

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE:  
CARDIOLOGIA E CIÊNCIAS CARDIOVASCULARES**

**TESE DE DOUTORADO**

**Associação de fatores de risco cardiovascular e  
polimorfismo de apoE com mortalidade em idosos longevos:  
uma coorte de 18 anos**

**Aluna: Lilian Vivian**

**Orientador: Prof. Emilio Hideyuki Moriguchi, MD, PhD**

**Porto Alegre, dezembro de 2012.**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE:  
CARDIOLOGIA E CIÊNCIAS CARDIOVASCULARES**

**LILIAN VIVIAN**

**Associação de fatores de risco cardiovascular e  
polimorfismo de apoE com mortalidade em idosos longevos:  
uma coorte de 18 anos**

**Orientador: Prof. Emilio Hideyuki Moriguchi, MD, PhD**

**Tese apresentada como pré-requisito para obtenção do título de Doutora em Ciências da Saúde - Cardiologia e Ciências Cardiovasculares, na Universidade Federal do Rio Grande do Sul.**

**Porto Alegre, dezembro de 2012.**

***Dedico este trabalho aos longevos de Veranópolis  
e aos seus descendentes.***

## AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Professor Emilio Hideyuki Moriguchi, por ser meu maior exemplo acadêmico, e mostrar-me, nas suas atitudes cotidianas, que a humildade é o maior sinal de sabedoria.

À Neide Maria Bruscato, coordenadora dos Estudos da Longevidade em Veranópolis, que foi essencial no meu amadurecimento científico, especialmente, na pesquisa clínica com sua postura altamente produtiva e ética. Obrigada de forma particular à sua amizade incondicional.

Aos Profs. Paulo Caleb Júnior de Lima Santos e Alexandre da Costa Pereira do Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular do Instituto do Coração (InCor-HC/FMUSP) pela acolhida e parceria generosa nos exames de genotipagem da apoE.

À Sirlei, secretária do PPG em Ciências da Saúde (Cardiologia e Ciências Cardiovasculares), pela simpatia e o bom humor jovial aos alunos e ao tratar as questões burocráticas.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo incentivo à pesquisa na forma de provimento da bolsa de doutorado.

Aos idosos de Veranópolis e suas famílias pelas acolhidas carinhosas, singelas e espontâneas, essenciais para avigorar o prosseguimento da pesquisa de campo.

À minha família, especialmente à minha mãe Zenaide, pelo amor e pelos sacrifícios para que eu tivesse a melhor educação.

Ao meu esposo, Diogo, pelo amor, carinho e muita paciência. Espero poder sempre retribuir o teu cuidado e amor.

À minha filha, Heloisa, por revigorar minhas forças durante esta caminhada e ser a maior e melhor conquista da minha vida.

Agradeço a Deus, por colocar no meu caminho pessoas amorosas e pelo dom da vida.

## SUMÁRIO

<b>RESUMO .....</b>	<b>vi</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS .....</b>	<b>vii</b>
<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>2 HIPÓTESE .....</b>	<b>3</b>
<b>3 OBJETIVOS .....</b>	<b>3</b>
<b>4 METODOLOGIA .....</b>	<b>4</b>
4.1 População Investigada .....	4
4.2 Tamanho Amostral.....	5
4.3 Variáveis.....	5
4.4 Análise Estatística.....	9
<b>5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>11</b>
<b>6 ARTIGO ORIGINAL EM INGLÊS .....</b>	<b>16</b>
<b>7 ARTIGO ORIGINAL EM PORTUGUÊS .....</b>	<b>33</b>
<b>ANEXO 1 – INSTRUMENTO DE PESQUISA: ENTREVISTA .....</b>	<b>51</b>
<b>ANEXO 2 – INSTRUMENTO DE PESQUISA: EXAME FÍSICO .....</b>	<b>62</b>
<b>ANEXO 3 – INSTRUMENTO DE PESQUISA: B-ADL .....</b>	<b>65</b>

## RESUMO

**Contexto:** Doenças crônicas como as cardiovasculares e demências são mais frequentes na população idosa, especialmente na faixa etária acima dos 80 anos. Apesar desta evidência, são poucos os estudos delineados com indivíduos longevos. E frequentes são os resultados indefinidos ou inversos quando avaliados. Esta lacuna no conhecimento é dificultada pela complexidade de fatores ambientais e genéticos que influenciam a progressão das doenças crônicas. Especificamente, os níveis de pressão arterial e colesterol e o alelo  $\epsilon 4$  da apolipoproteína E (apoE) tem efeitos divergentes nos idosos longevos comparados aos idosos jovens. O objetivo deste estudo é investigar a relação entre o polimorfismo do gene da apoE e a mortalidade por doença cardiovascular e demência em idosos longevos que vivem em comunidade e avaliar a sobrevida de acordo com este polimorfismo e fatores de risco cardiovascular.

**Métodos:** Uma amostra de 74 idosos com 80 anos ou mais da coorte do Projeto Veranópolis foi selecionada para genotipagem da apoE. Na linha de base, foram coletadas variáveis antropométricas, dosagens sanguíneas de glicose e lipídeos, pressão arterial e variáveis de estilo de vida como tabagismo, consumo de álcool e atividade física. O seguimento médio da coorte foi 16,4 anos e total de 18 anos. As causas de morte foram classificadas de acordo com a CID-10 em cardiovasculares e demenciais. A Escala Bayer de Atividades da Vida Diária foi aplicada aos cuidadores dos idosos para avaliar demência. A sobrevida dos portadores dos genótipos da apoE foi comparada através do método de estimação da curva por Kaplan-Meier e o modelo de azares proporcional da Regressão de Cox foi utilizado na descrição dos fatores associados à mortalidade geral.

**Resultados:** A frequência gênica da apoE presente na amostra foi: 4,1%  $\epsilon 2$ ; 85,1%  $\epsilon 3$  e 10,8%  $\epsilon 4$ . E a frequência genotípica: 1,4% E2E2; 5,4% E2E3; 71,6% E3E3 e 21,6% E3E4. Para a comparação dos desfechos foram formados 2 grupos: portadores do genótipo apoE3E3 (53 idosos) e portadores do genótipo apoE3E4 (16 idosos). A expectativa de vida média foi de 92,3 anos (IC95% 91,2-93,5). Diferenças significativas entre os genótipos foram encontradas com relação à idade média de entrada na coorte, índice de massa corporal e pressão arterial diastólica. Encontramos uma tendência para que os níveis de colesterol total e LDL-colesterol fossem maiores no grupo E3E4. Não encontramos associação entre desfechos de morbidade (AVC, IAM e ICC) ou mortalidade entre os genótipos. Para a amostra no geral, os fatores significativamente associados à mortalidade foram: tabagismo, atividade física, pressão arterial sistólica (PAS), pressão de pulso (PP) e *diabetes mellitus*. O risco de morte em indivíduos fumantes e ex-fumantes foi 2,83 vezes (IC95% 1,00-7,98) do risco em não fumantes. Indivíduos que praticavam atividade física vigorosa ( $\geq 4.000$  kcal/semana) tiveram uma redução no risco de óbito em 54% (IC95% 10%-77%). Para o aumento de 1mmHg na PAS ou na PP houve uma redução de 2% (IC95% 1%-3%) no risco de morte. Os idosos diabéticos tiveram 3,43 (IC95% 1,03-11,50) vezes o risco de óbito dos não diabéticos.

**Conclusão:** Não foi encontrada associação entre os dois genótipos da apoE mais frequentes na população e mortalidade cardiovascular ou sobrevida em idosos longevos. Em toda a amostra, os fatores de risco significativamente associados à mortalidade foram tabagismo e *diabetes mellitus*. Atividade física vigorosa, PAS e PP maiores foram considerados fatores de proteção para mortalidade geral.

**Palavras-chave:** Apolipoproteína E4, Doenças Cardiovasculares, Fatores de Risco, Análise de Sobrevida, Mortalidade, Idoso de 80 Anos ou mais.

## LISTA DE ABREVIATURAS

ApoE	Apolipoproteína E
AVC	Acidente Vascular Cerebral
B-ADL	<i>The Bayer - Activities of Daily Living Scale</i>
CID-10	Décima Revisão da Classificação Estatística Internacional de Doenças e Problemas Relacionados à Saúde
CT	Colesterol Total
DA	Doença de Alzheimer
DCV	Doença Cardiovascular
DM	<i>Diabetes Mellitus</i>
HDL	<i>High-Density Lipoprotein</i>
HR	<i>Hazard Ratio</i>
HYVET	<i>Hypertension Very Elderly Trial</i>
IAM	Infarto Agudo do Miocárdio
ICC	Insuficiência Cardíaca Congestiva
IL-6	Interleucina-6
IMC	Índice de Massa Corporal
LDL	<i>Low-Density Lipoprotein</i>
METs	<i>Metabolic Equivalents</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
PA	Pressão Arterial
PAD	Pressão Arterial Diastólica
PAS	Pressão Arterial Sistólica
PCR	Proteína C Reativa
PP	Pressão de Pulso
TG	Triglicerídeos

## 1 INTRODUÇÃO

O rápido crescimento da população idosa em todo o mundo desperta o interesse e a necessidade de estudos sobre os fatores para alcançar uma longevidade com qualidade de vida. Dados de mortalidade em idosos com mais de 80 anos mostram que as doenças cardiovasculares (DCV) representam metade das causas de óbito<sup>1</sup>. Sustenta-se que pesquisas que determinem um padrão de risco cardiovascular para esse grupo etário são fundamentais, tanto para a prevenção como o manejo dos mesmos riscos.

Apesar da frequência de doenças crônicas, como as cardiovasculares ou demências, aumentarem com a idade, idosos acima dos 80 anos, em geral, são excluídos dos estudos bem controlados ou são analisados como subgrupos. Quando incluídos surgiram resultados diferentes dos encontrados para idosos jovens (60 a 74 anos), como maior mortalidade associada à diminuição da pressão diastólica<sup>2</sup> ou da pressão sistólica<sup>3,4</sup> e à redução do colesterol<sup>5</sup>. No entanto, outros fatores de risco como tabagismo<sup>6</sup> e *diabetes mellitus* (DM)<sup>7</sup> tiveram associação semelhante mesmo em idades mais avançadas. De outra forma, um fator genético extensamente estudado, o polimorfismo da apolipoproteína E (apoE), mais especificamente o alelo  $\epsilon 4$ , mostrou-se como fator de risco para demência de Alzheimer em adultos e idosos jovens<sup>8,9</sup>. Entretanto, resultados de uma coorte específica de idosos longevos identificaram um efeito paradoxal do alelo  $\epsilon 2$  da apoE associado a um aumento da Doença de Alzheimer (DA) por critérios neuropatológicos *post mortem*<sup>10</sup>. Resultado que remete, novamente, às particularidades da idade anciã e ao respaldo para a pesquisa científica especificamente na faixa etária acima dos 80 anos.

O polimorfismo do éxon 4 é o mais comum do gene da apoE, sendo referido inicialmente por Utermann e colaboradores no final da década de 1970<sup>11-13</sup>. Evolutivamente, surgiram algumas mutações no gene codificador da apoE, que está localizado no cromossomo 19. Essas mutações fazem parte, atualmente, do *pool* do genoma humano, resultando em genes com pequenas variações, ou alelos. Em humanos, existem três principais isoformas da apoE (apoE2, apoE3 e apoE4) que são codificadas por três alelos ( $\epsilon 2$ ,  $\epsilon 3$  e  $\epsilon 4$ , respectivamente), os quais têm em comum um mesmo *locus* no gene<sup>14</sup>. As isoformas protéicas produzidas por esses alelos diferem na composição de aminoácidos nas posições 112 e/ou 158: a isoforma apoE2 possui o aminoácido cisteína nas duas posições da proteína (aminoácidos 112 e 158), a apoE3 tem uma cisteína na posição 112 e uma arginina na 158, enquanto que a isoforma apoE4 possui argininas nestas duas posições<sup>15</sup>.

A apoE é parte constituinte das lipoproteínas de alta densidade (HDL - *high-density lipoprotein*), de densidade muito baixa (VLDL - *very low-density lipoprotein*) e de quilomícrons, além dos produtos de lipólise, como remanescentes de quilomícrons e lipoproteína de densidade



intermediária (IDL – *intermediate-density lipoprotein*)<sup>16,17</sup>. A principal função da apoE é mediar a interação das lipoproteínas que contêm apoE com os receptores de lipoproteínas, que inclui o receptor de LDL e o receptor LRP (*LDL receptor related protein*) que é específico para a apoE<sup>17,18</sup>. No entanto, a afinidade da apoE pelos receptores hepáticos, que em última análise resulta na captação por endocitose da lipoproteína, está relacionada, em grande parte, às interações dos aminoácidos das posições 112 e 158 da apoE no sítio de ligação<sup>15,19</sup>. Portanto, o polimorfismo da apoE modifica a proteína tanto na sua estrutura quanto na sua função. As várias combinações possíveis de dois dos três alelos principais podem dar origem a seis genótipos: apoE2/E2, apoE3/E3, apoE4/E4, apoE2/E3, apoE3/E4 e apoE2/E4. A frequência gênica (alelos) e a genotípica nas diferentes populações mundiais são altamente variáveis<sup>20,21</sup>. A revisão epidemiológica feita por Eichner e colaboradores<sup>21</sup> demonstrou esta variabilidade étnica ao descrever as frequências gênicas dos alelos  $\epsilon$ 2,  $\epsilon$ 3 e  $\epsilon$ 4: na população africana da Nigéria (2,8; 66,2 e 31,0%, respectivamente), na população caucasiana da Itália (7,3; 82,7 e 10,0%) e entre os japoneses (3,7; 84,6 e 8,2%). Adicionalmente, o polimorfismo da apoE tem sido relacionado a modificações significativas no perfil das lipoproteínas<sup>22,23</sup>, assim como na incidência de diferentes patologias incluindo DCV<sup>23-30</sup>, DA<sup>8,31,32</sup>, demência vascular<sup>33,34</sup> e diferentes tipos de neoplasias<sup>35-38</sup>. Logo, os estudos com populações de homogeneidade étnica são essenciais para descrever desfechos que possam ser influenciados pelas características genéticas<sup>31</sup>.

Novamente, idosos longevos parecem ter um perfil de risco diferente das pessoas mais jovens e o papel preditivo dos fatores de risco clássicos não é claro<sup>39-41</sup>. Estudos de metanálises mostraram que os portadores do alelo  $\epsilon$ 4 da apoE apresentam maior risco de DCV<sup>30,42</sup> precoce e demência de Alzheimer<sup>43</sup> comparados aos portadores do genótipo de referência apoE3E3. No entanto, não existem estudos que indiquem se esta associação se mantém na faixa etária dos longevos. Entendemos que investigações que determinem um padrão de risco cardiovascular ou demencial para todas as faixas etárias são fundamentais, tanto para a prevenção como para o manejo dos mesmos riscos.

## **2 HIPÓTESE**

Idosos com mais de 80 anos portadores do alelo  $\epsilon 4$  da apoE teriam um risco aumentado de morte por doenças crônicas, como as de causa cardiovascular e demencial, quando comparados a portadores do genótipo de referência apoE3E3.

## **3 OBJETIVOS**

- 3.1 Investigar a relação entre o polimorfismo do éxon 4 da apoE e a morte relacionada à demência ou DCV, em indivíduos longevos;
- 3.2 Descrever a sobrevida de idosos longevos conforme os genótipos da apoE;
- 3.3 Descrever a sobrevida de idosos longevos conforme a exposição a fatores de risco cardiovascular clássicos.

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 População Investigada

Durante a década de 1990, existiam informações não oficiais de que a cidade de Veranópolis, localizada numa região montanhosa ao sul do Brasil e, cuja população descendia de imigrantes europeus, em sua maioria de origem italiana, teria uma das maiores expectativas de vida do país. Este índice foi confirmado, oficialmente, através de dados de recontagem populacional e da mortalidade do Departamento de Informática do SUS, que estimou uma longevidade média de 77,7 anos em Veranópolis, ao passo que, no mesmo período, a expectativa média de vida no Brasil foi de 68,1 anos<sup>44</sup>.

O grupo de pesquisadores coordenado pelo geriatra Emilio Hideyuki Moriguchi acolheu o fato e, em 1994, com o apoio da prefeitura municipal de Veranópolis, iniciou um estudo de coorte que pretendeu estudar o envelhecimento bem-sucedido dos idosos longevos. Este estudo recebeu o nome de Projeto Veranópolis. Os critérios de elegibilidade foram: (1) ter 80 anos completos até a data do recrutamento e (2) residir no domínio territorial de Veranópolis, podendo ser na cidade ou no interior.

O recrutamento dos idosos elegíveis ocorreu em 1994, 1996 e 1998. O primeiro recrutamento aconteceu durante o mês de julho de 1994 através de um convite informal do coordenador da pesquisa aos participantes de uma cerimônia religiosa. Faz-se referência à particularidade desta comunidade em frequentar o domingo de oração da prática católica. Espontaneamente, os presentes inscreveram-se e comunicaram aos seus próximos. Durante três semanas do mês de julho de 1994, os pesquisadores visitaram 100 idosos em suas próprias residências ou em centros comunitários. Em 1996, com uma estrutura formalizada e por divulgação em emissora de rádio local, mais 129 idosos entraram no estudo e os que já haviam participado em 1994 foram reavaliados. Em 1998, uma amostra aleatória simples dos participantes dos anos anteriores e mais 13 voluntários novos fizeram a genotipagem da apolipoproteína E (apoE) e os principais testes das avaliações progressas. Assim, 242 indivíduos constituíram a coorte do Projeto Veranópolis. Número que perfaz 87,4% dos idosos com 80 anos ou mais residentes no município entre os anos de 1994 e 1998<sup>45</sup>.

Em 1999, fez-se o primeiro levantamento de óbitos da coorte e a avaliação dos preditores cardiovasculares para tal mortalidade<sup>46</sup>. Este levantamento foi realizado junto à Secretaria de Saúde do município, que cadastra anualmente a mortalidade e os indicadores de saúde. Nos anos de 2006 a 2009, o *status vital* de todos os participantes da coorte foi apurado através de visitas domiciliares. Fez-se o registro do dia exato do óbito e da causa da morte pelo Atestado de Óbito. Para as declarações de óbito duvidosas, a causa da morte foi confirmada ou especificada por meio de entrevista com familiares próximos, médicos, especialistas e verificaram-se os registros hospitalares

pouco antes da morte<sup>47</sup>. Durante 2011 e 2012, o *status vital* dos idosos amostrados para a genotipagem da apoE foi verificado, novamente, através de visitas domiciliares e, nesta oportunidade, também, foi aplicado o questionário da Escala Bayer de Atividades da Vida Diária (*The Bayer - Activities of Daily Living Scale – B-ADL*) aos cuidadores dos idosos. Abaixo, a Figura 1 resume a linha do tempo da coorte do Projeto Veranópolis.

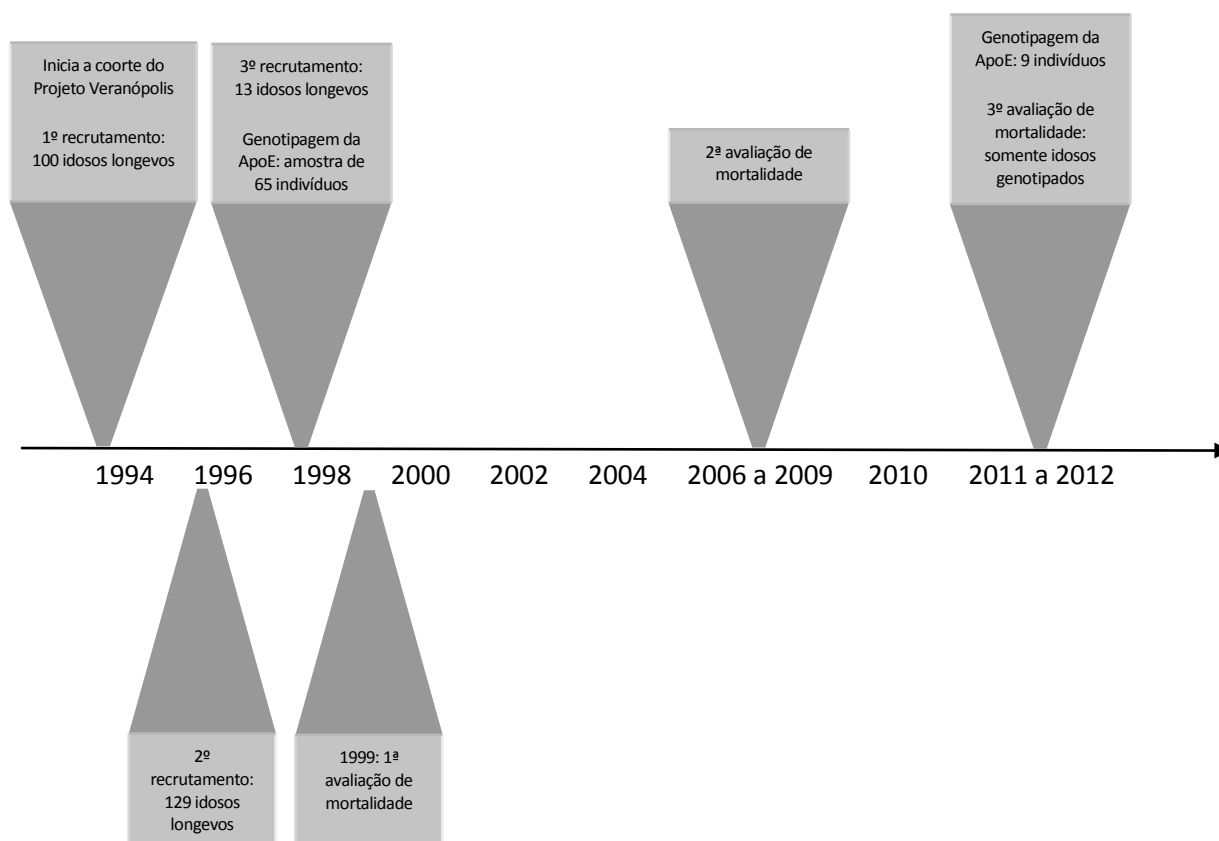


Figura 1: Linha do tempo da coorte do Projeto Veranópolis

## 4.2 Tamanho Amostral

Para este trabalho utilizou-se uma amostra de conveniência de 74 indivíduos da coorte do Projeto Veranópolis, que, por sua vez, é composta por 242 indivíduos. Considera-se que este é um estudo populacional de coorte, sem cálculo de tamanho amostral prévio.

## 4.3 Variáveis

Utilizou-se nesta avaliação da coorte de Veranópolis os genótipos da apoE como variável preditora, um fator genético analisado em dois momentos durante o seguimento: (1º) numa amostra aleatória de 65 indivíduos genotipados em 1998 e (2º) todos os indivíduos vivos em 2011 que não

havia sido amostrados em 1998, ou seja, mais 9 idosos. A metodologia da primeira genotipagem foi descrita com detalhes em Schwanke e colaboradores<sup>48</sup> e utilizou a técnica de amplificação do gene através de PCR-RFLP (*polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism*) e clivagem pela enzima de restrição Hha I. Para a genotipagem realizada em 2011, numa parceria com o Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular do Instituto do Coração do Hospital das Clínicas de São Paulo (InCor-HC/FMUSP), as amostras foram processadas utilizando-se a metodologia de extração de DNA e genotipagem da apoE descrita em Alvim e colaboradores<sup>49</sup>, com identificação dos genótipos da apoE (rs7412 e rs429358) através do método de análise HRM (*high resolution melting*).

O desfecho definido neste estudo foi mortalidade por doença cardiovascular crônica incluída nos códigos I00-I99 ou por demência incluída nos códigos F00-F03 da décima revisão da Classificação Estatística Internacional de Doenças e Problemas Relacionados à Saúde (CID-10). Para a definição da causa *mortis* do indivíduo idoso, foram apresentadas as segundas vias das certidões de óbito a dois profissionais médicos, um geriatra e outro cardiologista, que estiveram cegados entre si e com relação aos genótipos dos falecidos. Nos casos de divergência entre os profissionais com relação à causa do óbito, foi solicitada a avaliação por um terceiro profissional. O diagnóstico final, em caso de impasse, foi definido por consenso dos três profissionais. Quando não foi possível definir a causa de morte apenas pelo documento, foram levantados dados de prontuários e entrevistas com os médicos das famílias ou com os familiares do idoso falecido.

A coorte do Projeto Veranópolis é um estudo amplo de variáveis que busca respostas para a longevidade peculiar desta população. Dentre as diversas variáveis investigadas na coorte (anexos 1 e 2 - Instrumentos de pesquisa: Entrevista e Exame Físico), selecionou-se para este estudo aquelas que são descritas como fatores de risco clássicos para as DCV e, que poderiam estar associadas de forma independente ao desfecho estudado: hipertensão arterial, obesidade, DM, dislipidemia, tabagismo, abuso do álcool e inatividade física. Além destes fatores, as morbidades cardiovasculares como claudicação intermitente, acidente vascular cerebral (AVC) prévio e cardiopatia definidas pelo Protocolo de Rose<sup>50</sup> positivo (anexo 1 - Instrumento de pesquisa: Entrevista) foram avaliadas em diferentes épocas do seguimento: 1996, 1998 e 2006 a 2009. Os resultados destas análises foram utilizados para o cálculo da incidência das morbidades cardiovasculares na amostra, que incluiu ainda a informação contida no atestado de óbito como causa de morte devido a infarto agudo do miocárdio (IAM), insuficiência cardíaca congestiva (ICC) ou AVC.

Sucintamente, os métodos utilizados na mensuração dos fatores de risco cardiovasculares e as justificativas da categorização, quando aplicáveis, foram descritos a seguir. A pressão arterial (PA) foi obtida utilizando-se de um esfigmomanômetro de mercúrio (Erka, Germany) com manguito adequado para a circunferência do braço direito. Os participantes permaneceram em repouso por no

mínimo 5 minutos antes do início das medições. Foram tomadas duas ou três medidas, conforme a variabilidade, aguardando-se o intervalo recomendado pelas diretrizes e fez-se a média ponderada. O aparecimento dos sons foi utilizado para a identificação da pressão arterial sistólica (PAS) e o desaparecimento - fase V de Korotkoff - para identificação da pressão arterial diastólica (PAD). Em idosos longevos, existe a possibilidade de ocorrência de pseudo hipertensão causada pelo enrijecimento da artéria braquial pela aterosclerose - que pode elevar a pressão em 30mmHg ou mais. Devido a este fato, utilizou-se concomitante à medida da PAS, a manobra de Osler (considerada positiva quando a artéria radial permanece palpável ao se insuflar o manguito acima do nível da PAS), sendo excluídos os casos positivos. Para a análise dos dados, a PA foi utilizada como variável quantitativa e categorizada, sendo considerado o indivíduo hipertenso quando  $PA \geq 140/90$ mmHg ou em uso de medicamento anti-hipertensivo<sup>51</sup>. Ainda, avaliou-se a pressão de pulso (PAS-PAD).

A obesidade foi definida pelo índice de massa corporal (IMC), sendo o peso medido com os participantes minimamente vestidos, sem sapatos, utilizando-se de uma balança mecânica de contrapeso (Filizolla, São Paulo). A estatura foi determinada em pé, sem sapatos, utilizando-se de fita métrica, quando os ombros estavam em uma posição normal. O cálculo do IMC foi feito através da fórmula da razão do peso em quilogramas pelo quadrado da altura em metros ( $\text{kg}/\text{m}^2$ ). Para a análise dos dados, o IMC foi utilizado como variável contínua e categórica, com definição de obesidade e excesso de peso pelos pontos de corte  $\geq 30\text{kg}/\text{m}^2$  (Organização Mundial da Saúde – OMS)<sup>52</sup> e  $>27\text{kg}/\text{m}^2$  (Lipzchitz)<sup>53</sup>, respectivamente.

Nas avaliações bioquímicas do perfil lipídico e da glicemia, foram coletadas amostras de sangue venoso, após 12h de jejum. Utilizou-se o sistema de venoclise com aparato descartável a vácuo (Vacutainer) em tubos sem anticoagulante. As dosagens plasmáticas foram realizadas através de técnica manual de reação enzimática colorimétrica com padrões de calibração e amostras em duplicata. DM foi definido como glicemia de jejum  $\geq 126\text{mg}/\text{dL}$  ou em uso de medicação hipoglicemiante<sup>54</sup>. A dislipidemia foi avaliada através das dosagens plasmáticas de triglicerídeos (TG), colesterol total (CT), HDL-colesterol e do cálculo do LDL-colesterol, sendo utilizadas como variáveis quantitativas e categorizadas de acordo com os critérios da IV Diretriz Brasileira sobre Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose<sup>55</sup> ( $TG \geq 150\text{mg}/\text{dL}$ ;  $CT \geq 200\text{mg}/\text{dL}$ ; HDL-colesterol  $< 50\text{mg}/\text{dL}$  para mulheres e  $< 40\text{mg}/\text{dL}$  para homens; LDL-colesterol  $\geq 160\text{mg}/\text{dL}$ ). O LDL-colesterol foi obtido através da fórmula de Friedwald, para valores de TG inferiores a  $400\text{mg}/\text{dL}$ .

As variáveis de estilo de vida - tabagismo, abuso de álcool e inatividade física - foram obtidas através de um questionário padronizado aplicado na linha de base (anexo 1 - Instrumento de pesquisa: Entrevista). O tabagismo foi avaliado através do relato do consumo ou não de tabaco (cigarro, palheiro, cachimbo). Consideraram-se dois grupos: 1) não tabagistas: indivíduos que nunca

fumaram; 2) tabagistas ou ex-tabagistas: indivíduos que fumavam pelo menos um cigarro por dia e/ou eram ex-fumantes. O abuso do álcool foi avaliado através do relato da quantidade de álcool ingerida por semana, sendo considerado uso abusivo valores >210g/semana para homens e >105g/semana para mulheres<sup>56,57</sup>. A quantidade de etanol consumida (g/semana) foi calculada com base no tipo de bebida, utilizando-se dos fatores de correção para o teor alcoólico médio, conforme medidas padronizadas de vinho, cerveja e de bebidas destiladas. O teor alcoólico do vinho foi estimado em 11% e medida padrão de 140mL (um copo), o teor alcoólico da cerveja foi estimado em 4% e medida padrão de 350mL (uma lata ou duas latas equivalendo a uma garrafa) e o de bebidas destiladas, um teor alcoólico estimado de 45% e medida padrão 35mL (equivalente a uma dose). A inatividade física foi avaliada através do relato das atividades diárias durante uma semana normal de trabalho e lazer. Utilizaram-se dois diferentes pontos de corte: <2.000kcal/semana<sup>58,59</sup> e <4.000kcal/semana<sup>60</sup>, por serem quantidades mínimas de atividade física para alcançar benefícios cardiovasculares importantes como atenuação do espessamento da camada íntima-média das artérias carótidas<sup>58</sup>, aumento do HDL-colesterol<sup>59</sup> e redução da mortalidade em pacientes com doença arterial coronariana<sup>60</sup>. O instrumento utilizado para reportar as diferentes atividades físicas constituiu-se de uma lista de 27 atividades habituais da rotina de pessoas campesinas e citadinas e mais uma pergunta aberta sobre outra atividade além das pré-selecionadas. Solicitou-se aos participantes do estudo que reportassem o tempo gasto em minutos e a frequência semanal para desenvolverem tais atividades. A quantificação ou o cálculo da atividade física ou do gasto energético é um tema complexo nos idosos longevos uma vez que as padronizações do gasto energético em diversas atividades foram realizadas quase que universalmente em adultos e idosos jovens. Além dessa limitação quantitativa, considerou-se também a limitação qualitativa da atividade física que os idosos longevos de Veranópolis desenvolviam e que não são descritas em instrumentos comumente utilizados. Portanto, seguindo o mesmo caminho de outros estudos de idosos longevos, optamos pela utilização do gasto energético calculado em quilocalorias por semana (kcal/sem) que considera o peso do participante, o tempo de atividade referido, os METs (metabolic equivalents) da atividade específica de acordo com Ainsworth e colaboradores<sup>61</sup> e a frequência semanal das atividades:  $\text{Gasto energético(kcal/sem)} = \text{MET} \times \text{Peso(Kg)} \times \text{Tempo da atividade(minutos)} / 60 \times \text{frequência semanal}$ . Deste modo, julgamos que essa medida reflete melhor o gasto energético do idoso longevo da comunidade estudada (rural e urbana) do que a simples mensuração dos METs, usualmente descrita nos trabalhos atuais.

