome. *Front Behav Neurosci* 2015; 9: 239.
- [75] Portelius E, Soininen H, Andreasson U, et al. Exploring Alzheimer Molecular Pathology in Down's Syndrome Cerebrospinal Fluid. *Neurodegener Dis* 2014; 14: 98-106.
- [76] Portelius E, Hölttä M, Soininen H, et al. Altered Cerebrospinal Fluid Levels of Amyloid  $\beta$  and Amyloid Precursor-Like Protein 1 Peptides in Down's Syndrome. *NeuroMolecular Med* 2014; 16: 510-516.
- [77] Wasco W, Brook JD, Tanzi RE. The Amyloid Precursor-like Protein (APLP) Gene Maps to the Long Arm of Human Chromosome 19. *Genomics* 1993; 15: 237-239.
- [78] Yanagida K, Okochi M, Tagami S, et al. The 28-amino acid form of an APLP1-derived A $\beta$ -like peptide is a surrogate marker for A $\beta$ 42 production in the central nervous system. *EMBO Mol Med* 2009; 1: 223-235.
- [79] Garcia-Ayllón M-S, Lopez-Font I, Boix CP, et al. C-terminal fragments of the amyloid precursor protein in cerebrospinal fluid as potential biomarkers for Alzheimer disease. *Sci Rep* 2017; 7: 2477.
- [80] Sogorb-Esteve A, Garcia-Ayllón M-S, Fortea J, et al. Cerebrospinal fluid Presenilin-1 increases at asymptomatic stage in genetically determined Alzheimer's disease. *Mol Neurodegener* 2016; 11: 66.
- [81] Conti E, Galimberti G, Piazza F, et al. Increased Soluble APP<sub>63</sub>, A $\beta$ 1-42, and Anti-A $\beta$ 1-42 Antibodies in Plasma From Down Syndrome Patients. *Alzheimer Dis Assoc Disord* 2010; 24: 96-100.
- [82] Jones EL, Hanney M, Francis PT, et al. Amyloid  $\beta$  concentrations in older people with Down syndrome and dementia. *Neurosci Lett* 2009; 451: 162-164.
- [83] Head E, Doran E, Nistor M, et al. Plasma amyloid- $\beta$  as a function of age, level of intellectual disability, and presence of dementia in Down syndrome. *J Alzheimers Dis* 2011; 23: 399-409.
- [84] Prasher VP, Sajith SG, Mehta P, et al. Plasma  $\beta$ -amyloid and duration of Alzheimer's disease in adults with Down syndrome. *Int J Geriatr Psychiatry* 2010; 25: 202-207.
- [85] Lee N-C, Yang S-Y, Chieh J-J, et al. Blood Beta-Amyloid and Tau in Down Syndrome: A Comparison with Alzheimer's Disease. *Front Aging Neurosci* 2016; 8: 316.
- [86] Iulita MF, Ower A, Barone C, et al. An inflammatory and trophic disconnect biomarker profile revealed in Down syndrome plasma: Relation to cognitive decline and longitudinal evaluation. *Alzheimer's Dement* 2016; 12: 1132-1148.
- [87] Tatebe H, Kasai T, Ohmichi T, et al. Quantification of plasma phosphorylated tau to use as a biomarker for brain Alzheimer pathology: pilot case-control studies including patients with Alzheimer's disease and down syndrome. *Mol Neurodegener* 2017; 12: 63.
- [88] Kasai T, Tatebe H, Kondo M, et al. Increased levels of plasma total tau in adult Down syndrome. *PLoS One* 2017; 12: e0188802.
- [89] Strydom A, Heslegrave A, Startin CM, et al. Neurofilament light as a blood biomarker for neurodegeneration in Down syndrome. *Alzheimers Res Ther* 2018; 10: 39.
- [90] Zetterberg H. Neurofilament Light: A Dynamic Cross-Disease Fluid Biomarker for Neurodegeneration. *Neuron* 2016; 91: 1-3.
- [91] Mattsson N, Andreasson U, Zetterberg H, et al. Association of Plasma Neurofilament Light With Neurodegeneration in Patients With Alzheimer Disease. *JAMA Neurol* 2017; 74: 557-566.
- [92] Weston PSJ, Poole T, Ryan NS, et al. Serum neurofilament light in familial Alzheimer disease. *Neurology* 2017; 89: 2167-2175.
- [93] Prasher VP, Airuehia E, Patel A, et al. Total serum cholesterol levels and Alzheimer's dementia in patients with down syndrome. *Int J Geriatr Psychiatry* 2008; 23: 937-942.
- [94] Hamlett ED, Goetzl EJ, Ledreux A, et al. Neuronal exosomes reveal Alzheimer's disease biomarkers in Down syndrome. *Alzheimer's Dement* 2017; 13: 541-549.

DISCLAIMER: The above article has been published in Epub (ahead of print) on the basis of the materials provided by the author. The Editorial Department reserves the right to make minor modifications for further improvement of the manuscript.

