

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas René Rachou
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

ESTUDO DA ASSOCIAÇÃO DO ALELO E4 DA APOLIPOPROTEÍNA E (APOE)
COM O COMPROMETIMENTO COGNITIVO E COM AS DIMENSÕES DA
COGNIÇÃO EM IDOSOS VIVENDO EM COMUNIDADE: PROJETO BAMBUÍ

por

Sandra Regina Quintino dos Santos

Belo Horizonte
Março/2014

TESE DSC-CPqRR

S.R.Q. Santos

2014

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas René Rachou
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

ESTUDO DA ASSOCIAÇÃO DO ALELO E4 DA APOLIPOPROTEÍNA E (APOE)
COM O COMPROMETIMENTO COGNITIVO E COM AS DIMENSÕES DA
COGNIÇÃO EM IDOSOS VIVENDO EM COMUNIDADE: PROJETO BAMBUÍ

por

Sandra Regina Quintino dos Santos

Tese apresentada com vistas à
obtenção do Título de Doutor em
Ciências na área de concentração
Saúde Coletiva.

Orientação: Maria Fernanda Furtado
Lima e Costa

Co-orientação: Érico de Castro e
Costa

Belo Horizonte
Março/2014

Catálogo-na-fonte
Rede de Bibliotecas da FIOCRUZ
Biblioteca do CPqRR
Segemar Oliveira Magalhães CRB/6 1975

S237e Santos, Sandra Regina Quintino dos.
2014

Estudo da associação do alelo E4 da apolipoproteína E (APOE) com o comprometimento cognitivo e com as dimensões da cognição em idosos vivendo em comunidade: projeto Bambuí / Sandra Regina Quintino dos Santos. – Belo Horizonte, 2014.

XIII, 50 f.: il.; 210 x 297mm.

Bibliografia: f.: 59-63

Tese (Doutorado) – Tese para obtenção do título de Doutora em Ciências pelo Programa de Pós - Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou. Área de concentração: Saúde Coletiva.

1. Idoso/fisiopatologia 2. Envelhecimento/patologia 3. Cognição/fisiopatologia I. Título. II. Costa, Maria Fernanda Furtado Lima (Orientação). III. Costa, Érico de Castro e (Co-orientação)

CDD – 22. ed. – 305.26

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas René Rachou
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

ESTUDO DA ASSOCIAÇÃO DO ALELO E4 DA APOLIPOPROTEÍNA E (APOE)
COM O COMPROMETIMENTO COGNITIVO E COM AS DIMENSÕES DA
COGNIÇÃO EM IDOSOS VIVENDO EM COMUNIDADE: PROJETO BAMBUÍ

por

Sandra Regina Quintino dos Santos

Foi avaliada pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Dr. Érico de Castro e Costa (Presidente)

Prof. Dr. Breno Satler de Oliveira Diniz

Prof. Dr. Leandro Fernandes Malloy Diniz

Prof.^a Dr.^a Juliana Vaz de Melo Mambrini

Suplente: Prof. Dr. Sérgio William Viana Peixoto

Tese defendida e aprovada em: 27/03/2014.

“Gosto de ser gente porque, inacabado, sei que sou um ser condicionado, mas, consciente do inacabamento, sei que posso ir mais além dele.”

Paulo Freire

AGRADECIMENTOS

À professora Maria Fernanda, pela oportunidade e pela orientação no desenvolvimento deste trabalho.

Ao professor Érico, pela orientação e pelo conhecimento transmitido durante a elaboração deste trabalho.

À Secretaria de Pós-Graduação do Centro de Pesquisas René Rachou, pelo suporte oferecido durante o período de realização do doutorado.

Aos professores Assuero Rodrigues da Silva e José Carlos Nogueira pelo constante estímulo e valorização.

Às irmãs Fátima, Claudia e Regina pela amizade e paciência nos momentos de ansiedade.

À minha linda sobrinha Joana pelo auxílio nas traduções e por entender a importância de tudo.

Aos amigos irmãos, Anderson, Daniela, Marlon, Antônio e Renato, pelo companheirismo constante.

Aos meus alunos, pela compreensão nos momentos de ausência.

Aos espíritos iluminados que me acompanham e me dão humor para encarar a vida sempre.

À Fundação Oswaldo Cruz, ao Centro de Pesquisas René Rachou e ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde pela oportunidade ofertada.

A todos que de alguma forma contribuíram no desenvolvimento desse estudo.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	VIII
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	IX
RESUMO	X
ABSTRACT	XII
1 INTRODUÇÃO	14
2 OBJETIVOS	17
3 METODOLOGIA	18
3.1 Área e População de estudo	18
3.2 Variável dependente	18
3.3 Variável independente	18
3.4 Covariáveis	19
3.5 Análise estatística	19
4 RESULTADOS	21
4.1 Artigo 1	21
4.2 Artigo 2	34
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	49
6 ANEXOS	51
6.1 Primeiro artigo publicado	51
6.2 Submissão do segundo artigo	58
7 REFERÊNCIAS	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 (Artigo 1) - Características de base da população por genótipo APOE.....	27
Tabela 2 (Artigo 1) - Associação do alelo E4 do gene APOE com o comprometimento cognitivo.....	28
Tabela 1 (Artigo 2) - Características dos participantes por zigosidade para APOE E4.....	40
Tabela 2 (Artigo 2) - Análise da associação entre portadores e não portadores do alelo APOE E4 e as dimensões do MEEM (regressão linear ajustada e não ajustada).....	42
Tabela 3 (Artigo 2) - Análise da associação entre a dose gênica APOE E4 e os domínios memória e concentração do MEEM (regressão linear ajustada e não ajustada).....	42

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ANOVA	Análise de Variância
APOE	Apolipoproteína E
DA	Doença de Alzheimer
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>
DP	Desvio Padrão
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
GHQ	<i>General Health Questionnaire</i>
HDL	<i>High Density Lipoprotein</i>
IC	Intervalo de Confiança
MEEM	Mini Exame do Estado Mental
OR	<i>Odds Ratio</i>
PCA	<i>Principal Component Analysis</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais

RESUMO

A função cognitiva em idosos saudáveis é motivo de preocupação já que se observa um envelhecimento da população mundial. Fatores genéticos como o gene APOE podem predispor a um pior desempenho cognitivo em testes neuropsicológicos tanto na função cognitiva global como em domínios específicos da cognição. No Brasil, raros são os estudos epidemiológicos envolvendo indivíduos idosos saudáveis vivendo em comunidade, que avaliam os fatores que afetam o processo cognitivo durante o envelhecimento. Os objetivos deste estudo foram avaliar a associação do gene APOE e o comprometimento cognitivo em idosos participantes da linha de base da coorte de Bambuí e também determinar se a associação acontece de forma similar com todos os domínios da cognição mensurados pelo Mini Exame do Estado Mental. Participantes da linha de base do Projeto Bambuí que tiveram amostra de sangue colhida para genotipagem e a função cognitiva mensurada pelo MEEM (n=1408) foram incluídos no estudo. Uma versão do MEEM adaptada à população brasileira foi utilizada, tendo um ponto de corte de 22 pontos (total de 30). As seguintes variáveis foram também consideradas nesse estudo: idade na linha de base, sexo, estado civil, escolaridade, cor da pele, colesterol HDL, triglicérides, pressão sanguínea e sintomas depressivos avaliados pelo General Health Questionnaire-12 (GHQ-12). Os *odds ratio* (OR) para a associação foram obtidos através de regressão logística não ajustada e ajustada em cinco modelos. Coeficientes β não ajustados e ajustados foram estimados por regressão linear para a estimativa da relação entre o alelo APOE E4 e as dimensões do MEEM obtidas pela análise da principal componente (PCA). A homozigose para o alelo E4 foi significativamente associada ao menor escore do MEEM, e a associação foi mantida após o ajustamento pela idade, sexo, escolaridade, estado civil, cor da pele e outros possíveis fatores de confusão (HDL, triglicérides, pressão sistólica e escore do GHQ (OR = 2,98; IC 95% 1,15 – 7,71). O escore do fator da dimensão memória foi significativamente menor para os portadores do alelo APOE E4 enquanto que o escore do fator da dimensão concentração foi significativamente menor para os não portadores do alelo. A dimensão memória está inversamente associada com os heterozigotos para o alelo APOE E4 (β : -0,15; IC95%: -0,27 a -0,03). Os resultados mostraram haver uma associação somente entre indivíduos homozigotos para o alelo E4 do gene APOE e um comprometimento cognitivo medido pelo MEEM. Não portadores do alelo e heterozigotos obtiveram o mesmo *odds ratio*, não havendo

associação com o comprometimento cognitivo nestes indivíduos. Na avaliação das dimensões do MEEM a única associação encontrada foi entre os indivíduos heterozigotos para o alelo E4 e o domínio memória. Apesar de não ter sido encontrada associação nos indivíduos homozigotos, houve uma relação de dose-resposta em relação ao domínio memória. Através da utilização de um único teste neuropsicológico (MEEM), foi possível identificar indivíduos com um comprometimento cognitivo associado ao alelo APOE E4 e verificar que dentre as dimensões cognitivas avaliadas no teste houve um efeito diferencial, marcadamente no domínio memória em associação com a presença do alelo.

ABSTRACT

Cognitive function of healthy elders has been a global concern since the beginning of demographic transition. It is well known that some genes, like the APOE gene can influence the cognitive performance in neuropsychological tests, either on global cognition performance or on specific domains of cognition. There are few epidemiological studies in Brazil searching for factors that could affect cognition during the aging process and which also work with community-dwelling older. Our first objective was to evaluate a possible association between the APOE genotype and cognitive impairment in the baseline participants of the Bambuí Study. Our second objective was to analyze if the APOE alleles differentially affect specific domains of cognition measured by the Mini Mental State Exam (MMSE). All of the participants at baseline (n = 1,408) who had either a cognitive status measured by MMSE and blood collected for APOE genotyping were selected for the study. The study questionnaire includes a standard Brazilian version of the MMSE with a cutoff point at 22 (out of 30). The following variables were also considered in this study: baseline age, gender, marital status, educational level, skin color, HDL cholesterol, triglycerides, systolic blood pressure (SBP) and depressive symptoms as assessed by General Health Questionnaire-12 (GHQ). The unadjusted and adjusted odds ratios (ORs) were estimated by using logistic regression to assess the relationship between the APOE genotype and cognitive impairment. The analysis was based on five models. Unadjusted and adjusted β coefficients were estimated by linear regression to assess the relation between APOE E4 carriers and dimensions underlying the MMSE obtained using a Principal Component Analysis (PCA). APOE E4 homozygosity was significantly associated with a lower MMSE score, and this association remained after incrementally adjusting for age, gender, education, marital status, skin color, and for all other potential confounding variables (HDL, SBP, triglycerides and GHQ score) (OR = 2.98; 95% CI 1.15-7.71). Memory dimension was inversely associated with APOE E4 heterozygotes (β : -0.15; 95%CI: -0.27 to -0.03). Other dimensions were not associated with either APOE E4 homozygotes or heterozygotes. The APOE E4 allele is solely associated with cognitive impairment in homozygotes, there is no association with heterozygotes and non-carriers in the study population. The domains underlying the MMSE were differentially affected being the memory domain the only one associated with the presence of the allele. By the use of one neuropsychological test (MMSE) it was possible to identify those

subjects with cognitive impairment associated with the APOE gene and also identify which cognitive domain (memory) is affected by the presence of the APOE E4 allele.

1 INTRODUÇÃO

Com a mudança do perfil demográfico mundial e o aumento da população idosa, muda também o perfil epidemiológico e observa-se um predomínio de condições de saúde crônico-degenerativas sendo a morbidade e mortalidade dos idosos devida, principalmente, às doenças cardiovasculares, neoplasias, condições músculo-esqueléticas e alterações mentais (WHO – World Health Organization, 1998).

O comprometimento cognitivo no idoso é parte constituinte do processo de envelhecimento fisiológico, podendo tornar-se patológico na presença de fatores diversos. Sendo o tipo mais comum de demência, a doença de Alzheimer (DA) tem aumentado sua incidência sendo estimada uma taxa de 1% por ano em indivíduos na faixa de 65-69 anos até aproximadamente 14% por ano em indivíduos acima de 85 anos de idade (Bachman et al., 1993). Além de fatores sócio demográficos (Farrer et al. 1997), a constituição genética individual é condição predisponente para o desenvolvimento não só da DA, mas também do comprometimento cognitivo, considerado um dos sinais prodromicos da doença (Poirer et al., 1993; Stritmatter et al., 1995). Como a DA pode levar anos para se desenvolver e indivíduos normais podem ser assintomáticos nos estágios iniciais da doença (Hulette et al., 1998; Knopman et al., 2003), torna-se importante estabelecer os fatores predisponentes para idosos sem demência.

Vários genes têm sido associados ao comprometimento cognitivo em idosos. O mais importante e mais bem replicado deles é o gene APOE que com seu alelo E4 afeta a função cognitiva levando ao comprometimento cognitivo e às doenças neurodegenerativas (Corder et al., 1993; Dupuy et al., 2001). A ApoE é uma lipoproteína plasmática que desempenha sua principal função no metabolismo de lipídeos e está diretamente envolvida na formação de placas amiloides no cérebro. Dois polimorfismos na região codificadora do gene APOE formam três alelos, APOE E2, APOE E3 (o mais comum), e APOE E4, e três isoformas da proteína cada uma com propriedades diferentes.

Estudos de associação do genótipo APOE e as disfunções cognitivas, principalmente a DA (Sohrabi et al, 2009; Gene Chen et al, 2002; Caselli et al, 2009; Christensen et al, 2008; Jorm et al, 2007), mostraram que portadores heterozigotos do alelo E4 do gene APOE têm um risco de 3 a 4 vezes maior de desenvolver a

doença em comparação aos não portadores e, que os homozigotos para o alelo possuem um risco 10 a 12 vezes maior de desenvolver DA.

A avaliação do papel do alelo E4 do gene APOE no desempenho cognitivo de indivíduos saudáveis (Anstey & Christensen, 2000; Lautenschlager, 2005; Bretsky, 2003) também vem sendo testada, já que a possibilidade de detecção precoce do comprometimento poderia identificar uma fase pré-clínica tratável (Roberts et al., 2008). Entretanto, os resultados desses estudos são contraditórios, alguns mostrando um aumento do risco de declínio cognitivo em portadores e outros mostrando nenhuma associação (Wilson, 2002; Small, 2000). No Brasil os estudos existentes buscam avaliar especificamente a associação entre o genótipo da APOE e a doença de Alzheimer ou o chamado comprometimento cognitivo leve, na maioria das vezes analisando pacientes institucionalizados (Forlenza et al., 2009; Oliveira et al., 2008; Bahia et al., 2008; Charchat-Fichman et al., 2004; Ojopi et al., 2004). Um único estudo encontrado (Garcia et al., 2008) que avaliou a influência da APOE no comprometimento cognitivo em idosos vivendo em comunidade não obteve resultados para a associação.