A B-ADL (anexo 3) foi aplicada, por um pesquisador treinado e cegado com relação aos genótipos dos idosos, aos seus cuidadores no período de agosto de 2011 a dezembro de 2012. O instrumento foi empregado como forma de identificar casos de demência e o resultado utilizado

como variável confundidora em potencial, uma vez que está bem descrito que o alelo  $\epsilon 4$  da apoE é um fator de risco para o desenvolvimento da DA<sup>8,9</sup>. A B-ADL foi criada com uma base internacional para avaliar déficits no desempenho de atividades cotidianas<sup>62</sup> e é reconhecida como instrumento de aplicação multi-cultural, sendo traduzida em diversos idiomas e validada em diferentes países<sup>63,64</sup>, incluindo o Brasil<sup>65</sup>. Além disso, foi proposta como instrumento para diferenciar os casos de demência leve e moderada do envelhecimento normal<sup>66</sup>. A escala compreende 25 itens, que devem ser respondidos por um cuidador ou familiar próximo, numa escala de 1 a 10 pontos. Os dois primeiros itens referem-se às habilidades do indivíduo para atividades cotidianas de uma forma geral; as questões de 3 a 20 avaliam diretamente os problemas em relação às tarefas específicas da vida diária e as 5 últimas avaliam aspectos das outras funções cognitivas. Além da escala de 10 pontos, a categoria “não se aplica” pode ser utilizada naqueles casos nos quais a dificuldade ocorreria devido a qualquer transtorno não cognitivo. Quando o informante não consegue avaliar o paciente em alguma atividade, por não dispor da informação necessária, pode utilizar a categoria “não sabe”. O escore total é composto pela soma dos pontos, excluindo as perguntas respondidas como “não sabe” ou “não se aplica” e a divisão desse total pelo número de itens que receberam pontuação. O escore final varia de 1,00 a 10,00 e representa maior dificuldade nas atividades da vida diária quanto maior a pontuação<sup>64</sup>. Para a análise dos dados, o escore da B-ADL foi utilizado como variável quantitativa e categorizada, utilizando-se o ponto de corte  $\geq 3,12$  para definição dos casos de demência<sup>66</sup>.

#### **4.4 Análise Estatística**

As variáveis quantitativas foram descritas por média e desvio padrão ou mediana e amplitude interquartilica. Para a comparação entre os grupos utilizou-se o teste t-Student para amostras independentes e, em caso de assimetria, o teste de Mann-Whitney. As variáveis qualitativas foram descritas através de frequências absolutas e relativas. Na comparação de proporções entre os grupos, o teste qui-quadrado de Pearson ou exato de Fisher foi aplicado. Para avaliar o tempo de sobrevivência, utilizou-se o método de estimação da curva por Kaplan-Meier e a comparação entre os grupos através do teste qui-quadrado de Log-rank.

Para controlar fatores de confusão em relação ao óbito, utilizou-se o modelo de azares proporcional de Cox. Como medida de efeito, foi calculada a razão de densidades de incidência (*hazard ratio*), com seus respectivos intervalos de 95% de confiança. O critério para a entrada da variável no modelo multivariado foi de que apresentasse um valor  $p < 0,20$  na análise bivariada. Também, foi aplicado o modelo de Regressão de Poisson para ajustar o efeito do genótipo nos desfechos estudados.



O nível de significância adotado foi de 5% ( $p \leq 0,05$ ) e os dados foram analisados com o programa SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*) versão 18.0.

## 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. World Health Organization. Causes of death 2008: summary tables. Geneva, World Health Organization, 2011. Available at [apps.who.int/gho/data/?vid=10012#](http://apps.who.int/gho/data/?vid=10012#)
2. Boshuizen HC, Izaks GJ, van Buuren S, Ligthart GJ Blood pressure and mortality in elderly people aged 85 and older: community based study. *BMJ*. 1998;316(7147):1780-4.
3. Poortvliet RK, de Ruijter W, de Craen AJ, Mooijaart SP, Westendorp RG, Assendelft WJ, Gussekloo J, Blom JW. Blood pressure trends and mortality: the Leiden 85-plus Study. *Journal of Hypertension*. 2013;31(1):63-70.
4. Rastas S, Pirttilä T, Viramo P, Verkkoniemi A, Halonen P, Juva K, Niinistö L, Mattila K, Länsimies E, Sulkava R. Association between blood pressure and survival over 9 years in a general population aged 85 and older. *Journal of the American Geriatrics Society*. 2006;54(6):912-8.
5. Weiss A, Beloosesky Y, Weiss HS, Grossman E, Boaz M. Serum total cholesterol: A mortality predictor in elderly hospitalized patients. *Clinical Nutrition*. 2012;S0261-5614(12)00258-0.
6. Gellert C, Schöttker B, Brenner H. Smoking and all-cause mortality in older people: systematic review and meta-analysis. *Archives of Internal Medicine*. 2012;172(11):837-44.
7. Fraser GE, Shavlik DJ. Risk factors for all-cause and coronary heart disease mortality in the oldest-old. The Adventist Health Study. *Archives of Internal Medicine*. 1997;157(19):2249-58.
8. Liu CC, Kanekiyo T, Xu H, Bu G. Apolipoprotein E and Alzheimer disease: risk, mechanisms and therapy. *Nature Reviews: Neurology*. 2013;9(2):106-18
9. Hashimoto T, Serrano-Pozo A, Hori Y, Adams KW, Takeda S, Banerji AO, Mitani A, Joyner D, Thyssen DH, Bacskai BJ, Frosch MP, Spires-Jones TL, Finn MB, Holtzman DM, Hyman BT. Apolipoprotein E, especially apolipoprotein E4, increases the oligomerization of amyloid  $\beta$  peptide. *The Journal of Neuroscience*. 2012;32(43):15181-92.
10. Berlau DJ, Corrada MM, Head E, Kawas CH. APOE epsilon2 is associated with intact cognition but increased Alzheimer pathology in the oldest old. *Neurology*. 2009;72(9):829-34.
11. Utermann G, Hees M, Steinmetz A. Polymorphism of apolipoprotein E and occurrence of dysbetalipoproteinaemia in man. *Nature*. 1977;269(5629):604-7.
12. Utermann G, Vogelberg KH, Steinmetz A, Schoenborn W, Pruin N, Jaeschke M, Hees M, Canzler H. Polymorphism of apolipoprotein E. II. Genetics of hyperlipoproteinemia type III. *Clinical Genetics*. 1979;15(1):37-62.
13. Utermann G, Langenbeck U, Beisiegel U, Weber W. Genetics of the apolipoprotein E system in man. *American Journal of Human Genetics*. 1980;32(3):339-47.
14. Zannis VI, Breslow JL, Utermann G, Mahley RW, Weisgraber KH, Havel RJ, Goldstein JL, Brown MS, Schonfeld G, Hazzard WR, Blum C. Proposed nomenclature of apoE isoproteins, apoE genotypes, and phenotypes. *Journal of Lipid Research*. 1982;23(6):911-4.

15. Weisgraber KH, Rall SC Jr, Mahley RW. Human E apoprotein heterogeneity: cysteine-arginine interchanges in the aminoacid sequence of the apo-E isoforms. *The Journal of Biological Chemistry*. 1981;256(17):9077-83.
16. Brandão AC *et al*. Polimorfismo genético da apolipoproteína E na doença arterial periférica. *Jornal Vascular Brasileiro*. 2004;3(4):317-22.
17. Mahley RW. Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. *Science*. 1988;240(4852):622-30 *apud* Mahley RW and Rall Jr SC, Type III Hyperlipoproteinemia (Dysbetalipoproteinemia): The Role of Apolipoprotein E in Normal and Abnormal Lipoprotein Metabolism *In* Scriver CR *et al*. The metabolic and molecular bases of inherited disease. 7ed. New York: McGraw-Hill, 1995. 1962p.
18. Utermann G, Langenbeck U, Beisiegel U, Weber W. Genetics of the apolipoprotein E system in man. *American Journal of Human Genetics*. 1980;32(3):339-47 *apud* Bennet AM *et al*. Association of apolipoprotein E genotypes with lipid levels and coronary risk. *JAMA*. 2007;298(11):1300-11.
19. Weisgraber KH, Innerarity TL, Mahley RW. Abnormal lipoprotein receptor-binding activity of the human E apoprotein due to cysteine-arginine interchange at a single site. *The Journal of Biological Chemistry*. 1982;257(5):2518-21.
20. Marca V, Acosta O, Cornejo-Olivas M, Ortega O, Huerta D, Mazzetti P. Polimorfismo genético de la Apolipoproteína E en una población peruana. [Genetic polymorphism of Apolipoprotein E in a peruvian population] *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*. 2011;28(4):589-94.
21. Eichner JE, Dunn ST, Perveen G, Thompson DM, Stewart KE, Stroehla BC. Apolipoprotein E polymorphism and cardiovascular disease: a HuGE review. *American Journal Epidemiology*. 2002;155(6):487-95.
22. Hu M, Mak VW, Tomlinson B. Polymorphisms in apolipoprotein E and apolipoprotein A-V do not influence the lipid response to rosuvastatin but are associated with baseline lipid levels in Chinese patients with hyperlipidemia. *Journal of Clinical Lipidology*. 2012;6(6):585-92.
23. Bennet AM, Di Angelantonio E, Ye Z, Wensley F, Dahlin A, Ahlbom A, Keavney B, Collins R, Wiman B, de Faire U, Danesh J. Association of apolipoprotein E genotypes with lipid levels and coronary risk. *JAMA*. 2007;298(11):1300-11.
24. Tanguturi P, Pullareddy B, Sampath Kumar P, Murthy DK. Association Between Apolipoprotein E Gene Polymorphism and Myocardial Infarction. *Biochemical genetics*. 2013 Jan 31.
25. Gungor Z, Anuurad E, Enkhmaa B, Zhang W, Kim K, Berglund L. Apo E4 and lipoprotein-associated phospholipase A2 synergistically increase cardiovascular risk. *Atherosclerosis*. 2012 Jul;223(1):230-4.
26. Ciftdoğan DY, Coskun S, Ulman C, Tıkız H. The association of apolipoprotein E polymorphism and lipid levels in children with a family history of premature coronary artery disease. *Journal of Clinical Lipidology* 2012;6(1):81-7.
27. Niu W, Qi Y, Qian Y, Gao P, Zhu D. The relationship between apolipoprotein E epsilon2/epsilon3/epsilon4 polymorphisms and hypertension: a meta-analysis of six studies comprising 1812 cases and 1762 controls. *Hypertension Research*. 2009;32(12):1060-6.

28. Anuurad E, Rubin J, Lu G, Pearson TA, Holleran S, Ramakrishnan R, Berglund L. Protective effect of apolipoprotein E2 on coronary artery disease in African Americans is mediated through lipoprotein cholesterol. *Journal of Lipid Research*. 2006;47:2475-81.
29. Jurkovicova D, Goncalvesova E, Sedlakova B, Hudecova S, Fabian J, Krizanova O. Is the ApoE polymorphism associated with dilated cardiomyopathy? *General Physiology and Biophysics*. 2006;25:3-10.
30. Wang CH, Zhou X. Meta-analysis for relationship between apoE gene polymorphism and coronary heart disease. *Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi*. 2003;(5):368-70.
31. Fei M, Jianhua W. Apolipoprotein ε4-Allele as a Significant Risk Factor for Conversion from Mild Cognitive Impairment to Alzheimer's disease: a Meta-analysis of Prospective Studies. *Journal of Molecular Neuroscience: MN*. 2012 Dec 15.
32. Sadigh-Eteghad S, Talebi M, Farhoudi M. Association of apolipoprotein E epsilon 4 allele with sporadic late onset Alzheimer`s disease. A meta-analysis. *Neurosciences (Riyadh)*. 2012;17(4):321-6.
33. Gdovinová Z, Habalová V, Novosadová Z. Polymorphism of apolipoproteine E in relation with alzheimer and vascular dementia. *Cellular and Molecular Neurobiology*. 2006;26(7/8):1219-24.
34. Souza DRS, De Godoy MR, Hotta J, Tajara EH, Brandão AC, Pinheiro Jr S, Tognola WA, Dos Santos JE. Association of apolipoprotein E polymorphism in late-onset Alzheimer`s disease and vascular dementia in Brazilians. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 2003;36:919-23.
35. De Feo E, Rowell J, Cadoni G, Nicolotti N, Arzani D, Giorgio A, Amore R, Paludetti G, Ricciardi G, Boccia S. A case-control study on the effect of apolipoprotein E genotype on head and neck cancer risk. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*. 2010;19(11):2839-46.
36. Grant WB. A multicountry ecological study of risk-modifying factors for prostate cancer: apolipoprotein E epsilon4 as a risk factor and cereals as a risk reduction factor. *Anticancer Research*. 2010;30(1):189-99.
37. Trompet S, Jukema JW, Katan MB, Blauw GJ, Sattar N, Buckley B, Caslake M, Ford I, Shepherd J, Westendorp RG, de Craen AJ. Apolipoprotein e genotype, plasma cholesterol, and cancer: a Mendelian randomization study. *American Journal of Epidemiology*. 2009;170(11):1415-21.
38. Cetinkalp S, Karadeniz M, Erdogan M, Zengi A, Cetintas V, Tetik A, Eroglu Z, Kosova B, Ozgen AG, Saygili F, Yilmaz C. Apolipoprotein E gene polymorphism and polycystic ovary syndrome patients in Western Anatolia, Turkey. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 2009;26(1):1-6.
39. Paganini-Hill A. Hypertension and dementia in the elderly: the leisure world cohort study. *International Journal of Hypertension*. 2012;2012:205350.
40. Paganini-Hill A. Lifestyle practices and cardiovascular disease mortality in the elderly: the leisure world cohort study. *Cardiology Research and Practice*. 2011;2011:983764.
41. Oates DJ, Berlowitz DR, Glickman ME, Silliman RA, Borzecki AM. Blood pressure and survival in the oldest old. *Journal of the American Geriatrics Society*. 2007 Mar;55(3):383-8.
42. Song Y, Stampfer MJ, Liu S. Meta-analysis: apolipoprotein E genotypes and risk for coronary heart disease. *Annals of Internal Medicine*. 2004;141(2):137-47.
43. Farrer LA, Cupples LA, Haines JL, Hyman B, Kukull WA, Mayeux R, Myers RH, Pericak-Vance MA, Risch N, van Duijn CM. Effects of age, sex, and ethnicity on the association between apolipoprotein E genotype and

- Alzheimer disease. A meta-analysis. APOE and Alzheimer Disease Meta Analysis Consortium. *JAMA*. 1997;278(16):1349-56.
44. DATASUS (Departamento de Informática do SUS), 1994. *Informações de saúde – indicadores de saúde - indicadores e dados básicos (IDB - Brasil - 2011) - indicadores demográficos - esperança de vida ao nascer* <<http://www.datasus.gov.br>>. Dado atualizado e acessado em 15/12/2012 refere que as esperanças de vida ao nascer foram extraídas das tábuas de mortalidade interpoladas a partir das tábuas construídas para os anos de 1991 e 2000.
  45. DATASUS (Departamento de Informática do SUS), 1998. *Informações de saúde – demográficas e socioeconômicas - Censos (1980, 1991, 2000 e 2010), Contagem (1996) e projeções intercensitárias (1981 a 2012), segundo faixa etária, sexo e situação de domicílio* <<http://www.datasus.gov.br>>. Dado atualizado e acessado em 15/12/2012.
  46. Marafon LP, da Cruz IBM, Schwanke CHA, Moriguchi EH. Preditores cardiovasculares da mortalidade em idosos longevos. *Cad. Saúde Pública*, Rio de Janeiro, 19(3):799-808, mai-jun, 2003.
  47. Werle MH, Moriguchi E, Fuchs SC, Bruscatto NM, de Carli W, Fuchs FD. Risk factors for cardiovascular disease in the very elderly: results of a cohort study in a city in southern Brazil. *European Journal of Cardiovascular Prevention and Rehabilitation*. 2011;18(3):369-77.
  48. Schwanke CHA, da Cruz IBM, Leal NF, Scheibe R, Moriguchi Y, Moriguchi EH. Análise da associação entre polimorfismo do gene da apolipoproteína E e fatores de risco cardiovasculares em idosos longevos. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*. 2002;78(6):561-70.
  49. Alvim RO, Freitas SRS, Ferreira NE, Santos PCJL, Cunha RS, Mill JG, Krieger JE, Pereira AC. APOE polymorphism is associated with lipid profile, but not with arterial stiffness in the general population. *Lipids in Health and Disease*. 2010;9:128.
  50. Rose GA, Blackburn H, Gillum RF, Prineas RJ. *Cardiovascular Survey Methods* 2ed. Geneva: World Health Organization, 1982.
  51. The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. U.S. Department of Health and Human Services. National Institutes of Health. National Heart, Lung, and Blood Institute. *National High Blood Pressure Education Program*. August 2004.
  52. World Health Organization. Obesity: preventing and managing the global epidemic. *Geneva: World Health Organization*; 1998. (Technical Report Series, 894).
  53. Lipschitz DA. Screening for nutritional status in the elderly. *Primary Care* 1994;21:55-67.
  54. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes 2009 - Sociedade Brasileira de Diabetes. 3ed. Itapevi, SP: A. Araújo Silva Farmacêutica, 2009.
  55. IV Diretriz Brasileira Sobre Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia* - Volume 88, Suplemento I, Abril 2007.
  56. Fuchs FD, Chambless LE, Folsom AR, Eigenbrodt ML, Duncan BB, Gilbert A, Szklo M. Association between Alcoholic Beverage Consumption and Incidence of Coronary Heart Disease in Whites and Blacks The Atherosclerosis Risk in Communities Study. *American Journal of Epidemiology*. 2004;160(5):466-74.

57. Steffens AA, Moreira LB, Fuchs SC, Wiehe M, Gus M, Fuchs FD. Incidence of hypertension by alcohol consumption: is it modified by race? *Journal of Hypertension*. 2006;24(8):1489-92.
58. Schmidt-Trucksass A, Huonker M, Halle M, Dickhuth HH, Sandrock M. Effect of Physical Activity on the Arterial Wall. *Deutschezeitschrift fur Sportmedizin*. 2008;59(9):200-5.
59. Drygas W, Kostka T, Jegier A, Kun´ski H. Long-Term Effects of Different Physical Activity Levels on Coronary Heart Disease Risk Factors in Middle-Aged Men. *International Journal of Sports Medicine*. 2000;21:235-41.
60. Janssen I and Jolliffe CJ. Influence of physical activity on mortality in elderly with coronary artery disease. *Medicine and Science in Sports and Exercise*. 2006;38(3):418-23.
61. Ainsworth BE, Haskell WL, Whitt MC, Irwin ML, Swartz AM, Strath SJ, O´Brien WL, Bassett Jr DR, Schmitz KH, Emplaincourt PO, Jacobs Jr DR, Leon AR. Compendium of physical activities: an update of activity codes and MET intensities. *Medicine & Science in Sports & Exercise*. 2000;32(9):S498-S516.
62. Hindmarch I, Lehfeld H, Jongh P, Erzigkeit H. The Bayer activities of daily living scale (B-ADL). *Dementia and Geriatric Cognitive Disorders*. 1998;9(Suppl.2):20-6.
63. Lehfeld H, Reisberg B, Finkel S, Kanowski S, Wied V, Pittas J, Tsolaki M, Robert PH, Hulla F, Heininger K, Erzigkeit H. Informantrated Activities-of-Daily-Living (ADL) assessments: results of a study of 141 items in the U.S.A., Germany, Russia, and Greece from the International ADL Scale Development Project. *Alzheimer Disease and Associated Disorders*. 1997;11(Suppl 4):S39-44.
64. Erzigkeit H, Lehfeld H, Pena-Casanova J, Bieber F, Yekrang- Hartmann C, Rupp M, Rappard F, Arnold K, Hindmarch I. The Bayer - Activities of Daily Living Scale (B-ADL): Results from a Validation Study in Three European Countries. *Dementia and Geriatric Cognitive Disorders*. 2001;12(5):348-58.
65. Mapi Research Institute. Cultural Adaptation of the Bayer Activities of Daily Living Scale (B-ADL) into Brazilian Portuguese. Report. Lyon-France: Mapi Research Institute; 1999. p. 1-19.
66. Folquitto JC, Bustamante SEZ, Barros SB, Azevedo D, Lopes MA, Hototian SR, Jacob Fº W, Litvoc J, Bottino CMC. The Bayer - Activities of Daily Living Scale (B-ADL) in the differentiation between mild to moderate dementia and normal aging. *Revista Brasileira de Psiquiatria*. 2007;29(4):350-3.

## Association of cardiovascular risk and apoE polymorphism with mortality in the longevous elderly: an 18-year cohort

### ABSTRACT

**Context:** Chronic diseases such as cardiovascular and dementias are more frequent in the elderly population, especially in those aged 80 and older. Despite such evidence, there are few studies outlined with longevous individuals. Also, when evaluated, the results are frequently undefined or inverted. This gap in knowledge is made more difficult by the complexity of environmental and genetic factors that influence the progression of chronic diseases. More specifically, blood pressure and cholesterol levels and the  $\epsilon 4$  allele in apolipoprotein E (apoE) produce diverging effects in the longevous elderly when compared to the young elderly. The objective of this study is to investigate the relation between the apoE gene polymorphism and the mortality from cardiovascular disease and dementia in the longevous elderly who live in a community and evaluate the survival rates according to this polymorphism and cardiovascular risk factors.

**Methods:** A sample group of 74 elderlies aged 80 and older from the Veranópolis Project cohort was selected for apoE genotyping. At the baseline, anthropometric variables, glucose and lipid blood levels, blood pressure and lifestyle variables such as smoking, alcohol consumption and physical activity were collected. The medium cohort follow-up was of 16.4 years and the total, 18 years. The causes of death were classified according to the ICD-10 for cardiovascular and dementias. The Bayer – Activities of Daily Living Scale was applied to the carers of the elderlies to evaluate dementia.

**Results:** The ApoE gene frequency present in the sample was: 4.1%  $\epsilon 2$ ; 85.1%  $\epsilon 3$  and 10.8%  $\epsilon 4$ . And the genotype frequency: 1.4% E2E2; 5.4% E2E3; 71.6% E3E3 and 21.6% E3E4. For purposes of comparing the outcomes, 2 groups were formed: carriers of the apoE3E3 genotype (53 elderlies) and carriers of the apoE3E4 genotype (16 elderlies). The average life expectancy was of 92.3 years (IC95% 91.2-93.5). Significant differences were found between the genotypes in relation to the average age upon entering the cohort, body mass index and diastolic blood pressure. A trend was found for the levels of total cholesterol and LDL-cholesterol would be higher in the E3E4 group. No association was found between the morbidity outcomes (CVA, AMI and CHF) or mortality between the genotypes. For the general sample, the factors that were significantly associated with mortality were: smoking, physical activity, systolic blood pressure (SBP), pulse pressure (PP) and *diabetes mellitus* (DM). The risk of death for smokers and ex-smokers was 2.83 times (IC95% 1.00-7.98) that for non-smokers. Those individuals who practiced vigorous physical activities ( $\geq 4,000$  kcal/week) had a reduced risk of death of 54% (IC95% 10%-77%). An increase of 1mmHg in systolic blood pressure (SBP) or pulse pressure (PP) reduced the risk of death by 2% (IC95% 1%-3%). Diabetic elderlies had 3.43 (IC95% 1.03-11.50) times higher risk of death than non-diabetic.

**Findings:** No association was found between the two most frequent apoE genotypes in the population and cardiovascular mortality or survival of longevous elderlies. Throughout the sample, the risk factors significantly associated with mortality were smoking and DM. Vigorous physical activity, higher PAS and PP were deemed to be protection factors for general mortality.

**Key words:** Alipoprotein E4, Cardiovascular Diseases, Risk Factors, Survival Analysis, Mortality, Elderly aged 80 and older.

## INTRODUCTION

The rapid growth in the older population worldwide has brought about an increased interest in and need for studies on factors to attain a long, high quality life. Mortality data about elderly aged 80 and older show that cardiovascular diseases (CVD) represent half the causes of death<sup>1</sup>. It is held that researches to determine a standard of cardiovascular risks for this age group are fundamental, both for preventing and handling those risks.

Despite the frequency of chronic diseases, such as cardiovascular and dementias, increasing with age, the elderly aged 80 and older in general are excluded from well controlled studies or analyzed as subgroups. When they are included, the results produced are different from those for young elderly (aged 60 to 74), such as higher mortality associated with the reduction of diastolic pressure<sup>2</sup> or systolic pressure<sup>3,4</sup> and the reduction in cholesterol<sup>5</sup>. However, other risk factors such as smoking<sup>6</sup> and *diabetes mellitus* (DM)<sup>7</sup> were similarly associated even at more advanced ages. Otherwise, a widely studied genetic factor, the apolipoprotein E (apoE) polymorphism, more specifically the  $\epsilon 4$  allele, appears as a risk factor for Alzheimer's disease in adults and young elderly<sup>8,9</sup>. However, results from a specific cohort with longevous elderly identified a paradoxical effect of apoE  $\epsilon 2$  allele associated to an increase in Alzheimer's Disease (AD) through post-mortem neuropathological criteria<sup>10</sup>. This result again points to the particularities of very old age and to the basis for scientific research specifically for the 80 years and older age group.

The most common apoE gene polymorphism was first referred to by Utermann and collaborators in the late 1970s<sup>11-13</sup>. The point mutations in exon 4 gave origin to three main alleles  $\epsilon 2$ ,  $\epsilon 3$  and  $\epsilon 4$ , which determined the apoE isoforms designated as apoE2, E3 and E4, respectively<sup>14</sup>. The protein forms are distinct among them from the cysteine and arginine contents at the codons 112 and 158 positions. The apoE2 isoform has the cysteine amino acid in both positions, apoE3 has one cysteine in position 112 and one arginine in position 158, while the apoE4 isoform has arginines in both these positions<sup>15</sup>.

The main function of apoE is to mediate the interaction of lipoproteins that contain apoE with the lipoprotein receptors, which include the LDL receptor and the LDP receptor (LDL receptor related protein), specific for apoE<sup>16,17</sup>. However,

the affinity of apoE for the hepatic receptors, which in the end results in the endocytosis capture of the lipoprotein, is related to the interactions of these amino acids at the binding site<sup>18,19</sup>. Therefore, the apoE polymorphism modifies both the protein's structure and its function. The several possible combinations by two of the three main alleles can give origin to six genotypes: apoE2/E2, apoE3/E3, apoE4/E4, apoE2/E3, apoE3/E4 and apoE2/E4. The frequency of genes (alleles) and genotypes in the different world populations is highly variable<sup>20,21</sup>. Additionally, the apoE polymorphism has been related to significant modifications to the profile of lipoproteins<sup>22,23</sup>, as well as in the incidence of different pathologies, including CVD<sup>23-30</sup>, DA<sup>8,31,32</sup>, vascular dementia<sup>33,34</sup> and different types of neoplasias<sup>35-38</sup>. Studies on ethnically homogenic populations are essential to describe outcomes that could be influenced by the genetic characteristics<sup>31</sup>.

Once more, longevous elderly seem to have a different risk profile from younger people and the predictive factor of the classical risk factors is not clear<sup>39-41</sup>. Meta-analysis studies have shown that carriers of the apoE  $\epsilon 4$  allele present a higher risk of early CVD<sup>30,42</sup> and Alzheimer's<sup>43</sup> dementia when compared to carriers of the apoE3/E3 reference genotype. However, there are no studies to indicate whether such association is maintained in the longevous age group. Through this outlook, the objective of this study is to test the above hypothesis by investigating the relation between the apoE exon 4 polymorphism and death related to dementia or CVD in longevous individuals, and to describe survival according to the genotypes and exposure to classical cardiovascular risk factors.

## METHODOLOGY

### Outline and Population investigated

The Veranópolis Project cohort started in 1994 following two comprehensive eligibility criteria: (1) aged equal to or older than 80 years and (2) residing within the territorial domain of the municipality of Veranópolis (Brazil). During the 1990s, the city of Veranópolis, located in a mountainous region in the south of Brazil, whose population descended from European immigrants, most of which of Italian origin, had one of the highest life expectancies in the country. The rate, which in Brazil was of 68.1 years on average, reached a notorious 77.7 years in that city<sup>44</sup>.



Recruitment of the eligible elderly took place in 1994, 1996 and 1998. The first recruitment happened briefly during the month of July 1994 through an informal invitation by the research coordinator to participants in a religious ceremony. Those present registered spontaneously and informed their next of kin. During three weeks in July 1994 the researchers visited 100 elderly at their own homes or in community centers. In 1996, having a formal structure and through broadcasting in a local radio station, another 129 elderly consented to take part in the study, and those who had participated in 1994 were reassessed. In 1998, a simple random sample of the participants in the previous years and another 13 new volunteers carried out the genotyping of apoE and the main tests from the previous assessments. Thus, 242 individuals comprised the Veranópolis Project cohort. The number totaled 87.4% of the elderly aged 80 and older who resided in the municipality between 1994 and 1998<sup>45</sup>.

In 1999, the first survey of the cohort deaths was made, as well as an evaluation of the cardiovascular predictors for such mortality<sup>46</sup>. The survey was made in conjunction with the municipality Health Office that makes a yearly registry of the mortality and health indicators. From 2006 to 2009, the vital status of all participants in the cohort was ascertained through home visits<sup>47</sup>. During 2011 and 2012 the vital status of the elderly sampled for apoE genotyping was checked once more through home visits and, at that same moment, the Bayer - Activities of Daily Living Scale – B-ADL questionnaire was applied to the carers of the elderly.