**Artigo Científico:** Calil V, Elliott E, Borelli WV, Barbosa BJAP, Bram JMF, Mariano LI, Dias N, Hornberger M, Caramelli P. Challenges in the diagnosis of dementia: insights from United Kingdom-Brazil Dementia Workshop. *Dement Neuropsychol* 2020, 14(3):201-208. DOI: 10.1590/1980-57642020dn14-030001

*Dement Neuropsychol* 2020 September;14(3):201-208

Views & Reviews

<http://doi.org/10.1590/1980-57642020dn14-030001>

## Challenges in the diagnosis of dementia Insights from the United Kingdom–Brazil Dementia Workshop

Victor Calil<sup>1,2</sup>, Emma Elliott<sup>3</sup>, Wyllys Vendramini Borelli<sup>4,5</sup>, Breno José Alencar Pires Barbosa<sup>6,7</sup>,  
Jessyka Bram<sup>8</sup>, Felipe de Oliveira Silva<sup>9</sup>, Leonardo Galvão Machado Cardoso<sup>10</sup>,  
Luciano Inácio Mariano<sup>11</sup>, Natalia Dias<sup>12</sup>, Michael Hornberger<sup>13</sup>, Paulo Caramelli<sup>14</sup>

**ABSTRACT.** In July 2019, a group of multidisciplinary dementia researchers from Brazil and the United Kingdom (UK) met in the city of Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, to discuss and propose solutions to current challenges faced in the diagnosis, public perception and care of dementia. Here we summarize the outcomes from the workshop addressing challenges in diagnosis. Brazil faces a major problem in dementia underdiagnosis, particularly involving the population in an adverse socioeconomic context. There is poor availability of resources and specialists, and the knowledge of general practitioners and other healthcare professionals is far from satisfactory. Low education level is a further obstacle in diagnosing dementia, as the most commonly used screening tests are not designed to evaluate this population. Patients and their families must overcome the stigma of a diagnosis of dementia, which is still prevalent in Brazil and increases the burden of this condition. Whilst the UK has greater resources, dedicated memory services and a National Dementia Strategy plan, the National Health Service (NHS) has limited funding. Therefore, some challenges regarding diagnosis are common across both countries. The authors suggest possible solutions to confront these, with the goal of improving assessment and recognition of dementia and reducing misdiagnosis.

**Keywords:** dementia, diagnosis, cognitive impairment, biomarkers, neurobehavioral manifestations.

### DESAFIOS NO DIAGNÓSTICO DE DEMÊNCIA: CONCLUSÕES DO WORKSHOP DE DEMÊNCIA REINO UNIDO-BRASIL

**RESUMO.** Em julho de 2019, um grupo multidisciplinar de pesquisadores em demência do Brasil e do Reino Unido se reuniu em Belo Horizonte para discutir e propor soluções para os desafios no diagnóstico, percepção pública e tratamento dessa condição. Neste artigo, sintetizamos as conclusões do workshop sobre os desafios no diagnóstico de demência. O Brasil enfrenta um grande problema no subdiagnóstico de demência, principalmente entre a população em condições socioeconômicas adversas. Há pouca disponibilidade de recursos e de especialistas e o conhecimento de médicos generalistas e de outros profissionais de saúde é pouco abrangente. Baixa escolaridade é também um obstáculo no diagnóstico de demência, uma vez que os testes de rastreio mais utilizados na prática clínica não são estruturados para avaliar a população com esse perfil. Os pacientes com demência e suas famílias ainda têm que superar o estigma do diagnóstico, que é ainda muito prevalente no Brasil e colabora para a piora da qualidade de vida. O Reino Unido, por outro lado, dispõe de mais recursos financeiros e de pessoal,

This study was conducted at Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil, and University of East Anglia, Norwich, Norfolk, United Kingdom.

<sup>1</sup>Instituto D'Or de Ensino e Pesquisa – Rio de Janeiro, RJ, Brazil. <sup>2</sup>Universidade Federal do Rio de Janeiro – Rio de Janeiro, RJ, Brazil. <sup>3</sup>Institute of Cardiovascular and Medical Sciences, University of Glasgow – Glasgow, United Kingdom. <sup>4</sup>Faculdade de Medicina, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul – Porto Alegre, RS, Brazil. <sup>5</sup>Instituto do Cérebro do Rio Grande do Sul – Porto Alegre, RS, Brazil. <sup>6</sup>Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira – Recife, PE, Brazil. <sup>7</sup>Departamento de Neurologia, Hospital das Clínicas, Universidade de São Paulo – São Paulo, SP, Brazil. <sup>8</sup>Laboratório de Neurociências, Departamento e Instituto de Psiquiatria, Universidade de São Paulo – São Paulo, SP, Brazil. <sup>9</sup>Instituto de Psiquiatria, Universidade Federal do Rio de Janeiro – Rio de Janeiro, RJ, Brazil. <sup>10</sup>Faculdade de Medicina, Universidade Federal da Bahia – Salvador, BA, Brazil. <sup>11</sup>Programa de Pós-Graduação em Neurociências, Universidade Federal de Minas Gerais – Belo Horizonte, MG, Brazil. <sup>12</sup>Laboratório Interdisciplinar de Investigação Médica, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais – Belo Horizonte, MG, Brazil. <sup>13</sup>Norwich Medical School, University of East Anglia – Norwich, United Kingdom. <sup>14</sup>Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais – Belo Horizonte, MG, Brazil.

**Paulo Caramelli.** Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Prof. Alfredo Balena, 190, Sals 246 – Santa Elizabete – 30130-100 Belo Horizonte MG – Brazil. E-mail: caramelli@ufmg.br

Disclosure: The authors report no conflicts of interest.

Funding: The United Kingdom-Brazil Dementia Workshop was funded by a Global Challenges Research Fund Rapid Response Award from the University of East Anglia, Norwich, United Kingdom, and by the Behavioral and Cognitive Neurology Research Group from Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil. The organization of the event was also supported by the National Institute for Health Research Applied Research Collaboration East of England Programme. The views expressed are those of the authors and not necessarily those of the NHS, the NIHR or the Department of Health and Social Care. Paulo Caramelli is also supported by a research grant from CNPq, Brazil (bolsa de produtividade em pesquisa – Process 308171/2017-9).