Além de seu efeito na função cognitiva global, a presença do alelo E4 da APOE tem sido avaliada em relação aos domínios específicos da cognição e, estudos demonstram que esse efeito pode ser diferente para domínios específicos (Greenwood et al., 2000; Greenwood et al., 2005). Na mensuração da função cognitiva, vários testes podem ser utilizados, não somente para medir a cognição global, mas também para medir domínios específicos da cognição. Vários domínios da cognição têm sido utilizados para estabelecer critérios diagnósticos para as disfunções cognitivas e a demência, e a influência do gene APOE tem sido avaliada em cada um deles, tais como: memória episódica (Bondi et al., 1995; Jorm et al., 2007; Packard et al., 2007), habilidade verbal (Mortensen & Hogh, 2001), função executiva (Swan et al., 2005) e velocidade de percepção (Jorm et al., 2007; Packard et al., 2007). Apesar da divergência entre estudos, a maior parte deles encontra o efeito mais acentuado do alelo E4 nos domínios da memória e da função executiva (Small et al., 2002), que são geralmente as primeiras funções afetadas nos distúrbios cognitivos.

Muitos são os testes neuropsicológicos utilizados, nos estudos supracitados, para mensurar a função cognitiva, alguns medindo o desempenho cognitivo global e

outros medindo domínios específicos. O Mini Exame do Estado Mental (MEEM) (Folstein et al, 1975) é a escala de rastreamento mais utilizada para avaliação da função cognitiva global. É um teste rápido e de fácil aplicação. Compõem o MEEM onze questões que se correlacionam em cinco dimensões ou domínios da cognição, quais sejam: concentração, linguagem/práxis, orientação, memória e atenção, com um escore máximo de 30 pontos. Em estudos epidemiológicos sua utilização já foi extensivamente discutida, já que as questões que o compõem sofrem forte influência das características sócio demográficas de uma população (Sczufca et al., 2009). O fator escolaridade e a cultura regional impactam os resultados obtidos através da aplicação do MEEM. A sensibilidade e especificidade do teste variam de acordo com o nível de escolaridade, sendo de 100% e 92%, respectivamente para indivíduos com mais de 9 anos de educação formal, enquanto que para indivíduos com menos de 8 anos de educação formal a sensibilidade é de 63,3% e a especificidade de 65,2% (Valle et al, 2009). Além das adaptações culturais, outra controvérsia surge sobre a interpretação dos resultados, ou seja, quais seriam os pontos de corte ideais para se definir o comprometimento cognitivo sem que houvesse confundimento com o nível de escolaridade e para isso foram sugeridas algumas estratégias, tais como: (1) o ajustamento dos pontos de corte de acordo com a escolaridade (Bertolucci et al., 1994; Caramelli et al., 1999) e (2) o uso dos pontos de corte baseado na distribuição dos escores na população estudada (Laks et al., 2007).

A aplicação de vários testes neuropsicológicos em estudos epidemiológicos, principalmente naqueles de base populacional, é bastante dificultada tanto pela necessidade de longos períodos de tempo quanto pelo fato destes testes serem aplicados por médicos especialistas com treinamento específico. Em populações como a de Bambuí isso envolveria uma logística complexa. A utilização de um teste como o MEEM além de possibilitar a identificação de indivíduos com comprometimento cognitivo pode, através da análise de suas dimensões, identificar os portadores de alterações cognitivas específicas, sendo uma alternativa viável para o uso das baterias de testes neuropsicológicos.

2 OBJETIVOS

Geral

Verificar a associação entre o genótipo APOE com o desempenho cognitivo em idosos brasileiros vivendo em comunidade.

Específicos

1° Artigo

Verificar a existência de associação entre o genótipo APOE com o escore total do MEEM entre idosos vivendo em comunidade.

2° Artigo

Verificar a existência da associação entre o genótipo APOE com as dimensões específicas do MEEM entre idosos vivendo em comunidade.

3 METODOLOGIA

3.1 Área e População de estudo

O projeto Bambuí é um estudo de coorte de base populacional sobre a saúde de idosos, desenvolvido na cidade de mesmo nome, situada em Minas Gerais, Brasil. A linha de base da coorte foi constituída em 1997 (Lima-Costa et al, 2000). Os participantes da pesquisa foram identificados por meio de um censo completo realizado no município pela equipe do projeto. Todos os moradores com sessenta anos ou mais de idade em 1º de janeiro de 1997 (n=1742) foram convidados a participar do estudo e 1606 (92,2%) participaram da linha de base da coorte. Para o presente trabalho foram selecionados todos os participantes que tiveram amostra de sangue colhida para a genotipagem da APOE e que responderam ao MEEM (n=1408).

3.2 Variável dependente

O questionário do estudo incluiu uma versão do MEEM adaptada para a população brasileira (Seabra et al., 1990). Na ausência de um ponto de corte consensual para a detecção da disfunção cognitiva em populações com baixa escolaridade, foi considerada a distribuição em percentis (abaixo do 5º percentil – escore ≤ 13 ; entre o 5º e o 25º percentil – escore entre 14 e 21; quartis superiores ≥ 22) dos escores do MEEM na população estudada, como previamente sugerido para a mesma (Castro-Costa et al., 2008). As dimensões do MEEM foram obtidas através da Análise da Componente Principal (PCA) determinando uma solução de cinco fatores para as 30 questões do MEEM (Castro-Costa et al. 2009). O MEEM foi aplicado por entrevistadores com pelo menos 11 anos completos de escolaridade, selecionados entre moradores da cidade de Bambuí. O treinamento foi realizado por psiquiatra qualificada e os entrevistadores foram certificados somente após avaliação da confiabilidade intra e entre observadores.

3.3 Variável independente

A variável independente deste estudo é o genótipo APOE dos idosos que responderam ao MEEM. A análise genotípica foi realizada na linha de base da coorte de Bambuí. A coleta do sangue foi feita por técnicos treinados na Faculdade de Medicina da UFMG e realizada no Posto Avançado Emmanuel Dias da FIOCRUZ. As amostras foram então, enviadas para o laboratório de Patologia

Clínica do projeto localizado no Laboratório de Epidemiologia e Antropologia Médica do Centro de Pesquisa René Rachou. Para a genotipagem da apolipoproteína E, o DNA genômico foi extraído das amostras e armazenado a -70 °C até o uso. As amostras foram então, submetidas à amplificação pela reação em cadeia da polimerase (PCR) e o DNA amplificado foi submetido à técnica dos polimorfismos de comprimento de fragmentos de restrição (RFLP).

3.4 Covariáveis

As seguintes variáveis foram também consideradas nesse estudo: idade, sexo, estado civil, nível de escolaridade, cor da pele, colesterol HDL, triglicérides, pressão sanguínea sistólica e sintomas depressivos avaliados pelo General Health Questionnaire-12 (GHQ). O nível de escolaridade foi categorizado em até 4 anos de estudo ou mais de 4 anos de estudo. Os entrevistadores classificaram a cor da pele dos participantes baseados em fotografias representativas de diferentes tons (branco, mulato claro, mulato escuro, preto). Os níveis séricos de colesterol HDL e triglicérides foram medidos após 12 horas de jejum com kits específicos (Boehringer Mannheim Corp., Ingelheim, Germany) em um analisador automático (Eclipse Vitalab, Merck, Netherlands). A pressão sanguínea foi medida por 3 vezes com esfigmomanômetro de mercúrio. A primeira medida foi tomada pela manhã após 5 minutos de descanso, seguida por medidas a intervalos de 2 minutos ou após 30 minutos do último cigarro ou ingestão de cafeína. Foi considerada para a pressão sanguínea a média aritmética da segunda e terceira aferição

3.5 Análise estatística

As associações não ajustadas do genótipo da APOE com os fatores sócio demográficos, biomarcadores e sintomas de saúde mental foram mensuradas utilizando-se o χ^2 de Pearson ou ANOVA para avaliar a significância estatística das diferenças entre as variáveis categóricas e contínuas respectivamente. *Odds ratios* (ORs) não ajustados e ajustados foram estimados através de regressão logística avaliando a relação entre o genótipo APOE e o comprometimento cognitivo. A análise foi baseada em cinco modelos. Primeiramente foi calculada a associação bruta entre o escore do MEEM e o genótipo da APOE, em seguida o cálculo foi ajustado aditivamente por sexo, idade, escolaridade (modelo2); estado civil e cor da pele (modelo 3); HDL, triglicérides e pressão sistólica (modelo 4); e o escore do GHQ (modelo 5). Além disso, interações dos portadores de APOE E4 com sexo e

cor da pele também foram testadas. Coeficientes β não ajustados e ajustados foram estimados por regressão linear para a estimativa da relação entre o alelo APOE E4 e as dimensões do MEEM. A análise foi baseada nos cinco modelos supracitados. Todas as análises foram feitas utilizando-se o software STATA.

4 RESULTADOS

4.1 ARTIGO 1

HOMOZIGOSE PARA O ALELO E4 DO GENE *APOE* ESTÁ ASSOCIADA À FUNÇÃO COGNITIVA DE IDOSOS VIVENDO EM COMUNIDADE – PROJETO BAMBUÍ

Quintino-Santos, S.R. et al. Homozygosity for the *APOE* E4 allele is solely associated with lower cognitive performance in Brazilian community-dwelling older adults – The Bambui Study. *Rev Bras Psiquiatr.* 2012; 34:440-445.

RESUMO

OBJETIVO: Demonstrar que a presença do alelo *APOE* E4 está associada ao declínio cognitivo em idosos vivendo em comunidade. **MÉTODO:** Participaram do estudo 1408 residentes na cidade de Bambuí (MG) com 60 ou mais anos de idade. A variável dependente do estudo foi a função cognitiva, mensurada pelo Mini Exame do Estado Mental (MEEM). A variável de interesse do estudo foi o genótipo da apolipoproteína E (*APOE*). Para efeito de ajustamento na regressão logística foram consideradas como covariáveis o sexo, escolaridade, cor da pele, estado civil, sintomas depressivos, dosagem de triglicérides, HDL e pressão sistólica. **RESULTADOS:** A frequência alélica do gene *APOE* (E4, E3, E2) mostrou distribuição em equilíbrio de Hardy-Weinberg. Foi detectada uma forte associação entre a presença do alelo E4 e o comprometimento cognitivo quando em homozigose (OR: 3,1; IC 95%: 1,39–6,99) mesmo após ajustamento por todas as potenciais variáveis de confusão (OR:2,9; IC95%: 1,15–7,71). **CONCLUSÕES:** Os resultados mostraram que existe uma forte associação entre a presença do alelo E4 da *APOE* e a função cognitiva em idosos. Esta associação existiu somente entre indivíduos homozigotos (E4E4), indicando dependência da dose gênica no comprometimento cognitivo.

ABSTRACT

OBJECTIVES: To show that *APOE* E4 allele status is associated with the cognitive functioning of elderly people. **METHODS:** Participants (1408) for the Bambuí Cohort Study of Aging were selected based on results from both variables (*APOE* genotype and MMSE score). Gender, age, education, marital status, skin color, GHQ score and biological measures were used as confounding factors for adjusting the logistic regression. **RESULTS:** The population was in Hardy-Weinberg equilibrium, the *APOE* E4 allele frequency was 13.4%. The homozygosis for *APOE* E4 allele conferred increased risk for cognitive impairment (OR=3,1, CI 95%) compared to heterozygotes for E4 allele (OR=0,99, CI 95%) even when adjusted for age, sex, education, marital status, skin color, triglycerides, HDL, systolic pressure, GHQ (OR=2,9 CI 95%). No differences were noticed between the others covariates. **CONCLUSIONS:** *APOE* E4 allele was observed to have a dramatic effect on cognitive impairment, especially in homozygotes, which comprised about 2% of the population.

KEY WORDS: Cognitive performance, Apolipoprotein E, MMSE, Elderly.

INTRODUÇÃO

Os polimorfismos do gene da apolipoproteína E (APOE) são um dos mais importantes e bem pesquisados fatores genéticos de risco para a doença de Alzheimer (DA).¹ A ApoE é uma lipoproteína plasmática composta por 299 aminoácidos que desempenha sua principal função no metabolismo de lipídeos e está diretamente envolvida na formação de placas amiloides no cérebro. Dois polimorfismos na região codificadora do gene APOE formam três alelos, APOE E2, APOE E3 (o mais comum), e APOE E4, e três isoformas da proteína cada uma com propriedades diferentes. Resultados conjuntos de estudos de associação mostraram que portadores do alelo E4 do gene APOE têm um risco de 3 a 4 vezes maior de desenvolver a DA em comparação aos não portadores e, homocigotos para o alelo possuem um risco 10 a 12 vezes maior de DA.² Devido a essa associação, existe também um interesse no papel do alelo E4 no desempenho cognitivo de indivíduos saudáveis.³⁻⁵ Entretanto, os resultados desses estudos tem sido contraditórios, alguns mostrando um aumento do risco de declínio cognitivo em portadores e outros mostrando nenhuma associação.⁶⁻⁷ Os estudos realizados no Brasil têm focado, principalmente, na relação entre o gene APOE e o declínio cognitivo patológico (Alzheimer) em indivíduos que procuram atendimento clínico.⁸⁻¹¹ Somente um estudo populacional encontrado pesquisou a relação entre a função cognitiva e o gene APOE. Esse estudo mostrou a ausência de associação entre o alelo APOE E4 e o comprometimento cognitivo em uma população de idosos vivendo em comunidade.¹²

O objetivo desse estudo é investigar a relação entre a presença do alelo E4 do gene APOE e o desempenho cognitivo em uma população de idosos vivendo em comunidade. Serão considerados vários fatores de confusão, em potencial, que foram previamente descritos como relacionados com a função cognitiva.

MÉTODOS

Projeto Bambuí

A coorte de Bambuí foi utilizada como população de base para as análises feitas nesse estudo.¹³ É um projeto longitudinal populacional sobre saúde e envelhecimento de indivíduos de 60 anos ou mais, residentes na cidade de Bambuí, uma cidade de 15.000 habitantes, localizada em Minas Gerais, região sudeste do Brasil. Um censo completo foi realizado durante os meses de novembro e dezembro

de 1996 para a seleção dos participantes. Desde 1998 essa população tem sido acompanhada anualmente através do uso de entrevistas e exames selecionados. Toda a equipe de campo foi treinada e certificada antes de cada avaliação.