### **Sample Size**

This paper made use of a convenience sample of 74 individuals in the Veranópolis Project, which, in turn, comprised 242 individuals. This is deemed to be a population study of the cohort, with no previous sample size calculation.

### **Variables**

This Veranópolis cohort assessment made use of the apoE genotypes as a predictor variable, a genetic factor analyzed in two instances during follow-up: (1st) in a random sample of 65 individuals genotyped in 1998 and (2nd) all living individuals in 2011 who had not been sampled in 1998, that is, another 9 elderly. The methodology for the first genotyping was described in detail in

Schwanke and collaborators<sup>48</sup> and it utilized the gene amplifying technique through PCR-RFLP (polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism) and Hha I restriction enzyme cleavage. For the genotyping performed in 2011, in a partnership with the Molecular Cardiology and Genetics Laboratory of the Heart Institute at the Clinics Hospital (InCor-HC/FMUSP), the molecules were processed using the apoE DNA extraction and genotyping methodology described in Alvim and collaborators<sup>49</sup>, with apoE genotypes (rs7412 and rs429358) identification through the HRM (high resolution melting) analysis method.

The outcome defined in this study was mortality from chronic cardiovascular disease included in codes I00-I99 or from dementia included in codes F00-F03 of the International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems, Tenth Revision (ICD-10). To define the cause of death of elderly individuals, copies of their death certificates were presented to two medical professionals, one geriatrician and one cardiologist, who were blinded between them and as to the genotypes of the deceased. In case of any divergence between the professionals concerning the cause of death, an assessment was requested from a third professional. The final diagnostic, in case of an impasse, was defined by consensus between the three professionals. When the cause of death could not be defined through the document only, medical records were surveyed and interviews made with the family doctors or next of kin of the deceased elderly.

The Veranópolis Project cohort is a broad study to seek answers for the peculiar longevity of this population. Among the variables investigated in the cohort for this study were selected those that are described as classical risk factors for CVDs, and those that could be associated independently with the outcome being studied: arterial hypertension, obesity, DM, dyslipidemia, smoking, alcohol abuse and physical inactivity. In addition to these factors, cardiovascular morbidities such as intermittent claudication, previous cerebrovascular accident (CVA) and cardiopathy, defined by a positive Rose's Protocol<sup>50</sup> were assessed at different periods of the follow-up: 1996, 1998, and 2006 to 2009. The results from these analyses were used to calculate the incidence of cardiovascular morbidities in the sample, which further includes the information in the death certificate as the cause of death due to acute myocardial infarction (AMI), congestive heart failure (CHF) or CVA.

The methods used to measure the cardiovascular risk factors and the justifications for the categorization, when applicable, are described succinctly below. Blood pressure (BP) was obtained using a mercury sphygmomanometer (Erka, Germany) with a cuff suited for the right arm circumference. The participants rested for at least 5 minutes before measurements began. Two or three measurements were taken according to variability, with the interval between them as recommended by the guidelines and the weighted average was calculated. The appearance of sounds was used to identify the systolic blood pressure (SBP) and their disappearance - Korotkoff phase V - to identify the diastolic blood pressure (DBP). Due to the possibility of pseudohypertension occurring in longevous elderlies, Osler's maneuver was used together with the SBP measurement, excluding the positive cases. To analyze the data, BP was used as a quantitative, categorized variable, with the individual being deemed hypertensive when  $BP \geq 140/90$  mmHg or when taking antihypertensive medication<sup>51</sup>. Furthermore, pulse pressure (SBP-DBP) was evaluated.

Obesity was defined by the body mass index (BMI), the weight being measured with participants dressed lightly, without shoes, using mechanical scales (Filizolla, São Paulo). Height was determined standing upright, without shoes, using a measuring tape with shoulders in a normal position. BMI calculation was made with the formula of the ratio between weight in kilograms times the squared height in meters ( $\text{kg}/\text{m}^2$ ). To analyze the data, BMI was used as a continuous, categoric variable, with obesity and overweight being defined by the cut off points  $\geq 30 \text{kg}/\text{m}^2$  (World Health Organization – WHO)<sup>52</sup> and  $>27 \text{kg}/\text{m}^2$  (Lipschitz)<sup>53</sup>, respectively.

For the lipid and glycemia profile biochemical evaluations, venous blood samples were collected after 12h of fasting. The venoclysis system with disposable vacuum device (Vacutainer) in tubes with no anticoagulant was used. Plasmatic dosages were done through the manual technique of colorimetric enzymatic reaction with calibration standards and samples in duplicate. DM was defined as fasting glycemia  $\geq 126 \text{mg}/\text{dL}$  or by taking hypoglycemia medication<sup>54</sup>. Dyslipidemia was evaluated through plasmatic dosages of triglycerides (TG), total cholesterol (TC), HDL-cholesterol and the LDL-cholesterol calculation, being used as quantitative, categorized variables according to the criteria in the IV Brazilian Directive

on Dyslipidemias and Prevention of Atherosclerosis<sup>55</sup> ( $TG \geq 150 \text{mg}/\text{dL}$ ;  $TC \geq 200 \text{mg}/\text{dL}$ ; HDL-cholesterol  $<50 \text{mg}/\text{dL}$  for women and  $<40 \text{mg}/\text{dL}$  for men; LDL-cholesterol  $\geq 160 \text{mg}/\text{dL}$ ). LDL-cholesterol was obtained through Friedwald's formula for TG values below  $400 \text{mg}/\text{dL}$ .

The lifestyle variables - smoking, alcohol abuse and physical inactivity - were obtained through a standardized questionnaire applied to the baseline. Smoking was evaluated through statements on consumption or not of tobacco (cigarette, corn straw cigarette, pipe). Two groups were considered: 1) non-smokers: individuals who never smoked; 2) smokers or ex-smokers: individuals who smoked at least one cigarette per day and/or were ex-smokers. Alcohol abuse was evaluated through statements on the amount of alcohol consumed per week, and abuse was considered at values of  $>210 \text{g}/\text{week}$  for men and  $>105 \text{g}/\text{week}$  for women<sup>56,57</sup>. The amount of ethanol consumed ( $\text{g}/\text{week}$ ) was calculated based on the type of drink using correction factors for the average alcohol content as per standardized measurements for wine, beer and distilled drinks. Physical inactivity was evaluated through statements on daily activities during a normal week of work and leisure. Two different cut-off points were used:  $<2,000 \text{kcal}/\text{week}$ <sup>58,59</sup> and  $<4,000 \text{kcal}/\text{week}$ <sup>60</sup>, those being minimum amounts of physical activity to attain major cardiovascular benefits such as attenuated thickening of the inner-middle layer of carotid arteries<sup>58</sup>, increase in HDL-cholesterol<sup>59</sup> and reduction of mortality in patients with coronary arterial disease<sup>60</sup>. The instrument used to report the different physical activities comprised a list of 27 habitual activities in the routine of people who live in the city and in the country, and one further open question about any other activity besides the pre-selected ones. It was requested from the participants in the study to report the time spent in minutes and the weekly frequency developing such activities. The quantification or calculation of physical activity or energy expenditure is a complex theme in longevous elderlies, since the energy expenditure standardizations for several activities were made almost universally with adults and young elderlies. In addition to this quantitative limitation, there was consideration also for the quantitative limitation for physical activities that the longevous elderlies in Veranópolis developed that are not described in instruments commonly used. Therefore, following the same rationing for other

studies on longevous elderlies, we chose to use the energy expenditure calculated in kilocalories per week (kcal/week) that considers the weight of the participant, the referred time duration of the activity, the METs (metabolic equivalents) for the specific activity according to Ainsworth and collaborators<sup>61</sup> and the weekly frequency of the activities: Energy expenditure (kcal/wk) = MET X Weight (Kg) X time duration of activity (minutes) / 60 X weekly frequency. We thus deem that this measurement better reflects the longevous elderly energy expenditure in the community studied (rural and urban) than simply measuring the METs that is usually described in current works.

B-ADL was applied by a researcher, who was trained and blinded in relation to the elderly genotypes, to their carers in the period from August 2011 to December 2012. The instrument was employed as a way of identifying cases of dementia and the result used as a potentially confounding variable, since it has been well described that the apoE  $\epsilon$ 4 allele is a risk factor for the development of DA<sup>8,9</sup>. B-ADL was created as an international basis to evaluate limitations in the performance of daily activities<sup>62</sup> and is recognized as an instrument for multicultural application, having been translated into several languages and validated in different countries<sup>63,64</sup>, including Brazil<sup>65</sup>. Moreover, it was proposed as an instrument to differentiate the cases of light and moderate dementia in normal aging<sup>66</sup>. The score obtained from the B-ADL ranges from 1.00 to 10.00, and represents greater difficulty in the activities the higher the scoring<sup>64</sup>. To analyze the data, the B-ADL score was used as a quantitative, categorized variable, using a cut-off point of  $\geq 3.12$  to define the cases of dementia<sup>66</sup>.

### Statistical Analysis

The quantitative variables were described in average and standard deviation or median and interquartile amplitude. For comparison between groups, the t-Student test was used, and in case of asymmetry, the Mann-Whitney test. The qualitative variables were described through absolute and relative frequencies. For comparing

the proportions between groups, the Pearson chi-square test or Fisher exact test were applied. To evaluate survival time, the Kaplan-Meier survival curve estimate method was used, and the comparison between groups, through the logrank chi-square test.

To control confounding factors in relation to death, the Cox proportional hazards model was used. As a measure of effect, the incidence density ratio (hazard ratio) was calculated, with its respective confidence intervals of 95%. The criterion to enter the variable in the multivariate model was that it presented a value  $p < 0.20$  in the bivariate analysis. Also, the Poisson Regression model was applied to adjust for the effect of genotype in the outcomes studied.

The level of significance adopted was of 5% ( $p \leq 0.05$ ) and the data were analyzed with the SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) software version 18.0.

### RESULTS

In this work, the sample of 74 individuals of the Veranópolis cohort had a total follow-up time of 18 years, and an average of 16.4 years. We point out that there were no follow-up losses. Based on statements by the elderlies, 94.6% descended from Italian immigrants. The apoE gene (allele) frequency present in the sample was: 4.1%  $\epsilon$ 2; 85.1%  $\epsilon$ 3 and 10.8%  $\epsilon$ 4; and the genotype frequency: 1.4% E2E2; 5.4% E2E3; 71.6% E3E3 and 21.6% E3E4. The genotype distribution is in Hardy-Weinberg equilibrium ( $\chi^2=0.07$ ; degree of freedom=1;  $p=0.79$ ). No carriers of the apoE2E4 and apoE4E4 genotypes were found in the sample. Therefore, only the apoE3E4 formed the exposed group, that is, carriers of the apoE  $\epsilon$ 4 risk allele. Thus, we excluded from the analysis the rare apoE2E2 and apoE2E3 genotypes and compared the outcomes and risk factors of the 53 apoE3E3 individuals (non-exposed group) with the 16 apoE3E4 individuals. Table 1 summarizes the characteristics of the groups of interest. This table can be found complete, including all the described variables, in a quantitative, categorized form in attachment 1.

Table 1: Characterization of the sample

Variables*	Total sample (n = 69)	E3E3 Genotype (n = 53)	E3E4 Genotype (n = 16)	p**
Age at entry (years)	82.6 ± 2.8	82.2 ± 2.7	84.0 ± 2.8	0.021
Sex				0.267
Male	23 (33.3)	20 (37.7)	3 (18.8)	
Female	46 (66.7)	33 (62.3)	13 (81.3)	
Bayer ADL Scale <sup>a</sup>	2.98 (1.44-5.55)	2.95 (1.38-5.46)	3.19 (1.54-7.44)	0.631
Smoking				0.717
Non-Smoker	56 (81.2)	42 (79.2)	14 (87.5)	
Ex-Smoker/Smoker	13 (18.8)	11 (20.8)	2 (12.5)	
Alcohol Abuse				0.093
No	17 (24.6)	13 (24.5)	4 (25.0)	
Yes (F>105g and M>210g)	18 (26.1)	17 (32.1)	1 (6.3)	
Teetotalers	34 (49.3)	23 (43.4)	11 (68.8)	
BMI (kg/m <sup>2</sup> ) <sup>a</sup>	26.8 ± 5.4	27.6 ± 5.5	23.7 ± 3.6	0.011
Physical Activity (kcal/week)	5133 (2386-9846)	5421 (2155-10544)	3580 (2300-6930)	0.216
SBP (mmHg)	161 ± 25.3	162 ± 23.7	158 ± 30.5	0.489
DBP (mmHg)	86.3 ± 13.2	88.6 ± 12.7	78.5 ± 12.4	0.007
Pulse Pressure (SBP-DBP)	75.1 ± 22.7	73.9 ± 21.5	79.0 ± 26.8	0.439
Hypertension	62 (89.9)	48 (90.6)	14 (87.5)	0.660
Fasting Glycemia (mg/dL) <sup>b</sup>	95.4 ± 20.7	96.2 ± 22.7	92.6 ± 12.2	0.539
Total Cholesterol (mg/dL) <sup>b</sup>	209 ± 48.8	203 ± 43.9	229 ± 59.5	0.066
LDL Cholesterol (mg/dL) <sup>b</sup>	138 ± 42.1	132 ± 36.0	156 ± 55.0	0.055
HDL Cholesterol (mg/dL) <sup>c</sup>	43.4 ± 11.4	44.0 ± 12.5	41.4 ± 6.6	0.284
Triglycerides (mg/dL) <sup>b</sup>	102 (85.8-146)	102 (83.4-144)	107 (88.2-159)	0.806

\*described in average ± standard deviation, median (percentiles 25 – 75) or n(%); \*\*t-student test (comparison of averages), Mann-Whitney test (comparison of medians), Pearson chi-square test (categorical variables) or Fisher exact test (for the smoking and hypertension variables). <sup>a</sup>Variables analyzed in 15 individuals of the apoE3E4 genotype. <sup>b</sup>Variables analyzed in 52 individuals of the apoE3E3 genotype. <sup>c</sup>Variable analyzed in 51 individuals of the apoE3E3 genotype.

The average age of group E3E4 was older than that of group E3E3, a significant difference of 1.8 years. There was no difference in proportions of males and females, although 19% of the individuals carriers of the apoE3E4 genotype were male *versus* 38% of the apoE3E3 genotype. The B-ADL evaluation featured average and proportion of positive cases for dementia higher in carriers of the genotype deemed to be of risk (apoE3E4), although this difference was not significant. The subjects in group E3E3 tended to consume a larger amount of grams of alcohol per week than those in group E3E4 (p=0.051). When this consumption was stratified into the three categories (1) abuse, (2) non-abuse, and (3) teetotaler, disparities were found but with no statistical difference, possibly due to the small sample number. It was observed

that the proportion of teetotalers in group E3E4 was of 69%, compared to 43% in group E3E3. Still, only 6% of the apoE3E4 genotype carriers abused alcohol *versus* 32% of the apoE3E3 genotype. BMI was used as a measure of obesity or excess weight in the sample through its quantitative analysis or by the cut-off points declared by the WHO and by Lipschitz, the latter being specific for the elderly. Comparing the groups, carriers of the apoE3E3 genotype presented an average BMI of 27.6Kg/m<sup>2</sup>, significantly higher than the apoE3E4 genotype (23.7Kg/m<sup>2</sup>). When using the cut-off points suggested by the WHO to define obesity and by Lipschitz for excess weight, no difference was found between the groups. Among the variables that evaluated BP, the most controversial risk factors in the longevous elderlies, we had another

interesting result. There was no inequality for SBP, PP and hypertension between the groups, but a significant difference was revealed for DBP, being lower in the E3E4 group on average 10.1 mmHg. When comparing the lipid profile, only a trend was found for the quantities of TC and LDL-cholesterol being higher in carriers of the E3E4 genotype.

The outcomes of interest are summarized in Table 2 that compares the proportions of selected cardiovascular events (AMI, CHF and CVA) and the causes of death between the E3E3 and E3E4 groups. We point out that the average life expectancy for those individuals was of 92.3 years

(IC95% 91.2 to 93.5). For comparison, the table presents the levels of significance without adjustment and those adjusted for the variables with  $p < 0.2$  in the univariate analysis. We observed that there was no significant difference between the groups. However, carriers of the apoE3E3 genotype presented a higher proportion of CHF ( $p=0.058$ ) and cardiopathy ( $p=0.018$ ) than those of the E3E4 genotype. Yet, when adjustment was made for the possible confounding factors, the sample descriptive level was no longer borderline for both outcomes ( $p=0.102$  and  $p=0.136$  respectively)

Table 2 – Comparison of outcomes between genotypes

Outcomes	Sample total	Genotype E3E3	Genotype E3E4	p	p <sub>adjusted***</sub>
	(n=69)	(n=53)	(n=16)		
	n (%)	n (%)	n (%)		
AMI	3 (4.3)	2 (3.8)	1 (6.3)	0.553*	0.828
CHF	38 (55.1)	33 (62.3)	5 (31.3)	0.058**	0.102
CVA	23 (33.3)	17 (32.1)	6 (37.5)	0.920**	0.469
Cardiopathy (AMI/CHF)	41 (59.4)	35 (66.0)	6 (37.5)	0.081**	0.136
CVD (CVA/Cardiopathy)	48 (69.6)	39 (73.6)	9 (56.3)	0.222*	0.806
Death	58 (84.1)	44 (83.0)	14 (87.5)	1.000*	0.888
Cause of death				0.389**	0.899
Cardiovascular	34 (58.6)	28 (63.6)	6 (42.9)		
Dementia	6 (10.3)	4 (9.1)	2 (14.3)		
Non-cardiovascular/dementia	18 (31.0)	12 (27.3)	6 (42.9)		

\* Fisher exact test; \*\* Pearson chi-square test; \*\*\* adjusted for age of entry in the study, alcohol consumption, BMI, physical activity  $\geq 4000$  kcal/week, diastolic blood pressure, total and LDL cholesterol.

To evaluate the survival of the elderly according to the apoE genotypes, the Kaplan-Meier survival curve estimate method was used, represented in the graph in Figure 1. We observed that there was no association between the apoE polymorphisms and survival (logrank=0.938) in the longevous elderlies in the sample.

Additionally, it is pertinent to analyze the cardiovascular risk factors associated with the mortality in longevous elderlies, since this age range usually presents singular and at the same time contradictory results. For such, the Kaplan-Meier survival estimates were used with Cox regression to control confounding. The results are presented in Table 3 (complete Table 3 – Attachment 2) through the calculation of the incidence density ratio or hazard ratio (HR). This way, the factors significantly associated with mortality were: smoking, physical activity, SBP, PP

and DM. The risk of death for smokers and ex-smokers was 2.83 (IC95% 1.00-7.98) times that for non-smokers. Those individuals who practiced vigorous physical activities ( $\geq 4,000$  kcal/week) had a reduced risk of death of 54% (IC95% 10-77%). An increase of 1mmHg in SBP or PP reduced the risk of death by 2% (IC95% 1-3%). Also, diabetic elderlies had 3.43 (IC95% 1.03-11.5) times higher risk of death than non-diabetic. The survival curves for the categoric factors associated with death can be veiwed in Figure 2.

## DISCUSSION

Revision studies have shown that the genetic frequencies related to apoE polymorphism are highly variable, especially in regard to the  $\epsilon 4$  allele<sup>21,67</sup>. In general, the gene frequency observed in the present study is similar to that found in the population in Italy<sup>68,69</sup>. Since the sample for this

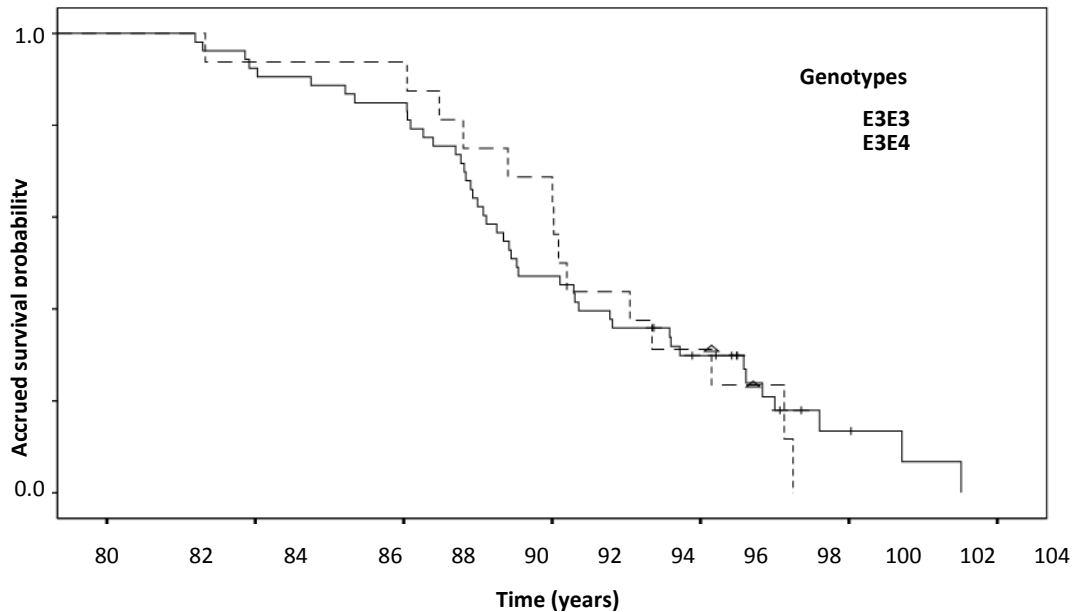
work comprised 94.6% of Italian immigrant descendants, such similarity was expected and it indicates that the sampling process was adequate.

Curiously, in our results, individuals with the apoE3E4 genotype presented an average age significantly older than apoE3E3 individuals. We believe this difference to be casual, since relevant publications indicate that there is no difference in mortality between carriers of the apoE3E3 and apoE3E4 genotypes before 80 years of age<sup>70,71</sup>.

Among the risk factors for CVDs investigated, BMI and DBP presented significant differences between the evaluated genotypes. In those cases,

individuals in the E3E3 group presented an average BMI classified as overweight (WHO) or excess weight (Lipschitz) and a higher DBP. We did not find similar data to these in studies previously published for community basis, but similar comparisons in larger samples in the adult-young elderly age range suggest that there is no association between obesity<sup>72</sup> or DBP levels<sup>73</sup> and the apoE genotypes. However, we could assume how much these risk factors act negatively on the apoE3E3 genotype in our sample or, even in a null manner, considering that they are longevous elderlies.

(A)



(B)

Survival probability (%)											
Time (years)	82	84	86	88	90	92	94	96	98	100	102
E3E3	100	92.5	88.7	84.9	62.3	47.2	35.8	29.9	20.9	13.4	6.7
E3E4	100	93.8	93.8	87.5	75.0	62.5	37.5	31.3	23.4	0.0	0.0

Figure 1 – (A) Kaplan-Meier survival curve for carriers of the apoE3E3 and apoE3E4 genotypes. —△ apoE3E3 censored; —+ apoE3E4 censored. (A) Survival probability for the groups with a periodicity of 2 years.

Table 3 – Univariate and multivariate Cox regression for factors associated with mortality

Variables	Univariate	p	Multivariate*	p
	HR (IC 95%)		HR (IC 95%)	
Age	0.98 (0.89 – 1.07)	0.595	-	-
Males	1.48 (0.86 – 2.54)	0.161	1.34 (0.57 – 3.12)	0.500
E3E4 Genotype	1.03 (0.56 – 1.88)	0.938	-	-
Bayer ADL Scale	0.95 (0.86 – 1.05)	0.325	-	-
<b>Smoker/Ex-smoker</b>	2.57 (1.35 – 4.89)	0.004	<b>2.83 (1.00 – 7.98)</b>	<b>0.050</b>
Alcohol consumption (g/week)	1.00 (0.99 – 1.00)	0.702	-	-
BMI	0.96 (0.91 – 1.01)	0.107	0.98 (0.92 – 1.04)	0.507
<b>Physical activity ≥ 4000 kcal/wk</b>	<b>0.61 (0.36 – 1.05)</b>	<b>0.074</b>	<b>0.46 (0.23 – 0.90)</b>	<b>0.023</b>
<b>SBP</b>	0.98 (0.97 – 0.99)	0.001	<b>0.98 (0.97 – 0.99)</b>	<b>0.004</b>
DBP	0.98 (0.96 – 1.01)	0.137	0.99 (0.96 – 1.02)	0.539
<b>Pulse pressure</b>	0.98 (0.97 – 0.99)	0.006	<b>0.98 (0.97 – 0.99)</b>	<b>0.007</b>
Hypertension	0.41 (0.18 – 0.93)	0.033	0.62 (0.21 – 1.85)	0.395
<b>Diabetes mellitus</b>	4.49 (1.50 – 13.5)	0.007	<b>3.43 (1.03 – 11.5)</b>	<b>0.045</b>
Total cholesterol ≥ 200mg/dL	0.51 (0.30 – 0.88)	0.015	0.55 (0.26 – 1.15)	0.113
LDL ≥ 160 mg/dL	0.66 (0.36 – 1.20)	0.173	1.43 (0.61 – 3.37)	0.411
Low HDL**	0.90 (0.51 – 1.58)	0.713	-	-
Triglycerides ≥ 150mg/dL	1.41 (0.75 – 2.66)	0.292	-	-
Intermittent claudication	1.03 (0.53 – 1.99)	0.932	-	-
CVA	1.03 (0.59 – 1.77)	0.930	-	-
AMI	0.41 (0.09 – 1.69)	0.215	-	-
CHF	1.09 (0.64 – 1.84)	0.762	-	-

\* the criterion for entering the variable in the multivariate model was that it presented a value  $p < 0.20$  in the bivariate analysis; \*\* low HDL refers to HDL-cholesterol  $< 40\text{mg/dL}$  for men and  $< 50\text{mg/dL}$  for women.

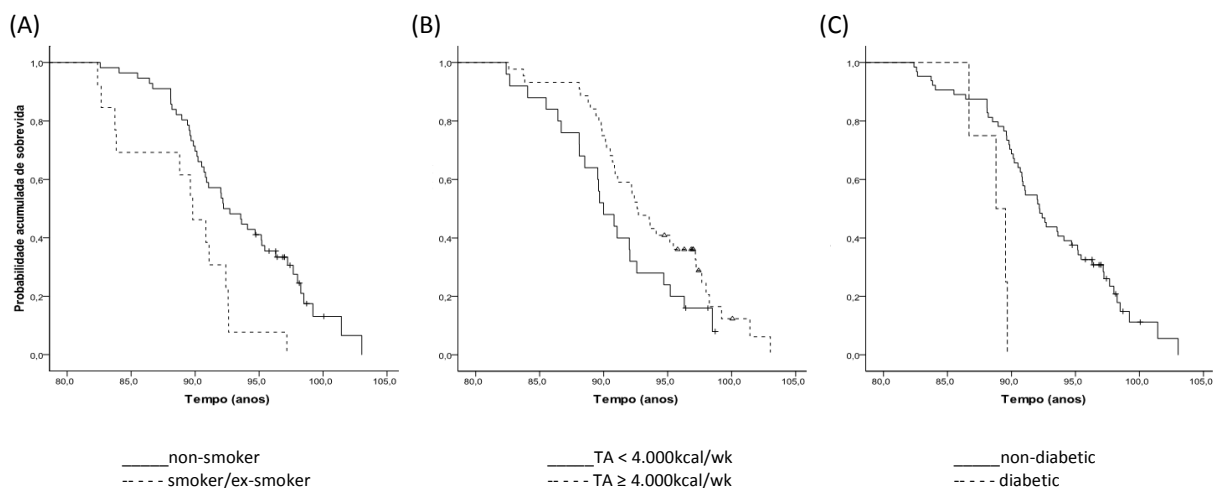


Figure 2: Survival curves for the factors associated with mortality in longevous elderly. (A) Smoking, (B) vigorous physical activity and (C) *diabetes mellitus*.

Furthermore, it is pertinent to comment on the alcohol consumption in the sample. It is known that there is an important gene-alcohol interaction in carriers of the  $\epsilon 4$  allele that modifies the levels of inflammatory markers such as C-reactive protein (CRP)<sup>74</sup> and interleukin-6 (IL-6)<sup>75</sup>. These studies have shown that the relation between the use of alcohol and CRP levels was significantly modified by the apoE genotype, with a positive association between participants with  $\epsilon 4$  allele, but tending to a reverse relation in those without this allele<sup>74</sup>. Additionally, alcohol consumption was not associated with concentrations of IL-6 in individuals non-carriers of the  $\epsilon 4$  allele, but was positively associated in carriers<sup>75</sup>. As previously mentioned, in our study the subjects in group E3E3 tended to consume larger amounts of grams of alcohol per week than those in group E3E4 ( $p=0.051$ ). More than two thirds of carriers of the apoE3E4 genotype were teetotalers and only 6% abused alcohol. These results called our attention and led us to speculate on a possible propensity in the group E3E4 to change habits. These data corroborate with the idea that genetic heterogeneity should be considered when adopting lifestyles and in the understanding of the cardiovascular effects from alcohol consumption. Furthermore, even if carriers of the apoE3E3 genotype consume a larger amount of alcohol weekly, these amounts are considered as moderate, and studies suggest a relation between low and moderate consumption of alcohol with a lower mortality<sup>76,77</sup>.

Our results show a trend for TC and LDL-cholesterol levels being higher in the E3E4 group. These findings are strengthened by evidence that the different apoE alleles can explain, approximately 10% of the interindividual variation in cholesterol levels in different populations<sup>78</sup>. While the  $\epsilon 3$  shows no deviations in the average population, the  $\epsilon 2$  and  $\epsilon 4$  alleles have significant effects in the levels of several lipids and lipoproteins, with the  $\epsilon 4$  allele being associated with high levels of TC and LDL-cholesterol<sup>23,79</sup>. The mechanism that causes these effects is known. The association with increased levels of plasmatic TC and LDL-cholesterol has been postulated that it occurs secondarily to the greater affinity of apoE4 for the LDL receptor. This fact would produce a faster capturing of the LDL particles and their internalization by hepatocytes, leading to the intracellular saturation of cholesterol with the resulting reduction in the expression of hepatic LDL

receptors. This process of receptor down-regulation would cause the accumulation of the LDL particles in the circulation with a subsequent increase in the levels of circulating LDL-cholesterol and total cholesterol<sup>80</sup>.

Another objective of this study was to investigate the relation between the apoE gene polymorphisms and death related to dementia or CVD. In the Veranópolis longevous elderly sample, the data from more than 15 years follow-up still do not support the existence of such relation. Firstly, the dementia related deaths were seldom, only six outcomes. This small number is insufficient to show any pre-tested relation. Also, the scientific literature has no studies that show the relation between mortality from dementia and apoE genotypes in longevous elderlies. As to the deaths from CVD, we found in other works strong evidence of non-association<sup>81-83</sup> with the genotypes in longevous populations, which corroborates the results from our study. Moreover, for both outcomes of interest, the possibility of  $\beta$  error should be considered due to the small sample number, when we state that there was no difference, when there should actually exist.