Received on February 09, 2020. Accepted in final form on May 04, 2020.



possui serviços dedicados à avaliação de problemas de memória e um plano estratégico nacional para demência. Contudo, o *National Health Service* (NHS) tem verbas limitadas, o que faz com que alguns dos desafios no diagnóstico de demência sejam comuns aos dois países. Os autores sugerem possíveis soluções para enfrentá-los, com o objetivo de melhorar a avaliação e o reconhecimento da demência e reduzir os erros de diagnóstico.

**Palavras-chave:** demência, diagnóstico, disfunção cognitiva, biomarcadores, manifestações neurocomportamentais.

## INTRODUCTION

The upcoming decades will see a rise in the prevalence of dementia, especially in developing countries. Therefore, healthcare systems must prepare to provide timely and accurate diagnosis and have the resources in place for efficient care. There are many barriers to reach this goal, and they vary in places with a lower socioeconomic status. An important step to address this is to share experience and best practice with professionals from other states and countries, establish collaborations and work together towards feasible, creative solutions.

The United Kingdom-Brazil Dementia Workshop took place in the city of Belo Horizonte, State of Minas Gerais, Brazil, on July 25–27, 2019, with participation of researchers from both countries, and aimed to facilitate collaborative and creative solutions to address challenges in public perception of dementia, diagnosis and care management. This article summarizes the discussions from the workshop regarding challenges in the diagnosis of dementia, both in Brazil and in the United Kingdom (UK). We also provide some suggestions to overcome these barriers, with the goal of improving the assessment and recognition of dementia and reducing misdiagnosis.

With the fifth largest population in the world, Brazil faces extreme socioeconomic inequality. Rich, cosmopolitan metropolises deal with a very different reality than small, remote or indigenous communities regarding access to healthcare (both primary and specialist, tertiary care) and availability of diagnostic resources. Even in the largest cities, there are important inequalities, for example, when we compare peripheral areas to rich neighbourhoods. Though there are data on prevalence of dementia in the richer, southernmost regions of Brazil,<sup>1-3</sup> there is no information, i.e. population-based studies, for other regions. Due to this heterogeneity, approximately 77% of people with dementia are left undiagnosed in Brazil.<sup>4</sup> As a comparison, since 2015 two-thirds of individuals with dementia in the UK have had a formal diagnosis.<sup>5</sup> At the other end of the spectrum, misdiagnosis is also

a problem, as many individuals in Brazil receive an incorrect diagnosis of a cognitive disorder. There are guidelines for diagnosis, both in Brazil and in the UK,<sup>6,7</sup> yet they have not been converted into practice in the Brazilian public healthcare system.

Around 850,000 people are estimated to be living with dementia within the UK.<sup>8</sup> The UK Government and the National Health Service (NHS) have made dementia a priority and, since the first National Dementia Strategy was published in 2009, improvements have been demonstrated in both dementia services and funding into dementia research. An example thereof is the increase of diagnostic rates since the launch of a national policy.<sup>9</sup> Memory clinics are an essential part of this strategy, serving as the cornerstone of diagnosis for people with suspected dementia and as gatekeepers to treatment and post-diagnostic support. Access is usually restricted to referral. They have been around since the early 1980s and have spread ever since to a current number of 222 in England.<sup>10</sup> Memory clinics are also extremely important because the staff there have the most expertise; they are delivered by specialist multi-disciplinary teams and are usually led by a Psychiatrist or Neurologist specialized in old age. Nevertheless, the NHS is substantially stretched and psychiatric services are often hit the worst. The UK is currently facing a shortage of psychiatrists and the effect this will have on services is worrisome.

Besides that, waiting lists are often long, and for those who live in remote areas, access may not be feasible. It can, therefore, take a long time to reach a diagnosis of dementia, which is also an issue in Brazil. This should not always be viewed negatively, since a range of investigations needs to be carried out and differential diagnoses must be considered. In the UK, diagnosis and support of vascular dementia need particular improvement, since many patients are turned away from memory clinics if the cognitive decline is deemed vascular in aetiology, for example if they have a history of stroke. This is mainly due to the uncertainty regarding trajectory of vascular cognitive impairment.

### Challenges in the diagnosis of cognitive impairment and dementia in primary care

The General Practitioner (GP) plays a crucial role in the pathway to receiving a diagnosis, therefore it is sensible to start with the challenges faced in the primary care setting. In the UK, GPs are encouraged to identify dementia cases, but they are not considered responsible for making a formal diagnosis. Suspected cases are referred onto memory clinics, and the clinicians there make the diagnosis. Reversible causes of cognitive decline, such as infection, metabolic disorders or depression, should be investigated by the GP and ruled out before specialist referral is made. An incorrect label of dementia can cause both physical and psychological harm, so it is crucial that healthcare professionals are aware of common dementia mimics, including functional cognitive disorders, which are frequently seen by memory clinics. One study found that more than 50% of memory clinic attendees had a functional cognitive disorder rather than dementia.<sup>11</sup>

Diagnosis of rarer forms of dementia, for example non-amnesic presentations of Alzheimer's disease (AD), frontotemporal dementia, and primary progressive aphasia (PPA), can be especially delayed, since there are fewer healthcare professionals with experience in recognizing these conditions, and fewer specialist centres with expertise. Moreover, in the Brazilian public health care system the access to neuroimaging tools, particularly magnetic resonance imaging (MRI), is still limited to larger cities. Also, the disconnection between different levels of care needs to be improved. Since the process of receiving a diagnosis can be timely and involves numerous stages, it is important that patients and families are kept informed of the timelines, what investigations are taking place, and why they are happening.