O Projeto Bambuí foi aprovado pelo Comitê de Ética da Fundação Oswaldo Cruz, no Rio de Janeiro em 1996 e, a presente análise foi aprovada pelo Comitê de Ética da Fundação Oswaldo Cruz em Belo Horizonte em 2006. Todos os participantes deram consentimento escrito para a participação.

População

Dos 1742 residentes com idade de 60 anos ou mais, 1606 (92,2%) foram entrevistados e 1496 (85,9%) foram examinados fisicamente (amostras de sangue, testes laboratoriais, medidas físicas e eletrocardiograma). Todos os participantes (n=1408) que tiveram ambos, função cognitiva medida pelo MEEM e amostras de sangue genotipadas para APOE, foram selecionados para esse estudo.

Medidas

Cognição

O questionário do estudo incluiu uma versão do MEEM adaptada para a população brasileira.¹⁴ O MEEM é um dos instrumentos mais utilizados na medida da função cognitiva, entretanto, sua aplicação na pesquisa é bem mais abrangente.¹⁵ Ele é usado para medir a função cognitiva em estudos clínicos e estudos epidemiológicos com indivíduos saudáveis. A versão validada no Brasil consta da modificação de algumas perguntas de acordo com a população alvo.¹⁶ No subitem Orientação as perguntas sobre estação do ano, edifício e andar, foram trocadas por período do dia, quarto e endereço. No subitem Registro e Recall as palavras usadas foram gato, árvore e violão. Para Atenção e Cálculo, a série de setes foi trocada por série de cinco e a palavra “world” foi trocada pela palavra “Maria” para soletrar invertido.

O escore do MEEM é influenciado pelo nível educacional¹⁷ e não existe um ponto de corte consensual validado para indivíduos com baixa escolaridade. Devido ao fato da população estudada ser de baixa escolaridade os pontos de corte foram baseados na distribuição em percentis dos escores. Nesse estudo utilizamos o ponto de corte de 21/22 pontos (em 30), correspondente ao quartil mais baixo.¹⁸

Apolipoproteína E

O DNA genômico foi extraído de amostras de sangue total usando Wizard[®] Genomic Purification System (Promega, Madison, WI, USA). Alíquotas de DNA foram amplificadas pela reação em cadeia da polimerase (PCR) e digeridas com enzima Hha I e a análise dos fragmentos de restrição (RFLP) foi feita como descrita previamente.¹⁹ As alíquotas de DNA foram submetidas a PCR com os seguintes primers: direto 5'TAA GCT TGG CAC GGC TGT CCA AGG A3' e reverso 5'ACA GAA TTC GCC CCG GCC TGG TAC AC3'. As condições da PCR foram: desnaturação 95°C por 5 minutos; 35 ciclos de 95°C por 1 minuto, 60°C por 1 minuto, e 70°C por 2 minutos; e extensão final a 72°C por 10 minutos. A análise dos RFLPs seguiu os seguintes padrões: E2E2 91 e 83pb; E3E3 91, 48 e 35 pb; E4E4 72, 48 e 35 pb. Cada um dos heterozigotos continham os fragmentos de ambos os alelos do APOE.

As seguintes variáveis foram também consideradas nesse estudo: idade na linha de base, sexo, estado civil, escolaridade, cor da pele, colesterol HDL, triglicérides, pressão sanguínea, e sintomas depressivos que foram avaliados pelo General Health Questionnaire-12 (GHQ-12) usando-se um ponto de corte de 4/5 definindo a sintomatologia como recomendado pra a população de Bambuí.²⁰ A escolaridade foi definida como tendo 4 anos ou menos de 4 anos de estudo. Os entrevistadores classificaram os indivíduos quanto à cor da pele baseados em fotografias representativas de indivíduos de cores diferentes (branco, mulato claro, mulato escuro e preto). Os níveis séricos de colesterol e triglicérides foram dosados após jejum recomendado de 12 horas com os kits comerciais (Boehringer Mannheim Corp., Ingelheim, Germany) em analisador automatizado (Eclipse Vitalab, Merck, Netherlands) como descrito anteriormente.¹³ Três medidas de pressão sistólica foram tomadas no braço direito com esfigmomanômetro de mercúrio. As medidas foram tomadas pela manhã, após descanso inicial de 5 minutos e, subsequentes medidas a intervalos de 2 minutos, e 30 minutos após ingestão de café ou cigarro. A pressão sanguínea foi calculada como a média aritmética da segunda e terceira medidas de acordo com os critérios do Seventh Joint National Committee. Os sintomas de distúrbios mentais comuns foram definidos pelo GHQ-12 com o ponto de corte 4/5.²⁰

Análise Estatística

As associações não ajustadas do genótipo da APOE com as características sócio demográficas, biomarcadores e sintomas de saúde mental foram mensuradas utilizando-se o χ^2 de Pearson ou ANOVA para avaliar a significância estatística das diferenças entre as variáveis categóricas e contínuas respectivamente. *Odds ratios* (ORs) não ajustados e ajustados foram estimados através de regressão logística avaliando a relação entre o genótipo APOE e o comprometimento cognitivo. A análise foi baseada em cinco modelos. Primeiramente foi calculada a associação bruta entre o escore do MEEM e o genótipo da APOE, em seguida o cálculo foi ajustado aditivamente por sexo, idade, escolaridade (modelo2); estado civil e cor da pele (modelo 3); HDL, triglicérides e pressão sistólica (modelo 4); e o escore do GHQ (modelo 5). Além disso, interações dos portadores de APOE E4 com sexo e cor da pele também foram testadas no modelo 5. Todas as análises foram feitas utilizando-se o software STATA.

RESULTADOS

Foram incluídos nessa análise 1408 participantes dos 1606 da coorte, na linha de base, que tiveram seu estado cognitivo mensurado e sangue genotipado para APOE (145 foram excluídos por não consentir na genotipagem e 53 por não responder ao MEEM). Quando comparados, os indivíduos incluídos na análise com aqueles excluídos não foram constatadas diferenças com respeito à idade ($69,0 \pm 7,1$ e $69,3 \pm 7,4$, respectivamente; $p = 0,14$), ou sexo (60,4% mulheres e 60% mulheres, respectivamente; $p = 0,81$).

As frequências alélicas e genótípicas da APOE dessa população foram demonstradas previamente.²¹ O alelo mais frequente foi o E3 (80%), seguido pelo alelo E4 (13,5%) e o alelo E2 (6,5%); essa distribuição é representativa da maioria das populações ocidentais. O genótipo E3E3 foi o mais comum (63,4%), seguido por E3E4 (21,9%), E2E3 (11,5%), E4E4 (1,8%), E2E4 (1,4%) e E2E2 (0,1%). A frequência alélica mostrou estar em equilíbrio de Hardy-Weinberg ($p \geq 0,05$).²¹

A Tabela 1 mostra as características da população relacionadas à presença do alelo E4 da APOE. A média do escore do MEEM foi de $24,4 \pm 4,7$. Os escores foram menores entre homozigotos para o alelo E4 quando comparados aos heterozigotos

E3E4 e E2E4. As outras características da população não mostraram diferença significativa entre os genótipos ($p \geq 0,05$).

Tabela 1: Características de base da população por genótipo APOE

CARACTERÍSTICAS	APOE4 NEGATIVO n=1054	APOE4 HETEROZIGOTO n=329	APOE4 HOMOZIGOTO n=25	valor p
MEEM (média/DP)	24,5 (4,7)	24,6 (4,6)	21,2 (4,9)	0,001
Sexo Feminino (%)	61,0	59,6	48,0	0,394
Idade (média/DP)	69,0 (7,0)	69,2 (7,3)	67,8 (7,0)	0,641
Escolaridade ≥ 4 anos (%)	36,0	32,8	24,0	0,287
Estado Civil (%)				0,766
1. Casado	49,7	51,6	50,0	
2. Solteiro	10,3	8,6	4,2	
3. Divorciado/Separado	5,6	3,8	4,2	
4. Viúvo	34,3	36,0	41,7	
Cor da pele (%)				0,053
1. Branco	59,7	62,9	48,0	
2. Moreno	34,9	30,7	32,0	
3. Mulato	3,3	3,6	8,0	
4. Negro	1,9	2,7	12,0	
Triglicérides (média/DP)	150,7 (102,3)	152,7 (95,2)	145,1 (74,8)	0,910
HDL (média/DP)	49,3 (14,9)	48,7 (15,7)	50,0 (16,1)	0,812
Pressão Sistólica (média/DP)	137,1 (23,0)	137,3 (20,7)	141,8 (28,6)	0,594
GHQ ≥ 5 (%)	38,6	35,4	33,3	0,555

A Tabela 2 mostra as estimativas de *odds ratio* ajustado e não ajustado para a associação entre portadores do alelo E4 e o comprometimento cognitivo. A homozigose para o alelo E4 foi significativamente associada ao menor escore do MEEM, e a associação foi mantida após o ajuste pela idade, sexo, escolaridade, estado civil, cor da pele e outros possíveis fatores de confusão (HDL, triglicérides, pressão sistólica e escore do GHQ) (OR = 2,98; IC 95% 1,15 – 7,71). A homozigose para E4 permaneceu associada mesmo quando os participantes abaixo do 5° percentil (ponto de corte 13/14) foram removidos da análise, minimizando a chance de mascarar os resultados com possíveis indivíduos com DA não diagnosticados.

Tabela 2: Associação da APOE com o comprometimento cognitivo

Alelo e4	Escore MEEM		OR (IC95%) não ajustado	Ajustado para idade, sexo, escolaridade	Ajustado para idade, sexo, escolaridade, estado civil, cor da pele	Ajustado para idade, sexo, escolaridade, estado civil, cor da pele, triglicérides, HDL, pressão sistólica	Ajustado para idade, sexo, escolaridade, estado civil, cor da pele, triglicérides, HDL, pressão sistólica, GHQ
	≥22	<22					
0	824	207	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
1	255	64	0,99 (0,73 – 1,36)	0,92 (0,65 – 1,28)	0,94 (0,65 – 1,34)	0,95 (0,66 – 1,37)	0,95 (0,66 – 1,38)
2	14	11	3,12 (1,39 – 6,99)	2,99 (1,22 – 7,32)	2,91 (1,13 – 7,50)	2,81 (1,09 – 7,28)	2,98 (1,15 – 7,71)

Embora interações entre sexo e cor da pele com portadores do alelo E4 da APOE tenha sido testada no último modelo, a heterogeneidade entre sexo ($p = 0,92$) ou entre cor de pele ($p = 0,31$) não foi significativa estatisticamente (dados não mostrados).

DISCUSSÃO

Esse estudo mostrou evidências epidemiológicas de que a homozigose para o alelo E4 da APOE está associada ao comprometimento cognitivo em uma população de idosos vivendo em comunidade, e que essa associação manteve-se após o controle por potenciais fatores de confusão.

Em nosso entender, esse é o primeiro estudo a avaliar a associação do alelo e4 da APOE com o estado cognitivo em uma coorte populacional no Brasil. As vantagens desse estudo são: (1) o uso da distribuição em percentis do escore do MEEM, na ausência de pontos de corte comparáveis na população brasileira; (2) o tamanho da população com alto índice de resposta; (3) o ajustamento dos cálculos por uma gama de variáveis incluindo, cor da pele, HDL e sintomas depressivos. A equivalência cultural do MEEM foi uma preocupação, entretanto, para sobrepor esse problema foi utilizado uma versão adaptada que funcionou bem para essa população.²³

Embora os estudos que investigam a associação dos portadores do APOE E4 e o estado cognitivo de idosos vivendo em comunidade sejam raros na América Latina, estudos em outros países sugerem que exista a associação entre a presença do alelo E4 e o desempenho cognitivo. Em uma meta-análise recente,²⁴ 38 estudos mostraram que a associação entre os heterozigotos para o APOE E4 não foi significativamente diferente com relação aos não portadores do alelo. Entretanto, os

homozigotos para o APOE E4 exibiram uma significativa piora no desempenho quando comparados aos não portadores; esses resultados foram confirmados em nosso estudo.

Os achados do nosso estudo são comparáveis aos de vários estudos que observaram um déficit aumentado no desempenho cognitivo de homozigotos para APOE E4. Yaffe e colaboradores²⁵ demonstraram em uma população de 1750 mulheres vivendo em comunidade com função cognitiva normal, idade igual ou superior a 65 anos, nos EUA, que após ajustamento para idade, escolaridade e depressão, a redução no escore do MEEM foi de 0% em não portadores do APOE E4, 1,9% em heterozigotos para o alelo e 3,7% para os homozigotos para o alelo. Em um estudo transversal com indivíduos com cognição normal (entre 30 e 70 anos de idade), Caselli e colaboradores²⁶ demonstraram um declínio de memória em 8 dos testes utilizados (inclusive o MEEM) nos homozigotos APOE e4. Mais ainda, nosso estudo avaliou uma população maior do que o único outro estudo brasileiro¹² que não encontrou associação entre o alelo E4 e o estado cognitivo.

É sabido que o alelo APOE e4 representa um fator de risco em várias populações e é considerado o mais importante fator de suscetibilidade ao desenvolvimento da DA. Portadores heterozigotos para esse alelo tem um risco aumentado de 3 a 4 vezes de se tornarem dementes com DA, e homozigotos APOE e4 têm um risco de 10 a 12 vezes maior de desenvolver DA.²⁷ Em um estudo escocês recente,²⁸ no seguimento de uma coorte os resultados indicaram que o genótipo da APOE está associado às mudanças cognitivas nos idosos, eles também sugeriram que a influência do genótipo esteja restrita a domínios específicos da cognição. Este estudo é consistente com nossos resultados mostrando uma significativa relação entre o genótipo APOE e o desempenho cognitivo.

Em conclusão, na população analisada, o comprometimento cognitivo está associado à homozigose para o alelo APOE e4, mas não com a heterozigose, sugerindo um efeito de dose gênica na cognição. Estudos futuros são necessários para avaliar o papel complexo dos marcadores genéticos como o gene APOE no desempenho cognitivo de idosos brasileiros. Os dados da análise longitudinal dessa população devem ajudar a elucidar nossos achados.