Survival curves for longevous elderlies are scarce in the literature for apoE genotypes. And when they do exist, they aggregate the genotypes or refer to the alleles. Our study showed that there was no significant difference in the survival of carriers of the apoE3E3 and apoE3E4 genotypes (logrank=0.938). The Kulminski and collaborators<sup>71</sup> cohort study with 3924 individuals aged between 5 and 70 followed up for 36 years showed no survival difference between the E3E4 groups and non-carriers of the  $\epsilon 4$  allele. However, the Rosvall and collaborators<sup>84</sup> study that selected elderlies aged 75 and older found that the apoE gene has a relation with mortality, that is, a 22% increase in the individuals carriers of the  $\epsilon 4$  allele compared with the apoE3E3 genotype. However, it is known that the average lifespan of apoE4E4 homozygotes is shorter than the averages for apoE3E4<sup>71</sup> heterozygotes. This way, by estimating the mortality by aggregating the homozygotes to the heterozygotes, Rosvall et al overestimated the mortality of the apoE3E4 genotype carriers.

In addition to the analysis by apoE genotypes, our cohort study with longevous elderlies pointed to some relevant factors that may be important in clinical practice, since this type of data is rare in the literature. Our results have indicated that some cardiovascular risk factors are associated with



mortality in general, even in longevous elderlies, age group in which the majority of these classical factors lose their predictive power of risk. Smoking appeared as being important in this relation. The risk of death for smokers and ex-smokers was 2.83 (IC95% 1.00-7.98) times that for non-smokers. A recent meta-analysis<sup>6</sup> brings evidence that smoking remains a strong risk factor for early mortality in elderlies aged 80 and older as well. Vigorous physical activity appeared as a factor of protection for death. Those individuals who expended more than 4,000 kcal/week through work and leisure activities had a 54% reduction in the risk of death (IC95% 10%-77%). Several publications have brought evidence of the positive association between leisure activities, especially regular physical ones, and longevity<sup>85-87</sup>. Recent works, such as the Kungsholmen Project<sup>88</sup>, a community based cohort, reinforce such evidence. This study that evaluated elderlies aged 75 and older during 18 years of follow-up showed a strong association between the practice of physical activity and survival of the participants. One of the results asserts that the average age of death for individuals who had regular activities such as swimming, walking or gymnastics was two years older than of those who did not practice activities. Regarding the practice of vigorous activities, the cohort from the Australian Longitudinal Study on Women's Health and the Health in Men study, with more than 18 thousand participants with average ages over 70 reinforces our findings. In this work, the physical activities were categorized according to the intensity and showed a reduction of 40% in mortality for women and 22% for men who practiced rigorous physical activity<sup>89</sup>. Where diabetic elderlies were concerned, despite the low percentage present in our sample, (6%), it was enough to attain a significant difference. Diabetic longevous elderlies had 3.43 (IC95% 1.03-11.5) times the risk of death from the non-diabetics, showing that this risk factor remains important, even over 80 years of age. A similar result became evident in the longevous cohort The Adventist Health Study<sup>7</sup>. Lastly, in our work, the increase in SBP and PP appeared as a factor of protection for general mortality. Thus, an increase of 1mmHg in SBP or PP reduced the risk of death by 2%. These findings are in accordance with the results from most studies that identified an inverted reaction between blood pressure and the risk of death for cardiovascular or any other causes in persons aged 80 or older<sup>4,90-100</sup>. However, this subject still

generates discussions and propositions in the scientific medium. A cohort that investigated the association between blood pressure and mortality in persons aged 85 and older, with 601 participants and 9 years of follow-up, when adjusted for confounding variables, showed that low levels of SBP were associated with the risk of death<sup>4</sup>. In a recent retrospective cohort, in which patients aged 80 and older with hypertension, of which 84.5% were taking antihypertensive medication, a lower survival was reported for those with SBP below 140mmHg, even after adjusting for the known predictors of mortality<sup>41</sup>. Therefore, all the evidence from epidemiological studies must be explained through a thorough physiopathological revision. Despite not being the objective of our work, some considerations become necessary. With the increase in age, there are generalized structural and functional changes in blood circulation that contribute to changes to the regional blood flow and progression of atherogenesis that can lead to microvascular abnormalities<sup>101</sup>. Sufficiently high levels of blood pressure may be required to ensure an adequate cardiac output and cerebral perfusion. The conflicting results from the cohort studies and from some clinical trials such as the results from the HYVET (Hypertension Very Elderly Trial)<sup>102</sup> are difficult, but have a plausible explanation. Blood pressure is a risk for cardiovascular events when it is too low and when it is too high. The HYVET included participants with at least 160mmHg, and the target for SBP was to attain levels below 150mmHg. Confronting our study, which is community based and therefore had no BP restriction, the risk for individuals with very low BP probably surpassed the risk for those with high BP, which could explain our data for protection.

In sum, our study did not make evident that longevous elderlies carriers of the apoE ε4 allele were at greater risk of death from cardiovascular disease or Alzheimer's dementia than carriers of the apoE3E3 reference genotype. Additionally, there was no association between the apoE polymorphisms and survival in the age range over 80. Otherwise, some exposures related significantly to the general mortality at an advanced age, namely smoking and DM were characterized as risk factors. However, vigorous physical activity and higher SBP and PP were factors of protection

## CONSIDERATIONS AND SHORTCOMINGS

Considering that the sample for this study comprised elderlies selected at two moments of the follow-up, there may have been a selection bias. Specifically, the nine elderlies that were genotyped in 2011 would form a group of survivors. With the intention of weighting such bias, we did new analyses removing those individuals. This way, we obtained very similar results, including in reference to the sample descriptive level, with exception for smoking and vigorous physical activity that lost the association with mortality. In this new analysis, the risk of death in smokers and ex-smokers was of 1.98 (IC95% 1.04-3.76) in the univariate model and 1.42 (IC95% 0.62-3.25) in the multivariate model. Physical activity  $\geq 4.000$  kcal/wk did not appear to be associated with the risk of death in the univariate model ( $p=0.217$ ).

Other shortcomings in this study must be considered, with the small sample size being the main one. Although previous studies described a difference of over 40% in the percentages of death from CVD among the carriers of the E3E3 and E3E4<sup>42,103</sup> genotype, our study did not attain an ideal sample size to evaluate these proportions. We worked with a convenience sample, whose population is scarce, and for this reason, the sample power that our study attained is low. However, despite this fact, we obtain signs that the sample was representative of a cohort that attained more than 875 of the eligible individuals. Furthermore, there were no follow-up losses. Another shortcoming that could be considered was the inclusion of infirm elderlies, that is, with physical restrictions, in the same group of elderlies with a weekly energy expenditure below 4,000 kcal. These elderlies were considered as being sedentary, although it was a situation at the moment of evaluation and not exactly reflecting the life habit of the elderlies. Nevertheless, only 5% of the sample were infirm and without possibility of practicing any physical activity.

## FINANCING

GD doctorate scholarship - National Scientific and Technological Development Council (CNPq)

## BIBLIOGRAPHIC REFERENCES

1. World Health Organization. Causes of death 2008: summary tables. Geneva, World Health Organization, 2011. Available at [apps.who.int/gho/data/?vid=10012#](http://apps.who.int/gho/data/?vid=10012#)

2. Boshuizen HC, Izaks GJ, van Buuren S, Ligthart GJ. Blood pressure and mortality in elderly people aged 85 and older: community based study. *BMJ*. 1998;316(7147):1780-4.
3. Poortvliet RK, de Ruijter W, de Craen AJ, Mooijart SP, Westendorp RG, Assendelft WJ, Gussekloo J, Blom JW. Blood pressure trends and mortality: the Leiden 85-plus Study. *Journal of Hypertension*. 2013;31(1):63-70.
4. Rastas S, Pirttilä T, Viramo P, Verkkoniemi A, Halonen P, Juva K, Niinistö L, Mattila K, Länsimies E, Sulkava R. Association between blood pressure and survival over 9 years in a general population aged 85 and older. *Journal of the American Geriatrics Society*. 2006;54(6):912-8.
5. Weiss A, Beloosesky Y, Weiss HS, Grossman E, Boaz M. Serum total cholesterol: A mortality predictor in elderly hospitalized patients. *Clinical Nutrition*. 2012;S0261-5614(12)00258-0.
6. Gellert C, Schöttker B, Brenner H. Smoking and all-cause mortality in older people: systematic review and meta-analysis. *Archives of Internal Medicine*. 2012;172(11):837-44.
7. Fraser GE, Shavlik DJ. Risk factors for all-cause and coronary heart disease mortality in the oldest-old. The Adventist Health Study. *Archives of Internal Medicine*. 1997;157(19):2249-58.
8. Liu CC, Kanekiyo T, Xu H, Bu G. Apolipoprotein E and Alzheimer disease: risk, mechanisms and therapy. *Nature Reviews: Neurology*. 2013;9(2):106-18
9. Hashimoto T, Serrano-Pozo A, Hori Y, Adams KW, Takeda S, Banerji AO, Mitani A, Joyner D, Thyssen DH, Bacskai BJ, Frosch MP, Spires-Jones TL, Finn MB, Holtzman DM, Hyman BT. Apolipoprotein E, especially apolipoprotein E4, increases the oligomerization of amyloid  $\beta$  peptide. *The Journal of Neuroscience*. 2012;32(43):15181-92.
10. Berlau DJ, Corrada MM, Head E, Kawas CH. APOE epsilon2 is associated with intact cognition but increased Alzheimer pathology in the oldest old. *Neurology*. 2009;72(9):829-34.
11. Utermann G, Hees M, Steinmetz A. Polymorphism of apolipoprotein E and occurrence of dysbetalipoproteinaemia in man. *Nature*. 1977;269(5629):604-7.
12. Utermann G, Vogelberg KH, Steinmetz A, Schoenborn W, Pruin N, Jaeschke M, Hees M, Canzler H. Polymorphism of apolipoprotein E. II. Genetics of hyperlipoproteinemia type III. *Clinical Genetics*. 1979;15(1):37-62.
13. Utermann G, Langenbeck U, Beisiegel U, Weber W. Genetics of the apolipoprotein E system in man. *American Journal of Human Genetics*. 1980;32(3):339-47.
14. Zannis VI, Breslow JL, Utermann G, Mahley RW, Weisgraber KH, Havel RJ, Goldstein JL, Brown MS, Schonfeld G, Hazzard WR, Blum C. Proposed nomenclature of apoE isoproteins, apoE genotypes, and phenotypes. *Journal of Lipid Research*. 1982;23(6):911-4.
15. Weisgraber KH, Rall SC Jr, Mahley RW. Human E apoprotein heterogeneity: cysteine-arginine interchanges in the amino acid sequence of the apo-E isoforms. *The Journal of Biological Chemistry*. 1981;256(17):9077-83.
16. Mahley RW. Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. *Science*. 1988;240(4852):622-30 *apud* Mahley RW and Rall Jr SC, Type III Hyperlipoproteinemia (Dysbetalipoproteinemia): The Role of Apolipoprotein E in Normal and Abnormal Lipoprotein Metabolism *In* Scriver CR *et al.* The metabolic and molecular bases of inherited disease. 7ed. New York: McGraw-Hill, 1995. 1962p.

17. Utermann G, Langenbeck U, Beisiegel U, Weber W. Genetics of the apolipoprotein E system in man. *American Journal of Human Genetics*. 1980;32(3):339-47 *apud* Bennet AM *et al*. Association of apolipoprotein E genotypes with lipid levels and coronary risk. *JAMA*. 2007;298(11):1300-11.
18. Weisgraber KH, Innerarity TL, Mahley RW. Abnormal lipoprotein receptor-binding activity of the human E apoprotein due to cysteine-arginine interchange at a single site. *The Journal of Biological Chemistry*. 1982;257(5):2518-21.
19. Weisgraber KH, Rall SC Jr, Mahley RW. Human E apoprotein heterogeneity: cysteine-arginine interchanges in the amino acid sequence of the apo-E isoforms. *The Journal of Biological Chemistry*. 1981;256(17):9077-83.
20. Marca V, Acosta O, Cornejo-Olivos M, Ortega O, Huerta D, Mazzetti P. Polimorfismo genético de la Apolipoproteína E en una población peruana. [Genetic polymorphism of Apolipoprotein E in a peruvian population] *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*. 2011;28(4):589-94.
21. Eichner JE, Dunn ST, Perveen G, Thompson DM, Stewart KE, Stroehla BC. Apolipoprotein E polymorphism and cardiovascular disease: a HuGE review. *American Journal Epidemiology*. 2002;155(6):487-95.
22. Hu M, Mak VW, Tomlinson B. Polymorphisms in apolipoprotein E and apolipoprotein A-V do not influence the lipid response to rosuvastatin but are associated with baseline lipid levels in Chinese patients with hyperlipidemia. *Journal of Clinical Lipidology*. 2012;6(6):585-92.
23. Bennet AM, Di Angelantonio E, Ye Z, Wensley F, Dahlin A, Ahlborn A, Keavney B, Collins R, Wiman B, de Faire U, Danesh J. Association of apolipoprotein E genotypes with lipid levels and coronary risk. *JAMA*. 2007;298(11):1300-11.
24. Tanguturi P, Pullareddy B, Sampath Kumar P, Murthy DK. Association Between Apolipoprotein E Gene Polymorphism and Myocardial Infarction. *Biochemical genetics*. 2013 Jan 31.
25. Gungor Z, Anuurad E, Enkmaa B, Zhang W, Kim K, Berglund L. Apo E4 and lipoprotein-associated phospholipase A2 synergistically increase cardiovascular risk. *Atherosclerosis*. 2012 Jul;223(1):230-4.
26. Ciftçođan DY, Coskun S, Ulman C, Tıkız H. The association of apolipoprotein E polymorphism and lipid levels in children with a family history of premature coronary artery disease. *Journal of Clinical Lipidology* 2012;6(1):81-7.
27. Niu W, Qi Y, Qian Y, Gao P, Zhu D. The relationship between apolipoprotein E epsilon2/epsilon3/epsilon4 polymorphisms and hypertension: a meta-analysis of six studies comprising 1812 cases and 1762 controls. *Hypertension Research*. 2009;32(12):1060-6.
28. Anuurad E, Rubin J, Lu G, Pearson TA, Holleran S, Ramakrishnan R, Berglund L. Protective effect of apolipoprotein E2 on coronary artery disease in African Americans is mediated through lipoprotein cholesterol. *Journal of Lipid Research*. 2006;47:2475-81.
29. Jurkovicova D, Goncalvesova E, Sedlakova B, Hudcova S, Fabian J, Krizanova O. Is the ApoE polymorphism associated with dilated cardiomyopathy? *General Physiology and Biophysics*. 2006;25:3-10.
30. Wang CH, Zhou X. Meta-analysis for relationship between apoE gene polymorphism and coronary heart disease. *Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi*. 2003;(5):368-70.
31. Fei M, Jianhua W. Apolipoprotein ε4-Allele as a Significant Risk Factor for Conversion from Mild Cognitive Impairment to Alzheimer's disease: a Meta-analysis of Prospective Studies. *Journal of Molecular Neuroscience: MN*. 2012 Dec 15.
32. Sadigh-Eteghad S, Talebi M, Farhoudi M. Association of apolipoprotein E epsilon 4 allele with sporadic late onset Alzheimer's disease. A meta-analysis. *Neurosciences (Riyadh)*. 2012;17(4):321-6.
33. Gdovinová Z, Habalová V, Novosadová Z. Polymorphism of apolipoproteine E in relation with alzheimer and vascular dementia. *Cellular and Molecular Neurobiology*. 2006;26(7/8):1219-24.
34. Souza DRS, De Godoy MR, Hotta J, Tajara EH, Brandão AC, Pinheiro Jr S, Tognola WA, Dos Santos JE. Association of apolipoprotein E polymorphism in late-onset Alzheimer's disease and vascular dementia in Brazilians. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 2003;36:919-23.
35. De Feo E, Rowell J, Cadoni G, Nicolotti N, Arzani D, Giorgio A, Amore R, Paludetti G, Ricciardi G, Boccia S. A case-control study on the effect of apolipoprotein E genotype on head and neck cancer risk. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*. 2010;19(11):2839-46.
36. Grant WB. A multicountry ecological study of risk-modifying factors for prostate cancer: apolipoprotein E epsilon4 as a risk factor and cereals as a risk reduction factor. *Anticancer Research*. 2010;30(1):189-99.
37. Trompet S, Jukema JW, Katan MB, Blauw GJ, Sattar N, Buckley B, Caslake M, Ford I, Shepherd J, Westendorp RG, de Craen AJ. Apolipoprotein e genotype, plasma cholesterol, and cancer: a Mendelian randomization study. *American Journal of Epidemiology*. 2009;170(11):1415-21.
38. Cetinkalp S, Karadeniz M, Erdogan M, Zengi A, Cetintas V, Tetik A, Eroglu Z, Kosova B, Ozgen AG, Saygili F, Yilmaz C. Apolipoprotein E gene polymorphism and polycystic ovary syndrome patients in Western Anatolia, Turkey. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 2009;26(1):1-6.
39. Paganini-Hill A. Hypertension and dementia in the elderly: the leisure world cohort study. *International Journal of Hypertension*. 2012;2012:205350.
40. Paganini-Hill A. Lifestyle practices and cardiovascular disease mortality in the elderly: the leisure world cohort study. *Cardiology Research and Practice*. 2011;2011:983764.
41. Oates DJ, Berlowitz DR, Glickman ME, Silliman RA, Borzecki AM. Blood pressure and survival in the oldest old. *Journal of the American Geriatrics Society*. 2007 Mar;55(3):383-8.
42. Song Y, Stampfer MJ, Liu S. Meta-analysis: apolipoprotein E genotypes and risk for coronary heart disease. *Annals of Internal Medicine*. 2004;141(2):137-47.
43. Farrer LA, Cupples LA, Haines JL, Hyman B, Kukull WA, Mayeux R, Myers RH, Pericak-Vance MA, Risch N, van Duijn CM. Effects of age, sex, and ethnicity on the association between apolipoprotein E genotype and Alzheimer disease. A meta-analysis. APOE and Alzheimer Disease Meta Analysis Consortium. *JAMA*. 1997;278(16):1349-56.
44. DATASUS (Departamento de Informática do SUS), 1994. *Informações de saúde – indicadores de saúde - indicadores e dados básicos (IDB - Brasil - 2011) - indicadores demográficos - esperança de vida ao nascer* <<http://www.datasus.gov.br>>. Dado atualizado e acessado em 15/12/2012 refere que as esperanças de vida ao nascer foram extraídas das tábuas de mortalidade interpoladas a partir das tábuas construídas para os anos de 1991 e 2000.
45. DATASUS (Departamento de Informática do SUS), 1998. *Informações de saúde – demográficas e socioeconômicas - Censos (1980, 1991, 2000 e 2010), Contagem (1996) e projeções intercensitárias (1981*

- a 2012), segundo faixa etária, sexo e situação de domicílio <http://www.datasus.gov.br>. Dado atualizado e acessado em 15/12/2012.
46. Marafon LP, da Cruz IBM, Schwanke CHA, Moriguchi EH. Preditores cardiovasculares da mortalidade em idosos longevos. *Cad. Saúde Pública*, Rio de Janeiro, 19(3):799-808, mai-jun, 2003.
  47. Werle MH, Moriguchi E, Fuchs SC, Bruscato NM, de Carli W, Fuchs FD. Risk factors for cardiovascular disease in the very elderly: results of a cohort study in a city in southern Brazil. *European Journal of Cardiovascular Prevention and Rehabilitation*. 2011;18(3):369-77.
  48. Schwanke CHA, da Cruz IBM, Leal NF, Scheibe R, Moriguchi Y, Moriguchi EH. Análise da associação entre polimorfismo do gene da apolipoproteína E e fatores de risco cardiovasculares em idosos longevos. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*. 2002;78(6):561-70.
  49. Alvim RO, Freitas SRS, Ferreira NE, Santos PCJL, Cunha RS, Mill JG, Krieger JE, Pereira AC. APOE polymorphism is associated with lipid profile, but not with arterial stiffness in the general population. *Lipids in Health and Disease*. 2010;9:128.
  50. Rose GA, Blackburn H, Gillum RF, Prineas RJ. *Cardiovascular Survey Methods* 2ed. Geneva: World Health Organization, 1982.
  51. The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. U.S. Department of Health and Human Services. National Institutes of Health. National Heart, Lung, and Blood Institute. *National High Blood Pressure Education Program*. August 2004.
  52. World Health Organization. Obesity: preventing and managing the global epidemic. *Geneva: World Health Organization*; 1998. (Technical Report Series, 894).
  53. Lipschitz DA. Screening for nutritional status in the elderly. *Primary Care* 1994;21:55-67.
  54. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes 2009 - Sociedade Brasileira de Diabetes. 3ed. Itapevi, SP: A. Araújo Silva Farmacêutica, 2009.
  55. IV Diretriz Brasileira Sobre Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia - Volume 88, Suplemento I, Abril 2007*.
  56. Fuchs FD, Chambless LE, Folsom AR, Eigenbrodt ML, Duncan BB, Gilbert A, Szklo M. Association between Alcoholic Beverage Consumption and Incidence of Coronary Heart Disease in Whites and Blacks The Atherosclerosis Risk in Communities Study. *American Journal of Epidemiology*. 2004;160(5):466-74.
  57. Steffens AA, Moreira LB, Fuchs SC, Wiehe M, Gus M, Fuchs FD. Incidence of hypertension by alcohol consumption: is it modified by race? *Journal of Hypertension*. 2006;24(8):1489-92.
  58. Schmidt-Trucksass A, Huonker M, Halle M, Dickhuth HH, Sandrock M. Effect of Physical Activity on the Arterial Wall. *Deutschezeitschrift fur Sportmedizin*. 2008;59(9):200-5.
  59. Drygas W, Kostka T, Jegier A, Kun'ski H. Long-Term Effects of Different Physical Activity Levels on Coronary Heart Disease Risk Factors in Middle-Aged Men. *International Journal of Sports Medicine*. 2000;21:235-41.
  60. Janssen I and Jolliffe CJ. Influence of physical activity on mortality in elderly with coronary artery disease. *Medicine and Science in Sports and Exercise*. 2006;38(3):418-23.
  61. Ainsworth BE, Haskell WL, Whitt MC, Irwin ML, Swartz AM, Strath SJ, O'Brien WL, Bassett Jr DR, Schmitz KH, Emplaincourt PO, Jacobs Jr DR, Leon AR. Compendium of physical activities: an update of activity codes and MET intensities. *Medicine & Science in Sports & Exercise*. 2000;32(9):S498-S516.
  62. Hindmarch I, Lehfeld H, Jongh P, Erzigkeit H. The Bayer activities of daily living scale (B-ADL). *Dementia and Geriatric Cognitive Disorders*. 1998;9(Suppl.2):20-6.
  63. Lehfeld H, Reisberg B, Finkel S, Kanowski S, Wied V, Pittas J, Tsolaki M, Robert PH, Hulla F, Heininger K, Erzigkeit H. Informantrated Activities-of-Daily-Living (ADL) assessments: results of a study of 141 items in the U.S.A., Germany, Russia, and Greece from the International ADL Scale Development Project. *Alzheimer Disease and Associated Disorders*. 1997;11(Suppl 4):S39-44.
  64. Erzigkeit H, Lehfeld H, Pena-Casanova J, Bieber F, Yekrang-Hartmann C, Rupp M, Rappard F, Arnold K, Hindmarch I. The Bayer - Activities of Daily Living Scale (B-ADL): Results from a Validation Study in Three European Countries. *Dementia and Geriatric Cognitive Disorders*. 2001;12(5):348-58.
  65. Mapi Research Institute. Cultural Adaptation of the Bayer Activities of Daily Living Scale (B-ADL) into Brazilian Portuguese. Report. Lyon-France: Mapi Research Institute; 1999. p. 1-19.
  66. Folquitto JC, Bustamante SEZ, Barros SB, Azevedo D, Lopes MA, Hototian SR, Jacob Fº W, Litvoc J, Bottino CMC. The Bayer - Activities of Daily Living Scale (B-ADL) in the differentiation between mild to moderate dementia and normal aging. *Revista Brasileira de Psiquiatria*. 2007;29(4):350-3.
  67. Siest G, Pilot T, Régis-Bailly A, Leininger-Muller B, Steinmetz J, Galteau MM, Visvikis S. Apolipoprotein E: An Important Gene and Protein to Follow in Laboratory Medicine. *Clinical Chemistry*. 1995;41(8):1068-86.
  68. Ruiu G, Cassader M, Gambino R, Alemanno N, Demichieli F, Pagano A, Veglia F, Pagano G. Apolipoprotein E allele frequencies in an Italian population: relation to age and lipid profile. *Aging (Milano)*. 1995;7(4):185-9.
  69. Bader G, Zuliani G, Kostner GM, Fellin R. Apolipoprotein E polymorphism is not associated with longevity or disability in a sample of Italian octo- and nonagenarians. *Gerontology*. 1998;44(5):293-9.
  70. Lima-Costa MF, Peixoto SV, Taufer M, Moriguchi EH. Apolipoprotein E genotype does not predict 9-year all-cause mortality in Brazilian older adults: the Bambuí cohort. *Journal of the American Geriatrics Society*. 2008;56(12):2366-8.
  71. Kulminski AM, Culminskaya I, Ukraintseva SV, Arbeev KG, Arbeeva L, Wu D, Akushevich I, Land KC, Yashin AI. Trade-off in the effects of the apolipoprotein E polymorphism on the ages at onset of CVD and cancer influences human lifespan. *Aging Cell* 2011;10(3):533-41.
  72. Petkeviciene J, Smalinskiene A, Luksiene DI, Jureniene K, Ramauskiene V, Klumbiene J, Lesauskaite V. Associations between apolipoprotein E genotype, diet, body mass index, and serum lipids in Lithuanian adult population. *PLoS One*. 2012;7(7):e41525.
  73. Fuzikawa AK, Peixoto SV, Taufer M, Moriguchi EH, Lima-Costa MF. Association of ApoE polymorphisms with prevalent hypertension in 1406 older adults: the Bambuí Health Aging Study (BHAS). *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 2008;41(2):89-94.
  74. Mukamal KJ, Cushman M, Mittleman MA, Tracy RP, Siscovick DS. Alcohol consumption and inflammatory markers in older adults: the Cardiovascular Health Study. *Atherosclerosis*. 2004;173:79-87.
  75. Mukamal KJ, Jenny NS, Tracy RP, Siscovick DS. Alcohol consumption, interleukin-6 and apolipoprotein E genotypes, and concentrations of interleukin-6 and serum amyloid P in older adults. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2007;86:444-50.

76. Scherr PA, LaCroix AZ, Wallace RB, Berkman L, Curb JD, Cornoni-Huntley J, Evans DA, Hennekens CH. Light to moderate alcohol consumption and mortality in the elderly. *Journal of the American Geriatrics Society*. 1992;40(7):651-7.
77. Thun MJ, Peto R, Lopez AD, Monaco JH, Henley SJ, Heath CW Jr, Doll R. Alcohol consumption and mortality among middle-aged and elderly U.S. adults. *The New England Journal of Medicine*. 1997;337(24):1705-14.
78. Dallongeville J, Lussier-Cacan S, Davignon J. Modulation of plasma triglyceride levels by apoE phenotype: a meta-analysis. *Journal of Lipid Research*. 1992;33(4):447-54.
79. Sing CF and Davignon J. Role of the apolipoprotein E polymorphism in determining normal plasma lipid and lipoprotein variation. *American Journal of Human Genetics*. 1985;37(2):268-85.
80. Weintraub MS, Eisenberg S, Breslow JL. Dietary fat clearance in normal subjects is regulated by genetic variation in apolipoprotein E. *The Journal of Clinical Investigation*. 1987;80(6):1571-7.
81. Mooijaart SP, Berbée JF, van Heemst D, Havekes LM, de Craen AJ, Slagboom PE, Rensen PC, Westendorp RG. ApoE plasma levels and risk of cardiovascular mortality in old age. *PLoS Medicine*. 2006;3(6):e176.
82. Heijmans BT, Slagboom PE, Gussekloo J, Droog S, Lagaay AM, Kluit C, Knook DL, Westendorp RG. Association of APOE epsilon2/epsilon3/epsilon4 and promoter gene variants with dementia but not cardiovascular mortality in old age. *American Journal of Medical Genetics*. 2002;107(3):201-8.
83. Juva K, Verkkoniemi A, Viramo P, Polvikoski T, Kainulainen K, Kontula K, Sulkava R. APOE epsilon4 does not predict mortality, cognitive decline, or dementia in the oldest old. *Neurology*. 2000;54(2):412-5.
84. Rosvall L, Rizzuto D, Wang HX, Winblad B, Graff C, Fratiglioni L. APOE-related mortality: effect of dementia, cardiovascular disease and gender. *Neurobiology of Aging*. 2009;30(10):1545-51.
85. Benetos A, Thomas F, Bean KE, Pannier B, Guize L. Role of modifiable risk factors in life expectancy in the elderly. *Journal of Hypertension*. 2005;23:1803-8.
86. Knuops KT, de Groot LC, Kromhout D, Perrin AE, Moreiras-Varela O, Menotti A, et al. Mediterranean diet, lifestyle factors, and 10-year mortality in elderly European men and women: the HALE project. *JAMA*. 2004;292:1433-9.
87. Yates LB, Djousse L, Kurth T, Buring JE, Gaziano JM. Exceptional longevity in men: modifiable factors associated with survival and function to age 90 years. *Archives Internal Medicine*. 2008;168:284-90.
88. Rizzuto D, Orsini N, Qiu C, Wang HX, Fratiglioni L. Lifestyle, social factors, and survival after age 75: population based study. *BMJ*. 2012;345:e5568.
89. Brown WJ, McLaughlin D, Leung J, McCaul KA, Flicker L, Almeida OP, Hankey GJ, Lopez D, Dobson AJ. Physical activity and all-cause mortality in older women and men. *British Journal of Sports Medicine*. 2012;46(9):664-8.
90. Mattila K, Haavisto M, Rajala S, Heikinheimo R. Blood pressure and five year survival in the very old. *British Medical Journal (Clinical Research Ed.)*. 1988;296(6626):887-9.
91. Blazer DG, Landerman LR, Hays JC, Grady TA, Havlik R, Corti MC. Blood pressure and mortality risk in older people: comparison between African Americans and whites. *Journal of the American Geriatrics Society*. 2001;49(4):375-81.
92. Glynn RJ, Field TS, Rosner B, Hebert PR, Taylor JO, Hennekens CH. Evidence for a positive linear relation between blood pressure and mortality in elderly people. *Lancet*. 1995;345(8953):825-9.
93. Psaty BM, Furberg CD, Kuller LH, Cushman M, Savage PJ, Levine D, O'Leary DH, Bryan RN, Anderson M, Lumley T. Association between blood pressure level and the risk of myocardial infarction, stroke, and total mortality: the cardiovascular health study. *Archives of Internal Medicine*. 2001;161(9):1183-92.
94. Lindholm L, Lanke J, Bengtsson B. U-shaped association between mortality and blood pressure in a thirteen-year prospective study. *Family Practice*. 1986;3(1):3-8.
95. Okumiya K, Matsubayashi K, Wada T, Fujisawa M, Osaki Y, Doi Y, Yasuda N, Ozawa T. A U-shaped association between home systolic blood pressure and four-year mortality in community-dwelling older men. *Journal of the American Geriatrics Society*. 1999;47(12):1415-21.
96. Port S, Garfinkel A, Boyle N. There is a non-linear relationship between mortality and blood pressure. *European Heart Journal*. 2000;21(20):1635-8.
97. Siegel D, Kuller L, Lazarus NB, Black D, Feigal D, Hughes G, Schoenberger JA, Hulley SB. Predictors of cardiovascular events and mortality in the Systolic Hypertension in the Elderly Program pilot project. *American Journal of Epidemiology*. 1987;126(3):385-99.
98. Taylor JO, Cornoni-Huntley J, Curb JD, Manton KG, Ostfeld AM, Scherr P, Wallace RB. Blood pressure and mortality risk in the elderly. *American Journal of Epidemiology*. 1991;134(5):489-501.
99. van Bommel T, Gussekloo J, Westendorp RG, Blauw GJ. In a population-based prospective study, no association between high blood pressure and mortality after age 85 years. *Journal of Hypertension*. 2006;24(2):287-92.
100. Satish S, Freeman DH Jr, Ray L, Goodwin JS. The relationship between blood pressure and mortality in the oldest old. *Journal of the American Geriatrics Society*. 2001;49(4):367-74.
101. Blacher J, Safar M. Specific aspects of high blood pressure in the elderly. *Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System: JRAAS*. 2002;3(1):S10-5.
102. Gueyffier F, Bulpitt C, Boissel JP, Schron E, Ekblom T, Fagard R, Casiglia E, Kerlikowske K, Coope J. Antihypertensive drugs in very old people: a subgroup meta-analysis of randomised controlled trials. INDANA Group. *Lancet*. 1999;353(9155):793-6.
103. Stengård JH, Weiss KM, Sing CF. An ecological study of association between coronary heart disease mortality rates in men and the relative frequencies of common allelic variations in the gene coding for apolipoprotein E. *Human Genetics*. 1998;103:234-241.