### Challenges in screening

The problem with diagnosing dementia in Brazilian primary care starts at the very first step of memory complaints evaluation: cognitive screening. Medical appointments tend to have a very short duration in this setting, sometimes less than ten minutes, and must comprise all kinds of health issues, some of which are much more compelling than memory complaints. Even when the GP assesses cognition, the limited time makes detailed cognitive tests not doable, which makes shorter, simpler tests more suitable. However, health professionals in Brazil are usually not aware of different instruments for dementia screening and are not trained to perform them.

Appointment length is not so dissimilar within primary care in the UK, with duration also affecting feasibility of cognitive screening. A GP will usually have to see the patient over multiple appointments to gather collateral history, carry out cognitive screening and report back results of cognitive and blood tests. Cognitive test choice is ultimately down to the individual GP's preference. A recent survey found the three tests most commonly used by British GPs are the Mini-Mental State Examination (MMSE), GP Assessment of Cognition (GPCOG), and the 6-Item Cognitive Impairment Test (6CIT).<sup>12</sup>

In Brazil, the MMSE<sup>13</sup> is the most commonly used tool, as suggested by the Brazilian Ministry of Health Protocol for Alzheimer's Evaluation.<sup>14</sup> The use of MMSE, however, is not fully standardized, not only because of the lack of training, but also due to the frequent use of cultural adaptations. This happens with the aim to overcome differences between international samples and the Brazilian population (e.g. replacing "season" with "semester" or "time") and to reduce floor effects related to educational bias (e.g. serial additions of "5" instead of subtractions of "7" and spelling "Maria" backwards instead of "world").<sup>15</sup> Another problem with the MMSE is the big influence of education on the performance of patients and the different cut-points suggested in the literature.<sup>15</sup> Despite these limitations, the MMSE is useful for initial cognitive screening in Brazil.

Other common challenges which are not country-specific include testing individuals with sensory loss who forget to bring along their glasses/hearing aid, so it is crucial that healthcare professionals remind and stress the importance of bringing them to the appointment. Environmental factors also affect assessment. The importance of having a relaxed, quiet atmosphere is emphasized for an accurate, reliable cognitive assessment. A rushed GP appointment may therefore affect performance.

The best way to improve the screening of dementia in primary care is to establish protocols using simple and short tests. Tests should be standardized, regarding not only the method of evaluation, but also normative values. Ideally, the screening instruments should not be heavily influenced by educational level. After that, health professionals should be trained to choose and use the tests properly.

There are a number of tests available which can be administered in under ten minutes, for example some shortened versions of the Montreal Cognitive Assessment (MoCA) have been found to have high sensitivity, similar to that of the full scale.<sup>16</sup> Test choice should be informed by psychometric properties and the available

resources in the service one is referring onto. For example, highly sensitive tests are generally preferred (so that dementia cases are not missed); however, these come at a cost of lower specificity (more false positive cases). If this does not suit the service, then a test with a higher specificity may be preferred. Evidence-based guidance exists for test choice within a primary care setting.<sup>17</sup>

Informant-based assessments, such as the Informant Questionnaire on Cognitive Decline in the Elderly (IQCODE),<sup>18</sup> may also provide additional useful information, but are often overlooked both clinically and in research.<sup>19</sup> The questionnaire can be filled out by someone close to the patient to evaluate whether there has been any change in cognition over time. The ideal would be to have this information in addition to the patient's cognitive evaluation.

#### Who should screen and diagnose?

In the UK, cognitive screening is carried out by a range of healthcare professionals: physicians, nurses, occupational therapists, and psychologists. Although screening tests are designed for non-specialists, training should not be taken for granted. Ambiguous or incorrect scoring has been found both in clinical practice and research.<sup>20</sup> Formal diagnosis is usually made by specialists (geriatricians, neurologists or psychiatrists).

In Brazilian primary care, diagnosis of dementia rarely comes from a multi-disciplinary assessment, given that physicians are usually the only professionals trained to perform cognitive screening. Training other healthcare professionals to use screening instruments correctly is a feasible solution. Community health agents could also be a useful alternative, as they benefit from increased contact with the local population. Scales and interviews with proxies, such as the IQCODE,<sup>18</sup> could be administered by these agents. Moreover, simple and basic guidelines or flowcharts could be used to enable these professionals to raise suspicion of pathological aging and refer patients with memory complaints to specialists.