REFERÊNCIAS

1. Corder EH, Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel DE, Gaskell PC, Small GW, Roses AD, Haines JL, Pericak-Vance MA: Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science*, 1993; 5123:921–923.
2. Farrer LA, Cupples LA, Haines JL, Hyman BT, Kukull WA, Mayeux R, et al. Effects of age, sex, and ethnicity on the association between apolipoprotein E genotype and Alzheimer disease: a meta-analysis. *JAMA*, 1997; 278, 1349-1356.
3. Anstey K & Christensen H. Education, activity, health, blood pressure, and apolipoprotein E as predictors of cognitive change in old age: A review. *Gerontology*, 2000; 46: 163-177.
4. Lautenschlager NT, Flicker L, Vasikaran S, Leedman P, Almeida OP. Subjective memory complaints with and without objective memory impairment: relationship with risk factors for dementia. *Am J Geriatr Psychiatry*, 2005; 8:731-734.
5. Bretsky P, Guralnik JM, Launer L, Albert M & Seeman TE. The role of APOE ϵ 4 in longitudinal cognitive decline: MacArthur studies of successful aging. *Neurology*, 2003; 60:1077-1081.
6. Wilson RS, Bienias JL, Berry-Kravis E, Evans DA & Bennet DA. The apolipoprotein E ϵ 2 allele and decline in episodic memory. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 2002; 672-677.
7. Small BJ, Graves AB, McEvoy CL, Crawford FC, Mullan M, Mortimer JA. Is APOE4 ϵ 4 a risk factor for cognitive impairment in normal aging? *Neurology*, 2000; 54: 2082-2088.
8. Yip AG, Brayne C, Easton D, Rubinstein DC. Apolipoprotein E4 is only a weak predictor of dementia and cognitive decline in the general population. *J Med Genet*, 2002; 39:639-43.
9. Bahia VS, Kok F, Marie SN, Shinjo SO, Caramelli P, Nitrini R. Polymorphisms of APOE and LRP genes in Brazilian individual with Alzheimer disease. *Alzheimer Dis Assoc Disord*, 2008; 22(1):61-5.
10. Souza DR, de Godoy MR, Hotta J, Tajara EH, Brandão AC, Pinheiro Júnior S, Tognola WA, dos Santos JE. Association of apolipoprotein E polymorphism in later-onset Alzheimer's disease and vascular dementia in Brazilians. *Braz J Med Biol Res*, 2003; 36(7):919-23.

11. De-Andrade FM, Larrandaburu M, Callegari-Jacques SM, Gastaldo G, Hutz MH. Association of apolipoprotein E polymorphism with plasma lipids and Alzheimer's disease in a Southern Brazilian population. *Braz J Med Biol Res*, 2000; 33(5):529-37.
12. Almeida OP, Shimokomaki CM. Apolipoprotein E4 and Alzheimer's disease in São Paulo-Brazil. *Arq Neuropsiquiatr*, 1997; 55(2):1-7.
13. Garcia AN, Silva HA, Silva RC, Leal EMM, Rodrigues L, Silva VC, et al. APOE ϵ 4 polymorphism and cognitive deficit among the elderly population of Fernando de Noronha. *Arq Neuropsiquiatr*, 2008; 66(2-B): 298-302.
14. Cohort profile: the Bambuí (Brazil) Cohort Study of Ageing. Lima-Costa MF, Firmo JO, Uchoa E. *Int J Epidemiol*. 2011 Aug;40(4):862-7.
15. Seabra MLV, Concilio G, Villares JB, et al: Avaliação do teste "Mini-mental state" em voluntários e pacientes brasileiros. *Revista ABP-APL* 1990; 12:1–29
16. Folstein MF, Folstein S, McHugh PR: Mini-Mental State: a practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *J Psychiat Res* 1975; 12:189–198
17. Castro-Costa E, Fuzikawa C, Ferri CP, Uchoa E, Firmo JOA, Lima-Costa MF, et al. Dimensions underlying the Mini-Mental State Examination in a sample with low-education levels: the Bambuí Health and Aging Study. *Am J Geriatr Psychiatry* 2009; 17:863-72.
18. Crum RM, Anthony JC, Bassett SS, Folstein MF. Population-based norms for the Mini-Mental State Examination by age and education level. *JAMA*, 1993; 269:2386-2391.
19. Castro-Costa E, Fuzikawa C, Uchoa E, Firmo JOA, Lima-Costa MF. Norms for the Mini-Mental State Examination. Adjustments of the cut-off point in population-based studies (evidences from the Bambuí Health and Ageing Study). *Arq Neuropsiquiatr* 2008; 66(3-A):524-528
20. Hixson JE, Vernier DT. Restriction isotyping of human apolipoprotein E by gene amplification and cleavage with HhaI. *J Lipid Res* 1990; 31: 545-548.
21. Fuzikawa AK, Peixoto SV, Kaufer M, Moriguchi EH, Lima-Costa MF. Apolipoprotein E polymorphism distribution in an elderly Brazilian population: the Bambuí Health and Aging Study. *Braz J Med Biol Res*, 2007; 40(11): 1429-34.

22. Chobanian AV, Bakris GL, Black HR, Cushman WC, Green LA, Izzo JL Jr, et al. The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure: the JNC 7 report. *JAMA* 2003; 289: 2560-2572.
23. Costa, E., Barreto, S. M., Uchoa, E., Firmo, J. O. A., Lima-Costa, M.F. and Prince, M. Is the GDS-30 better than the GHQ-12 for screening depression in the elderly people in the community? The Bambui Health Aging Study (BHAS). *Int. Psychogeriatr.*, 2006, 18: 493–503.
24. Castro-Costa E, Fuzikawa C, Ferri CP, Uchôa E, Firmo JOA, Lima-Costa MF, et al. Dimensions underlying the Mini-Mental State Examination in a sample with low-education levels: the Bambui Health and Aging Study. *Am J Geriatr Psychiatry* 2009; 17:863-72.
25. Anderson TM, Sachdev PS, Brodaty H, Trollor JN, Andrews G. Effects of sociodemographic and health variables on Mini-Mental State Exam scores in older Australians. *Am J Geriatr Psychiatry*, 2007; 15:467-76.
26. Chui H, Zhang Q. Evaluation of dementia: a systematic study of the usefulness of the American Academy of Neurology's practice parameters. *Neurology* 1997; 49:925-935.
27. Small BJ, Rosnick CB, Fratiglioni L, Backman L. Apolipoprotein E and cognitive performance: A Meta-Analysis. *Psychology and Aging*, 2004; 19(4):592-600.
28. Yaffe K, Cauley J, Sands L & Browner W. Apolipoprotein E phenotype and cognitive decline in a prospective study of elderly community women. *Arch Neurol*, 1997; 54:1110-1114.
29. Caselli RJ, Reiman EM, Hentz JG, Osborne D, Alexander GE, & Boeve BF. A distinctive interaction between memory and chronic daytime somnolence in asymptomatic APOE e4 homozygotes. *Sleep*, 2002; 25; 447-453.
30. Garcia AN, Silva HA, Silva RC, Leal EMM, Rodrigues L, Silva VC, Dellalibera E, Freitas EM, Ataíde Jr, L, Muniz MTC. APOE-e4 polymorphism and cognitive deficit among the elderly population of Fernando de Noronha. *Arq Neuropsiquiatr*, 2008;66(2-B):298-302
31. Farrer LA, Cupples LA, Haines JL, Hyman BT, Kukull WA, Mayeux R, et al. Effects of age, sex, and ethnicity on the association between apolipoprotein E genotype and Alzheimer disease: a meta-analysis. *J Am Med Assoc*, 1997: 1349-56.

32. Wilson RS, Schneider JA, Barnes LL, Beckett LA, Aggarwal NT, Cochran EJ et al. The Apolipoprotein E e4 allele and decline in different cognitive systems during a 6-year period. *Arch Neurol*, 2002; 59, 1154-1160.
33. Rosen VM, Bergeson JL, Putnam K, Harwell A, Sunderland T. Working memory and apolipoprotein E: what's the connection? *Neuropsychologia*. 2002;40(13):2226-33.
34. Parasuraman R, Greenwood PM, Sunderland T. The apolipoprotein E gene, attention, and brain function. *Neuropsychology*. 2002 Apr;16(2):254-74.

4.2 ARTIGO 2

APOE E4 E AS DIMENSÕES DO MINI-EXAME DO ESTADO MENTAL EM UMA AMOSTRA COM BAIXA ESCOLARIDADE: PROJETO BAMBUÍ

Sandra R Quintino-Santos, Breno Satler Diniz, Josélia O A Firmo, Emilio Moryguchi, Maria Fernanda F Lima-Costa, Erico Castro-Costa

Submetido ao American Journal of Geriatrics Society em 25/02/2014

RESUMO

OBJETIVO: Avaliar a associação do alelo E4 do gene APOE com as dimensões medidas pelo Mini Exame do Estado Mental (MEEM). **MÉTODO:** Participaram do estudo 1408 residentes na cidade de Bambuí (MG) com 60 ou mais anos de idade. Coeficientes β não ajustados e ajustados foram estimados por regressão linear para a estimativa da relação entre o alelo APOE E4 e as dimensões do MEEM obtidas através da Análise da Principal Componente (PCA). Para efeito de ajustamento foram consideradas como covariáveis o sexo, escolaridade, cor da pele, estado civil, sintomas depressivos, dosagem de triglicérides, HDL e pressão sistólica. **RESULTADOS:** O escore do fator da dimensão concentração foi significativamente menor para não portadores do alelo enquanto que o escore do fator da dimensão memória foi significativamente menor para os portadores do alelo APOE E4. Houve uma associação estatística inversa da dimensão memória (β : -0,16; 95%CI: -0,27 a -0,04) com a presença do alelo APOE E4, principalmente com indivíduos heterozigotos (β : -0,15; 95%CI: -0,27 a -0,03). Houve também uma associação forte mas não estatisticamente significativa com os indivíduos homozigotos para o alelo APOE E4 (β : -0,30; 95%CI: -0,74 a 0,13). **CONCLUSÕES:** Nesta população de idosos brasileiros, o efeito do alelo APOE E4 demonstrou ser específico para o domínio memória do MEEM. Com utilização do escore dos fatores das dimensões do MEEM, obtidos através da PCA, demonstrou-se uma associação diferenciada entre o alelo APOE E4 e os domínios da cognição.

PALAVRAS CHAVE: Cognição, Memória, APOE, Envelhecimento.

ABSTRACT

OBJECTIVE: To analyze the association between E4 allele of APOE gene and the dimensions underlying the Mini Mental State Exam (MMSE). **METHODS:** Participants (1408) for the Bambuí Cohort Study of Aging were selected based on results from both variables (APOE genotype and MMSE score). Dimensions underlying the MMSE were obtained using Principal Component Analysis (PCA). Unadjusted and adjusted β coefficients were estimated by linear regression to assess the relation between APOE E4 carriers and dimensions underlying the MMSE. **RESULTS:** Factor score of concentration dimension was significantly lower for APOE E4 non-carriers while factor score of memory dimension was significantly lower for APOE E4 carriers. Only memory dimension was inversely statically associated (β : -0.16; 95%CI: -0.27 to -0.04) mainly with APOE E4 heterozygotes (β : -0.15; 95%CI: -0.27 to -0.03). Also, there was strong, but not statically, significant association between APOE E4 homozygotes (β : -0.30; 95%CI: -0.74 to 0.13). **CONCLUSIONS:** In this Brazilian elderly population, there was a strong effect of the APOE E4 allele only on the memory dimension underlying the MMSE. The use of the scores of dimensions underlying MMSE obtained through PCA shown that the E4 allele a specific association with the cognitive domains.

KEY WORDS: Cognition, Memory, APOE, Elderly.

INTRODUÇÃO

Vários genes têm sido associados ao comprometimento cognitivo em idosos. O mais importante e mais bem replicado deles é o gene APOE, que com seu alelo E4 afeta a função cognitiva levando ao comprometimento cognitivo e às doenças neurodegenerativas¹⁻³. Resultados de estudos de associação demonstram que indivíduos portadores do alelo APOE E4 possuem uma chance aumentada de 3 a 4 vezes de se tornarem comprometidos cognitivamente e, que indivíduos homocigotos para o mesmo têm um risco de 10 a 12 vezes maior de serem afetados⁴. Atualmente também existe um interesse no papel do alelo E4 do gene APOE como fator de risco de comprometimento cognitivo em indivíduos sem demência⁵. Resultados de uma meta-análise mostraram que indivíduos homocigotos APOE E4 têm um pior desempenho de cognição global, memória episódica e função executiva do que os não portadores, enquanto que os heterocigotos para o alelo não mostram diferença significativa dos não portadores⁶⁻⁷.

Com o propósito de avaliar a função cognitiva em estudos epidemiológicos a utilização de uma bateria de testes neuropsicológicos específicos para os diferentes domínios da cognição é dispendiosa e demorada, não justificando seu uso em uma população que em sua maioria não tenha sinais de comprometimento cognitivo. Um teste bem administrado para a função cognitiva global seria mais adequado, mais rápido e de mais fácil aplicação. Tais testes são informativos sobre o comprometimento cognitivo e podem gerar dados sobre as dimensões cognitivas em grandes estudos.

Um dos testes neuropsicológicos mais utilizado em estudos internacionais, o Mini Exame do Estado Mental (MEEM) mede a cognição global⁸, mas possui dimensões subjacentes com equivalência entre culturas distintas⁹. A maioria dos estudos tem investigado a associação entre o alelo APOE E4 e os domínios da cognição utilizando um conjunto de testes neuropsicológicos específicos¹⁰⁻¹⁵. Somente o estudo de Blasi e colaboradores (2009)¹⁶ mostrou uma associação do alelo APOE E4 com um pior desempenho na dimensão memória (“recall and registration”) medido pelo MEEM.

Nenhum estudo prévio avaliou a relação entre o genótipo APOE e as dimensões da cognição medidas pelo MEEM usando fatores gerados pela Análise da Componente

Principal (PCA). Também investigamos se a dose gênica para o alelo APOE E4 contribui na presença e magnitude do comprometimento cognitivo associado.

MÉTODOS

Estudo Bambuí (The Bambuí Cohort Study of Aging)

A análise desse estudo foi feita na linha de base da coorte de Bambuí (Bambuí Cohort Study of Aging)¹⁷. A coorte de Bambuí é um estudo longitudinal de base populacional sobre saúde e envelhecimento, com participantes de idade igual ou maior que 60 anos moradores da cidade de Bambuí, localizada no estado de Minas Gerais, sudeste do Brasil. Durante os meses de novembro e dezembro de 1996 foi realizado um censo completo dos 15.000 habitantes para a seleção dos participantes no projeto. Desde 1998 seguimentos anuais tem sido feitos nesta população através do uso de entrevistas e exames. A entrevista inicial na linha de base teve duração de 90 minutos e foi administrada por moradores locais com mais de 11 anos de escolaridade que foram intensivamente treinados nos procedimentos por uma psiquiatra qualificada.

O Estudo de Bambuí foi aprovado pelo Comitê de Ética da Fundação Oswaldo Cruz em 1996, na cidade do Rio de Janeiro, RJ, Brasil e, a presente análise foi aprovada pelo Comitê de Ética da Fundação Oswaldo Cruz em 2006, na cidade de Belo Horizonte, MG, Brasil. Todos os participantes deram seus consentimentos plenamente informados.