## ATTACHMENT 1

Complete Table 2: Characterization of the sample

Variables*	Total sample (n = 69)	E3E3 Genotype (n = 53)	E3E4 Genotype (n = 16)	p**
Age at entry (years)	82.6 ± 2.8	82.2 ± 2.7	84.0 ± 2.8	0.021
Sex				0.267
Male	23 (33.3)	20 (37.7)	3 (18.8)	
Female	46 (66.7)	33 (62.3)	13 (81.3)	
Bayer ADL Scale	2.98 (1.44-5.55)	2.95 (1.38-5.46)	3.19 (1.54-7.44)	0.631
Bayer ADL Scale ≥ 3.12	31 (45.6)	23 (43.4)	8 (53.3)	0.698
Smoking				0.717
Non-Smoker	56 (81.2)	42 (79.2)	14 (87.5)	
Ex-Smoker/Smoker	13 (18.8)	11 (20.8)	2 (12.5)	
Alcohol consumption (g/wk)	12.6 (0-143)	59.9 (0-148)	0 (0-39.6)	0.051
Alcohol Abuse				0.093
No	17 (24.6)	13 (24.5)	4 (25.0)	
Yes (F>105g and M>210g)	18 (26.1)	17 (32.1)	1 (6.3)	
Teetotalers	34 (49.3)	23 (43.4)	11 (68.8)	
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	26.8 ± 5.4	27.6 ± 5.5	23.7 ± 3.6	0.011
BMI ≥ 27 kg/m <sup>2</sup>	29 (42.6)	26 (49.1)	3 (20.0)	0.087
BMI ≥ 30 kg/m <sup>2</sup>	17 (25.0)	16 (30.2)	1 (6.7)	0.092
Physical Activity (kcal/week)	5133 (2386-9846)	5421 (2155-10544)	3580 (2300-6930)	0.216
Physical activity				0.109
< 4000 kcal/week	25 (36.2)	16 (30.2)	9 (56.3)	
≥ 4000 kcal/week	44 (63.8)	37 (69.8)	7 (43.8)	
SBP (mmHg)	161 ± 25.3	162 ± 23.7	158 ± 30.5	0.489
DBP (mmHg)	86.3 ± 13.2	88.6 ± 12.7	78.5 ± 12.4	0.007
Pulse Pressure (SBP-DBP)	75.1 ± 22.7	73.9 ± 21.5	79.0 ± 26.8	0.439
Hypertension	62 (89.9)	48 (90.6)	14 (87.5)	0.660
Fasting glycemia (mg/dL)	95.4 ± 20.7	96.2 ± 22.7	92.6 ± 12.2	0.539
<i>Diabetes mellitus</i>	4 (5.9)	4 (7.7)	0 (0.0)	0.566
Total Cholesterol (mg/dL)	209 ± 48.8	203 ± 43.9	229 ± 59.5	0.066
Total cholesterol ≥ 200 mg/dL	37 (54.4)	27 (51.9)	10 (62.5)	0.649
LDL Cholesterol (mg/dL)	138 ± 42.1	132 ± 36.0	156 ± 55.0	0.055
LDL ≥ 160 mg/dL	20 (29.9)	13 (25.5)	7 (43.8)	0.213
HDL Cholesterol (mg/dL)	43.4 ± 11.4	44.0 ± 12.5	41.4 ± 6.6	0.284
Low HDL	45 (66.2)	32 (61.5)	13 (81.3)	0.248
Triglycerides (mg/dL)	102 (85.8-146)	102 (83.4-144)	107 (88.2-159)	0.806
Triglycerides ≥ 150 mg/dL	15 (22.1)	11 (21.2)	4 (25.0)	0.739

\* described in average ± standard deviation, median (percentiles 25 – 75) or n(%); \*\*t-student test (comparison of averages), Mann-Whitney test (comparison of medians), Pearson chi-square test (categorical variables) or Fisher exact test (for the smoking, BMI ≥ 30 kg/m<sup>2</sup>, hypertension, *diabetes mellitus*, LDL ≥ 160 mg/dL and triglycerides ≥ 150 mg/dL variables)

## ATTACHMENT 2

Complete Table 4 – Univariate and multivariate Cox regression to evaluate factors associated with mortality

Variables	Univariate	p	Multivariate*	p
	HR (IC 95%)		HR (IC 95%)	
Age (years)	0.98 (0.89 – 1.07)	0.595	-	-
Male	1.48 (0.86 – 2.54)	0.161	1.34 (0.57 – 3.12)	0.500
E3E4 Genotype	1.03 (0.56 – 1.88)	0.938	-	-
Bayer ADL Scale	0.95 (0.86 – 1.05)	0.325	-	-
Bayer ADL Scale $\geq$ 3.12	0.73 (0.42 – 1.25)	0.252	-	-
<b>Smoker/Ex-smoker</b>	2.57 (1.35 – 4.89)	0.004	<b>2.83 (1.00 – 7.98)</b>	<b>0.050</b>
Alcohol consumption (g/week)	1.00 (0.99 – 1.00)	0.702	-	-
Alcohol Abuse				
No	1.0			
Yes (F>105g and M>210g)	0.70 (0.33 – 1.48)	0.354	-	-
Teetotalers	0.69 (0.36 – 1.33)	0.268	-	-
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	0.96 (0.91 – 1.01)	0.107	0.98 (0.92 – 1.04)	0.507
BMI > 27 kg/m <sup>2</sup>	0.77 (0.45 – 1.33)	0.352	-	-
BMI $\geq$ 30 kg/m <sup>2</sup>	0.98 (0.53 – 1.80)	0.948	-	-
<b>Physical activity <math>\geq</math> 4000 kcal/wk</b>	<b>0.61 (0.36 – 1.05)</b>	<b>0.074</b>	<b>0.46 (0.23 – 0.90)</b>	<b>0.023</b>
<b>SBP (mmHg)</b>	0.98 (0.97 – 0.99)	0.001	<b>0.98 (0.97 – 0.99)</b>	<b>0.004</b>
DBP (mmHg)	0.98 (0.96 – 1.01)	0.137	0.99 (0.96 – 1.02)	0.539
<b>Pulse Pressure (SBP-DBP)</b>	0.98 (0.97 – 0.99)	0.006	<b>0.98 (0.97 – 0.99)</b>	<b>0.007</b>
Hypertension	0.41 (0.18 – 0.93)	0.033	0.62 (0.21 – 1.85)	0.395
Glycemia (mg/dL)	1.00 (0.99 – 1.02)	0.677	-	-
<b>Diabetes mellitus</b>	4.49 (1.50 – 13.5)	0.007	<b>3.43 (1.03 – 11.5)</b>	<b>0.045</b>
Total Cholesterol (mg/dL)	0.99 (0.99 – 1.00)	0.044	-	-
TC $\geq$ 200 mg/dL	0.51 (0.30 – 0.88)	0.015	0.55 (0.26 – 1.15)	0.113
LDL Cholesterol (mg/dL)	0.99 (0.99 – 1.00)	0.062	-	-
LDL $\geq$ 160 mg/dL	0.66 (0.36 – 1.20)	0.173	1.43 (0.61 – 3.37)	0.411
HDL Cholesterol (mg/dL)	1.00 (0.98 – 1.03)	0.971	-	-
Low HDL**	0.90 (0.51 – 1.58)	0.713	-	-
Triglycerides (mg/dL)	1.00 (0.99 – 1.00)	0.666	-	-
TG $\geq$ 150 mg/dL	1.41 (0.75 – 2.66)	0.292	-	-
Intermittent claudication	1.03 (0.53 – 1.99)	0.932	-	-
CVA	1.03 (0.59 – 1.77)	0.930	-	-
AMI	0.41 (0.09 – 1.69)	0.215	-	-
CHF	1.09 (0.64 – 1.84)	0.762	-	-
Cardiopath	0.90 (0.52 – 1.53)	0.685	-	-
CVD	0.88 (0.50 – 1.56)	0.660	-	-

\* the criterion for entering the variable in the multivariate model was that it presented a value  $p < 0.20$  in the bivariate analysis; \*\* low HDL refers to HDL-cholesterol  $< 40$ mg/dL for men and  $< 50$ mg/dL for women.

## Associação de fatores de risco cardiovascular e polimorfismo de apoE com mortalidade em idosos longevos: uma coorte de 18 anos

### RESUMO

**Contexto:** Doenças crônicas como as cardiovasculares e demências são mais frequentes na população idosa, especialmente na faixa etária acima dos 80 anos. Apesar desta evidência, são poucos os estudos delineados com indivíduos longevos. E frequentes são os resultados indefinidos ou inversos quando avaliados. Esta lacuna no conhecimento é dificultada pela complexidade de fatores ambientais e genéticos que influenciam a progressão das doenças crônicas. Especificamente, os níveis de pressão arterial e colesterol e o alelo  $\epsilon 4$  da apolipoproteína E (apoE) tem efeitos divergentes nos idosos longevos comparados aos idosos jovens. O objetivo deste estudo é investigar a relação entre o polimorfismo do gene da apoE e a mortalidade por doença cardiovascular e demência em idosos longevos que vivem em comunidade e avaliar a sobrevida de acordo com este polimorfismo e fatores de risco cardiovascular.

**Métodos:** Uma amostra de 74 idosos com 80 anos ou mais da coorte do Projeto Veranópolis foi selecionada para genotipagem da apoE. Na linha de base, foram coletadas variáveis antropométricas, dosagens sanguíneas de glicose e lipídeos, pressão arterial e variáveis de estilo de vida como tabagismo, consumo de álcool e atividade física. O seguimento médio da coorte foi 16,4 anos e total de 18 anos. As causas de morte foram classificadas de acordo com a CID-10 em cardiovasculares e demenciais. A escala Bayer – Atividades da Vida Diária foi aplicada aos cuidadores dos idosos para avaliar demência.

**Resultados:** A frequência gênica da ApoE presente na amostra foi: 4,1%  $\epsilon 2$ ; 85,1%  $\epsilon 3$  e 10,8%  $\epsilon 4$ . E a frequência genotípica: 1,4% E2E2; 5,4% E2E3; 71,6% E3E3 e 21,6% E3E4. Para a comparação dos desfechos foram formados 2 grupos: portadores do genótipo apoE3E3 (53 idosos) e portadores do genótipo apoE3E4 (16 idosos). A expectativa de vida média foi de 92,3 anos (IC95% 91,2-93,5). Diferenças significativas entre os genótipos foram encontradas com relação à idade média de entrada na coorte, índice de massa corporal e pressão arterial diastólica. Encontramos uma tendência para que os níveis de colesterol total e LDL-colesterol fossem maiores no grupo E3E4. Não encontramos associação entre desfechos de morbidade (AVC, IAM e ICC) ou mortalidade entre os genótipos. Para a amostra no geral, os fatores significativamente associados à mortalidade foram: tabagismo, atividade física, pressão arterial sistólica (PAS), pressão de pulso (PP) e *diabetes mellitus* (DM). O risco de morte em indivíduos fumantes e ex-fumantes foi 2,83 vezes (IC95% 1,00-7,98) do risco em não fumantes. Indivíduos que praticavam atividade física vigorosa ( $\geq 4.000$  kcal/semana) tiveram uma redução no risco de óbito em 54% (IC95% 10%-77%). Para o aumento de 1mmHg na pressão arterial sistólica (PAS) ou na pressão de pulso (PP) houve uma redução de 2% (IC95% 1%-3%) no risco de morte. Os idosos diabéticos tiveram 3,43 (IC95% 1,03-11,50) vezes o risco de óbito dos não diabéticos.

**Conclusão:** Não foi encontrada associação entre os dois genótipos da apoE mais frequentes na população e mortalidade cardiovascular ou sobrevida em idosos longevos. Em toda a amostra, os fatores de risco significativamente associados à mortalidade foram tabagismo e DM. Atividade física vigorosa, PAS e PP maiores foram considerados fatores de proteção para mortalidade geral.

**Palavras-chave:** Apolipoproteína E4, Doenças Cardiovasculares, Fatores de Risco, Análise de Sobrevida, Mortalidade, Idoso de 80 Anos ou mais.



## INTRODUÇÃO

O rápido crescimento da população idosa em todo o mundo desperta o interesse e a necessidade de estudos sobre os fatores para alcançar uma longevidade com qualidade de vida. Dados de mortalidade em idosos com mais de 80 anos mostram que as doenças cardiovasculares (DCV) representam metade das causas de óbito<sup>1</sup>. Sustenta-se que pesquisas que determinem um padrão de risco cardiovascular para esse grupo etário são fundamentais, tanto para a prevenção como o manejo dos mesmos riscos.

Apesar da frequência de doenças crônicas, como as cardiovasculares ou demências, aumentarem com a idade, idosos acima dos 80 anos, em geral, são excluídos dos estudos bem controlados ou são analisados como subgrupos. Quando incluídos surgiram resultados diferentes dos encontrados para idosos jovens (60 a 74 anos), como maior mortalidade associada à diminuição da pressão diastólica<sup>2</sup> ou da pressão sistólica<sup>3,4</sup> e à redução do colesterol<sup>5</sup>. No entanto, outros fatores de risco como tabagismo<sup>6</sup> e *diabetes mellitus* (DM)<sup>7</sup> tiveram associação semelhante mesmo em idades mais avançadas. De outra forma, um fator genético extensamente estudado, o polimorfismo da apolipoproteína E (apoE), mais especificamente o alelo  $\epsilon$ 4, mostrou-se como fator de risco para demência de Alzheimer em adultos e idosos jovens<sup>8,9</sup>. Entretanto, resultados de uma coorte específica de idosos longevos identificaram um efeito paradoxal do alelo  $\epsilon$ 2 da apoE associado a um aumento da Doença de Alzheimer (DA) por critérios neuropatológicos *post mortem*<sup>10</sup>. Resultado que remete, novamente, às particularidades da idade anciã e ao respaldo para a pesquisa científica especificamente na faixa etária acima dos 80 anos.

O polimorfismo mais comum do gene da apoE foi referido inicialmente por Utermann e colaboradores no final da década de 1970<sup>11-13</sup>. As mutações de ponto no éxon 4 originaram três alelos principais  $\epsilon$ 2,  $\epsilon$ 3 e  $\epsilon$ 4, que determinam as isoformas da apoE designadas como apoE2, E3 e E4, respectivamente<sup>14</sup>. As formas protéicas são distintas entre si pelo conteúdo de cisteína e arginina nas posições dos códons 112 e 158. A isoforma apoE2 possui o aminoácido cisteína nas duas posições, a apoE3 tem uma cisteína na posição 112 e uma arginina na 158, enquanto a isoforma apoE4 possui argininas nestas duas posições<sup>15</sup>.

A principal função da apoE é mediar a interação das lipoproteínas que contém apoE com os receptores de lipoproteínas, que inclui o receptor de LDL e o receptor LRP (*LDL receptor related protein*) que é específico para a apoE<sup>16,17</sup>. No entanto, a afinidade da apoE pelos receptores hepáticos, que em última análise resulta na captação por endocitose da lipoproteína, está relacionada às interações destes aminoácidos no sítio de ligação<sup>18,19</sup>. Portanto, o polimorfismo da apoE modifica a proteína tanto na sua estrutura quanto na sua função. As várias combinações possíveis de dois dos três alelos principais podem dar origem a seis genótipos: apoE2/E2, apoE3/E3, apoE4/E4, apoE2/E3, apoE3/E4 e apoE2/E4. A frequência gênica (alelos) e a genotípica nas diferentes populações mundiais são altamente variáveis<sup>20,21</sup>. Adicionalmente, o polimorfismo da apoE tem sido relacionado a modificações significativas no perfil das lipoproteínas<sup>22,23</sup>, assim como na incidência de diferentes patologias incluindo DCV<sup>23-30</sup>, DA<sup>8,31,32</sup>, demência vascular<sup>33,34</sup> e diferentes tipos de neoplasias<sup>35-38</sup>. Estudos com populações de homogeneidade étnica são essenciais para descrever desfechos que possam ser influenciados pelas características genéticas<sup>31</sup>.

Novamente, idosos longevos parecem ter um perfil de risco diferente das pessoas mais jovens e o papel preditivo dos fatores de risco clássicos não é claro<sup>39-41</sup>. Estudos de metanálises mostraram que os portadores do alelo  $\epsilon$ 4 da apoE apresentam maior risco de DCV<sup>30,42</sup> precoce e demência de Alzheimer<sup>43</sup> comparados aos portadores do genótipo de referência apoE3E3. No entanto, não existem estudos que indiquem se esta associação se mantém na faixa etária dos longevos. Por este panorama, o objetivo deste estudo é testar a hipótese acima, investigando a relação entre o polimorfismo do éxon 4 da apoE e a morte relacionada à demência ou DCV, em indivíduos longevos, e descrever a sobrevivência conforme os genótipos e a exposição a fatores de risco cardiovascular clássicos.

## METODOLOGIA

### Delineamento e População investigada

A coorte do Projeto Veranópolis iniciou em 1994 com dois critérios abrangentes de elegibilidade: (1) idade igual ou superior a 80 anos e (2) residência no domínio territorial do município de Veranópolis (Brasil). Durante a década de 1990, a cidade de Veranópolis, localizada numa região montanhosa ao sul do Brasil, cuja população

descendia de imigrantes europeus, em sua maioria de origem italiana, tinha uma das maiores expectativas de vida do país. O índice que no Brasil era de 68,1 anos em média, alcançava notáveis 77,7 anos nesta cidade<sup>44</sup>.

O recrutamento dos idosos elegíveis ocorreu em 1994, 1996 e 1998. Brevemente, o primeiro recrutamento aconteceu durante o mês de julho de 1994 através de um convite informal do coordenador da pesquisa aos participantes de uma cerimônia religiosa. Espontaneamente, os presentes inscreveram-se e comunicaram aos seus próximos. Durante três semanas do mês de julho de 1994, os pesquisadores visitaram 100 idosos em suas próprias residências ou em centros comunitários. Em 1996, com uma estrutura formalizada e por divulgação em emissora de rádio local, mais 129 idosos consentiram em participar do estudo e os que já haviam participado em 1994 foram reavaliados. Em 1998, uma amostra aleatória simples dos participantes dos anos anteriores e mais 13 voluntários novos fizeram a genotipagem da apoE e os principais testes das avaliações progressas. Assim, 242 indivíduos constituíram a coorte do Projeto Veranópolis. Número que perfaz 87,4% dos idosos com 80 anos ou mais residentes no município entre os anos de 1994 e 1998<sup>45</sup>.

Em 1999, fez-se o primeiro levantamento de óbitos da coorte e a avaliação dos preditores cardiovasculares para tal mortalidade<sup>46</sup>. Este levantamento foi realizado junto à Secretaria de Saúde do município, que cadastra anualmente a mortalidade e os indicadores de saúde. Nos anos de 2006 a 2009, o *status vital* de todos os participantes da coorte foi apurado através de visitas domiciliares<sup>47</sup>. Durante 2011 e 2012, o *status vital* dos idosos amostrados para a genotipagem da apoE foi verificado, novamente, através de visitas domiciliares e, nesta oportunidade, também, foi aplicado o questionário da Escala Bayer de Atividades da Vida Diária (*The Bayer - Activities of Daily Living Scale* – B-ADL) aos cuidadores dos idosos.

#### **Tamanho Amostral**

Para este trabalho utilizou-se uma amostra de conveniência de 74 indivíduos da coorte do Projeto Veranópolis, que, por sua vez, é composta por 242 indivíduos. Considera-se que este é um estudo populacional de coorte, sem cálculo de tamanho amostral prévio.

#### **Variáveis**

Utilizou-se nesta avaliação da coorte de Veranópolis os genótipos da apoE como variável preditora, um fator genético analisado em dois momentos durante o seguimento: (1<sup>o</sup>) numa amostra aleatória de 65 indivíduos genotipados em 1998 e (2<sup>o</sup>) todos os indivíduos vivos em 2011 que não haviam sido amostrados em 1998, ou seja, mais 9 idosos. A metodologia da primeira genotipagem foi descrita com detalhes em Schwanke e colaboradores<sup>48</sup> e utilizou a técnica de amplificação do gene através de PCR-RFLP (*polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism*) e clivagem pela enzima de restrição Hha I. Para a genotipagem realizada em 2011, numa parceria com o Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular do Instituto do Coração do Hospital das Clínicas (InCor-HC/FMUSP), as amostras foram processadas utilizando a metodologia de extração de DNA e genotipagem da apoE descrita em Alvim e colaboradores<sup>49</sup>, com identificação dos genótipos da apoE (rs7412 e rs429358) através do método de análise HRM (*high resolution melting*).

O desfecho definido neste estudo foi mortalidade por doença cardiovascular crônica incluída nos códigos I00-I99 ou por demência incluída nos códigos F00-F03 da décima revisão da Classificação Estatística Internacional de Doenças e Problemas Relacionados à Saúde (CID-10). Para a definição da causa *mortis* do indivíduo idoso, foram apresentadas as segundas vias das certidões de óbito a dois profissionais médicos, um geriatra e outro cardiologista, que estiveram cegados entre si e com relação aos genótipos dos falecidos. Nos casos de divergência entre os profissionais com relação à causa do óbito, foi solicitada a avaliação por um terceiro profissional. O diagnóstico final, em caso de impasse, foi definido por consenso dos três profissionais. Quando não foi possível definir a causa de morte apenas pelo documento, foram levantados dados de prontuários e entrevistas com os médicos das famílias ou com os familiares do idoso falecido.

A coorte do Projeto Veranópolis é um estudo amplo de variáveis que busca respostas para a longevidade peculiar desta população. Dentre as diversas variáveis investigadas na coorte, selecionou-se para este estudo aquelas que são descritas como fatores de risco clássicos para as DCV e, que poderiam estar associadas de forma independente ao desfecho estudado: hipertensão arterial, obesidade, DM, dislipidemia, tabagismo,

abuso do álcool e inatividade física. Além destes fatores, as morbidades cardiovasculares como claudicação intermitente, acidente vascular cerebral (AVC) prévio e cardiopatia definidas pelo Protocolo de Rose<sup>50</sup> positivo foram avaliadas em diferentes épocas do seguimento: 1996, 1998 e 2006 a 2009. Os resultados destas análises foram utilizados para o cálculo da incidência das morbidades cardiovasculares na amostra, que incluiu ainda a informação contida no atestado de óbito como causa de morte devido a infarto agudo do miocárdio (IAM), insuficiência cardíaca congestiva (ICC) ou AVC.

Sucintamente, os métodos utilizados na mensuração dos fatores de risco cardiovasculares e as justificativas da categorização, quando aplicáveis, foram descritos a seguir. A pressão arterial (PA) foi obtida utilizando-se de um esfigmomanômetro de mercúrio (Erka, Germany) com manguito adequado para a circunferência do braço direito. Os participantes permaneceram em repouso por no mínimo 5 minutos antes do início das medições. Foram tomadas duas ou três medidas, conforme a variabilidade, aguardando-se o intervalo recomendado pelas diretrizes e fez-se a média ponderada. O aparecimento dos sons foi utilizado para a identificação da pressão arterial sistólica (PAS) e o desaparecimento - fase V de Korotkoff - para identificação da pressão arterial diastólica (PAD). Devido à possibilidade de ocorrência de pseudo hipertensão em idosos longevos, utilizou-se, concomitante à medida da PAS, a manobra de Osler, sendo excluídos os casos positivos. Para a análise dos dados, a PA foi utilizada como variável quantitativa e categorizada, sendo considerado o indivíduo hipertenso quando  $PA \geq 140/90$  mmHg ou em uso de medicamento anti-hipertensivo<sup>51</sup>. Ainda, avaliou-se a pressão de pulso (PAS-PAD).

A obesidade foi definida pelo índice de massa corporal (IMC), sendo o peso medido com os participantes minimamente vestidos, sem sapatos, utilizando-se de uma balança mecânica de contrapeso (Filizolla, São Paulo). A estatura foi determinada em pé, sem sapatos, utilizando-se de fita métrica, quando os ombros estavam em uma posição normal. O cálculo do IMC foi feito através da fórmula da razão do peso em quilogramas pelo quadrado da altura em metros ( $\text{kg}/\text{m}^2$ ). Para a análise dos dados, o IMC foi utilizado como variável contínua e categórica, com definição de obesidade e excesso de peso pelos pontos de corte

$\geq 30 \text{kg}/\text{m}^2$  (Organização Mundial da Saúde – OMS)<sup>52</sup> e  $>27 \text{kg}/\text{m}^2$  (Lipzchitz)<sup>53</sup>, respectivamente.

Nas avaliações bioquímicas do perfil lipídico e da glicemia, foram coletadas amostras de sangue venoso, após 12h de jejum. Utilizou-se o sistema de venoclise com aparato descartável a vácuo (Vacutainer) em tubos sem anticoagulante. As dosagens plasmáticas foram realizadas através de técnica manual de reação enzimática colorimétrica com padrões de calibração e amostras em duplicata. DM foi definido como glicemia de jejum  $\geq 126 \text{mg}/\text{dL}$  ou em uso de medicação hipoglicemiante<sup>54</sup>. A dislipidemia foi avaliada através das dosagens plasmáticas de triglicerídeos (TG), colesterol total (CT), HDL-colesterol e do cálculo do LDL-colesterol, sendo utilizadas como variáveis quantitativas e categorizadas de acordo com os critérios da IV Diretriz Brasileira sobre Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose<sup>55</sup> ( $TG \geq 150 \text{mg}/\text{dL}$ ;  $CT \geq 200 \text{mg}/\text{dL}$ ; HDL-colesterol  $< 50 \text{mg}/\text{dL}$  para mulheres e  $< 40 \text{mg}/\text{dL}$  para homens; LDL-colesterol  $\geq 160 \text{mg}/\text{dL}$ ). O LDL-colesterol foi obtido através da fórmula de Friedwald, para valores de TG inferiores a  $400 \text{mg}/\text{dL}$ .

As variáveis de estilo de vida - tabagismo, abuso de álcool e inatividade física - foram obtidas através de um questionário padronizado aplicado na linha de base. O tabagismo foi avaliado através do relato do consumo ou não de tabaco (cigarro, palheiro, cachimbo). Consideraram-se dois grupos: 1) não tabagistas: indivíduos que nunca fumaram; 2) tabagistas ou ex-tabagistas: indivíduos que fumavam pelo menos um cigarro por dia e/ou eram ex-fumantes. O abuso do álcool foi avaliado através do relato da quantidade de álcool ingerida por semana, sendo considerado uso abusivo valores  $> 210 \text{g}/\text{semana}$  para homens e  $> 105 \text{g}/\text{semana}$  para mulheres<sup>56,57</sup>. A quantidade de etanol consumida ( $\text{g}/\text{semana}$ ) foi calculada com base no tipo de bebida, utilizando-se dos fatores de correção para o teor alcóolico médio, conforme medidas padronizadas de vinho, cerveja e de bebidas destiladas. A inatividade física foi avaliada através do relato das atividades diárias durante uma semana normal de trabalho e lazer. Utilizaram-se dois diferentes pontos de corte:  $< 2.000 \text{kcal}/\text{semana}$ <sup>58,59</sup> e  $< 4.000 \text{kcal}/\text{semana}$ <sup>60</sup>, por serem quantidades mínimas de atividade física para alcançar benefícios cardiovasculares importantes como atenuação do espessamento da camada íntima-média das artérias carótidas<sup>58</sup>, aumento do HDL-colesterol<sup>59</sup> e redução da

mortalidade em pacientes com doença arterial coronariana<sup>60</sup>. O instrumento utilizado para reportar as diferentes atividades físicas constituiu-se de uma lista de 27 atividades habituais da rotina de pessoas camponesas e citadinas e mais uma pergunta aberta sobre outra atividade além das pré-selecionadas. Solicitou-se aos participantes do estudo que reportassem o tempo gasto em minutos e a frequência semanal para desenvolver tais atividades. A quantificação ou o cálculo da atividade física ou do gasto energético é um tema complexo nos idosos longevos uma vez que as padronizações do gasto energético em diversas atividades foram realizadas quase que universalmente em adultos e idosos jovens. Além dessa limitação quantitativa, considerou-se também a limitação qualitativa da atividade física que os idosos longevos de Veranópolis desenvolviam e que não são descritas em instrumentos comumente utilizados. Portanto, seguindo o mesmo caminho de outros estudos de idosos longevos, optamos pela utilização do gasto energético calculado em quilocalorias por semana (kcal/sem) que considera o peso do participante, o tempo de atividade referido, os METs (metabolic equivalents) da atividade específica de acordo com Ainsworth e colaboradores<sup>61</sup> e a frequência semanal das atividades:  $\text{Gasto energético(kcal/sem)} = \text{MET} \times \text{Peso(Kg)} \times \text{Tempo da atividade(minutos)} / 60 \times \text{frequência semanal}$ . Deste modo, julgamos que essa medida reflete melhor o gasto energético do idoso longevo da comunidade estudada (rural e urbana) do que a simples mensuração dos METs, usualmente descrita nos trabalhos atuais.