Another reason for underdiagnosis of dementia in Brazilian primary care is the lack of confidence of GPs to diagnose these conditions. Most physicians are not aware of the guidelines and protocols for evaluation and management of patients with memory complaints, such as the Brazilian Ministry of Health protocol.<sup>14</sup> On the other hand, there is little availability of specialists (neurologists, psychiatrists, geriatricians) in the public health system, particularly in smaller cities or in rural areas. Communication between GPs and specialist teams also needs to be improved. For some cases it

would be beneficial if GPs received more training and were able to take a greater role in providing a diagnosis of dementia. For patients in remote areas unable to attend to see their GP or attend specialist appointments, telemedicine consultations should be considered. There are cognitive screening tests specifically developed to be delivered over the telephone, for example the Telephone Interview for Cognitive Status (TICS).<sup>21</sup>

#### Challenges in diagnosis of cognitive impairment and dementia in populations with low education and immigrants

Although low education level is not considered a common issue in the UK, the increase of immigration in the past few years has raised concern about the development and diagnosis of dementia in adverse socioeconomic situations. Healthcare professionals are usually not capable of interpreting cultural norms or preferences and may not acknowledge differences both between and within immigrant groups, thus jeopardizing diagnosis and management of these patients.<sup>22</sup> As a consequence, individuals from minority ethnic groups tend to be diagnosed later and are less likely to receive medications for dementia.<sup>23,24</sup>

Low education and poverty are among the greatest challenges in the Brazilian population. Patients in these categories not only have a higher risk of developing dementia, but also have poorer access to health services and diagnostic tests. They also face geographical obstacles, as proper healthcare rarely arrives in remote places, such as the indigenous communities in the Amazon or the poorer towns in the semi-arid region of the Brazilian Northeast. Similar issues are still present within the UK in areas with a lower socioeconomic status, but on a much smaller scale than that of Brazil.

Most of the studies regarding dementia in low education patients were performed in developed countries, where individuals with less than five years of formal study are rare. Hence, there is little evidence on how to properly diagnose these patients. The most commonly used screening tools, such as the MMSE and the MoCA, are influenced by educational level and may yield a high number of incorrect diagnoses. There are some tools devised to solve this problem, such as the Rowland Universal Dementia Assessment Scale (RUDAS),<sup>25</sup> which has been shown to have high specificity across cultures in immigrant populations and to be less affected by education and language than the MMSE.<sup>26</sup> Some of the classic screening tools also have versions to test individuals with low education, such as the MoCA-Basic test.<sup>27</sup> Another option is the Brief Cognitive Battery (BCB),<sup>28</sup> which is also not significantly influenced by education

and has been used by different groups in Brazil and in other Latin-American countries.

The first step to diagnose dementia among immigrants and people with low education is to recognize the important cultural peculiarities that may serve as a barrier in these populations. As an important example, some people in Brazil and in immigrant communities in the UK may understand symptoms of dementia as a religious (sometimes even as a punishment) or a pejorative issue, thus delaying help-seeking and treatment.<sup>29</sup> Community agents may play a pivotal role in this context, as they generally belong to the same population as the patients they assess and tend to have a better understanding of their cultural particularities than a physician.

Education and training of health professionals is a priority, particularly to recognize dementia in individuals with low cognitive demand. The most common screening methods have important limitations, so that it is very important that providers are aware of the different cut-points and of instruments less affected by education. It is also essential to raise dementia awareness amongst the general population, so people know when they should seek help. This can be done through soap operas, social networks or national campaigns, ideally with simple, straightforward messages.

#### Clinical vs. biological approach of dementia

In recent years, the emergence of cerebrospinal fluid (CSF) and neuroimaging biomarkers has shifted the definition of dementia from a clinical to a biological perspective.<sup>30</sup> This change of framework has been suggested only for research purposes and not yet for clinical use, as there is currently no specific treatment affecting the molecular basis of AD. Nevertheless, the availability of biomarkers is already changing the way physicians treat patients with suspected AD. More concretely, the IDEAS Study<sup>31</sup> showed that the use of amyloid imaging with positron emission tomography (PET) was associated with changes in the clinical management of patients with mild cognitive impairment (MCI) and dementia, even though there is still no evidence that current Alzheimer drugs are more efficient in patients with positive biomarkers.

It is still too early to presume the impact of this change of paradigm in public health. The biological definition of AD will substantially increase diagnosis, including asymptomatic individuals with pre-clinical disease.<sup>32</sup> This might be an opportunity to intervene in early phases of dementia when targeted disease-modifying treatment for AD are available. Until this happens,

however, the high prices of AD biomarkers make their cost-effectiveness debatable, particularly in low- and middle-income countries. More importantly, the evidence supporting biomarker-based diagnosis is not yet definitive.<sup>33</sup> Labelling healthy individuals with AD pathology as having the disease even though they may never develop cognitive impairment<sup>33</sup> would significantly raise healthcare expenses, expose individuals to adverse effects of treatment and have important legal implications.<sup>34</sup>

The Brazilian protocol for diagnosis of dementia<sup>14</sup> suggests that the basic evaluation of patients with memory complaints should include neuroimaging — either computed tomography (CT) scan or MRI — and blood tests for exclusion of reversible dementias. Nevertheless, it may take several months for patients in public health to get a simple brain CT scan and even longer to get an MRI. In Brazil, AD biomarkers analysis is currently restricted to research centres in universities or private clinics. Most of the patients who would benefit from such testing (i.e. early onset, atypical presentations), however, do not have access to these centres or cannot afford their high cost. In the UK, CT scans are organized by the memory clinic. Beyond this, further imaging is generally only recommended where symptoms are rapidly progressing or where diagnosing a dementia subtype is considered beneficial and knowledge of this would change management. Therefore, they are not routinely undertaken.

Interpretation of AD biomarkers is still a problem, since there may be significant differences between methods and techniques. Moreover, there is a concern that misinterpretation of these tests might increase the prevalence of false diagnosis, particularly if they are taken out of clinical context. We suggest that such tests should only be asked and interpreted by specialists.

Another relatively new tool in dementia diagnosis are genetic tests. Genetic tests might be useful for the diagnosis of hereditary forms of dementia or to recognize high-risk individuals. This kind of evaluation is still restricted to some university centres and major cities and are not available in the public health system. In order to avoid misdiagnosis, we also believe that only specialists should require such testing.