Participantes do estudo

Dos 1742 residentes com idade ≥ 60 anos, 1606 (92,2%) foram entrevistados e 1496 (85,9%) foram fisicamente examinados (amostras de sangue, testes laboratoriais, medidas antropométricas e eletrocardiograma). Todos os participantes que tiveram tanto seu estado cognitivo mensurado pelo MEEM, quanto sangue coletado para a genotipagem de DNA (1408) foram selecionados para o presente estudo.

Medidas

Função Cognitiva

O questionário desse estudo incluiu uma versão brasileira padronizada do MEEM⁸. Na validação do teste no Brasil algumas questões foram modificadas de acordo com

sua relevância na população alvo¹⁸. Na seção Orientação de Folstein, as questões sobre estação do ano, prédio e andar, foram trocadas por período do dia, quarto e endereço. Para Memória (“Registration and Recall”) as palavras utilizadas foram gato, árvore e violão. Para Atenção e Cálculo (“Attention”), uma série de cinco foi utilizada no lugar da série de setes, e a palavra Maria, mais comum na cultura brasileira¹⁸, substituiu a palavra “World”.

As dimensões do MEEM foram obtidas através da Análise da Componente Principal (PCA) não rotacionada, baseada numa matriz de correlação tetracórica seguido por uma rotação oblíqua (PROMAX) e um exame do gráfico Catell determinando uma solução de 5 fatores para as 30 questões do MEEM⁹. O primeiro fator (Concentração) foi consistente com os itens de atenção/cálculo (série de cinco) com carga alta (0,79-0,89). O segundo fator (Linguagem/Práxis) teve carga média para alguns dos itens de linguagem (“pode repetir: sem se, e ou mas”, “escreva a sentença completa”, “não consegue ler nem seguir instruções”, e “copiar o desenho de 2 polígonos”) e para itens de orientação (“que período do dia é esse?”). O terceiro fator (Orientação) teve carga média para ambos os itens tempo e local. Finalmente, o quarto fator (Atenção) e o quinto fator (Memória) tiveram carga alta dos itens de “recall” imediato e atrasado, respectivamente. Cinco itens “em que quarto estamos?”, “qual é a data?”, “pode nomear um relógio”, “pode nomear uma caneta”, e o comando em três passos, tiveram carga baixa em todos os cinco fatores.

Apolipoproteína E

Para a genotipagem de APOE, o DNA foi extraído de amostras de sangue usando Wizard[®] Genomic DNA Purification System (Promega, Madison, WI, USA). As amostras de DNA foram amplificadas pela reação em cadeia da polimerase (PCR), seguido de digestão com enzima Hha I e análise dos fragmentos de restrição (RFLP), como descrito previamente¹⁹. Os primers utilizados para a PCR foram: forward 5' TAA GCT TGG CAC GGC TGT CCA AGG A 3' e reverse 5' ACA GAA TTC GCC CCG GCC TGG TAC AC 3'. As condições da PCR foram: desnaturação a 95°C por 5 minutos, 35 ciclos de 95°C por 1 min., 60°C por 1 min., e 70°C por 2 min., para a extensão final 72°C por 10 minutos. A análise dos polimorfismos de restrição (RFLP) seguiu os seguintes padrões: E2E2, 91 e 83 pb; E3E3, 91, 48 e 35 pb; E4E4 72, 48 e 35 pb. Cada um dos heterozigotos continham ambos os grupos de fragmentos²⁰.

Covariáveis

As seguintes variáveis foram também consideradas nesse estudo: idade, sexo, estado civil, nível de escolaridade, cor da pele, colesterol HDL, triglicérides, pressão sanguínea sistólica e sintomas depressivos avaliados pelo General Health Questionnaire-12 (GHQ) com ponto de corte 4/5 como recomendado para a população de Bambuí²¹. O nível de escolaridade foi categorizado em 4 anos de estudo ou mais de 4 anos de estudo. Os entrevistadores classificaram a cor da pele dos participantes com base em fotografias representativas de diferentes tons (branco, mulato claro, mulato escuro, preto). Os níveis séricos de colesterol HDL e triglicérides foram medidos após 12 horas de jejum com kits específicos (Boehringer Mannheim Corp., Ingelheim, Germany) em um analisador automático (Eclipse Vitalab, Merck, Netherlands) como descrito previamente¹⁷. A pressão sanguínea foi medida por 3 vezes com esfigmomanômetro de mercúrio. A primeira medida foi tomada pela manhã após 5 minutos de descanso, seguida por medidas a intervalos de 2 minutos ou após 30 minutos do último cigarro ou ingestão de cafeína. Foi considerada para a pressão sanguínea a média aritmética da segunda e terceira aferição.

Análise Estatística

A associação não ajustada do alelo APOE E4 com os fatores sócio demográficos, biomarcadores e sintomas de saúde mental foram avaliados usando o teste do χ^2 de Pearson, ou ANOVA para avaliar a significância estatística das diferenças entre as variáveis categóricas e contínuas, respectivamente. Coeficientes β não ajustados e ajustados foram estimados por regressão linear para a estimativa da relação entre o alelo APOE E4 e as dimensões do MEEM. A análise foi baseada em cinco modelos: (modelo 1) associação bruta entre o escore dos fatores de cada dimensão com o genótipo APOE; (modelo 2) associação ajustada adicionalmente por idade e sexo; (modelo 3) associação ajustada adicionalmente por estado civil, escolaridade e cor da pele; (modelo 4) ajuste adicional por HDL, triglicérides e pressão sanguínea e, (modelo 5) ajuste pelo escore do GHQ. Interações com sexo e cor da pele foram também testadas no último modelo. Todas as análises foram realizadas no programa STATA.

RESULTADOS

Dos 1606 membros da coorte, foram incluídos nesse estudo aqueles (1408) que tiveram seu estado cognitivo avaliado pelo MEEM e sangue colhido para a genotipagem de APOE (145 foram excluídos por não fornecerem amostras de sangue e 53 por não responderem ao MEEM). Nenhuma diferença com respeito ao sexo (60,4% e 60% mulheres; $p=0,81$) e a idade ($69,0\pm 7,1$ e $69,3\pm 7,4$ anos; $p=0,14$) foi observada quando comparados os participantes incluídos com os excluídos.

As características da amostra estão sumarizadas na Tabela 1. A idade média dos participantes foi de 69 ($\pm 7,1$) anos, a maioria do sexo feminino e com baixa escolaridade predominante. A Tabela 1 sumariza também a análise não ajustada dos fatores associados com a presença do alelo APOE E4. O escore do fator da dimensão Concentração foi significativamente menor para não portadores do alelo enquanto que o escore do fator da dimensão memória foi significativamente menor para os portadores do alelo APOE E4.

Tabela 1: Características dos participantes por zigossidade para APOE E4

Características	Total n= 1.408	Não portadores n=1.054	Portadores n=344	Valor p
Dimensões do MEEM (escore do fator)(média/DP)				
1. Concentração	0,025(0,9)	-0,003(1,0)	0,112(0,9)	0,033
2. Orientação	0,050(0,9)	0,053(0,9)	0,040(0,9)	0,836
3. Linguagem/Praxis	0,026(0,9)	0,024(0,9)	0,033(1,0)	0,445
4. Atenção	0,190(0,9)	0,005(0,9)	0,061(0,7)	0,176
5. Memória	0,026(0,9)	0,060(0,9)	-0,0078(1,0)	0,030
Sexo(Feminino) (%)	60,4	61,0	58,8	0,454
Idade (média/DP)	69,0(7,1)	69,0 (7,0)	69,2 (7,3)	0,821
Escolaridade \geq 4 anos (%)	35,1	36,0	32,2	0,192
Estado civil (%)				0,386
1. Casado	50,2	49,7	51,5	
2. Solteiro	9,8	10,3	8,3	
3. Divorciado	5,2	5,6	3,8	
4. Viúvo	34,8	34,3	36,4	
Cor da pele (%)				0,258
1. Branco	60,3	59,8	61,8	
2. Mulato claro	33,9	34,9	30,8	
3. Mulato escuro	3,5	3,3	3,9	
4. Negro	2,3	2,0	3,4	
Triglicérides (média/DP)	151,1(100,2)	150,7 (102,3)	152,2 (93,2)	0,407
HDL (média/DP)	49,2(15,1)	49,3 (14,9)	48,8 (15,7)	0,612
Pressão sanguínea sistólica (média/DP)	137,3(22,6)	137,1 (23,0)	137,6 (21,3)	0,359
GHQ escore \geq 5 (%)	37,7	38,6	35,3	0,287

Na Tabela 2 observa-se uma associação estatística inversa da dimensão memória (β : -0.16; 95%CI: -0.27 a -0.04) com a presença do alelo APOE E4 no modelo final (5). Não houve associação entre a presença do alelo com as outras dimensões.

Na Tabela 3, a dimensão memória encontra-se inversamente associada com os heterozigotos para o alelo APOE E4 (β : -0.15; 95%CI: -0.27 a -0.03).

Tabela 2: Análise da associação entre portadores e não portadores do alelo APOE E4 e as dimensões do MEEEM (regressão linear ajustada e não ajustada)

APOE E4 (portadores x não portadores), coeficiente β (95% CI)		Modelo 3			Modelo 4		Modelo 5	
Dimensões MEEEM	Modelo 1	Modelo 2	Modelo 3	Modelo 4	Modelo 5	Modelo 4	Modelo 5	Modelo 5
Concentração	0.11(-0.008 a 0.239) t=1.83; p=0.068	0.12(-0.001 a 0.244) t=1.94; p=0.052	0.11(-0.003 a 0.231) t=1.91; p=0.057	0.10(-0.007 a 0.227) t=1.84; p=0.066	0.10(-0.008 a 0.227) t=1.82; p=0.069			
Orientação	-0.12(-0.13 a 0.10) t=-0.21; p=0.837	-0.009(-0.12 a 0.10) t=-0.16; p=0.871	0.006(-0.09 a 0.11) t=0.13; p=0.900	0.005(-0.98 a 0.11) t=0.10; p=0.923	0.003(-0.10 a 0.10) t=0.06; p=0.951			
Linguagem/Praxis	0.008(-0.11 a 0.13) t=0.14; p=0.892	0.02(-0.09 a 0.14) t=0.41; p=0.681	0.05(-0.05 a 0.15) t=0.92; p=0.359	0.04(-0.05 a 0.15) t=0.87; p=0.382	0.04(-0.06 a 0.14) t=0.79; p=0.431			
Atenção	0.05(-0.06 a 0.17) t=0.93; p=0.353	0.06(-0.05 a 0.17) t=1.02; p=0.307	0.05(-0.05 a 0.17) t=1.02; p=0.308	0.05(-0.05 a 0.17) t=1.03; p=0.303	0.05(-0.05 a 0.17) t=0.97; p=0.331			
Memória	-0.13(-0.26 a -0.01) t=-2.16; p=0.031	-0.12(-0.25 a -0.006) t=-2.06; p=0.040	-0.16(-0.27 a -0.04) t=-2.68; p=0.008	-0.15(-0.27 a -0.4) t=-2.63; p=0.009	-0.16(-0.27 a -0.04) t=-2.68; p=0.007			

Modelo 1: não ajustado; Modelo 2: ajustado por idade e sexo; Modelo 3: ajustado por idade, sexo, escolaridade, estado civil e cor da pele; Modelo 4: ajustado por idade, sexo, escolaridade, estado civil, cor da pele, triglicérides, HDL, pressão sanguínea; Modelo 5: ajustado por idade, sexo, escolaridade, estado civil, cor da pele, triglicérides, HDL, pressão sanguínea; escore GHO; p<0.05

Tabela 3: Análise da associação entre a dose gênica APOE E4 e os domínios memória e concentração do MEEEM (regressão linear ajustada e não ajustada)

APOE E4		Modelo 2		Modelo 3		Modelo 4		Modelo 5	
Dimensões do MEEEM	Modelo 1	Modelo 2	Modelo 3	Modelo 4	Modelo 5	Modelo 4	Modelo 5	Modelo 5	Modelo 5
Concentração	1 0.12(-0.007 a 0.24) t=1.85; p=0.065	0.12(0.003 a 0.25) t=1.97; p=0.049	0.11(-0.003 a 0.23) t=1.90; p=0.057	0.11(-0.007 a 0.23) t=1.84; p=0.066	0.11(-0.009 a 0.23) t=1.81; p=0.070				
	2 0.05(-0.40 a 0.51) t=0.22; p=0.825	0.05(-0.40 a 0.50) t=0.22; p=0.826	0.07(-0.35 a 0.51) t=0.34; p=0.734	0.06(-0.36 a 0.50) t=0.30; p=0.762	0.07(-0.35 a 0.51) t=0.35; p=0.726				
Memória	1 -0.13(-0.25 a -0.002) t=-2.00; p=0.046	-0.11(-0.24 a 0.006) t=-1.87; p=0.062	-0.15(-0.27 a -0.03) t=-2.46; p=0.014	-0.14(-0.27 a -0.02) t=-2.42; p=0.016	-0.15(-0.27 a -0.03) t=-2.48; p=0.013				
	2 -0.27(-0.74 a 0.19) t=-1.15; p=0.249	-0.28(-0.76 a 0.17) t=-1.24; p=0.216	-0.32(-0.76 a 0.11) t=-1.47; p=0.143	-0.32(-0.75 a 0.11) t=-1.45; p=0.148	-0.30(-0.74 a 0.13) t=-1.37; p=0.171				

Modelo 1: não ajustado; Modelo 2: ajustado por idade e sexo; Modelo 3: ajustado por idade, sexo, escolaridade, estado civil e cor da pele; Modelo 4: ajustado por idade, sexo, escolaridade, estado civil, cor da pele, triglicérides, HDL, pressão sanguínea; Modelo 5: ajustado por idade, sexo, escolaridade, estado civil, cor da pele, triglicérides, HDL, pressão sanguínea; escore GHO; p<0.05.

DISCUSSÃO

Esse estudo descreve o que acreditamos ser a primeira investigação da associação entre os fatores dos escores das dimensões do MEEM obtidos pela PCA e a presença do alelo E4 do gene APOE em idosos vivendo em comunidade, levando em consideração uma gama de potenciais fatores de confusão. Na população de Bambuí estudada, somente a dimensão Memória do MEEM foi inversamente associada à presença do alelo APOE E4 em indivíduos heterozigotos.

As vantagens desse estudo incluem: (1) o uso das dimensões cognitivas de um teste de cognição global em um grande estudo epidemiológico; (2) análise feita a partir dos fatores dos escores do teste, em vez da soma dos subitens; (3) medidas da associação para heterozigotos e homozigotos para o alelo APOE E4 e finalmente (4) utilização de uma versão do MEEM validada para a população brasileira.