A B-ADL foi aplicada, por um pesquisador treinado e cegado com relação aos genótipos dos idosos, aos seus cuidadores no período de agosto de 2011 a dezembro de 2012. O instrumento foi empregado como forma de identificar casos de demência e o resultado utilizado como variável confundidora em potencial, uma vez que está bem descrito que o alelo  $\epsilon 4$  da apoE é um fator de risco para o desenvolvimento da DA<sup>8,9</sup>. A B-ADL foi criada com uma base internacional para avaliar déficits no desempenho de atividades cotidianas<sup>62</sup> e é reconhecida como instrumento de aplicação multi-cultural, sendo traduzida em diversos idiomas e validada em diferentes países<sup>63,64</sup>, incluindo o Brasil<sup>65</sup>. Além disso, foi proposta como instrumento para diferenciar os casos de demência leve e moderada do envelhecimento normal<sup>66</sup>. O escore obtido com a B-ADL varia de 1,00 a 10,00 e

representa maior dificuldade nas atividades da vida diária quanto maior a pontuação<sup>64</sup>. Para a análise dos dados, o escore da B-ADL foi utilizado como variável quantitativa e categorizada, utilizando o ponto de corte  $\geq 3,12$  para definição dos casos de demência<sup>66</sup>.

### Análise Estatística

As variáveis quantitativas foram descritas por média e desvio padrão ou mediana e amplitude interquartilica. Para a comparação entre os grupos utilizou-se o teste t-Student para amostras independentes e, em caso de assimetria, o teste de Mann-Whitney. As variáveis qualitativas foram descritas através de frequências absolutas e relativas. Na comparação de proporções entre os grupos, o teste qui-quadrado de Pearson ou exato de Fisher foi aplicado. Para avaliar o tempo de sobrevivência, utilizou-se o método de estimação da curva por Kaplan-Meier e a comparação entre os grupos através do teste qui-quadrado de Log-rank.

Para controlar fatores de confusão em relação ao óbito, utilizou-se o modelo de azares proporcional de Cox. Como medida de efeito, foi calculada a razão de densidades de incidência (*hazard ratio*), com seus respectivos intervalos de 95% de confiança. O critério para a entrada da variável no modelo multivariado foi de que apresentasse um valor  $p < 0,20$  na análise bivariada. Também, foi aplicado o modelo de Regressão de Poisson para ajustar o efeito do genótipo nos desfechos estudados.

O nível de significância adotado foi de 5% ( $p \leq 0,05$ ) e os dados foram analisados com o programa SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*) versão 18.0.

### RESULTADOS

Neste trabalho, a amostra de 74 indivíduos da coorte de Veranópolis teve um tempo de seguimento total de 18 anos e médio de 16,4 anos. Salienta-se que não houve perdas de seguimento. Com base no relato dos idosos, 94,6% eram descendentes de imigrantes italianos. A frequência gênica (alelos) da apoE presente na amostra foi: 4,1%  $\epsilon 2$ ; 85,1%  $\epsilon 3$  e 10,8%  $\epsilon 4$ . E a frequência genotípica: 1,4% E2E2; 5,4% E2E3; 71,6% E3E3 e 21,6% E3E4. A distribuição genotípica está em equilíbrio de Hardy-Weinberg ( $\chi^2=0,07$ ; grau de liberdade=1;  $p=0,79$ ). Não foram encontrados portadores dos genótipos apoE2E4 e apoE4E4 na amostra. Portanto, somente o genótipo apoE3E4 formou o grupo exposto, ou seja, portadores do

alelo de risco  $\epsilon 4$  da apoE. Deste modo, excluímos da análise os genótipos raros apoE2E2 e apoE2E3 e comparamos os desfechos e fatores de risco dos 53 indivíduos apoE3E3 (grupo não exposto) com os 16 indivíduos apoE3E4. A Tabela 1 resume as

características dos grupos de interesse. Esta tabela encontra-se completa, incluindo todas as variáveis descritas de forma quantitativa e categorizada, no anexo 1.

Tabela 1: Caracterização da amostra

Variáveis*	Amostra total (n = 69)	Genótipo E3E3 (n = 53)	Genótipo E3E4 (n = 16)	p**
Idade na entrada (anos)	82,6 ± 2,8	82,2 ± 2,7	84,0 ± 2,8	0,021
Sexo				0,267
Masculino	23 (33,3)	20 (37,7)	3 (18,8)	
Feminino	46 (66,7)	33 (62,3)	13 (81,3)	
Escala Bayer AVDs <sup>a</sup>	2,98 (1,44-5,55)	2,95 (1,38-5,46)	3,19 (1,54-7,44)	0,631
Tabagismo				0,717
Não fumante	56 (81,2)	42 (79,2)	14 (87,5)	
Ex-fumante/fumante	13 (18,8)	11 (20,8)	2 (12,5)	
Uso abusivo de álcool				0,093
Não	17 (24,6)	13 (24,5)	4 (25,0)	
Sim (F>105g e M>210g)	18 (26,1)	17 (32,1)	1 (6,3)	
Abstêmios	34 (49,3)	23 (43,4)	11 (68,8)	
IMC (kg/m <sup>2</sup> ) <sup>a</sup>	26,8 ± 5,4	27,6 ± 5,5	23,7 ± 3,6	0,011
Atividade física (kcal/semana)	5133 (2386-9846)	5421 (2155-10544)	3580 (2300-6930)	0,216
PAS (mmHg)	161 ± 25,3	162 ± 23,7	158 ± 30,5	0,489
PAD (mmHg)	86,3 ± 13,2	88,6 ± 12,7	78,5 ± 12,4	0,007
Pressão de pulso (PAS-PAD)	75,1 ± 22,7	73,9 ± 21,5	79,0 ± 26,8	0,439
Hipertensão	62 (89,9)	48 (90,6)	14 (87,5)	0,660
Glicemia jejum (mg/dL) <sup>b</sup>	95,4 ± 20,7	96,2 ± 22,7	92,6 ± 12,2	0,539
Colesterol total (mg/dL) <sup>b</sup>	209 ± 48,8	203 ± 43,9	229 ± 59,5	0,066
Colesterol LDL (mg/dL) <sup>b</sup>	138 ± 42,1	132 ± 36,0	156 ± 55,0	0,055
Colesterol HDL (mg/dL) <sup>c</sup>	43,4 ± 11,4	44,0 ± 12,5	41,4 ± 6,6	0,284
Triglicerídeos (mg/dL) <sup>b</sup>	102 (85,8-146)	102 (83,4-144)	107 (88,2-159)	0,806

\*descritas por média ± desvio padrão, mediana (percentis 25 – 75) ou n(%); \*\*teste t-student (comparação de médias), teste de Mann-Whitney (comparação de medianas), teste qui-quadrado de Pearson (variáveis categóricas) ou teste exato de Fisher (nas variáveis tabagismo e hipertensão). <sup>a</sup>Variáveis analisadas em 15 indivíduos do genótipo apoE3E4. <sup>b</sup>Variáveis analisadas em 52 indivíduos do genótipo apoE3E3. <sup>c</sup>Variável analisada em 51 indivíduos do genótipo apoE3E3.

A média de idade do grupo E3E4 foi maior que do grupo E3E3, uma diferença significativa de 1,8 anos. Não houve diferença entre proporções do sexo masculino e feminino, apesar de 19% dos indivíduos portadores do genótipo apoE3E4 serem homens *versus* 38% do genótipo apoE3E3. A avaliação da B-ADL teve média e proporção de casos positivos para demência maiores nos portadores do genótipo considerado de risco (apoE3E4), porém esta diferença não foi

significativa. Os sujeitos do grupo E3E3 tenderam a consumir maior quantidade de gramas de álcool por semana que os do grupo E3E4 (p=0,051). Quando este consumo foi estratificado nas três categorias (1) abusivo, (2) não abusivo e (3) abstinência, localizou-se as disparidades, porém sem diferença estatística, possivelmente devido ao pequeno número amostral. Observou-se que a proporção de abstinência no grupo E3E4 foi 69% em comparação aos 43% do grupo E3E3. Ainda,

somente 6% dos portadores do genótipo apoE3E4 faziam uso abusivo do álcool *versus* 32% do genótipo apoE3E3. O IMC foi utilizado como medida de obesidade ou excesso de peso na amostra, através da sua análise quantitativa ou pelos pontos de corte declarados pela OMS e por Lipschitz, este, específico para idosos. Na comparação entre os grupos, portadores do genótipo apoE3E3 apresentaram IMC médio de 27,6Kg/m<sup>2</sup>, significativamente maior que do genótipo apoE3E4 (23,7Kg/m<sup>2</sup>). Ao utilizarem-se os pontos de corte sugeridos pela OMS para definição de obesidade e por Lipschitz para excesso de peso, não foi encontrada diferença entre os grupos. Das variáveis que avaliaram a PA, o fator de risco mais controverso em idosos longevos, novamente, tivemos um resultado interessante. Não houve desigualdade de PAS, PP e hipertensão entre os grupos, mas, uma diferença significativa foi revelada na PAD, sendo mais baixa no grupo E3E4, em média 10,1mmHg. Na comparação do perfil lipídico, encontrou-se somente uma tendência

para que as quantidades de CT e LDL-colesterol fossem maiores nos portadores do genótipo apoE3E4.

Os desfechos de interesse estão resumidos na Tabela 2 que compara as proporções de eventos cardiovasculares selecionados (IAM, ICC e AVC) e as causas de óbito entre os grupos E3E3 e E3E4. Salienta-se que a expectativa de vida média para estes indivíduos foi de 92,3 anos (IC95% 91,2 a 93,5). Para as comparações, na tabela, foram apresentados os níveis de significância sem ajuste e os ajustados às variáveis com p<0,2 na análise univariada. Observamos que não houve diferença significativa entre os grupos. Porém, os portadores do genótipo apoE3E3 tenderam a apresentar maior proporção de ICC (p=0,058) e cardiopatia (p=0,081) que os do genótipo apoE3E4. No entanto, quando realizado o ajuste para os possíveis fatores de confusão, o nível descritivo amostral deixou de ser limítrofe para ambos os desfechos (p=0,102 e p=0,136, respectivamente).

Tabela 2 – Comparação dos desfechos entre os genótipos

Desfechos	Amostra	Genótipo	Genótipo	p	p <sub>ajustado***</sub>
	total	E3E3	E3E4		
	(n=69)	(n=53)	(n=16)		
	n (%)	n (%)	n (%)		
IAM	3 (4,3)	2 (3,8)	1 (6,3)	0,553*	0,828
ICC	38 (55,1)	33 (62,3)	5 (31,3)	0,058**	0,102
AVC	23 (33,3)	17 (32,1)	6 (37,5)	0,920**	0,469
Cardiopatia (IAM/ICC)	41 (59,4)	35 (66,0)	6 (37,5)	0,081**	0,136
DCV (AVC/Cardiopatia)	48 (69,6)	39 (73,6)	9 (56,3)	0,222*	0,806
Óbito	58 (84,1)	44 (83,0)	14 (87,5)	1,000*	0,888
Causa do óbito				0,389**	0,899
Cardiovascular	34 (58,6)	28 (63,6)	6 (42,9)		
Demência	6 (10,3)	4 (9,1)	2 (14,3)		
Não cardiovascular/demência	18 (31,0)	12 (27,3)	6 (42,9)		

\* teste exato de Fisher; \*\* teste qui-quadrado de Pearson; \*\*\* ajustado para idade na entrada do estudo, consumo de álcool, IMC, atividade física ≥ 4000 kcal/semana, pressão arterial diastólica, colesterol total e LDL.

Para avaliar a sobrevida dos indivíduos idosos conforme os genótipos da apoE, utilizou-se a curva de sobrevivência estimada pelo método de Kaplan-Meier, representada no gráfico da Figura1. Observamos que não houve associação entre os polimorfismos da apoE e sobrevida (log-rank=0,938) nos idosos longevos da amostra.

Complementando, é pertinente analisar os fatores de risco cardiovasculares associados à mortalidade em idosos longevos, uma vez que esta

faixa etária costuma apresentar resultados singulares e, ao mesmo tempo, contraditórios. Para isso, utilizaram-se as estimativas de sobrevida de Kaplan-Meier com regressão de Cox para controlar confundimento. Os resultados foram apresentados na Tabela 3, (Tabela 3 completa – anexo 2), através do cálculo da razão de densidades de incidência ou *hazard ratio* (HR). Deste modo, os fatores significativamente associados à mortalidade foram: tabagismo,

atividade física, PAS, PP e DM. O risco de morte em indivíduos fumantes e ex-fumantes foi 2,83 (IC95% 1,00-7,98) vezes do risco em não fumantes. Indivíduos que praticavam atividade física vigorosa ( $\geq 4.000$  kcal/semana) tiveram uma redução no risco de óbito em 54% (IC95% 10-77%). Para o aumento de 1mmHg na PAS ou na PP ocorreu uma redução de 2% (IC95% 1-3%) no risco de morte. Também, idosos diabéticos tiveram 3,43 (IC95% 1,03-11,5) vezes o risco de óbito dos não diabéticos. As curvas de sobrevivência dos fatores categóricos associados à mortalidade podem ser visualizadas na Figura 2.

### DISCUSSÃO

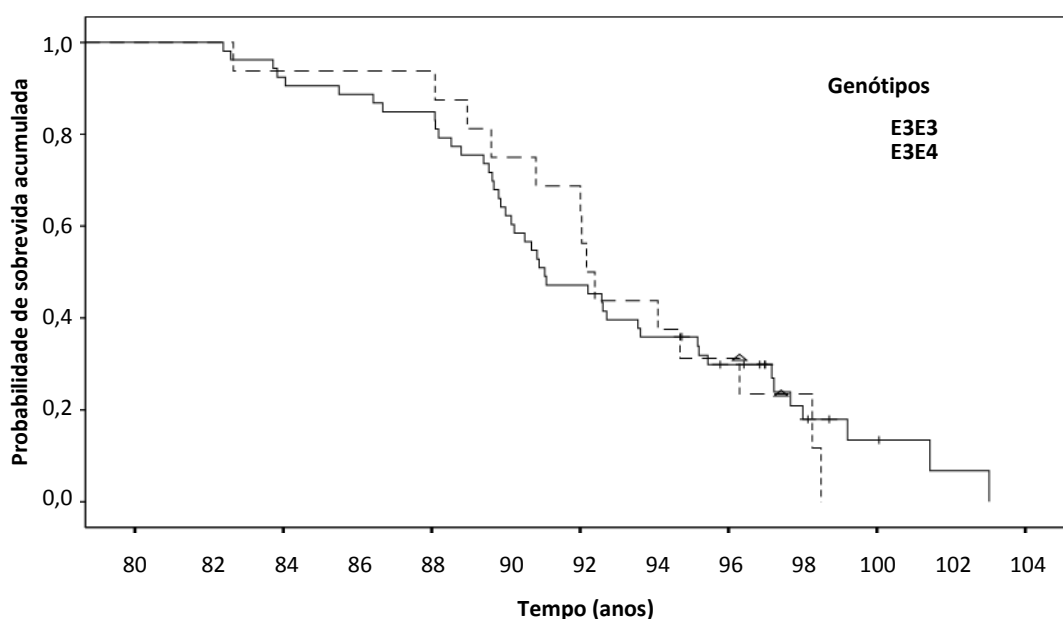
Estudos de revisão mostram que as frequências genéticas relacionadas ao polimorfismo da apoE são altamente variáveis, principalmente no que diz respeito ao alelo  $\epsilon 4$ <sup>21,67</sup>. De modo geral, a frequência gênica observada no presente estudo foi semelhante à encontrada na população da

Itália<sup>68,69</sup>. Uma vez que a amostra deste trabalho continha 94,6% de descendentes de imigrantes italianos, essa similaridade era esperada e indica que o processo de amostragem foi adequado.

Curiosamente, nos nossos resultados, indivíduos com o genótipo apoE3E4 apresentaram uma idade média significativamente maior do que indivíduos apoE3E3. Acreditamos que esta diferença possa ser casual, uma vez que publicações relevantes indicam que não há diferença para mortalidade geral entre portadores dos genótipos apoE3E3 e apoE3E4 antes dos 80 anos<sup>70,71</sup>.

Dentre os demais fatores de risco para DCVs que foram investigados, o IMC e a PAD foram os que apresentaram diferenças significativas entre os genótipos avaliados. Nestes casos, indivíduos do grupo E3E3 apresentaram um IMC médio classificado como sobrepeso (OMS) ou excesso de peso (Lipschitz) e uma maior PAD. Não encontramos dados similares a estes em estudos

(A)



(B)

Probabilidade de sobrevivência (%)											
Tempo (anos)	82	84	86	88	90	92	94	96	98	100	102
E3E3	100	92,5	88,7	84,9	62,3	47,2	35,8	29,9	20,9	13,4	6,7
E3E4	100	93,8	93,8	87,5	75,0	62,5	37,5	31,3	23,4	0,0	0,0

Figura 1 – (A) Curva de sobrevivência de Kaplan-Meier dos portadores dos genótipos apoE3E3 e apoE3E4. —△— censura apoE3E3; —+— censura apoE3E4. (B) Probabilidade de sobrevivência para os grupos com periodicidade de 2 anos.

Tabela 3 – Regressão de Cox univariada e multivariada de fatores associados à mortalidade

Variáveis	Univariada	p	Multivariada*	p
	HR (IC 95%)		HR (IC 95%)	
Idade	0,98 (0,89 – 1,07)	0,595	-	-
Sexo masculino	1,48 (0,86 – 2,54)	0,161	1,34 (0,57 – 3,12)	0,500
Genótipo E3E4	1,03 (0,56 – 1,88)	0,938	-	-
Escala Bayer AVDs	0,95 (0,86 – 1,05)	0,325	-	-
<b>Fumante/Ex-fumante</b>	<b>2,57 (1,35 – 4,89)</b>	<b>0,004</b>	<b>2,83 (1,00 – 7,98)</b>	<b>0,050</b>
Consumo de álcool (g/semana)	1,00 (0,99 – 1,00)	0,702	-	-
IMC	0,96 (0,91 – 1,01)	0,107	0,98 (0,92 – 1,04)	0,507
<b>Atividade física ≥ 4000 kcal/sem</b>	<b>0,61 (0,36 – 1,05)</b>	<b>0,074</b>	<b>0,46 (0,23 – 0,90)</b>	<b>0,023</b>
<b>PAS</b>	<b>0,98 (0,97 – 0,99)</b>	<b>0,001</b>	<b>0,98 (0,97 – 0,99)</b>	<b>0,004</b>
PAD	0,98 (0,96 – 1,01)	0,137	0,99 (0,96 – 1,02)	0,539
<b>Pressão pulso</b>	<b>0,98 (0,97 – 0,99)</b>	<b>0,006</b>	<b>0,98 (0,97 – 0,99)</b>	<b>0,007</b>
Hipertensão	0,41 (0,18 – 0,93)	0,033	0,62 (0,21 – 1,85)	0,395
<b>Diabetes mellitus</b>	<b>4,49 (1,50 – 13,5)</b>	<b>0,007</b>	<b>3,43 (1,03 – 11,5)</b>	<b>0,045</b>
Colesterol total ≥ 200mg/dL	0,51 (0,30 – 0,88)	0,015	0,55 (0,26 – 1,15)	0,113
LDL ≥ 160 mg/dL	0,66 (0,36 – 1,20)	0,173	1,43 (0,61 – 3,37)	0,411
HDL baixo**	0,90 (0,51 – 1,58)	0,713	-	-
Triglicérides ≥ 150mg/dL	1,41 (0,75 – 2,66)	0,292	-	-
Claudicação intermitente	1,03 (0,53 – 1,99)	0,932	-	-
AVC	1,03 (0,59 – 1,77)	0,930	-	-
IAM	0,41 (0,09 – 1,69)	0,215	-	-
ICC	1,09 (0,64 – 1,84)	0,762	-	-

\* o critério para a entrada da variável no modelo multivariado foi de que apresentasse um valor  $p < 0,20$  na análise bivariada; \*\* HDL baixo refere-se a HDL-colesterol  $< 40\text{mg/dL}$  para homens e  $< 50\text{mg/dL}$  para mulheres.

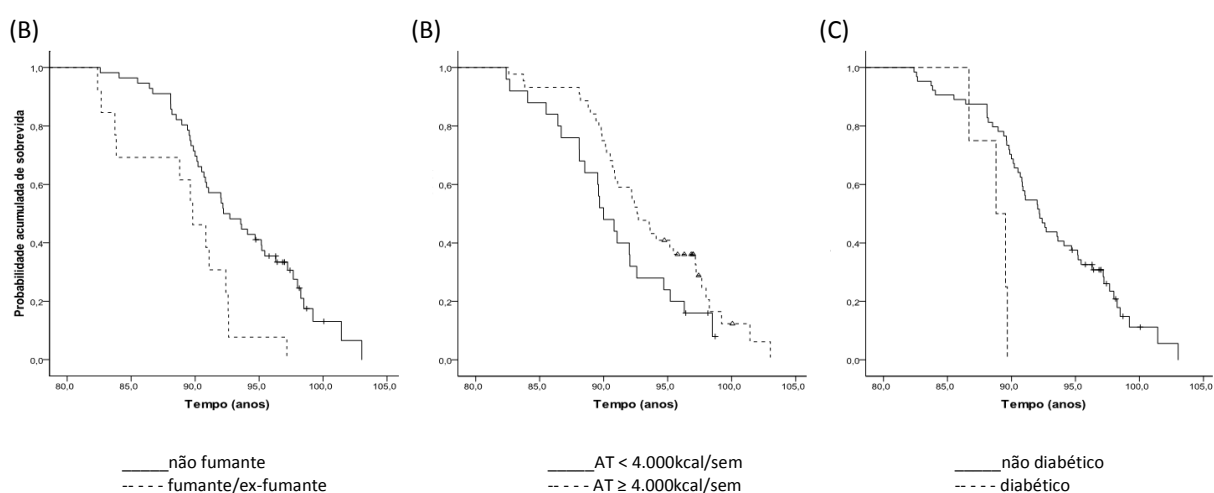


Figura 2: Curvas de sobrevida dos fatores associados à mortalidade em idosos longevos.  
 (B) Tabagismo, (B) atividade física vigorosa e (C) diabetes mellitus.



previamente publicados de base comunitária, mas comparações semelhantes, em amostras maiores na faixa etária adulto-idoso jovem, sugerem que não existe qualquer associação entre obesidade<sup>72</sup> ou níveis de PAD<sup>73</sup> e os genótipos da apoE. No entanto, poderíamos presumir o quanto estes fatores de risco agem de forma negativa junto ao genótipo apoE3E3 da nossa amostra ou, mesmo de forma nula, considerando que são idosos longevos.

Além disso, é pertinente comentar o consumo de álcool na amostra. Sabemos de uma importante interação gene-álcool em portadores do alelo  $\epsilon$ 4 que modificada os níveis de marcadores inflamatórios como proteína C reativa (PCR)<sup>74</sup> e interleucina-6 (IL-6)<sup>75</sup>. Nestes estudos, demonstrou-se que a relação do uso do álcool e níveis de PCR foi significativamente modificada pelo genótipo da apoE, com uma associação positiva entre participantes com alelo  $\epsilon$ 4, mas um tendência de relação inversa naqueles sem este alelo<sup>74</sup>. Adicionalmente, o consumo do álcool não esteve associado com concentrações de IL-6 nos indivíduos não portadores do alelo  $\epsilon$ 4, mas foi positivamente associado nos portadores<sup>75</sup>. Como mencionado anteriormente, em nosso estudo, os sujeitos do grupo E3E3 tenderam a consumir maiores quantidades de gramas de álcool por semana que os do grupo E3E4 ( $p=0,051$ ). Mais que dois terços dos portadores do genótipo apoE3E4 eram abstêmios e somente 6% faziam uso abusivo do álcool. Estes resultados chamaram nossa atenção e nos levam a especular uma possível propensão do grupo E3E4 em mudar de hábitos. Esses dados corroboram com a ideia de que a heterogeneidade genética deveria ser considerada na adoção de estilos de vida e na compreensão dos efeitos cardiovasculares do consumo de álcool. Além disso, ainda que os portadores do genótipo apoE3E3 consumissem maior quantidade de álcool semanalmente, estas quantidades seriam consideradas moderadas e, estudos sugerem uma relação entre baixo e moderado consumo de álcool e uma menor mortalidade<sup>76,77</sup>.

Nossos resultados mostraram uma tendência dos níveis de CT e LDL-colesterol serem maiores no grupo E3E4. Estes achados são fortalecidos por evidências de que os diferentes alelos da apoE podem explicar, aproximadamente, 10% da variação interindividual nos níveis de colesterol em diferentes populações<sup>78</sup>. Enquanto o alelo  $\epsilon$ 3 não mostra desvios na média populacional, os alelos  $\epsilon$ 2 e  $\epsilon$ 4 têm efeitos significativos nos níveis de vários lipídeos e lipoproteínas, sendo o alelo  $\epsilon$ 4 associado

com altos níveis de CT e LDL-colesterol<sup>23,79</sup>. O mecanismo que causa estes efeitos é conhecido. A associação com níveis aumentados de CT e LDL-colesterol plasmáticos foi postulado que ocorre, de forma secundária, a maior afinidade da apoE4 pelo receptor de LDL. Este fato conduziria a uma captação mais rápida das partículas de LDL e sua internalização pelo hepatócito, levando à saturação intracelular de colesterol com consequente diminuição da expressão de receptores LDL hepáticos. Este processo de *down-regulation* de receptores causaria o acúmulo das partículas de LDL na circulação com subsequente aumento dos níveis de LDL-colesterol e colesterol total circulantes<sup>80</sup>.

Outro objetivo deste estudo foi investigar a relação entre os polimorfismos do gene da apoE e a morte relacionada à demência ou DCV. Na amostra de idosos longevos de Veranópolis, os dados de mais de 15 anos de seguimento, ainda não suportam a existência desta relação. Primeiramente, as mortes relacionadas à demência foram escassas, apenas seis desfechos. Este pequeno número é insuficiente para mostrar qualquer relação pré-testada. Ainda, não há na literatura científica, estudos que mostrem a relação mortalidade por demência e genótipos da apoE em idosos longevos. Com relação às mortes por DCV, encontramos, em outros trabalhos, fortes evidências de não-associação<sup>81-83</sup> com os genótipos em populações longevas que corroboram os resultados do nosso estudo. Além disso, para ambos os desfechos de interesse, há que se considerar a possibilidade de erro  $\beta$ , devido ao número pequeno da amostra, quando afirmamos que não houve diferença, quando na verdade deveria existir.

Curvas de sobrevida em idosos longevos são escassas na literatura para os genótipos da apoE. E, quando existentes, agregam os genótipos ou referem-se aos alelos. Nosso estudo mostrou que não houve diferença significativa na sobrevida dos portadores do genótipo apoE3E3 e apoE3E4 (log-rank=0,938). O estudo de Kulminski e colaboradores<sup>71</sup>, uma coorte de 3924 indivíduos de 5 a 70 anos de idade acompanhada por 36 anos, não mostrou diferença de sobrevida entre os grupos E3E4 e não portadores do alelo  $\epsilon$ 4. Entretanto, o estudo de Rosvall e colaboradores<sup>84</sup> que selecionou idosos com 75 anos ou mais, encontrou que o gene da apoE tem uma relação com mortalidade, ou seja, aumentou 22% nos indivíduos portadores do alelo  $\epsilon$ 4 em comparação

ao genótipo apoE3E3. No entanto, sabemos que a expectativa de vida média dos homozigotos apoE4E4 é menor que as médias dos heterozigotos apoE3E4<sup>71</sup>. Assim, ao fazer-se uma estimação de mortalidade agregando homozigotos aos heterozigotos, Rosvall *et al* superestimaram a mortalidade dos portadores do genótipo apoE3E4.

Além da análise por genótipos da apoE, nosso estudo de coorte com idosos longevos apontou para alguns fatos relevantes que poderão ser importantes na prática clínica, uma vez que esse tipo de dado é raro na literatura. Nossos resultados indicaram que alguns fatores de risco cardiovascular estão associados à mortalidade geral mesmo em idosos longevos, faixa etária na qual a maior parte destes fatores clássicos perde o seu poder preditivo de risco. O tabagismo mostrou ser importante nesta relação. O risco de morte em indivíduos fumantes e ex-fumantes foi 2,83 (IC95% 1,00-7,98) vezes do risco em não fumantes. Uma metanálise recente<sup>6</sup> torna evidente que o fumo permanece como um forte fator de risco para mortalidade prematura, também em idosos com mais de 80 anos. A atividade física vigorosa apresentou-se como fator protetor para o óbito. Indivíduos que despendiam mais de 4.000 kcal/semana, em atividade de trabalho e lazer, tiveram uma redução no risco de óbito em 54% (IC95% 10%-77%). Diversas publicações já evidenciaram a associação positiva entre atividades de lazer, especialmente, físicas regulares, e a longevidade<sup>85-87</sup>. Trabalhos recentes, como o Projeto Kungsholmen<sup>88</sup>, uma coorte de base comunitária, reforçam estas evidências. Neste estudo, que avaliou idosos com 75 anos ou mais durante 18 anos de seguimento, mostrou-se uma forte associação entre a prática de atividade física e a sobrevida dos participantes. Um dos seus resultados afirma que a idade média do óbito em indivíduos que tiveram atividade regular, como natação, caminhada ou ginástica, foi dois anos maior que os não praticantes. Com relação à prática de atividades vigorosas, a coorte do *Australian Longitudinal Study on Women's Health and the Health in Men Study*, um estudo com mais de 18 mil participantes com média de idade superior a 70 anos, reforça nossos achados. Neste trabalho, as atividades físicas foram categorizadas de acordo com a intensidade e mostraram uma redução em 40% na mortalidade para mulheres e 22% para homens que praticavam atividade física vigorosa<sup>89</sup>. No que se refere aos idosos diabéticos, apesar do pequeno percentual presente na nossa

amostra (6%), este número foi suficiente para alcançar uma diferença significativa. Os idosos longevos diabéticos tiveram 3,43 (IC95% 1,03-11,5) vezes o risco de óbito dos não diabéticos, mostrando que este fator de risco continua sendo importante, mesmo acima dos 80 anos de idade. Resultado similar foi evidenciado ainda no estudo da coorte longeva *The Adventist Health Study*<sup>7</sup>. Por último, em nosso trabalho, o aumento da PAS e da PP mostrou-se como fator de proteção para mortalidade geral. Assim, para o aumento de 1mmHg na PAS ou na PP houve uma redução de 2% no risco de morte. Estes achados estão de acordo com os resultados da maioria dos estudos que identificaram uma relação inversa entre a pressão arterial e o risco de morte por causa cardiovascular ou qualquer outra causa, em pessoas com 80 anos de idade ou mais<sup>4,90-100</sup>. No entanto, este assunto continua sendo gerador de discussões e proposições no meio científico. Em uma coorte que investigou a associação entre a pressão arterial e a mortalidade em pessoas com idades superiores a 85 anos, com 601 participantes e 9 anos de seguimento, quando ajustado para variáveis confundidoras, mostrou que baixos níveis de PAS foram associados com alto risco de morte<sup>4</sup>. Em uma coorte retrospectiva recente, onde foram analisados pacientes com 80 anos de idade ou mais, com hipertensão, dos quais 84,5% estavam recebendo medicação anti-hipertensiva, foi relatada uma menor sobrevida para aqueles com níveis de PAS inferiores a 140mmHg, mesmo após ajuste para os preditores de mortalidade conhecidos<sup>41</sup>. Portanto, as evidências provenientes de estudos epidemiológicos devem ser explicadas por uma revisão fisiopatológica profunda. Apesar deste não ser o objetivo do nosso trabalho, algumas considerações se fazem necessárias. Com o aumento da idade, há mudanças estruturais e funcionais generalizadas na circulação arterial que contribuem para alterações no fluxo sanguíneo regional e progressão da aterogênese, podendo levar a anormalidades microvasculares<sup>101</sup>. Níveis suficientemente elevados de pressão arterial podem ser necessários para garantir a adequada perfusão cardíaca e cerebral. Os resultados conflitantes dos estudos de coorte e de alguns ensaios clínicos como os resultados do HYVET (*Hypertension Very Elderly Trial*)<sup>102</sup> são difíceis, mas têm uma explicação plausível. A pressão arterial é um risco para os eventos cardiovasculares quando é muito baixa e quando é muito alta. No HYVET, foram incluídos participantes com pelo menos

160mmHg e a meta para a PAS foi atingir níveis inferiores a 150mmHg. Contrapondo com nosso estudo, que é de base comunitária e, portanto, não teve restrição de nível de PA, o risco dos indivíduos com PA muito baixa, provavelmente, superou o risco daqueles com PA elevada, o que poderia explicar nossos dados de proteção.