#### How does the diagnosis affect the patient and the family? Diagnostic disclosure and stigma issues

In a systematic review comprising studies of several countries, more than 90% of individuals without cognitive impairment are in favour of diagnostic disclosure, as opposed to 85% of patients with memory issues.<sup>35</sup> In



the UK, once someone has received investigations and specialist input, they would rarely request a diagnosis to be withheld. In Brazil, however, the view is traditionally different. Family members and caregivers often ask physicians to not reveal the diagnosis to the patients: only 58% of relatives of patients with dementia in Brazil are in favour of diagnostic disclosure, though 90% of them would like to be aware of the diagnosis.<sup>36</sup> Moreover, only 45% of Brazilian medical specialists who commonly diagnose and treat individuals with dementia reported that they regularly disclose the diagnosis to patients.<sup>37</sup> The Brazilian guideline suggests that the approach on this issue should be individualized and should take into account cultural, regional and individual factors.<sup>6</sup>

Part of this interesting phenomenon can be explained by the stigma of dementia. In Brazil, cognitive decline is often viewed as a normal part of aging. People avoid saying “dementia” or “Alzheimer’s” aloud due to its negative connotations. As pointed before, some view it as a pejorative concept. Most individuals also have little or no knowledge about the progression of dementia, what to expect and what can be done to mitigate the problems to come. Stigma seems to be worse among high-income families, that would sometimes feel

ashamed and hide the condition from other people, as opposed to lower-income families, that frequently depend on a network of relatives, friends, and neighbours to solve their problems, e.g. to take care of the patient.

Stigma can only be tackled through education. It is essential to raise awareness of dementia in the general population, in order to reduce false preconceptions. The media and public figures are invaluable in achieving this goal. Health professionals need to be trained as well to adapt their approach to patients and families according to individual cultural idiosyncrasies that may lead to inaccurate perceptions of the disease. Most importantly, the provider needs to thoroughly explain the degenerative nature of dementia and what to expect in the years to come.

**Recommendations**

There are several challenges to ensure timely and accurate diagnosis to the majority of patients with dementia (Table 1), yet some of them may be overcome through training (Box 1). It is vital to train healthcare professionals to recognize signs of pathological aging, to know which screening methods to

**Table 1.** Challenges of dementia diagnosis in the United Kingdom (UK) and Brazil.

UK	Brazil
Long waiting lists to attend memory clinics	Memory clinics restricted to universities
Shortage of staffing, especially psychiatrists and psychologists	No National dementia strategy plan
Insufficient funding	Poor access to neuroimaging
Short appointment length in primary care	Short appointment length in primary care
Insufficient training for non-specialists	Non-specialists rarely perform cognitive screening
Minority ethnic groups and immigrants tend to be diagnosed later	Limitations in the diagnosis of dementia in low education patients
Stigma of dementia patients and their families	Stigma of dementia patients and their families

**Box 1.** Recommendations to address challenges in diagnosis.

Screening protocols with simple and short tests
Training healthcare professionals to accurately perform cognitive screening
Training GPs to diagnose patients with dementia
Enable community health agents to recognize signs of cognitive decline
Telemedicine consultations could improve access to specialists
Training healthcare professionals to recognize cultural peculiarities of immigrant communities
Use of screening methods less affected by education
Raise dementia awareness amongst the general population, through soap operas, social networks or national campaigns
AD biomarkers and genetic tests should only be interpreted by specialists
Reduce stigma by improving communication between provider and patients/families

GP: general practitioner, AD: Alzheimer’s disease.

use and how to apply them. They also need to know how to approach patients with different cultural backgrounds and how to reduce stigma by properly instructing patients and their families at the time of diagnosis.

Community agents should be viewed as a key part of the efforts to improve dementia diagnosis and care. These professionals are usually from the same neighbourhoods as the patients to whom they attend and share similar cultural characteristics. If properly trained, they can help the dementia screening process by recognizing memory complaints and may serve as a link to ease the communication between patients with low education or from specific backgrounds (e.g. immigrants) and health care professionals.

There are undoubtedly many structural flaws in Brazilian health care, given the financial situation of the country and its vast dimensions. However, we have good examples to follow, such as the *Mais Vida* Program, in the state of Minas Gerais, which aims to ease access to health care for the elderly population by creating smaller centres with specialized professionals.<sup>38</sup> Another interesting model happens in the UK, where charities and private organizations play an important role in the diagnosis and in the follow-up of individuals with dementia.

Most of the challenges in dementia diagnosis faced in Brazil may be reduced by a long-awaited national

plan, focused on the improvement of diagnosis and raising awareness of dementia. This is further justified since challenges faced by the UK have improved after implementing such a plan. It could also set a framework for quality outcomes, including acceptable waiting times for diagnostic tests or for evaluation by a specialist.

## ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank all other workshop attendees who contributed to the discussion (in alphabetical order): Marcus Vinicius Alves, Tamara Backhouse, Janine Bonfadini, Lucas de Carvalho, Francine Casemiro, Milena Contreras, Raquel da Costa, Helen Durgante, Michelle Ferreira, Abi Hall, Emma Hooper, Angélique Mavrodaris, Deborah Oliveira, Debora Paulo, Natalie Pereira, Larissa Serelli, Keir Yong. The workshop was co-chaired by international mentors (in alphabetical order): Maira Tonidandel Barbosa, Paulo Caramelli, Michael Hornberger, Naoko Kishita, Eneida Mioshi and Leonardo Cruz de Souza.