Entretanto existem algumas limitações: primeiro, as dimensões do MEEM não incluem todos os domínios da cognição. Testes neuropsicológicos validados para dimensões específicas seriam desejáveis, embora a incorporação destes num grande estudo epidemiológico de comunidades envolva desafios logísticos e testes para a função cognitiva global sejam mais utilizados. Segundo, o pequeno número de participantes homozigotos para o alelo APOE E4 (25 participantes; 1,8%), problema que é frequentemente demonstrado mesmo em amostras de meta-análises^{6,7}. Por fim, o estudo foi transversal, não permitindo definir a causalidade das relações encontradas.

A presença do alelo APOE E4 foi associada a um pior desempenho em testes de função cognitiva global, memória episódica e função executiva^{6,7}. O impacto do alelo E4 no domínio memória episódica em idosos não dementes parece ser maior e mais consistente em estudos longitudinais^{12,15,23-26}, quando comparados aos estudos sobre a função executiva^{27,28}. Estudos anteriores mostraram diferenças metodológicas na demonstração da associação do alelo com o domínio memória episódica apesar de não haver diferenças na interpretação dos dados^{10-16,29}.

Em todos os estudos os participantes foram avaliados durante um exame neurológico^{10-16,23,24}. A memória episódica foi testada utilizando baterias de testes neuropsicológicos específicos, compostas por diversos instrumentos. A exceção foi no estudo italiano de

Blasi e colaboradores¹⁶ que avaliou a memória por 2 testes específicos e pela somatória dos escores dos subitens do exame de cognição global. Outras diferenças metodológicas entre os estudos incluem a diferença no tamanho das amostras, a classificação dos participantes (voluntários sadios, indivíduos com histórico de familiares com DA, idosos negros, idosos sem demência, indivíduos com histórico de doenças vasculares ou sob risco devido a hipertensão, uso de cigarros e diabetes, pacientes em atenção primária), e também a variação das faixas etárias (acima de 50 anos, acima de 65 anos, adultos jovens ou distribuição estratificada)^{6,7}.

Os resultados de Bambuí são comparáveis, em parte, somente com os achados do estudo de Blasi e colaboradores (2009)¹⁶, no qual a memória episódica foi avaliada como resultado das mesmas medidas (dimensões do MEEM), e por testes neuropsicológicos aplicados em idosos saudáveis vivendo em comunidade. Em ambos os estudos os itens de “recall” foram associados com o alelo APOE E4. Entretanto os itens de “registration” foram associados ao alelo no estudo italiano, mas não no presente estudo. Uma explicação possível seria a diferença na estimativa dos escores das dimensões nos dois estudos. No estudo presente as dimensões foram analisadas pela PCA e no estudo italiano as dimensões foram agrupadas em subitens. Além disso, a diferença entre os participantes dos dois estudos podem contribuir para as variações achadas. Os participantes do nosso estudo têm uma menor escolaridade e nível socioeconômico pior do que os idosos italianos. Os idosos de Bambuí foram entrevistados em casa ao contrário dos italianos que foram entrevistados em clínicas, o que pode contribuir para a redução da atenção nos nossos participantes.

A comparação com outros estudos é limitada pelo fato de terem sido utilizados diferentes instrumentos de avaliação^{10-16,23-26,29}. Todos os outros estudos utilizaram uma bateria de testes neuropsicológicos, que incluíam testes específicos para a memória episódica durante o exame clínico, entretanto, a configuração e a duração dos testes variaram enormemente entre os estudos.

Implicações dos resultados do estudo

Nesta população de idosos brasileiros, as dimensões sob o MEEM puderam avaliar a associação entre o alelo APOE E4 e a memória episódica, frequentemente mensurada

por vários testes neuropsicológicos em estudos clínicos. Medidas específicas para os diferentes domínios da cognição são raras em epidemiologia geriátrica. A utilização das dimensões dos testes de cognição global torna possível esta análise. Muitos estudos epidemiológicos continuam focando suas investigações em testes de cognição global como uma escala unidimensional. Portanto, nós propomos a utilização da análise das dimensões sob os testes de cognição global como uma alternativa, na impossibilidade de uma bateria de testes neuropsicológicos específicos em grandes estudos epidemiológicos. Futuros estudos nessa área são necessários para investigar se esse resultado pode incrementar a análise da função cognitiva em estudos epidemiológicos.

REFERÊNCIAS

1. Corder EH, Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel DE, Gaskell PC, Small GW, Roses AD, Haines JL, Pericak-Vance MA: Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science*, 1993; 5123:921–923.
2. Dupuy AM, Mas E, Ritchie K, Descomps B, Badiou S, Cristol JP, et al. The relationship between apolipoprotein E4 and lipid metabolism is impaired in Alzheimer's disease. *Gerontology*, 2001; 47: 213-218.
3. Poirier J, Davignon J, Bouthillier D, Kogan S, Bertrand P, & Gauthier S. Apolipoprotein E polymorphism and Alzheimer's disease. *Lancet*, 342, 697–699.
4. Farrer LA, Cupples LA, Haines JL, Hyman BT, Kukull WA, Mayeux R, et al. Effects of age, sex, and ethnicity on the association between apolipoprotein E genotype and Alzheimer disease: a meta-analysis. *JAMA*, 1997; 278, 1349-1356
5. Anstey K & Christensen H. Education, activity, health, blood pressure, and apolipoprotein E as predictors of cognitive change in old age: A review. *Gerontology*, 2000; 46: 163-177.
6. Small BJ, Rosnick CB, Fratiglioni L, Backman L. Apolipoprotein E and cognitive performance: A Meta-Analysis. *Psychology and Aging*, 2004; 19(4): 592-600.
7. Wisdom NM, Callahan JL, Hawkins KA: 2011. The effects of apolipoprotein E on non-impaired cognitive functioning: a meta-analysis. *Neurobiol. Aging*, 2011; 32: 63-74.
8. Folstein MF, Folstein S, MCHugh PR: Mini-Mental State: a practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *J Psychiat Res* 1975; 12:189–198.
9. Castro-Costa E, Fuzikawa C, Ferri CP, Uchôa E, Firmo JOA, Lima-Costa MF, et al. Dimensions underlying the Mini-Mental State Examination in a sample with low-education levels: the Bambui Health and Aging Study. *Am J Geriatr Psychiatry* 2009; 17:863-72.
10. Chen JG, Edwards CL, Vidyarthi S, Tabrizi S, et al. Learning and recall in subjects at genetic risk for Alzheimer's Disease. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci*, 2002; 14: 58-63.
11. Caselli RJ, Reiman EM, Locke DEC, Hutton ML, et al. Cognitive domain decline in healthy apolipoprotein E e4 homozygotes before the diagnosis of mild cognitive impairment. *Arch Neurol*, 2007; 64(9):1306-1311.

12. Packard CJ, Westendorp GJ, Stott DJ, Caslake MJ, et al. Association between Apolipoprotein E4 and cognitive decline in elderly adults. *J AM Geriatr Soc*, 2007; 1777-1785.
13. Wehling E, Lundervold A, Standnes B, Gjerstard L, Reinvang I. Apoe status and its association to learning and memory performance in middle aged and older Norwegians seeking assessment for memory deficits. *Behavioral and Brain Functions*, 2007: 57.
14. Nilsson LG, Backman L, Nyberg L, Adolfsson, Small BJ. The influence of ApoE status on Episodic and Semantic Memory data from a population based study. *Neuropsychology*, 2006; 20: 645-657.
15. Barnes LL, Arvanitakis Z, Yu L, Kelly J, et al. Apolipoprotein E and changes in episodic memory in Blacks and Whites. *Neuroepidemiology*, 2013; 40:211-219.
16. Blasi S, Montesanto A, Martino C, Dato S, et al. ApoE polymorphism affects episodic memory among non demented elderly subjects. *Experimental Gerontology*, 2009; 44:224-227.
17. Lima-Costa MF, Firmo JO, Uchoa E. Cohort profile: the Bambui (Brazil) Cohort Study of Ageing. *Int J Epidemiol*. 2011 Aug; 40(4):862-7.
18. Seabra MLV, Concilio G, Villares JB, et al: Avaliação do teste “Mini-mental state” em voluntários e pacientes brasileiros. *Revista ABP-APL* 1990; 12:1–29
19. Fuzikawa AK, Peixoto SV, Kaufer M, Moriguchi EH, Lima-Costa MF. Apolipoprotein E polymorphism distribution in an elderly Brazilian population: the Bambuí Health and Aging Study. *Braz J Med Biol Res*, 2007; 40(11): 1429-34.
20. Hixson JE, Vernier DT. Restriction isotyping of human apolipoprotein E by gene amplification and cleavage with HhaI. *J Lipid Res*. 1990; 31:545-8.
21. Costa E, Barreto SM, Uchoa E, Firmo, JOA, Lima-Costa, MF and Prince M. Is the GDS-30 better than the GHQ-12 for screening depression in the elderly people in the community? The Bambui Health Aging Study (BHAS). *Int. Psychogeriatr.*, 2006, 18: 493–503.
22. Chobanian AV, Bakris GL, Black HR, Cushman WC, Green LA, Izzo JL Jr, et al. The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure: the JNC 7 report. *JAMA* 2003; 289: 2560-2572.
23. Wilson RS, Schneider JA, Barnes LL, et al. The apolipoprotein E epsilon 4 allele and decline in different cognitive systems during a 6-year period. *Arch Neurol*, 2002; 59:1154-1160.

24. Bretsky O, Guralnik JM, Launer L, Albert M, Seeman TE, 2003. The role of APOE-epsilon4, of APOE-epsilon4 in longitudinal cognitive decline: MacArthur studies of Successful Aging. *Neurology*, 2003; 60, 1077-1081.
25. Schiepers OJ, Harris SE, Gow AJ, Pattie A, Brett, CE, Starr, JM, Deary IJ. APOE E4 status predicts age-related cognitive decline in the ninth decade: longitudinal follow-up of the Lothian Birth Cohort 1921. *Mol. Psychiatry*, 2011; 17, 315-324.
26. Praetorius M, Thorvaldsson V, Hassing LB, Johansson B. Substantial effects of apolipoprotein E e4 on memory decline in very old age: longitudinal findings from a population-based sample. *Neurobiology of Ageing*, 2013; 2734-2739.
27. Helkala EL, Koivisto K, Hanninen T, Vanhnanen M, et al. The association of apolipoprotein E polymorphism with memory: A population-based study. *Neuroscience Letters*, 1995; 191:141-144.
28. Rosen VM, Bergeson K, Putnam K, Harwell A, et al. Working memory and apolipoprotein E: What's the connection? *Neuropsychologia*, 2002; 2226-2233.
29. Bondi MW, Salmon DP, Monsch AU, Galasko D, et al. Episodic memory changes are associated with the ApoE e4 in nondemented older adults. *Neurology*, 1995; 45:2203-2206.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O comprometimento cognitivo, por ser comum no processo de envelhecimento, se tornou, atualmente, um problema de saúde pública. O comprometimento cognitivo no idoso demanda uma avaliação criteriosa e rápida para que se possa prover uma melhor qualidade de vida a todos os envolvidos. Os estudos sobre este assunto envolvendo idosos vivendo em comunidade são raros no país e os resultados obtidos sobre a distribuição do comprometimento cognitivo e a associação com fatores que influenciam no seu desenvolvimento nos idosos de Bambuí, demonstram a necessidade de um melhor entendimento das disfunções cognitivas que possa ser aplicado à população brasileira em geral. Os artigos incluídos nesse volume apresentam a análise dos dados obtidos na linha de base (1997) do Projeto Bambuí. Pelo nosso conhecimento, este foi o primeiro estudo a investigar a associação entre o alelo E4 do gene APOE e as dimensões do MEEM geradas pela análise da principal componente (PCA). Esse é também, o primeiro grande estudo brasileiro de base populacional que investigou a associação entre o alelo APOE E4 com o comprometimento cognitivo em idosos vivendo em comunidade.

Os resultados do primeiro artigo demonstram que o alelo E4 do gene APOE quando em homozigose está significativamente associado com o comprometimento cognitivo. Estes achados são diferentes do estudo brasileiro anterior, mas confirmam os resultados da maioria dos estudos internacionais.

O segundo artigo demonstrou que somente a heterozigose para o alelo E4 está estatisticamente associada com o comprometimento cognitivo. Mas, apesar da homozigose não estar associada com o comprometimento cognitivo, também se observa um efeito de dose gênica na relação. Esses resultados reforçam a associação do alelo APOE E4 com a dimensão memória episódica, achados através de uma bateria de testes neuropsicológicos específicos para essa dimensão, mesmo quando utilizada uma escala de rastreamento como o MEEM. A partir desse resultado, a análise das dimensões do MEEM passa a ser uma alternativa na ausência do emprego de uma bateria de testes neuropsicológicos específicos tanto nos estudos epidemiológicos quanto na realidade da prática clínica.

Ao longo dos dois artigos houve uma preocupação metodológica em minimizar as limitações do uso de uma escala de rastreamento como o MEEM para a detecção do comprometimento cognitivo e a generalização dos resultados. Para isso, empregou-se a versão brasileira validada do MEEM com o ponto de corte baseado na distribuição em percentis, já que não existem pontos de corte comparáveis na população brasileira. Além disso, a análise dos dados de um grande estudo de base populacional, com alta taxa de resposta de idosos de uma população não isolada e com características sócio-demográficas muito semelhantes as da população brasileira, foi feita ajustando-se as associações por um número muito grande de potenciais fatores e confusão. Por fim, as dimensões do MEEM foram geradas pela PCA a partir de uma matriz tetracórica que reduz a presença de vieses para a interpretação dos resultados encontrados.

Algumas limitações ainda se encontram presentes no estudo: (1) as dimensões do MEEM não cobrem todos os domínios descritos para a função cognitiva; (2) um pequeno número de participantes homocigotos para o alelo E4 do gene APOE; (3) sendo um estudo seccional não se pode distinguir uma relação de causa e efeito em todas as relações encontradas.

Concluindo, este estudo demonstrou a forte associação do alelo E4 do gene APOE com o comprometimento cognitivo, mais especificamente com a dimensão da memória episódica, mesmo com o emprego de uma escala de rastreamento como o MEEM na população idosa de Bambuí. O uso de baterias neuropsicológicas específicas para os diferentes domínios da cognição é o mais desejado nos estudos epidemiológicos, no entanto, o longo tempo gasto para sua aplicação, a necessidade de profissionais altamente qualificados (médicos ou neuropsicólogos), e o grande número de participantes inviabilizam a sua aplicação. Com isso, o emprego das dimensões específicas do MEEM pode ser uma alternativa para suprir essa limitação nos estudos epidemiológicos.