Em resumo, nosso estudo não evidenciou que idosos longevos portadores do alelo  $\epsilon 4$  da apoE tivessem maior risco de morte por doença cardiovascular ou demência de Alzheimer que os portadores do genótipo de referência apoE3E3. Adicionalmente, não houve associação entre o polimorfismo da apoE e sobrevida na faixa etária acima dos 80 anos. De outra forma, algumas exposições relacionaram-se de forma significativa à mortalidade geral na idade avançada, notavelmente, o tabagismo e o DM caracterizaram-se como fatores de risco. Entretanto, a atividade física vigorosa e a PAS e PP maiores como fatores de proteção.

### CONSIDERAÇÕES E LIMITAÇÕES

Considerando que a amostra deste estudo foi composta por idosos selecionados em dois momentos do seguimento, poderia ter ocorrido um viés de seleção. Especificamente, os nove idosos genotipados no ano de 2011 formariam um grupo de sobreviventes. Com o intuito de ponderar esse viés, refizemos as análises retirando estes indivíduos. Deste modo, obtivemos resultados bastante semelhantes, inclusive no que se refere ao nível descritivo amostral das variáveis, com exceção do tabagismo e da atividade física vigorosa que perderam a associação com mortalidade. Nesta nova análise, o risco de morte em indivíduos fumantes e ex-fumantes foi 1,98 (IC95% 1,04-3,76) no modelo univariado e 1,42 (IC95% 0,62-3,25) no modelo multivariado. A atividade física  $\geq 4.000$ kcal/sem não mostrou-se associada ao risco de óbito no modelo univariado ( $p=0,217$ ).

Outras limitações deste estudo devem ser consideradas, sendo o pequeno tamanho amostral a principal delas. Apesar de estudos prévios descreverem uma diferença de mais de 40% nos percentuais de mortalidade por DCV entre os portadores do genótipo E3E3 e E3E4<sup>42,103</sup>, nosso estudo não alcançou um tamanho de amostra ideal para avaliar estas proporções. Trabalhamos com uma amostra de conveniência, cuja população é escassa e, por esse motivo, o poder amostral que nosso estudo alcançou é baixo. Porém, apesar deste fato, tivemos indícios de que amostra foi

representativa de uma coorte que atingiu mais de 87% do total de indivíduos elegíveis. Além disso, não tivemos perdas de seguimento. Outra limitação que pode ser considerada é a inclusão de idosos enfermos, ou seja, com restrições físicas no mesmo grupo de idosos com gasto energético semanal inferior a 4.000kcal. Estes idosos foram considerados como sedentários, apesar desta ser uma situação do momento da avaliação e por não refletir exatamente o hábito de vida do idoso. Contudo, somente 5% da amostra encontrava-se enferma e sem possibilidades de realizar qualquer atividade física.

### FINANCIAMENTO

Bolsa de doutorado GD - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. World Health Organization. Causes of death 2008: summary tables. Geneva, World Health Organization, 2011. Available at [apps.who.int/gho/data/?vid=10012#](https://apps.who.int/gho/data/?vid=10012#)
2. Boshuizen HC, Izaks GJ, van Buuren S, Ligthart GJ Blood pressure and mortality in elderly people aged 85 and older: community based study. *BMJ*. 1998;316(7147):1780-4.
3. Poortvliet RK, de Ruijter W, de Craen AJ, Mooijaart SP, Westendorp RG, Assendelft WJ, Gussekloo J, Blom JW. Blood pressure trends and mortality: the Leiden 85-plus Study. *Journal of Hypertension*. 2013;31(1):63-70.
4. Rastas S, Pirttilä T, Viramo P, Verkkoniemi A, Halonen P, Juva K, Niinistö L, Mattila K, Länsimies E, Sulkava R. Association between blood pressure and survival over 9 years in a general population aged 85 and older. *Journal of the American Geriatrics Society*. 2006;54(6):912-8.
5. Weiss A, Beloosesky Y, Weiss HS, Grossman E, Boaz M. Serum total cholesterol: A mortality predictor in elderly hospitalized patients. *Clinical Nutrition*. 2012;S0261-5614(12)00258-0.
6. Gellert C, Schöttker B, Brenner H. Smoking and all-cause mortality in older people: systematic review and meta-analysis. *Archives of Internal Medicine*. 2012;172(11):837-44.
7. Fraser GE, Shavlik DJ. Risk factors for all-cause and coronary heart disease mortality in the oldest-old. The Adventist Health Study. *Archives of Internal Medicine*. 1997;157(19):2249-58.
8. Liu CC, Kanekiyo T, Xu H, Bu G. Apolipoprotein E and Alzheimer disease: risk, mechanisms and therapy. *Nature Reviews: Neurology*. 2013;9(2):106-18
9. Hashimoto T, Serrano-Pozo A, Hori Y, Adams KW, Takeda S, Banerji AO, Mitani A, Joyner D, Thyssen DH, Bacskai BJ, Frosch MP, Spires-Jones TL, Finn MB, Holtzman DM, Hyman BT. Apolipoprotein E, especially apolipoprotein E4, increases the oligomerization of amyloid  $\beta$  peptide. *The Journal of Neuroscience*. 2012;32(43):15181-92.
10. Berlau DJ, Corrada MM, Head E, Kawas CH. APOE epsilon2 is associated with intact cognition but increased Alzheimer pathology in the oldest old. *Neurology*. 2009;72(9):829-34.

11. Utermann G, Hees M, Steinmetz A. Polymorphism of apolipoprotein E and occurrence of dysbetalipoproteinaemia in man. *Nature*. 1977;269(5629):604-7.
12. Utermann G, Vogelberg KH, Steinmetz A, Schoenborn W, Pruin N, Jaeschke M, Hees M, Canzler H. Polymorphism of apolipoprotein E. II. Genetics of hyperlipoproteinemia type III. *Clinical Genetics*. 1979;15(1):37-62.
13. Utermann G, Langenbeck U, Beisiegel U, Weber W. Genetics of the apolipoprotein E system in man. *American Journal of Human Genetics*. 1980;32(3):339-47.
14. Zannis VI, Breslow JL, Utermann G, Mahley RW, Weisgraber KH, Havel RJ, Goldstein JL, Brown MS, Schonfeld G, Hazzard WR, Blum C. Proposed nomenclature of apoE isoproteins, apoE genotypes, and phenotypes. *Journal of Lipid Research*. 1982;23(6):911-4.
15. Weisgraber KH, Rall SC Jr, Mahley RW. Human E apoprotein heterogeneity: cysteine-arginine interchanges in the aminoacid sequence of the apo-E isoforms. *The Journal of Biological Chemistry*. 1981;256(17):9077-83.
16. Mahley RW. Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. *Science*. 1988;240(4852):622-30 *apud* Mahley RW and Rall Jr SC, Type III Hyperlipoproteinemia (Dysbetalipoproteinemia): The Role of Apolipoprotein E in Normal and Abnormal Lipoprotein Metabolism *In* Scriver CR *et al.* The metabolic and molecular bases of inherited disease. 7ed. New York: McGraw-Hill, 1995. 1962p.
17. Utermann G, Langenbeck U, Beisiegel U, Weber W. Genetics of the apolipoprotein E system in man. *American Journal of Human Genetics*. 1980;32(3):339-47 *apud* Bennet AM *et al.* Association of apolipoprotein E genotypes with lipid levels and coronary risk. *JAMA*. 2007;298(11):1300-11.
18. Weisgraber KH, Innerarity TL, Mahley RW. Abnormal lipoprotein receptor-binding activity of the human E apoprotein due to cysteine-arginine interchange at a single site. *The Journal of Biological Chemistry*. 1982;257(5):2518-21.
19. Weisgraber KH, Rall SC Jr, Mahley RW. Human E apoprotein heterogeneity: cysteine-arginine interchanges in the aminoacid sequence of the apo-E isoforms. *The Journal of Biological Chemistry*. 1981;256(17):9077-83.
20. Marca V, Acosta O, Cornejo-Olivas M, Ortega O, Huerta D, Mazzetti P. Polimorfismo genético de la Apolipoproteína E en una población peruana. [Genetic polymorphism of Apolipoprotein E in a peruvian population] *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*. 2011;28(4):589-94.
21. Eichner JE, Dunn ST, Perveen G, Thompson DM, Stewart KE, Stroehla BC. Apolipoprotein E polymorphism and cardiovascular disease: a HuGE review. *American Journal Epidemiology*. 2002;155(6):487-95.
22. Hu M, Mak VW, Tomlinson B. Polymorphisms in apolipoprotein E and apolipoprotein A-V do not influence the lipid response to rosuvastatin but are associated with baseline lipid levels in Chinese patients with hyperlipidemia. *Journal of Clinical Lipidology*. 2012;6(6):585-92.
23. Bennet AM, Di Angelantonio E, Ye Z, Wensley F, Dahlin A, Ahlborn A, Keavney B, Collins R, Wiman B, de Faire U, Danesh J. Association of apolipoprotein E genotypes with lipid levels and coronary risk. *JAMA*. 2007;298(11):1300-11.
24. Tanguturi P, Pullareddy B, Sampath Kumar P, Murthy DK. Association Between Apolipoprotein E Gene Polymorphism and Myocardial Infarction. *Biochemical genetics*. 2013 Jan 31.
25. Gungor Z, Anuurad E, Enkhmaa B, Zhang W, Kim K, Berglund L. Apo E4 and lipoprotein-associated phospholipase A2 synergistically increase cardiovascular risk. *Atherosclerosis*. 2012 Jul;223(1):230-4.
26. Ciftdoğan DY, Coskun S, Ulman C, Tikiz H. The association of apolipoprotein E polymorphism and lipid levels in children with a family history of premature coronary artery disease. *Journal of Clinical Lipidology* 2012;6(1):81-7.
27. Niu W, Qi Y, Qian Y, Gao P, Zhu D. The relationship between apolipoprotein E epsilon2/epsilon3/epsilon4 polymorphisms and hypertension: a meta-analysis of six studies comprising 1812 cases and 1762 controls. *Hypertension Research*. 2009;32(12):1060-6.
28. Anuurad E, Rubin J, Lu G, Pearson TA, Holleran S, Ramakrishnan R, Berglund L. Protective effect of apolipoprotein E2 on coronary artery disease in African Americans is mediated through lipoprotein cholesterol. *Journal of Lipid Research*. 2006;47:2475-81.
29. Jurkovicova D, Goncalvesova E, Sedlakova B, Hudecova S, Fabian J, Krizanova O. Is the ApoE polymorphism associated with dilated cardiomyopathy? *General Physiology and Biophysics*. 2006;25:3-10.
30. Wang CH, Zhou X. Meta-analysis for relationship between apoE gene polymorphism and coronary heart disease. *Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi*. 2003;(5):368-70.
31. Fei M, Jianhua W. Apolipoprotein ε4-Allele as a Significant Risk Factor for Conversion from Mild Cognitive Impairment to Alzheimer's disease: a Meta-analysis of Prospective Studies. *Journal of Molecular Neuroscience: MN*. 2012 Dec 15.
32. Sadigh-Eteghad S, Talebi M, Farhoudi M. Association of apolipoprotein E epsilon 4 allele with sporadic late onset Alzheimer's disease. A meta-analysis. *Neurosciences (Riyadh)*. 2012;17(4):321-6.
33. Gdovinová Z, Habalová V, Novosadová Z. Polymorphism of apolipoprotein E in relation with alzheimer and vascular dementia. *Cellular and Molecular Neurobiology*. 2006;26(7/8):1219-24.
34. Souza DRS, De Godoy MR, Hotta J, Tajara EH, Brandão AC, Pinheiro Jr S, Tognola WA, Dos Santos JE. Association of apolipoprotein E polymorphism in late-onset Alzheimer's disease and vascular dementia in Brazilians. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 2003;36:919-23.
35. De Feo E, Rowell J, Cadoni G, Nicolotti N, Arzani D, Giorgio A, Amore R, Paludetti G, Ricciardi G, Boccia S. A case-control study on the effect of apolipoprotein E genotype on head and neck cancer risk. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*. 2010;19(11):2839-46.
36. Grant WB. A multicountry ecological study of risk-modifying factors for prostate cancer: apolipoprotein E epsilon4 as a risk factor and cereals as a risk reduction factor. *Anticancer Research*. 2010;30(1):189-99.
37. Trompet S, Jukema JW, Katan MB, Blauw GJ, Sattar N, Buckley B, Caslake M, Ford I, Shepherd J, Westendorp RG, de Craen AJ. Apolipoprotein e genotype, plasma cholesterol, and cancer: a Mendelian randomization study. *American Journal of Epidemiology*. 2009;170(11):1415-21.
38. Cetinkalp S, Karadeniz M, Erdogan M, Zengi A, Cetintas V, Tetik A, Eroglu Z, Kosova B, Ozgen AG, Saygili F, Yilmaz C. Apolipoprotein E gene polymorphism and polycystic ovary syndrome patients in Western Anatolia, Turkey. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 2009;26(1):1-6.

39. Paganini-Hill A. Hypertension and dementia in the elderly: the leisure world cohort study. *International Journal of Hypertension*. 2012;2012:205350.
40. Paganini-Hill A. Lifestyle practices and cardiovascular disease mortality in the elderly: the leisure world cohort study. *Cardiology Research and Practice*. 2011;2011:983764.
41. Oates DJ, Berlowitz DR, Glickman ME, Silliman RA, Borzecki AM. Blood pressure and survival in the oldest old. *Journal of the American Geriatrics Society*. 2007 Mar;55(3):383-8.
42. Song Y, Stampfer MJ, Liu S. Meta-analysis: apolipoprotein E genotypes and risk for coronary heart disease. *Annals of Internal Medicine*. 2004;141(2):137-47.
43. Farrer LA, Cupples LA, Haines JL, Hyman B, Kukull WA, Mayeux R, Myers RH, Pericak-Vance MA, Risch N, van Duijn CM. Effects of age, sex, and ethnicity on the association between apolipoprotein E genotype and Alzheimer disease. A meta-analysis. APOE and Alzheimer Disease Meta Analysis Consortium. *JAMA*. 1997;278(16):1349-56.
44. DATASUS (Departamento de Informática do SUS), 1994. *Informações de saúde – indicadores de saúde - indicadores e dados básicos (IDB - Brasil - 2011) - indicadores demográficos - esperança de vida ao nascer* <<http://www.datasus.gov.br>>. Dado atualizado e acessado em 15/12/2012 refere que as esperanças de vida ao nascer foram extraídas das tábuas de mortalidade interpoladas a partir das tábuas construídas para os anos de 1991 e 2000.
45. DATASUS (Departamento de Informática do SUS), 1998. *Informações de saúde – demográficas e socioeconômicas - Censos (1980, 1991, 2000 e 2010), Contagem (1996) e projeções intercensitárias (1981 a 2012), segundo faixa etária, sexo e situação de domicílio* <<http://www.datasus.gov.br>>. Dado atualizado e acessado em 15/12/2012.
46. Marafon LP, da Cruz IBM, Schwanke CHA, Moriguchi EH. Preditores cardiovasculares da mortalidade em idosos longevos. *Cad. Saúde Pública*, Rio de Janeiro, 19(3):799-808, mai-jun, 2003.
47. Werle MH, Moriguchi E, Fuchs SC, Bruscato NM, de Carli W, Fuchs FD. Risk factors for cardiovascular disease in the very elderly: results of a cohort study in a city in southern Brazil. *European Journal of Cardiovascular Prevention and Rehabilitation*. 2011;18(3):369-77.
48. Schwanke CHA, da Cruz IBM, Leal NF, Scheibe R, Moriguchi Y, Moriguchi EH. Análise da associação entre polimorfismo do gene da apolipoproteína E e fatores de risco cardiovasculares em idosos longevos. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*. 2002;78(6):561-70.
49. Alvim RO, Freitas SRS, Ferreira NE, Santos PCJL, Cunha RS, Mill JG, Krieger JE, Pereira AC. APOE polymorphism is associated with lipid profile, but not with arterial stiffness in the general population. *Lipids in Health and Disease*. 2010;9:128.
50. Rose GA, Blackburn H, Gillum RF, Prineas RJ. *Cardiovascular Survey Methods* 2ed. Geneva: World Health Organization, 1982.
51. The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. U.S. Department of Health and Human Services. National Institutes of Health. National Heart, Lung, and Blood Institute. *National High Blood Pressure Education Program*. August 2004.
52. World Health Organization. Obesity: preventing and managing the global epidemic. *Geneva: World Health Organization*; 1998. (Technical Report Series, 894).
53. Lipschitz DA. Screening for nutritional status in the elderly. *Primary Care* 1994;21:55-67.
54. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes 2009 - Sociedade Brasileira de Diabetes. 3ed. Itapevi, SP: A. Araújo Silva Farmacêutica, 2009.
55. IV Diretriz Brasileira Sobre Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia* - Volume 88, Suplemento I, Abril 2007.
56. Fuchs FD, Chambless LE, Folsom AR, Eigenbrodt ML, Duncan BB, Gilbert A, Szklo M. Association between Alcoholic Beverage Consumption and Incidence of Coronary Heart Disease in Whites and Blacks The Atherosclerosis Risk in Communities Study. *American Journal of Epidemiology*. 2004;160(5):466-74.
57. Steffens AA, Moreira LB, Fuchs SC, Wiehe M, Gus M, Fuchs FD. Incidence of hypertension by alcohol consumption: is it modified by race? *Journal of Hypertension*. 2006;24(8):1489-92.
58. Schmidt-Trucksass A, Huonker M, Halle M, Dickhuth HH, Sandrock M. Effect of Physical Activity on the Arterial Wall. *Deutsche Zeitschrift für Sportmedizin*. 2008;59(9):200-5.
59. Drygas W, Kostka T, Jegier A, Kun'ski H. Long-Term Effects of Different Physical Activity Levels on Coronary Heart Disease Risk Factors in Middle-Aged Men. *International Journal of Sports Medicine*. 2000;21:235-41.
60. Janssen I and Jolliffe CJ. Influence of physical activity on mortality in elderly with coronary artery disease. *Medicine and Science in Sports and Exercise*. 2006;38(3):418-23.
61. Ainsworth BE, Haskell WL, Whitt MC, Irwin ML, Swartz AM, Strath SJ, O'Brien WL, Bassett Jr DR, Schmitz KH, Emplaincourt PO, Jacobs Jr DR, Leon AR. Compendium of physical activities: an update of activity codes and MET intensities. *Medicine & Science in Sports & Exercise*. 2000;32(9):S498-S516.
62. Hindmarch I, Leffeld H, Jongh P, Erzigkeit H. The Bayer activities of daily living scale (B-ADL). *Dementia and Geriatric Cognitive Disorders*. 1998;9(Suppl.2):20-6.
63. Leffeld H, Reisberg B, Finkel S, Kanowski S, Wied V, Pittas J, Tsolaki M, Robert PH, Hulla F, Heining K, Erzigkeit H. Informant-rated Activities-of-Daily-Living (ADL) assessments: results of a study of 141 items in the U.S.A., Germany, Russia, and Greece from the International ADL Scale Development Project. *Alzheimer Disease and Associated Disorders*. 1997;11(Suppl 4):S39-44.
64. Erzigkeit H, Leffeld H, Pena-Casanova J, Bieber F, Yekrang-Hartmann C, Rupp M, Rappard F, Arnold K, Hindmarch I. The Bayer - Activities of Daily Living Scale (B-ADL): Results from a Validation Study in Three European Countries. *Dementia and Geriatric Cognitive Disorders*. 2001;12(5):348-58.
65. Mapi Research Institute. Cultural Adaptation of the Bayer Activities of Daily Living Scale (B-ADL) into Brazilian Portuguese. Report. Lyon-France: Mapi Research Institute; 1999. p. 1-19.
66. Folquitto JC, Bustamante SEZ, Barros SB, Azevedo D, Lopes MA, Hototian SR, Jacob F<sup>o</sup> W, Litvoc J, Bottino CMC. The Bayer - Activities of Daily Living Scale (B-ADL) in the differentiation between mild to moderate dementia and normal aging. *Revista Brasileira de Psiquiatria*. 2007;29(4):350-3.
67. Siest G, Pilot T, Régis-Bailly A, Leininger-Muller B, Steinmetz J, Galteau MM, Visvikis S. Apolipoprotein E: An Important Gene and Protein to Follow in Laboratory Medicine. *Clinical Chemistry*. 1995;41(8):1068-86.
68. Ruiu G, Cassader M, Gambino R, Alemanno N, Demicheli F, Pagano A, Veglia F, Pagano G. Apolipoprotein E allele frequencies in an Italian

- population: relation to age and lipid profile. *Aging (Milano)*. 1995;7(4):185-9.
69. Bader G, Zuliani G, Kostner GM, Fellin R. Apolipoprotein E polymorphism is not associated with longevity or disability in a sample of Italian octo- and nonagenarians. *Gerontology*. 1998;44(5):293-9.
70. Lima-Costa MF, Peixoto SV, Tauffer M, Moriguchi EH. Apolipoprotein E genotype does not predict 9-year all-cause mortality in Brazilian older adults: the Bambuí cohort. *Journal of the American Geriatrics Society*. 2008;56(12):2366-8.
71. Kulminski AM, Culminskaya I, Ukraintseva SV, Arbeev KG, Arbeeva L, Wu D, Akushevich I, Land KC, Yashin AI. Trade-off in the effects of the apolipoprotein E polymorphism on the ages at onset of CVD and cancer influences human lifespan. *Aging Cell* 2011;10(3):533-41.
72. Petkeviciene J, Smalinskiene A, Luksiene DI, Jureniene K, Ramauskiene V, Klumbiene J, Lesauskaite V. Associations between apolipoprotein E genotype, diet, body mass index, and serum lipids in Lithuanian adult population. *PLoS One*. 2012;7(7):e41525.
73. Fuzikawa AK, Peixoto SV, Tauffer M, Moriguchi EH, Lima-Costa MF. Association of ApoE polymorphisms with prevalent hypertension in 1406 older adults: the Bambuí Health Aging Study (BHAS). *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 2008;41(2):89-94.
74. Mukamal KJ, Cushman M, Mittleman MA, Tracy RP, Siscovick DS. Alcohol consumption and inflammatory markers in older adults: the Cardiovascular Health Study. *Atherosclerosis*. 2004;173:79-87.
75. Mukamal KJ, Jenny NS, Tracy RP, Siscovick DS. Alcohol consumption, interleukin-6 and apolipoprotein E genotypes, and concentrations of interleukin-6 and serum amyloid P in older adults. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2007;86:444-50.
76. Scherr PA, LaCroix AZ, Wallace RB, Berkman L, Curb JD, Cornoni-Huntley J, Evans DA, Hennekens CH. Light to moderate alcohol consumption and mortality in the elderly. *Journal of the American Geriatrics Society*. 1992;40(7):651-7.
77. Thun MJ, Peto R, Lopez AD, Monaco JH, Henley SJ, Heath CW Jr, Doll R. Alcohol consumption and mortality among middle-aged and elderly U.S. adults. *The New England Journal of Medicine*. 1997;337(24):1705-14.
78. Dallongeville J, Lussier-Cacan S, Davignon J. Modulation of plasma triglyceride levels by apoE phenotype: a meta-analysis. *Journal of Lipid Research*. 1992;33(4):447-54.
79. Sing CF and Davignon J. Role of the apolipoprotein E polymorphism in determining normal plasma lipid and lipoprotein variation. *American Journal of Human Genetics*. 1985;37(2):268-85.
80. Weintraub MS, Eisenberg S, Breslow JL. Dietary fat clearance in normal subjects is regulated by genetic variation in apolipoprotein E. *The Journal of Clinical Investigation*. 1987;80(6):1571-7.
81. Mooijaart SP, Berbée JF, van Heemst D, Havekes LM, de Craen AJ, Slagboom PE, Rensen PC, Westendorp RG. ApoE plasma levels and risk of cardiovascular mortality in old age. *PLoS Medicine*. 2006;3(6):e176.
82. Heijmans BT, Slagboom PE, Gussekloo J, Droog S, Lagaay AM, Kluit C, Knook DL, Westendorp RG. Association of APOE epsilon2/epsilon3/epsilon4 and promoter gene variants with dementia but not cardiovascular mortality in old age. *American Journal of Medical Genetics*. 2002;107(3):201-8.
83. Juva K, Verkkoniemi A, Viramo P, Polvikoski T, Kainulainen K, Kontula K, Sulkava R. APOE epsilon4 does not predict mortality, cognitive decline, or dementia in the oldest old. *Neurology*. 2000;54(2):412-5.
84. Rosvall L, Rizzuto D, Wang HX, Winblad B, Graff C, Fratiglioni L. APOE-related mortality: effect of dementia, cardiovascular disease and gender. *Neurobiology of Aging*. 2009;30(10):1545-51.
85. Benetos A, Thomas F, Bean KE, Pannier B, Guize L. Role of modifiable risk factors in life expectancy in the elderly. *Journal of Hypertension*. 2005;23:1803-8.
86. Knoops KT, de Groot LC, Kromhout D, Perrin AE, Moreiras-Varela O, Menotti A, et al. Mediterranean diet, lifestyle factors, and 10-year mortality in elderly European men and women: the HALE project. *JAMA*. 2004;292:1433-9.
87. Yates LB, Djousse L, Kurth T, Buring JE, Gaziano JM. Exceptional longevity in men: modifiable factors associated with survival and function to age 90 years. *Archives Internal Medicine*. 2008;168:284-90.
88. Rizzuto D, Orsini N, Qiu C, Wang HX, Fratiglioni L. Lifestyle, social factors, and survival after age 75: population based study. *BMJ*. 2012;345:e5568.
89. Brown WJ, McLaughlin D, Leung J, McCaul KA, Flicker L, Almeida OP, Hankey GJ, Lopez D, Dobson AJ. Physical activity and all-cause mortality in older women and men. *British Journal of Sports Medicine*. 2012;46(9):664-8.
90. Mattila K, Haavisto M, Rajala S, Heikinheimo R. Blood pressure and five year survival in the very old. *British Medical Journal (Clinical Research Ed.)*. 1988;296(6626):887-9.
91. Blazer DG, Landerman LR, Hays JC, Grady TA, Havlik R, Corti MC. Blood pressure and mortality risk in older people: comparison between African Americans and whites. *Journal of the American Geriatrics Society*. 2001;49(4):375-81.
92. Glynn RJ, Field TS, Rosner B, Hebert PR, Taylor JO, Hennekens CH. Evidence for a positive linear relation between blood pressure and mortality in elderly people. *Lancet*. 1995;345(8953):825-9.
93. Psaty BM, Furberg CD, Kuller LH, Cushman M, Savage PJ, Levine D, O'Leary DH, Bryan RN, Anderson M, Lumley T. Association between blood pressure level and the risk of myocardial infarction, stroke, and total mortality: the cardiovascular health study. *Archives of Internal Medicine*. 2001;161(9):1183-92.
94. Lindholm L, Lanke J, Bengtsson B. U-shaped association between mortality and blood pressure in a thirteen-year prospective study. *Family Practice*. 1986;3(1):3-8.
95. Okumiya K, Matsubayashi K, Wada T, Fujisawa M, Osaki Y, Doi Y, Yasuda N, Ozawa T. A U-shaped association between home systolic blood pressure and four-year mortality in community-dwelling older men. *Journal of the American Geriatrics Society*. 1999;47(12):1415-21.
96. Port S, Garfinkel A, Boyle N. There is a non-linear relationship between mortality and blood pressure. *European Heart Journal*. 2000;21(20):1635-8.
97. Siegel D, Kuller L, Lazarus NB, Black D, Feigal D, Hughes G, Schoenberger JA, Hulley SB. Predictors of cardiovascular events and mortality in the Systolic Hypertension in the Elderly Program pilot project. *American Journal of Epidemiology*. 1987;126(3):385-99.
98. Taylor JO, Cornoni-Huntley J, Curb JD, Manton KG, Ostfeld AM, Scherr P, Wallace RB. Blood pressure and mortality risk in the elderly. *American Journal of Epidemiology*. 1991;134(5):489-501.
99. van Bommel T, Gussekloo J, Westendorp RG, Blauw GJ. In a population-based prospective study, no association between high blood pressure and mortality after age 85 years. *Journal of Hypertension*. 2006;24(2):287-92.

100. Satish S, Freeman DH Jr, Ray L, Goodwin JS. The relationship between blood pressure and mortality in the oldest old. *Journal of the American Geriatrics Society*. 2001;49(4):367-74.
101. Blacher J, Safar M. Specific aspects of high blood pressure in the elderly. *Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System: JRAAS*. 2002;3(1):S10-5.
102. Gueyffier F, Bulpitt C, Boissel JP, Schron E, Ekblom T, Fagard R, Casiglia E, Kerlikowske K, Coope J. Antihypertensive drugs in very old people: a subgroup meta-analysis of randomised controlled trials. INDANA Group. *Lancet*. 1999;353(9155):793-6.
103. Stengård JH, Weiss KM, Sing CF. An ecological study of association between coronary heart disease mortality rates in men and the relative frequencies of common allelic variations in the gene coding for apolipoprotein E. *Human Genetics*. 1998;103:234-241.