**Author' contributions.** VC, EE, WVB, BJAPB, JB, FOS, LGMC, LIM and ND: conceptualization, visualization and writing. MH and PC: conceptualization, visualization, writing, supervision and funding acquisition.

## REFERENCES

- Nitrini R, Caramelli P, Herrera E Jr, Bahla VS, Cabeta LF, Radanovic M, et al. Incidence of dementia in a community-dwelling Brazilian population. *Alzheimer Dis Assoc Disord*. 2004;18(4):241-8.
- Bottino CM, Azevedo D Jr, Tatsch M, Hototian SR, Moscoso MA, Folquitto J, et al. Estimate of dementia prevalence in a community sample from São Paulo, Brazil. *Dement Geriatr Cogn Disord*. 2008;26(4):291-9. <https://doi.org/10.1159/000161053>
- Chaves ML, Camozzato AL, Godinho C, Plazenski I, Kaye J. Incidence of mild cognitive impairment and Alzheimer disease in Southern Brazil. *J Geriatr Psychiatry Neurol*. 2009;22(3):181-7. <https://doi.org/10.1177/0891988709332942>
- Nakamura AE, Opaleye D, Tani G, Ferr CP. Dementia underdiagnosis in Brazil. *Lancet*. 2015;385(9966):418-9. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)00153-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)00153-2)
- Baker C, Jarrett T, Powell T. Dementia: policy, services and statistics. London: House of Commons Library; 2019.
- Frota NAF, Nitrini R, Damasceno BP, Forienza OV, Dias-Tosta E, da Silva AB, et al. Criteria for the diagnosis of Alzheimer's disease: recommendations of the Scientific Department of Cognitive Neurology and Aging of the Brazilian Academy of Neurology. *Dement Neuropsychol*. 2011;5(3):146-52. <http://dx.doi.org/10.1590/S1980-57642011DN05030002>
- National Institute for Health and Care Excellence. Dementia: assessment, management and support for people living with dementia and their carers. London: National Institute for Health and Care Excellence; 2018.
- Prince M, Knapp M, Guerchet M, McCrone P, Prina M, Comas-Herrera A, et al. Dementia UK: Update. 2<sup>nd</sup> ed. London: King's College London and the London School of Economics for the Alzheimer's Society; 2014.
- Mukadam N, Livingston G, Rantell K, Rickman S. Diagnostic rates and treatment of dementia before and after launch of a national dementia policy: an observational study using English national databases. *BMJ Open*. 2014;4(1):e004119. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2013-004119>
- Hodge S. Second English National Memory Clinic Audit Report. London: Royal College of Psychiatrists, Department of Health; 2015.
- Bharambe V, Lamer AJ. Functional cognitive disorders: memory clinic study. *Prog Neurol Psychiatry*. 2018;22(3):19-22. <https://doi.org/10.1002/prp.509>
- Tong T, Thokala P, McMillan B, Ghosh R, Brazier J. Cost effectiveness of using cognitive screening tests for detecting dementia and mild cognitive impairment in primary care. *Int J Geriatr Psychiatry*. 2017;32(12):1392-400. <https://doi.org/10.1002/gps.4626>
- Folstein MF, Folstein SE, McHugh PR. "Mini-mental state". A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *J Psychiatr Res*. 1975;12(3):129-138. [https://doi.org/10.1016/0022-3956\(75\)90026-6](https://doi.org/10.1016/0022-3956(75)90026-6)
- Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Portaria conjunta no 13, de 28 de novembro de 2017. Aprova o Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas da Doença de Alzheimer. Brasília: Ministério da Saúde; 2017. p. 1-31.
- Santiago-Bravo G, Sudo FK, Assunção N, Drummond C, Mattos P. Dementia screening in Brazil: a systematic review of normative data for the mini-mental state examination. *Clinics (Sao Paulo)*. 2019;74:e971. <https://doi.org/10.6061/clinics/2019/e971>
- McDicken JA, Elliott E, Blayney G, Makin S, All M, Lamer AJ, et al. Accuracy of the short-form Montreal Cognitive Assessment: Systematic review and validation. *Int J Geriatr Psychiatry*. 2019;34(10):1515-25. <https://doi.org/10.1002/gps.5162>