6 ANEXOS

6.1 Artigo publicado



ORIGINAL ARTICLE

Homozygosity for the APOE E4 allele is solely associated with lower cognitive performance in Brazilian community-dwelling older adults - The Bambuí Study

Sandra Regina Quintino-Santos,^{1,2,3} Maria Fernanda Lima-Costa,^{1,2} Elizabeth Uchoa,^{1,2} Josélia Oliveira de Araujo Firmo,^{1,2} Emilio Hideyuki Moriguchi,⁴ Érico de Castro-Costa,^{1,2,5}

¹Programa de pós-graduação em Ciências da Saúde - Laboratório de Epidemiologia e Antropologia Médica (LEAM), Centro de Pesquisa Rene Rachou (CPqRR), Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ)

²Núcleo de Estudos em Saúde Pública e Envelhecimento (NESPE), Fundação Oswaldo Cruz,

Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil

³Faculdade de Saúde e Ecologia Humana, Vespasiano, MG, Brazil

⁴Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Universidade do Vale dos Sinos,

Hospital Moinhos de Vento de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil

⁵King's College London, Institute of Psychiatry, Health Service and Population Research, Section of Epidemiology, U.K.

Submitted on April 3, 2012; accepted on June 7, 2012

DESCRIPTORS:

Cognitive Performance;
Apolipoprotein E;
MMSE;
Elderly.

Abstract

Objective: To investigate if APOE E4 allelic status is associated with the cognitive functioning of elderly individuals. **Methods:** Participants (n = 1,408) from the Bambuí Cohort Study of Aging were selected based on the results from both variables (APOE genotype and MMSE score). Gender, age, education, marital status, skin color, GHQ score and biological measures were used as confounding factors for adjusting the logistic regression. **Results:** The population was in Hardy-Weinberg equilibrium, and the APOE E4 allele frequency was 13.4%. APOE E4 allele homozygosity conferred a superior odds ratio (OR) for cognitive impairment (OR = 3.1) compared to E4 allele heterozygosity (OR = 0.99) even when adjusted for age, sex, education, marital status, skin color, triglycerides, HDL, systolic pressure, and GHQ (OR = 2.9). No differences were observed between the other covariates. **Conclusions:** The APOE E4 allele was observed to have a dramatic effect on cognitive impairment, especially in homozygotes, which comprised approximately 2% of the population.

Corresponding author: S.R. Quintino-Santos. Núcleo de Estudos em Saúde Pública e Envelhecimento, Fundação Oswaldo Cruz

Universidade Federal de Minas Gerais. Av. Augusto de Lima, 1715, 6o andar, Belo Horizonte, MG 30130-002, Brazil.

E-mail: sandraquintino@cpqrr.fiocruz.br

1516-4446 - ©2012 Elsevier Editora Ltda. All rights reserved.

doi: 10.1016/j.rbp.2012.06.005

DESCRITORES:

Desempenho Cognitivo;
Apolipoproteína E;
MEEM;
Idoso.

Homozigose para o alelo E4 do gene APOE está associada à função cognitiva de idosos vivendo em comunidade - Projeto Bambuí**Resumo**

Objetivo: Demonstrar que a presença do alelo APOE E4 está associada ao declínio cognitivo em idosos vivendo em comunidade. **Método:** Participaram do estudo 1408 residentes na cidade de Bambuí (MG) com 60 ou mais anos de idade. A variável dependente do estudo foi a função cognitiva, mensurada pelo Mini Exame do Estado Mental (MEEM). A variável de interesse do estudo foi o genótipo da apolipoproteína E (APOE). Para efeito de ajustamento na regressão logística foram consideradas como covariáveis o sexo, escolaridade, cor da pele, estado civil, sintomas depressivos, dosagem de triglicérides, HDL e pressão sistólica. **Resultados:** A frequência alélica do gene APOE (E4, E3, E2) mostrou distribuição em equilíbrio de Hardy-Weinberg. Foi detectada uma forte associação entre a presença do alelo E4 e o comprometimento cognitivo quando em homozigose (OR: 3,1; IC 95%: 1,39-6,99) mesmo após ajustamento por todas as potenciais variáveis de confusão (OR: 2,9; IC95%: 1,15-7,71). **Conclusões:** Os resultados mostraram que existe uma forte associação entre a presença do alelo E4 da APOE e a função cognitiva em idosos. Esta associação existiu somente entre indivíduos homozigotos (E4E4), indicando dependência da dose gênica no comprometimento cognitivo.

Introduction

Polymorphisms of the apolipoprotein E gene (*APOE*) are one of the most important and well-replicated genetic risk factors for Alzheimer's disease (AD).¹ ApoE is a 299 amino acid plasma glycoprotein that plays a major role in lipid metabolism and is directly involved in amyloid plaque formation in the human brain. Two polymorphisms in the *APOE* coding region result in three alleles, *APOE* E2, *APOE* E3 (the most common allele) and *APOE* E4, and three major isoforms of the protein, each having different properties. Pooled results from association studies demonstrated that *APOE* E4 carriers have a 3- to 4-fold increased risk of developing AD, in contrast to the 10- to 12-fold increase that is observed for *APOE* E4 homozygotes.² There is also currently interest in the role of *APOE* E4 as a risk factor for cognitive performance in cognitively intact subjects.³⁻⁵ However, the results of these studies are contradictory; some show an increased risk for cognitive decline in association with the allele status, and some show no association.^{6,7} Brazilian studies have focused primarily on the relationship between the *APOE* gene and pathological cognitive decline (i.e., Alzheimer's disease) in individuals who were attended at health-service locations.⁸⁻¹¹ Only one previous community-based study has examined the relationship between *APOE* E4 and cognitive function. This study demonstrated a lack of association between the *APOE* E4 allele and cognitive impairment in cognitively intact, community-dwelling elderly individuals.¹²

The current study aims to investigate the relationship between the presence of the *APOE* E4 allele and cognitive performance in a large, community-based sample of Brazilian elderly individuals. The study will consider several potential confounding factors that were previously described to be related with cognitive impairment.

Methods*The Bambuí Cohort Study of Aging*

The analysis presented herein was performed using data from the Bambuí Cohort Study of Aging¹³ as a baseline. The Bambuí Cohort Study is a longitudinal, population-based study on the health and aging of participants aged at least 60 years from Bambuí, a town of 15,000 inhabitants in Minas Gerais State, Southeastern Brazil. A complete census was performed during November and December 1996 to choose the participants. Since 1998, annual follow-ups have been performed in this population by utilizing interviews and selected exams. The fieldwork staff members were trained and certified before each examination.

The Bambuí Cohort Study was approved by the Ethics Committee of the Oswaldo Cruz Foundation in Rio de Janeiro, Brazil in 1996, and the present investigation was approved by the Ethics Committee of the Oswaldo Cruz Foundation in Belo Horizonte, Brazil in 2006. All of the participants provided full-informed written consent.

Study participants

Of the 1,742 residents aged 60 years or more, 1606 (92.2%) were interviewed and 1496 (85.9%) were physically examined (blood sample, laboratory tests, physical measurement and electrocardiogram) according to the cohort study base-lines. All of the participants (N = 1,408) who had either a cognitive status measured by Mini-Mental State Exam (MMSE) or blood collected for *APOE* genotyping were selected for inclusion in the present study.

*Measures**Cognitive status*

The study questionnaire includes a standard Brazilian version of the MMSE.¹⁴ MMSE is a widely used instrument for assessing cognitive impairment.¹⁵ However, its application to research

is much broader; it is specifically used to measure cognitive function in clinical and epidemiological studies of cognitively intact individuals. In the Brazilian validation study, some of the questions were modified according to their relevance to the target population.¹⁶ In the orientation section by Folstein, questions regarding the season of the year, building and floor were replaced with period of the day, room, and address. In the registration and recall section, the words used were "cat", "tree", and "guitar". In the attention and calculation section, serial fives replaced serial sevens, and spelling "world" backward was replaced by "Maria," which is more commonly used in the Brazilian culture.

The MMSE score is influenced by education,¹⁷ and there is no consensual validated cutoff point to be used for individuals with a low education. Because a low education level predominated in the study population, cognitive status was categorized by the percentile distribution of the MMSE. In this study, we used the cutoff point 21/22 (out of 30) that corresponded to the lower quartile of the MMSE score distribution.¹⁸

Apolipoprotein E

Genomic DNA for *APOE* genotyping was extracted from blood samples using the Wizard[®] Genomic DNA Purification System (Promega, Madison, WI, USA). DNA samples were amplified by polymerase chain reaction (PCR), which was followed by digestion with HhaI and restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis as previously described.¹⁹ The DNA samples were subjected to PCR with the following primers: forward 5' TAA GCT TGG CAC GGC TGT CCA AGG A 3' and reverse 5' ACA GAA TTC GCC CCG GCC TGG TAC AC 3'. The PCR conditions were denaturation at 95 °C for 5 min.; 35 cycles of 95 °C for 1 min., 60 °C for 1 min., and 70 °C for 2 min.; and a final extension at 72 °C for 10 min. The RFLP analysis yielded the following patterns: E2E2, 91 and 83 bp; E3E3, 91, 48 and 35 bp; and E4E4, 72, 48 and 35 bp. Each of the heterozygote genotypes contained both sets of fragments from each *APOE* allele.

The following variables were additionally considered in this study: baseline age, gender, marital status, educational level, skin color, HDL cholesterol, triglycerides, systolic blood pressure (SBP) and depressive symptoms as assessed by General Health Questionnaire-12 (GHQ) using a cutoff of 4/5 to define case-level symptomatology as recommended for the Bambuí cohort study population.²⁰ The educational level was categorized as either 4 years or > 4 years of schooling. The interviewers classified the subjects' skin color based on photographs that were representative of individuals with different skin colors (white, light tan, dark tan, and black). After a 12-hour recommended overnight fast, the levels of HDL cholesterol and triglycerides were determined using commercial kits (Boehringer Mannheim Corp., Ingelheim, Germany) and an automated analyzer (Eclipse Vitalab, Merck, Netherlands) as described previously.¹³ Three blood pressure (BP) measurements were taken on the right arm with an appropriately sized cuff using a mercury sphygmomanometer. The BP measurements were taken early in the morning following a 5 min. initial rest, and they were subsequently taken at 2 min. intervals and after 30 min. or more from the last instance of caffeine intake or cigarette smoked. BP was considered as the arithmetic mean of the second and

third measurements. According to the Seventh Joint National Committee criteria,²¹ the symptoms of common mental disorders were assessed by General Health Questionnaire-12 (GHQ) using a cutoff of 4/5 to define case-level symptomatology.²⁰

Statistical Analysis

Unadjusted associations of *APOE* genotype with socio-demographic factors, biomarkers and mental health symptoms were evaluated using a Pearson χ^2 test or ANOVA for assessing statistical significance of differences between the categorical and continuous variables, respectively. The unadjusted and adjusted odds ratios (ORs) were estimated by using logistic regression to assess the relationship between the *APOE* genotype and cognitive impairment. The analysis was based on five models. The crude association between the MMSE score and *APOE* genotype was estimated first, and it was then adjusted incrementally for gender, age and education (model 2); marital status and skin color (model 3); HDL, triglycerides and SBP (model 4); and GHQ score (model 5). In addition, gender and skin color interactions with *APOE* E4 carriers were tested in model 5. All of the analyses were performed with the STATA software package.

Results

Of the 1,606 cohort members, those who were included in the present analysis were the 1,408 baseline participants from whom cognitive status and *APOE* genotyping were determined (145 were excluded for refusing to perform blood tests, and 53 were excluded because they did not answer the MMSE). When comparing those individuals who were included in this analysis with those who were excluded, no difference was observed with respect to age (mean age = 69.0 \pm 7.1 and 69.3 \pm 7.4 years, respectively; $p = 0.14$) or gender (60.4% were men and 60.0% were women; $p = 0.81$).

The *APOE* allelic and genotypic distributions in this population were previously demonstrated.²² The most frequent allele was E3 (80.0%), which was followed by E4 (13.5%) and E2 (6.5%); this distribution is representative of most western populations. The E3E3 genotype was the most common (63.4%), and it was followed by E3E4 (21.9%), E2E3 (11.5%), E4E4 (1.8%), E2E4 (1.4%), and E2E2 (0.1%). The allelic frequencies were within the Hardy-Weinberg equilibrium ($p > 0.05$).²²

Table 1 shows the selected characteristics of the study population based on the presence of *APOE* E4. The overall mean MMSE score was 24.4 \pm 4.7. The MMSE was lower among *APOE* E4 homozygotes when compared to the E2E4 and E3E4 heterozygotes. The other characteristics of the study participants did not differ significantly ($p > 0.05$) among the *APOE* genotypes.

Table 2 shows the unadjusted and adjusted OR for the associations between the *APOE* E4 carriers and cognitive impairment. *APOE* E4 homozygosity was significantly associated with a lower MMSE score, and this association remained after incrementally adjusting for age, gender, education, marital status, skin color, and for all other potential confounding variables (HDL, SBP, triglycerides and GHQ score) (OR = 2.98; 95% CI 1.15-7.71). Allele E4 homozygosity remained associated even when the participants who scored

Table 1 Baseline characteristics of participants by APOE genotype

CHARACTERISTICS	Total n = 1,408	APOE E4 NEGATIVE n = 1,054	APOE E4 HETEROZYGOTE n = 329	APOE E4 HOMOZYGOTE n = 25	p value
MMSE (mean/SD)	24.4 (4.7)	24.5 (4.7)	24.6 (4.6)	21.2 (4.9)	0.001
Gender (Female) (%)	60.4	61.0	59.6	48.0	0.394
Age (mean/SD)	69.0 (7.1)	69.0 (7.0)	69.2 (7.3)	67.8 (7.0)	0.641
Education \geq 4 years (%)	35.1	36.0	32.8	24.0	0.287
Marital Status (%)					0.766
1. Married	50.2	49.7	51.6	50.0	
2. Single	9.8	10.3	8.6	4.2	
3. Divorced	5.2	5.6	3.8	4.2	
4. Widowed	34.8	34.3	36.0	41.7	
Skin Color (%)					0.053
1. White	60.3	59.7	62.9	48.0	
2. Light Tan	33.9	34.9	30.7	32.0	
3. Dark Tan	3.5	3.3	3.6	8.0	
4. Black	2.3	1.9	2.7	12.0	
Triglycerides (mean/SD)	151.1 (100.2)	150.7 (102.3)	152.7 (95.2)	145.1 (74.8)	0.910
HDL (mean/SD)	49.2 (15.1)	49.3 (14.9)	48.7 (15.7)	50.0 (16.1)	0.812
Systolic Blood Pressure (mean/SD)	137.3 (22.6)	137.1 (23.0)	137.3 (20.7)	141.8 (28.6)	0.594
GHQ \geq 5 (%)	37.7	38.6	35.4	33.3	0.555

MMSE: Mini-Mental State Exam; GHQ: General Health Questionnaire-12

Table 2 Association of APOE E4 and cognitive impairment

Allele E4	Score MMSE		OR (CI 95%) Not adjusted	Adjusted for Age, Sex, Education	Adjusted for Age, Sex, Education, Marital Status, Skin Color	Adjusted for Age, Sex, Education, Marital Status, Skin Color, Triglycerides, HDL, Systolic Pressure	Adjusted for Age, Sex, Education, Marital Status, Skin Color, Triglycerides, HDL, Systolic Pressure, GHQ
	\geq 22	< 22					
0	824	207	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
1	255	64	0.99 (0.73 - 1.36)	0.92 (0.65 - 1.28)	0.94 (0.65 - 1.34)	0.95 (0.66 - 1.37)	0.95 (0.66 - 1.38)
2	14	11	3.12 (1.39 - 6.99)	2.99 (1.22 - 7.32)	2.91 (1.13 - 7.50)	2.81 (1.09 - 7.28)	2.98 (1.15 - 7.71)

below the 5th percentile (cutoff 13/14) were removed from the analysis, minimizing the chance of masking the results with the undiagnosed AD subjects.