## ANEXO 1 (Artigo Original em Português)

Tabela 2 completa: Caracterização da amostra

Variáveis*	Amostra total (n = 69)	Genótipo E3E3 (n = 53)	Genótipo E3E4 (n = 16)	p**
Idade na entrada (anos)	82,6 ± 2,8	82,2 ± 2,7	84,0 ± 2,8	0,021
Sexo				0,267
Masculino	23 (33,3)	20 (37,7)	3 (18,8)	
Feminino	46 (66,7)	33 (62,3)	13 (81,3)	
Escala Bayer AVDs	2,98 (1,44-5,55)	2,95 (1,38-5,46)	3,19 (1,54-7,44)	0,631
Escala Bayer AVDs ≥ 3,12	31 (45,6)	23 (43,4)	8 (53,3)	0,698
Tabagismo				0,717
Não fumante	56 (81,2)	42 (79,2)	14 (87,5)	
Ex-fumante/fumante	13 (18,8)	11 (20,8)	2 (12,5)	
Consumo de álcool (g/sem)	12,6 (0-143)	59,9 (0-148)	0 (0-39,6)	0,051
Uso abusivo de álcool				0,093
Não	17 (24,6)	13 (24,5)	4 (25,0)	
Sim (F>105g e M>210g)	18 (26,1)	17 (32,1)	1 (6,3)	
Abstêmios	34 (49,3)	23 (43,4)	11 (68,8)	
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	26,8 ± 5,4	27,6 ± 5,5	23,7 ± 3,6	0,011
IMC ≥ 27 kg/m <sup>2</sup>	29 (42,6)	26 (49,1)	3 (20,0)	0,087
IMC ≥ 30 kg/m <sup>2</sup>	17 (25,0)	16 (30,2)	1 (6,7)	0,092
Atividade física (kcal/semana)	5133 (2386-9846)	5421 (2155-10544)	3580 (2300-6930)	0,216
Atividade física				0,109
< 4000 kcal/semana	25 (36,2)	16 (30,2)	9 (56,3)	
≥ 4000 kcal/semana	44 (63,8)	37 (69,8)	7 (43,8)	
PAS (mmHg)	161 ± 25,3	162 ± 23,7	158 ± 30,5	0,489
PAD (mmHg)	86,3 ± 13,2	88,6 ± 12,7	78,5 ± 12,4	0,007
Pressão de pulso (PAS-PAD)	75,1 ± 22,7	73,9 ± 21,5	79,0 ± 26,8	0,439
Hipertensão	62 (89,9)	48 (90,6)	14 (87,5)	0,660
Glicemia jejum (mg/dL)	95,4 ± 20,7	96,2 ± 22,7	92,6 ± 12,2	0,539
<i>Diabetes mellitus</i>	4 (5,9)	4 (7,7)	0 (0,0)	0,566
Colesterol total (mg/dL)	209 ± 48,8	203 ± 43,9	229 ± 59,5	0,066
Colesterol total ≥ 200 mg/dL	37 (54,4)	27 (51,9)	10 (62,5)	0,649
Colesterol LDL (mg/dL)	138 ± 42,1	132 ± 36,0	156 ± 55,0	0,055
LDL ≥ 160 mg/dL	20 (29,9)	13 (25,5)	7 (43,8)	0,213
Colesterol HDL (mg/dL)	43,4 ± 11,4	44,0 ± 12,5	41,4 ± 6,6	0,284
HDL baixo	45 (66,2)	32 (61,5)	13 (81,3)	0,248
Triglicerídeos (mg/dL)	102 (85,8-146)	102 (83,4-144)	107 (88,2-159)	0,806
Triglicerídeos ≥ 150 mg/dL	15 (22,1)	11 (21,2)	4 (25,0)	0,739

\* descritas por média ± desvio padrão, mediana (percentis 25 – 75) ou n(%); \*\*teste t-student (comparação de médias), teste de Mann-Whitney (comparação de medianas), teste qui-quadrado de Pearson (variáveis categóricas) ou teste exato de Fisher (nas variáveis tabagismo, IMC ≥ 30 kg/m<sup>2</sup>, hipertensão, *diabetes mellitus*, LDL ≥ 160 mg/dL e triglicerídeos ≥ 150 mg/dL)



## ANEXO 2 (Artigo Original em Português)

Tabela 4 completa – Regressão de Cox univariada e multivariada para avaliar fatores associados à mortalidade

Variáveis	Univariada	p	Multivariada*	p
	HR (IC 95%)		HR (IC 95%)	
Idade (anos)	0,98 (0,89 – 1,07)	0,595	-	-
Sexo masculino	1,48 (0,86 – 2,54)	0,161	1,34 (0,57 – 3,12)	0,500
Genótipo E3E4	1,03 (0,56 – 1,88)	0,938	-	-
Escala Bayer AVDs	0,95 (0,86 – 1,05)	0,325	-	-
Escala Bayer AVDs ≥ 3,12	0,73 (0,42 – 1,25)	0,252	-	-
<b>Fumante/Ex-fumante</b>	<b>2,57 (1,35 – 4,89)</b>	<b>0,004</b>	<b>2,83 (1,00 – 7,98)</b>	<b>0,050</b>
Consumo de álcool (g/semana)	1,00 (0,99 – 1,00)	0,702	-	-
Uso abusivo de álcool				
Não	1,0			
Sim (F>105g e M>210g)	0,70 (0,33 – 1,48)	0,354	-	-
Abstêmios	0,69 (0,36 – 1,33)	0,268	-	-
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	0,96 (0,91 – 1,01)	0,107	0,98 (0,92 – 1,04)	0,507
IMC > 27 kg/m <sup>2</sup>	0,77 (0,45 – 1,33)	0,352	-	-
IMC ≥ 30 kg/m <sup>2</sup>	0,98 (0,53 – 1,80)	0,948	-	-
<b>Atividade física ≥ 4000 kcal/sem</b>	<b>0,61 (0,36 – 1,05)</b>	<b>0,074</b>	<b>0,46 (0,23 – 0,90)</b>	<b>0,023</b>
<b>PAS (mmHg)</b>	<b>0,98 (0,97 – 0,99)</b>	<b>0,001</b>	<b>0,98 (0,97 – 0,99)</b>	<b>0,004</b>
PAD (mmHg)	0,98 (0,96 – 1,01)	0,137	0,99 (0,96 – 1,02)	0,539
<b>Pressão pulso (PAS-PAD)</b>	<b>0,98 (0,97 – 0,99)</b>	<b>0,006</b>	<b>0,98 (0,97 – 0,99)</b>	<b>0,007</b>
Hipertensão	0,41 (0,18 – 0,93)	0,033	0,62 (0,21 – 1,85)	0,395
Glicemia (mg/dL)	1,00 (0,99 – 1,02)	0,677	-	-
<b>Diabetes mellitus</b>	<b>4,49 (1,50 – 13,5)</b>	<b>0,007</b>	<b>3,43 (1,03 – 11,5)</b>	<b>0,045</b>
Colesterol total (mg/dL)	0,99 (0,99 – 1,00)	0,044	-	-
CT ≥ 200 mg/dL	0,51 (0,30 – 0,88)	0,015	0,55 (0,26 – 1,15)	0,113
Colesterol LDL (mg/dL)	0,99 (0,99 – 1,00)	0,062	-	-
LDL ≥ 160 mg/dL	0,66 (0,36 – 1,20)	0,173	1,43 (0,61 – 3,37)	0,411
Colesterol HDL (mg/dL)	1,00 (0,98 – 1,03)	0,971	-	-
HDL baixo**	0,90 (0,51 – 1,58)	0,713	-	-
Triglicerídeos (mg/dL)	1,00 (0,99 – 1,00)	0,666	-	-
TG ≥ 150 mg/dL	1,41 (0,75 – 2,66)	0,292	-	-
Claudicação intermitente	1,03 (0,53 – 1,99)	0,932	-	-
AVC	1,03 (0,59 – 1,77)	0,930	-	-
IAM	0,41 (0,09 – 1,69)	0,215	-	-
ICC	1,09 (0,64 – 1,84)	0,762	-	-
Cardiopatia	0,90 (0,52 – 1,53)	0,685	-	-
DCV	0,88 (0,50 – 1,56)	0,660	-	-

\* o critério para a entrada da variável no modelo multivariado foi de que apresentasse um valor p<0,20 na análise bivariada; \*\* HDL baixo refere-se a HDL-colesterol <40mg/dL para homens e <50mg/dL para mulheres.

**ANEXO 1**

**INSTRUMENTO DE PESQUISA – ENTREVISTA**



**Projeto Veranópolis**

**FORMULÁRIO N° \_\_\_\_\_**

**1) Data da Entrevista: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_**

**DADOS PESSOAIS**

**2) Identificação**

**Nome:**

**Sobrenome:**

**Rua:**

**Bairro:**

**Cidade:**

**CEP:**

**Telefone:**

**Pessoa p/ contato: (não deve morar na mesma casa)**

**Nome:**

**Sobrenome:**

**Telefone p/ contato:**

**3) Data de nascimento: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_**

**4) Idade em anos:**

**5) Sexo:**  feminino       masculino

**6) Cor:**  branca     negra     parda     amarela     Outra: (especifique) \_\_\_\_\_

**7) Etnia:**  italiano     alemão     outra

## HISTÓRIA CLÍNICA

8) Algum médico já disse que o(a) Senhor(a) tem “pressão alta”?

não → vá para n° 10                       sim

9) Atualmente o(a) Senhor(a) faz algum tipo de tratamento para “pressão alta”?

não     sim → especificar o tipo de tratamento     tratamento não farmacológico  
 tratamento farmacológico  
 ambos

10) Algum médico já disse que o(a) Senhor(a) tem “diabete mellitus” (açúcar alto no sangue)?

não → vá para n° 12                       sim

11) Atualmente o(a) Senhor(a) faz algum tipo de tratamento para “diabete mellitus”?  
(citar: dieta; exercício; chás; controle de peso; remédios)

não     sim → especificar o tipo de tratamento     tratamento não farmacológico  
 tratamento farmacológico  
 ambos

12) Algum médico já disse que o(a) Senhor(a) tem “colesterol alto” (gordura alta no sangue)?

não → vá para n° 14                       sim

13) Atualmente o(a) Senhor(a) faz algum tipo de tratamento para “colesterol alto”?  
(citar: dieta; exercício; chás; controle de peso; remédios)

não     sim → especificar o tipo de tratamento     tratamento não farmacológico  
 tratamento farmacológico  
 ambos

14) Algum médico lhe disse que seu rim funciona mal?

não → vá para n° 16                       sim

15) Faz tratamento de diálise?

não  sim

16) Algum médico lhe disse que o(a) Senhor(a) tem “cálculo nos rins” (pedra)?

não  sim

17) O(A) Senhor(a) já operou os rins?

não  sim

18) Algum médico já lhe disse que o(a) Senhor(a) é portador (tem) cirrose?

não  sim

### MÓDULO DOENÇA CARDIOVASCULAR

#### DOR TORÁCICA AOS ESFORÇOS

\* Quando a resposta tiver o (\*) parar o questionário “Dor Torácica aos Esforços”.

19) Alguma vez o(a) Senhor(a) já teve dor ou desconforto no peito? (mostrar com a mão espalmada a região torácica anterior)

não\*  sim

20) O(A) Senhor(a) já teve dor no peito caminhando apressadamente ou quando estava subindo um morro uma escada?

não  sim  nunca caminho apressadamente/subo lombas

21) O(A) Senhor(a) tem dor no peito quando faz caminhadas no plano (numa reta)?

não  sim

22) O que o(a) Senhor(a) faz quando aparece a dor durante a caminhada?

continua caminhando\*  diminui o passo ou para

Nota: caso pare/diminua o passo após uso de nitrato SL, anotar como diminui o passo/para.

23) Se quando o(a) Senhor(a) para ou fica quieto o que acontece com a dor no peito?

não alivia\*  alivia (passa)

**24) Quanto tempo demora para passar a dor no peito?**

- mais de 10 minutos\*                       10 minutos ou menos

**25) Por favor, o(a) Senhor(a) pode apontar-me o local ou mostrar o local da dor? (pode ser mais de um)**

- esterno (superior/médio)  
 esterno (inferior)  
 precórdio  
 braço esquerdo  
 outros

**26) O(A) Senhor(a) sente alguma coisa a mais, tem algum outro sintoma?**

- não     sim

#### **POSSIBILIDADE DE INFARTO**

**27) O(A) Senhor(a) já teve uma dor no peito que durou mais de meia hora?**

#### **CLAUDICAÇÃO INTERMITENTE**

**\* Quando a resposta tiver o (\*) parar o questionário “Claudicação Intermitente”.**

**28) O(A) Senhor(a) tem dor nas pernas ao caminhar?**

- não\*     sim

**29) Essa dor costuma iniciar com o(a) Senhor(a) ainda parado de pé ou sentado?**

- não     sim\*

**30) Em que parte da sua perna dói?**

- barriga da perna (batata, panturrilha)                       outro local\*

**Nota: se outro local, perguntar, qual?**

**31) O(A) Senhor(a) tem dor na perna quando caminha apressadamente ou quando sobe morro ou lomba?**

- não\*     sim

**32) O(A) Senhor(a) tem dor na perna quando faz caminhadas no plano (em retas)?**

não  sim

**33) A dor na perna desaparece enquanto o(a) Senhor(a) ainda está caminhando?**

não  sim\*

**34) O que o(a) Senhor(a) faz quando está caminhando e aparece a dor na perna?**

continua caminhando\*  diminui o passo ou para

**35) O que acontece com a dor na perna quando o(a) Senhor(a) para e fica quieto(a)?**

alivia  não alivia\*

**36) Quanto tempo demora para passar a dor na perna?**

10 minutos ou menos  mais de 10 minutos

## **MÓDULO NEUROLÓGICO**

### **QUESTIONÁRIO DE RASTREAMENTO PARA ACIDENTE VASCULAR ENCEFÁLICO (QRN-AVE)**

#### **INSTRUÇÕES:**

**A. Este questionário deve ser aplicado ao paciente. Caso o mesmo tenha comprometimento de linguagem ou cognitivo que o impeça de responder, aplica-lo a um familiar.**

**B. Se o paciente ou familiar responderem positivamente a QUALQUER uma das questões abaixo, encaminhar para a entrevista neurológica.**

**C. Procure sempre obter uma resposta: SIM ou NÃO.**

**D. Explicações alternativas para as questões do QRN-AVE:**

- Paralisia = falta de força ou “sem mexer”.
- Lado do corpo = braço e/ou perna
- Paralisia no rosto = entortou a boca para o lado
- Dificuldade de falar = não conseguia dizer as palavras ou falava enrolado
- Derrame = coágulo, hemorragia

**37) O(A) Senhor(a) alguma vez teve paralisia de um lado do corpo que durou mais de 1 dia?**

não  sim

**38) O(A) Senhor(a) alguma vez teve paralisia no rosto que durou mais de 1 dia?**

não  sim

**39) O(A) Senhor(a) alguma vez teve dormências ou formigamentos em um lado do corpo ou do rosto que duraram mais de 1 dia?**

não  sim

**40) O(A) Senhor(a) alguma vez teve dificuldades para falar que durou mais de 1 dia?**

não  sim

**41) O(A) Senhor(a) alguma vez teve derrame, trombose ou isquemia cerebrais?**

não  sim

## **HÁBITOS DE VIDA**

### **CONSUMO DE ÁLCOOL**

**42) Com que frequência o(a) Senhor(a) ingere bebidas alcoólicas?**

nunca → vá para n° 44

menos que 1 vez por semana → vá para n° 44

somente no final de semana

3 a 5 dias por semana

mais que 5 dias por semana

**43) Que quantidade de bebida alcoólica tomou na última semana (últimos 7 dias)?**

**Cerveja:** \_\_\_\_\_ garrafas (600mL)  
\_\_\_\_\_ meia(s)-garrafa(a) (350mL)  
\_\_\_\_\_ copos (200mL)  
\_\_\_\_\_ lata (350mL)

**Vinho:** \_\_\_\_\_ garrafão (5L)  
\_\_\_\_\_ garrafão (3L)  
\_\_\_\_\_ garrafa (750mL)  
\_\_\_\_\_ copos (200mL)

**Destilados: (graspa, uísque, cachaça)**  
\_\_\_\_\_ doses (30mL)  
\_\_\_\_\_ copos (200mL)  
\_\_\_\_\_ garrafa (1000mL)

**Especificar a quantidade total de álcool consumido na última semana: (\_\_\_\_\_) g de álcool.**

**44) O(A) Senhor(a) já fumante?**

nunca → vá para n° 50                       sim

**45) O(A) Senhor(a) fuma atualmente?**

não     sim → vá para a n° 47

**46) Parou de fumar há quanto tempo?**

menos de 2 anos e nunca mais fumou

mais de 2 anos e nunca mais fumou → vá para n° 49

**47) Que tipo de fumo o(a) Senhor(a) consome ou consumia?**

cigarro

palheiro (cigarro de palha)

cachimbo

outro (especifique)\_\_\_\_\_



**48) Quantas unidades o(a) Senhor(a) consome ou consumia por dia?**

- 0-10                       11-20                       mais que 20

**49) Por quantos anos o(a) Senhor(a) fumou? □□**

### **USO REGULAR ATUAL DE MEDICAMENTOS**

**50) Assinale somente os fármacos utilizados:**

- |   |  |
|---|--|
| <input type="checkbox"/> AAS                        | <input type="checkbox"/> digoxina                  |
| <input type="checkbox"/> AINE                       | <input type="checkbox"/> diuréticos                |
| <input type="checkbox"/> antiarrítmicos             | <input type="checkbox"/> hipoglicemiantes orais    |
| <input type="checkbox"/> anticoagulantes orais      | <input type="checkbox"/> hipolipemiantes           |
| <input type="checkbox"/> anticonvulsivantes         | <input type="checkbox"/> insulina                  |
| <input type="checkbox"/> antidepressivos            | <input type="checkbox"/> neurolépticos             |
| <input type="checkbox"/> betabloqueadores           | <input type="checkbox"/> nitratos orais ou tópicos |
| <input type="checkbox"/> bloq. dos canais de cálcio | <input type="checkbox"/> reposição hormonal        |
| <input type="checkbox"/> bloqueadores H-2           | <input type="checkbox"/> trimetropim               |
| <input type="checkbox"/> cefalosporinas             | <input type="checkbox"/> outros                    |
| <input type="checkbox"/> corticosteróides           |  |

**Anote os nomes comerciais dos fármacos:**

---

---

---

---

### **MÓDULO DE ATIVIDADE FÍSICA**

**51) O(A) Senhor(a) pratica regularmente algum exercício ou atividade física vigorosa ou muito intensa?**

- não                                       sim

**52) O(A) Senhor(a) pratica algum exercício físico ou atividade física pelo menos 3 vezes na semana?**

- não                                       sim

**53) Quanto de atividade física o(a) Senhor(a) faz atualmente em comparação aos últimos 10 anos?**

a mesma coisa

mais atividade

menos atividade

**54) Quantos degraus de escada o(a) Senhor(a) sobe todos os dias? □□□**

**55) Qual é a distância em quilômetros que o(a) Senhor(a) caminha por dia em média? (10quarteirões = 1Km). □□□**

**56) Nas duas últimas semanas o(a) Senhor(a) fez alguma destas atividades físicas listadas abaixo?**

**Explicação: marcar primeiro com um X as respostas (SIM) ou (NÃO). As linhas em BRANCO serão preenchidas pelo médico no dia da sua entrevista.**

			Quantas horas/2sem total	Quantos min/cada ocasião
<b>Caminhar como exercício (sem parar e com vigor)</b>	<input type="checkbox"/> não	<input type="checkbox"/> sim	_____	_____
<b>Caminhar a passeio (caminhar devagar e com paradas)</b>	<input type="checkbox"/> não	<input type="checkbox"/> sim	_____	_____
<b>Subir morros</b>	<input type="checkbox"/> não	<input type="checkbox"/> sim	_____	_____
<b>Fazer jardinagem (regar, cuidar de horta, mexer com a terra)</b>	<input type="checkbox"/> não	<input type="checkbox"/> sim	_____	_____
<b>Fazer carpintaria em casa (pequenos consertos)</b>	<input type="checkbox"/> não	<input type="checkbox"/> sim	_____	_____
<b>Costurar (tricô, crochet)</b>	<input type="checkbox"/> não	<input type="checkbox"/> sim	_____	_____
<b>Podar plantação no campo</b>	<input type="checkbox"/> não	<input type="checkbox"/> sim	_____	_____
<b>Fazer plantio de sementes</b>	<input type="checkbox"/> não	<input type="checkbox"/> sim	_____	_____
<b>Capinar na roça</b>	<input type="checkbox"/> não	<input type="checkbox"/> sim	_____	_____
<b>Varrer ou lavar a casa</b>	<input type="checkbox"/> não	<input type="checkbox"/> sim	_____	_____
<b>Lavar ou passar roupa</b>	<input type="checkbox"/> não	<input type="checkbox"/> sim	_____	_____
<b>Aspirar o chão</b>	<input type="checkbox"/> não	<input type="checkbox"/> sim	_____	_____
<b>Amassar uva</b>	<input type="checkbox"/> não	<input type="checkbox"/> sim	_____	_____

<b>Cavalar</b> (com passos de trote)	<input type="checkbox"/> não	<input type="checkbox"/> sim	_____	_____
<b>Dirigir trator</b> ou operar máquinas	<input type="checkbox"/> não	<input type="checkbox"/> sim	_____	_____
<b>Jogar bocha ou boliche</b>	<input type="checkbox"/> não	<input type="checkbox"/> sim	_____	_____
<b>Jogar gamão</b>	<input type="checkbox"/> não	<input type="checkbox"/> sim	_____	_____
<b>Dançar dança de salão</b>	<input type="checkbox"/> não	<input type="checkbox"/> sim	_____	_____
<b>Andar de bicicleta</b>	<input type="checkbox"/> não	<input type="checkbox"/> sim	_____	_____
<b>Cortar lenha</b>	<input type="checkbox"/> não	<input type="checkbox"/> sim	_____	_____
<b>Tocar um instrumento</b>	<input type="checkbox"/> não	<input type="checkbox"/> sim	_____	_____
<b>Ordenhar vaca</b>	<input type="checkbox"/> não	<input type="checkbox"/> sim	_____	_____
<b>Jogar peteca ou pandorga</b>	<input type="checkbox"/> não	<input type="checkbox"/> sim	_____	_____
<b>Jogar futebol</b>	<input type="checkbox"/> não	<input type="checkbox"/> sim	_____	_____
<b>Preparar comida</b> (fazer almoço, jantar,...)	<input type="checkbox"/> não	<input type="checkbox"/> sim	_____	_____
<b>Cuidar de animal de criação</b> (dar ração, limpar chiqueiro)	<input type="checkbox"/> não	<input type="checkbox"/> sim	_____	_____

**57) O(A) Senhor(a) praticou algum outro exercício ou atividade física nas últimas 2 semanas que não está na lista acima?**

não                       sim                       não sabe

Se sim, quais são? \_\_\_\_\_ tempo: \_\_\_\_\_ min: \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_ tempo: \_\_\_\_\_ min: \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_ tempo: \_\_\_\_\_ min: \_\_\_\_\_

**58) Num dia NORMAL quanto tempo o(a) Senhor(a) gasta para fazer as seguintes atividades?**

**Explicação: escrever dentro dos quadradinhos o número correspondente de horas e minutos gastos para as atividades indicadas.**

	<b>HORAS</b>	<b>MINUTOS</b>
<b>Dormir a noite ou ficar deitado à noite</b>	□□	□□
<b>Fazer uma sesta</b>	□□	□□
<b>Ficar sentado assistindo TV ou ouvindo o rádio, lendo, conversando, tricotando,...)</b>	□□	□□

<b>Limpar a casa ou cozinhar</b>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<b>Fazer carpintaria em casa</b>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<b>Cuidar de crianças</b>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<b>Deitar para descansar durante o dia</b>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<b>Jogar cartas ou fazer tricô</b>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

**59) O(A) Senhor(a) ainda trabalha todos os dias?**

**Explicação: marcar a resposta com um X dentro do quadradinho, caso a resposta seja SIM, especificar qual atividade e o número de horas por dia.**

não  sim

**Qual tipo de trabalho?** \_\_\_\_\_

**Quantas horas?** \_\_\_\_\_

**ANEXO 2**

**INSTRUMENTO DE PESQUISA – EXAME FÍSICO**



**Projeto Veranópolis**

**Longevo:** \_\_\_\_\_ **Número:** \_\_\_\_\_

**1) GERAL**

**Peso:**

**Altura:**

**IMC:**

**Pressão Arterial (medida 1):**

**Pressão Arterial (medida 2):**

**Pressão Arterial (medida 3):**

**(sim) (não) pulso regular**

**(sim) (não) alteração do estado geral**

**(sim) (não) desidratado**

**(sim) (não) descorado**

**(sim) (não) escaras**

**(sim) (não) úlceras dee MMII**

**2) ESPECÍFICO**

**Audição**

**1. (sim) (não) Uso de aparelho**

**[1] com melhora**

**[2] sem melhora**

**2. (sim) (não) Diminuição da acuidade**

**[1] discreta**

**[2] limitante**

**3. Teste do sussurro:**

**Ouvido direito: [1] escuta**

**[2] não escuta**

**Ouvido esquer: [1] escuta**

**[2] não escuta**

**Função do braço:**

1. Alcança tocar a parte posterior da cabeça?

Direita: (sim) (não)      Esquerda: (sim) (não)

2. Consegue pegar a caneta e colocar de volta no local?

Direita: (sim) (não)      Esquerda: (sim) (não)

**Visão:**

1. (sim) (não) Uso de óculos

[1] com melhora      [2] sem melhora

2. (sim) (não) Diminuição da acuidade

[1] discreta      [2] limitante

3. Diminuição da acuidade

	a) sem óculos	b) com óculos
Sem dificuldades	1	1
Discretas dificuldades	2	2
Moderadas dificuldades	3	3
Serwas dificuldades	4	4

**Neurológico:**

1. (sim) (não) Rigidez ou outro sinal parkinsoniano? Descrever:

a) postura parkinsoniana ou vira em bloco?      (sim) (não)

b) marcha parkinsoniana?      (sim) (não)

2. (sim) (não) Tremor? Descrever:      [1] repouso      [2] ação

3. (sim) (não) Paresias?

4. (sim) (não) Hemiparesias?

5. (sim) (não) Ataxias?

6. (sim) (não) Coordenação? (bater alternadamente dorso ou palma da mão)

8. (sim) (não) Movimento finos? (moeda ou polegar X outros dedos)

9. Deixar escapar o dedo do examinador se o está agarrando com força?

	mão dominante (D,E)	mão não dominante
Não deixa escapar		
Deixa escapar opondo boa resistência		
Deixa escapar opondo resistência		
Deixa escapar opondo pouca resistência		

**10. Levantar de um banco sem braços:**

(sim) (não) Levanta da cadeira

(sim) (não) Caminha 10 passos

(sim) (não) Dá meia volta e senta novamente

**11. Com que dificuldade fez esse teste: ( )**

1. sozinho sem problemas

2. sozinho com alguma dificuldade

3. com ajuda

4. não consegue levantar

Obs: \_\_\_\_\_

**12. Marcha**

a) Passos: \_\_\_\_\_

b) Dificuldade:

(1) nenhuma (2) discreta (3) muito dificultosa (4) não deambula

c) Faz uso de aparelho auxiliar? (sim) (não) Qual? \_\_\_\_\_

Na avaliação geral do geriatra, esse logevo está:

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
debilitado e fraco			incomodado			forte e saudável			
saúde física pobre			saúde interm.			saúde física pobre			

O exame físico:

**1. Tem alterações ( )**

1. Estado físico geral severamente comprometido

2. Estado físico geral moderadamente comprometido

3. Estado físico geral discretamente comprometido

**2. Não tem alterações ( )**

1. Estado físico geral bom

2. Estado físico geral excelente

Observações: \_\_\_\_\_

### ANEXO 3

#### INSTRUMENTO DE PESQUISA – Escala Bayer de Atividades da Vida Diária (B-ADL)



### Projeto Veranópolis

As perguntas seguintes abordam atividades diárias que a pessoa sobre a qual estamos falando poderia ter dificuldades. Estas perguntas devem ser respondidas por familiar/informante que conheça bem o sujeito. Por favor, indique o quão frequentemente estas dificuldades ocorrem, marcando os números apropriados. Quanto maior o número, mais dificuldades a pessoa tem para fazer a atividade em questão. Se a dificuldade nunca ocorre marque 1. Se ocorre sempre, marque 10.

A pessoa tem dificuldades para...	pontuação	Não se aplica	Não sei	Escore
1 ...fazer suas atividades diárias	Nunca 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 sempre			
2 ...cuidar de si próprio	Nunca 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 sempre			
3 ...tomar remédio sem supervisão	Nunca 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 sempre			
4 ... cuidar de sua higiene pessoal	Nunca 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 sempre			
5 ...lembrar de datas, acontecimentos e compromissos importantes	Nunca 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 sempre			
6 ... concentrar-se na leitura	Nunca 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 sempre			
7 ...descrever o que ela acabou de ver ou ouvir	Nunca 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 sempre			
8 ...participar de uma conversa	Nunca 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 sempre			
9 ...usar o telefone	Nunca 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 sempre			
10 ...dar um recado a outra pessoa	Nunca 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 sempre			
11 ...sair para uma caminhada sem se perder	Nunca 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 sempre			
12 ...fazer compras	Nunca 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 sempre			
13 ...preparar a comida	Nunca 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 sempre			



14 ...contar o dinheiro sem errar	Nunca 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 sempre			
15 ...lidar com suas contas	Nunca 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 sempre			
16 ...ensinar o caminho, se perguntado	Nunca 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 sempre			
17 ...usar eletrodomésticos	Nunca 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 sempre			
18 ...orientar-se em lugar não familiar	Nunca 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 sempre			
19 ...usar sozinho meios de transporte	Nunca 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 sempre			
20 ...participar em atividades de lazer	Nunca 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 sempre			
21 ...continuar com a mesma atividade depois de uma breve interrupção	Nunca 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 sempre			
22 ...fazer duas coisas ao mesmo tempo	Nunca 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 sempre			
23 ...lidar com situações não familiares	Nunca 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 sempre			
24 ...fazer as coisas com segurança e sem se machucar	Nunca 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 sempre			
25 ...realizar uma tarefa quando sob pressão	Nunca 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 sempre			
<b>Total (soma da coluna escore)</b>				

O cálculo do Escore final da escala ADL-IS deve ser feito dividindo o total pelo número de perguntas respondidas (excluindo-se as questões assinaladas como Não se aplica ou Não sei):

Escore B-ADL =

Total

**ESCORE FINAL B-ADL**

Número de itens respondidos