17. Janssen J, Koekkoek PS, Mol van Charante EP, Jaap Kappelle L, Blesels GJ, Rutten GE. How to choose the most appropriate cognitive test to evaluate cognitive complaints in primary care. *BMC Fam Pract*. 2017;18(1):101. <https://doi.org/10.1186/s12875-017-0675-4>
18. Jorm AF, Korten AE. Assessment of cognitive decline in the elderly by Informant Interview. *Br J Psychiatry*. 1988;152:209-13. <https://doi.org/10.1192/bjp.152.2.209>
19. Harrison JK, Stolt DJ, McShane R, Noel-Storr AH, Swann-Price RS, Quinn TJ. Informant Questionnaire on Cognitive Decline in the Elderly (IQCODE) for the early diagnosis of dementia across a variety of healthcare settings. *Cochrane Database Syst Rev*. 2016;11(11):CD011333. <https://doi.org/10.1002/14651858.cd011333.pub2>
20. Cannon P, Larner AJ. Errors in the scoring and reporting of cognitive screening instruments administered in primary care. *Neurodegener Dis Manag*. 2016;8(4):271-6. <https://doi.org/10.2217/nmt-2016-0004>
21. Fong TG, Fearing MA, Jones RN, Shi P, Marcantonio ER, Rudolph JL, et al. Telephone Interview for cognitive status: Creating a crosswalk with the Mini-Mental State Examination. *Alzheimers Dement*. 2009;5(6):492-7. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2009.02.007>
22. Sagbakken M, Spilker RS, Nielsen TR. Dementia and immigrant groups: a qualitative study of challenges related to identifying, assessing, and diagnosing dementia. *BMC Health Serv Res*. 2018;18(1):910. <https://doi.org/10.1186/s12913-018-3720-7>
23. Cooper C, Tandy AR, Balamurali TBS, Livingston G. A systematic review and meta-analysis of ethnic differences in use of dementia treatment, care, and research. *Am J Geriatr Psychiatry*. 2010;18(3):193-203. <https://doi.org/10.1097/jgp.0b013e3181b19caf>
24. Livingston G, Sommerlad A, Orgeta V, Costafreda SG, Huntley J, Ames D, et al. Dementia prevention, intervention, and care. *Lancet*. 2017;390(10113):2673-734. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)31363-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)31363-6)
25. Storey JE, Rowland JTJ, Basic D, Conforti DA, Dickson HG. The Rowland Universal Dementia Assessment Scale (RUDAS): a multicultural cognitive assessment scale. *Int Psychogeriatr*. 2004;16(1):13-31. <https://doi.org/10.1017/s1041610204000043>
26. Naqvi RM, Halder S, Tomlinson G, Alibhai S. Cognitive assessments in multicultural populations using the Rowland Universal Dementia Assessment Scale: a systematic review and meta-analysis. *CMAJ*. 2015;187(5):E169-75. <https://doi.org/10.1503/cmaj.140802>
27. Julayanont P, Tangwongchal S, Hemmungsorn S, Tunvirachalsakul C, Phanthurachinda K, Hongsawat J, et al. The Montreal Cognitive Assessment-Basic: a screening tool for mild cognitive impairment in illiterate and low-educated elderly adults. *J Am Geriatr Soc*. 2015;63(12):2550-4. <https://doi.org/10.1111/jgs.13820>
28. Nitrini R, Lefevre BH, Mathias SC, Caramelli P, Carrilho PEM, Sawata N, et al. Testes neuropsicológicos de aplicação simples para o diagnóstico de demência. *Arq Neuro-Psiquiatr*. 1994;52(4):457-65. <http://dx.doi.org/10.1590/S0004-282X1994000400001>
29. Blakemore A, Kenning C, Mirza N, Daker-White G, Panagioti M, Waheed W. Dementia in UK South Asians: a scoping review of the literature. *BMJ Open*. 2018;8(4):e020290. <http://dx.doi.org/10.1136/bmjopen-2017-020290>
30. Jack CRJ, Bennett DA, Blennow K, Carrillo MC, Dunn B, Haeberlein SB, et al. NIA-AA Research Framework: toward a biological definition of Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement*. 2018;14(4):535-62. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2018.02.018>
31. Rabhnowid GD, Gatsoris C, Appgar C, Chaudhary K, Gareen I, Hanna L, et al. Association of amyloid positron emission tomography with subsequent change in clinical management among Medicare beneficiaries with mild cognitive impairment or dementia. *JAMA*. 2019;321(13):1286-94. <https://doi.org/10.1001/jama.2019.2000>
32. Jack Jr CR, Thomas TM, Wiegand SD, Wiste HJ, Knopman DS, Vemuri P, et al. Prevalence of biologically vs clinically defined Alzheimer spectrum entities using the National Institute on Aging-Alzheimer's Association research framework. *JAMA Neurol*. 2019;76(10):1174-83. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2019.1971>
33. McCleery J, Flicker L, Richard E, Quinn TJ. When Is Alzheimer's not dementia-Cochrane commentary on The National Institute on Aging and Alzheimer's Association Research Framework for Alzheimer's Disease. *Age Ageing*. 2019;48(2):174-7. <https://doi.org/10.1093/ageing/aty167>
34. Langa KM, Burke JF. Preclinical Alzheimer disease-early diagnosis or overdiagnosis? *JAMA Intern Med*. 2019;179(9):1161-2. <https://doi.org/10.1001/jamainternmed.2019.2629>
35. van den Dungen P, van Kulk L, van Marwijk H, van der Wouden J, van Charante EM, van der Horst H, et al. Preferences regarding disclosure of a diagnosis of dementia: a systematic review. *Int Psychogeriatr*. 2014;26(10):1603-18. <https://doi.org/10.1017/s1041610214000969>
36. Shimizu MM, Raicher I, Takahashi DY, Caramelli P, Nitrini R. Disclosure of the diagnosis of Alzheimer's disease: caregivers' opinions in a Brazilian sample. *Arq Neuro-Psiquiatr*. 2008;66(3E):625-30. <https://doi.org/10.1590/s0004-282x2008000500004>
37. Raicher I, Shimizu MM, Takahashi DY, Nitrini R, Caramelli P. Alzheimer's disease diagnosis disclosure in Brazil: a survey of specialized physicians' current practice and attitudes. *Int Psychogeriatr*. 2008;20(3):471-81. <https://doi.org/10.1017/s1041610207005819>
38. Secretaria de Estado de Saúde de Minas Gerais. Programa Mais Vida. 2011 [accessed on Feb. 01, 2020]. Available at: <http://www.saude.mg.gov.br/clevsminas/page/320-programa-mais-vida-seemg>