Although gender and skin color interactions with APOE E4 carriers were tested in the final model, the heterogeneity between the genders ($p = 0.92$) or among the skin colors ($p = 0.31$) was not statistically significant (data not shown).

Discussion

This study provides epidemiological evidence that APOE E4 homozygosity is associated with cognitive impairment in a population of Brazilian community-dwelling elderly, and the observed association persisted after carefully controlling for potential confounding variables.

To our knowledge, the current study is the first to evaluate the association of APOE E4 presence and cognitive status in a large, population-based cohort in Brazil. The strengths of this study include the following: (1) the use of an MMSE score percentile distribution in the absence of comparable cutoff points in the Brazilian population; (2) a large study population with a higher response rate (87.6%) of Brazilian elderly in a non-isolated population; (3) the adjustment for a range of potential confounders, including skin color, HDL and depression symptoms. The cross-cultural equivalence of the MMSE is concerning; however, to overcome this problem, we used a culturally adapted version of the MMSE that performed well in the studied population.²³

Although studies investigating the association of APOE E4 carriers and cognitive status in community-living elderly are rare in Latin America, previous studies worldwide have suggested that an association exists between APOE E4 and cognitive performance. In a recent meta-analysis,²⁴ 38 studies showed that this association in heterozygous E4 carriers was not significantly different from non-carriers. However, the E4E4 homozygotes exhibited significantly poorer performance when compared with non-carriers; these results were confirmed in our study.

The findings from our study are most comparable with several studies that observed greater deficits in cognitive performance among APOE E4 homozygotes. Yaffe et al.²⁵ demonstrated in 1,750 cognitively intact, community-dwelling women aged 65 years and older in the United States that after adjusting for age, education, presence of a severe tremor, and depression, the MMSE reduction was 0% for individuals lacking APOE E4, 1.9% for APOE E4 heterozygotes, and 3.7% for APOE E4 homozygotes. In a cross-sectional exploratory study of cognitively normal residents (between 30 and 70 years of age), Caselli et al.²⁶ established that memory declined on all eight memory measures (including MMSE) in APOE E4 homozygotes. Memory declined on two of the eight measures in the heterozygotes, and it declined on one of eight in the non-carriers. Moreover, our study evaluated a larger sample than the only other Brazilian study¹², which failed to demonstrate an association between the APOE E4 allele and cognitive status.

The APOE E4 allele is known to represent a genetic risk factor in many populations, and it is considered as the most important susceptibility factor for AD development. Heterozygous APOE E4 carriers are at a 3- to 4-fold increased risk of becoming demented with AD, and APOE E4 homozygotes are at a 10- to 12-fold increased risk of developing AD.²⁷ In a recent study of a Scotland cohort longitudinal follow-up,²⁸ the findings indicated that the APOE E4 status is associated with cognitive changes in old age; they also suggested that the influence of allelic status may be restricted to specific domains of cognitive functioning. This study is consistent with our findings with respect to the observed significant relationship between the APOE E4 allelic status and MMSE performance.

In conclusion, in the analyzed population, cognitive impairment was associated with homozygosity of the E4 allele of the APOE gene but not with heterozygosity, indicating a likely gene dosage effect. Further studies are needed to evaluate the complex role of genetic markers, such as the APOE gene, on cognitive performance in Brazilian elderly individuals. Data from a prospective analysis of this population could help to elucidate our findings.

Acknowledgments

This study was sponsored by the Supporting Agency of Studies and Projects (FINEP) and by the Oswaldo Cruz Foundation, Brazil. The Brazilian National Research Council (CNPq) provided scholarships to Dr. Lima-Costa, Dr. Uchoa and Dr. Firmo. Dr. Castro-Costa is supported by the Programa Nacional de Pós-doutorado em Saúde-PNDS.

Disclosure

Sandra Regina Quintino-Santos, MSc
Employment: Faculdade de Saúde e Ecologia Humana, Vespasiano, MG, Brazil. **Other:** Programa de pós-graduação em Ciências da Saúde - Laboratório de Epidemiologia e Antropologia Médica (LEAM); Centro de Pesquisa Rene Rachou (CPqRR) - Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Brazil.

Maria Fernanda Lima-Costa, MD, PhD

Employment: Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Brazil. Programa de pós-graduação em Ciências da Saúde - Laboratório de Epidemiologia e Antropologia Médica (LEAM); Centro de Pesquisa Rene Rachou (CPqRR) - Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Brazil. **Other:** Núcleo de Estudos em Saúde Pública e Envelhecimento (NESPE), Fundação Oswaldo Cruz, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil.

Elizabeth Uchoa, MD, PhD

Employment: Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Brazil. Programa de pós-graduação em Ciências da Saúde - Laboratório de Epidemiologia e Antropologia Médica (LEAM); Centro de Pesquisa Rene Rachou (CPqRR) - Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Brazil. **Other:** Núcleo de Estudos em Saúde Pública e Envelhecimento (NESPE), Fundação Oswaldo Cruz, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil.

Joselia Oliveira de Araujo Firmo, PhD

Employment: Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Brazil. Programa de pós-graduação em Ciências da Saúde - Laboratório de Epidemiologia e Antropologia Médica (LEAM); Centro de Pesquisa Rene Rachou (CPqRR) - Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Brazil. **Other:** Núcleo de Estudos em Saúde Pública e Envelhecimento (NESPE), Fundação Oswaldo Cruz, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil.

Emilio Hideyuki Moriguchi, MD, PhD

Employment: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Universidade do Vale dos Sinos, Hospital Moinhos de Vento de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil.

Erico de Castro-Costa, MD, PhD

Employment: Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Brazil. Programa de pós-graduação em Ciências da Saúde - Laboratório de Epidemiologia e Antropologia Médica (LEAM); Centro de Pesquisa Rene Rachou (CPqRR) - Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Brazil. **Other:** Núcleo de Estudos em Saúde Pública e Envelhecimento (NESPE), Fundação Oswaldo Cruz, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil; Associated research of King's College London, Institute of Psychiatry, Health Service and Population Research, Section of Epidemiology, United Kingdom.

All of the authors participated in the study concept and design. SRQ, S and EC-C, participated in the revision of literature, analysis, and interpretation of the data and drafted the manuscript. MFL-C, EU and JOAF participated in the analysis and interpretation of the data and revision of the manuscript. EHM participated in the genotyping procedures and analyses. All of the authors critically reviewed the paper for important intellectual content.

* Modest

** Significant

*** Significant. Amounts given to the author's institution or to a colleague for research in which the author has participation, not directly to the author.

References

1. Corder EH, Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel DE, Gaskell PC, Small GW, Roses AD, Haines JL, Pericak-Vance MA. Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science*, 1993;261:921-3.
2. Farrer LA, Cupples LA, Haines JL, Hyman BT, Kukull WA, Mayeux R, et al. Effects of age, sex, and ethnicity on the association between apolipoprotein E genotype and Alzheimer disease: a meta-analysis. *JAMA*, 1997;278:1349-56.
3. Anstey K & Christensen H. Education, activity, health, blood pressure, and apolipoprotein E as predictors of cognitive change in old age: A review. *Gerontology*, 2000;46:163-77.
4. Lautenschlager NT, Flicker L, Vasikaran S, Leedman P, Almeida OP. Subjective memory complaints with and without objective memory impairment: relationship with risk factors for dementia. *Am J Geriatr Psychiatry*, 2005;8:731-4.
5. Bretsky P, Guralnik JM, Launer L, Albert M, Seeman TE. The role of APOE ε4 in longitudinal cognitive decline: MacArthur studies of successful aging. *Neurology*, 2003;60:1077-81.
6. Small BJ, Graves AB, McEvoy CL, Crawford FC, Mullan M, Mortimer JA. Is APOE4 ε4 a risk factor for cognitive impairment in normal aging? *Neurology*, 2000;54:2082-8.
7. Yip AG, Brayne C, Easton D, Rubinsten DC. Apolipoprotein E4 is only a weak predictor of dementia and cognitive decline in the general population. *J Med Genet*, 2002;39:639-43.
8. Bahia VS, Kok F, Marie SN, Shinjo SO, Caramelli P, Nitrini R. Polymorphisms of APOE and LRP genes in Brazilian individual with Alzheimer disease. *Alzheimer Dis Assoc Disord*, 2008;22(11):61-5.

9. Souza DR, de Godoy MR, Hotta J, Tajara EH, Brandão AC, Pinheiro Júnior S, Tognola WA, dos Santos JE. Association of apolipoprotein E polymorphism in later-onset Alzheimer's disease and vascular dementia in Brazilians. *Braz J Med Biol Res.* 2003;36(7):919-23.
10. De-Andrade FM, Larrandaburu M, Callegari-Jacques SM, Gastaldo G, Hutz MH. Association of apolipoprotein E polymorphism with plasma lipids and Alzheimer's disease in a Southern Brazilian population. *Braz J Med Biol Res.* 2000;33(5):529-37.
11. Almeida OP, Shimokomaki CM. Apolipoprotein E4 and Alzheimer's disease in São Paulo-Brazil. *Arq Neuropsiquiatr.* 1997;55(2):1-7.
12. Garcia AN, Silva HA, Silva RC, Leal EMM, Rodrigues L, Silva VC, et al. *APOE*ε4 polymorphism and cognitive deficit among the elderly population of Fernando de Noronha. *Arq Neuropsiquiatr.* 2008;66(2-B):298-302.
13. Cohort profile: the Bambui (Brazil) Cohort Study of Ageing. Lima-Costa MF, Firmo JO, Uchoa E. *Int J Epidemiol.* 2011;40(4):862-7.
14. Seabra MLV, Concilio G, Villares JB, et al. Avaliação do teste "Mini-mental state" em voluntários e pacientes brasileiros. *Revista ABP-APL.* 1990;12:1-29.
15. Folstein MF, Folstein S, McHugh PR. Mini-Mental State: a practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *J Psychiat Res.* 1975;12:189-98.
16. Castro-Costa E, Fuzikawa C, Ferri CP, Uchoa E, Firmo JOA, Lima-Costa MF, et al. Dimensions underlying the Mini-Mental State Examination in a sample with low-education levels: the Bambui Health and Aging Study. *Am J Geriatr Psychiatry.* 2009;17:863-72.
17. Crum RM, Anthony JC, Basset SS, Folstein MF. Population-based norms for the Mini-Mental State Examination by age and education level. *JAMA.* 1993;269:2386-91.
18. Castro-Costa E, Fuzikawa C, Uchoa E, Firmo JOA, Lima-Costa MF. Norms for the Mini-Mental State Examination. Adjustments of the cut off point in population-based studies (evidences from the Bambui Health and Ageing Study). *Arq Neuropsiquiatr.* 2008;66(3-A):524-8.
19. Hixson JE, Vernier DT. Restriction isotyping of human apolipoprotein E by gene amplification and cleavage with HhaI. *J Lipid Res.* 1990;31:545-8.
20. Costa E, Barreto SM, Uchoa E, Firmo JOA, Lima-Costa MF, Prince M. Is the GDS-30 better than the GHQ-12 for screening depression in the elderly people in the community? The Bambui Health Aging Study (BHAS). *Int Psychogeriatr.* 2006;18:493-503.
21. Chobanian AV, Bakris GL, Black HR, Cushman WC, Green LA, Izzo JL Jr, et al. The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure: the JNC 7 report. *JAMA.* 2003;289:2560-72.
22. Fuzikawa AK, Peixoto SV, aufer M, Moriguchi EH, Lima-Costa MF. Apolipoprotein E polymorphism distribution in an elderly Brazilian population: the Bambui Health and Aging Study. *Braz J Med Biol Res.* 2007;40(11):1429-34.
23. Castro-Costa E, Fuzikawa C, Ferri CP, Uchoa E, Firmo JOA, Lima-Costa MF, et al. Dimensions underlying the Mini-Mental State Examination in a sample with low-education levels: the Bambui Health and Aging Study. *Am J Geriatr Psychiatry.* 2009;17:863-72.
24. Small BJ, Rosnick CB, Fratiglioni L, Backman L. Apolipoprotein E and cognitive performance: A Meta-Analysis. *Psychol Aging.* 2004;19(4):592-600.
25. Yaffe K, Cauley J, Sands L & Browner W. Apolipoprotein E phenotype and cognitive decline in a prospective study of elderly community women. *Arch Neurol.* 1997;54:1110-4.
26. Caselli RJ, Reiman EM, Hentz JG, Osborne D, Alexander GE, Boeve BF. A distinctive interaction between memory and chronic daytime somnolence in asymptomatic *APOE* ε4 homozygotes. *Sleep.* 2002;25:447-53.
27. Wilson RS, Schneider JA, Barnes LL, Beckett LA, Aggarwal NT, Cochran EJ, et al. The Apolipoprotein E ε4 allele and decline in different cognitive systems during a 6-year period. *Arch Neurol.* 2002;59:1154-60.
28. Schiepers OJG, Harris SE, Gow AJ, Pattie A, Brett CE, Starr JM, Deary IJ. *APOE* E4 status predicts age-related cognitive decline in the ninth decade: longitudinal follow-up of the Lothian Birth Cohort 1921. *Mol Psychiatry.* 2011;17:315-24.

6.2 Submissão do segundo artigo

Journal of the American Geriatrics Society



APOE ϵ 4 allele is associated with worse performance in memory dimensions of the Mini-Mental State Examination: The Bambuí Cohort Study of Ageing

Journal:	<i>Journal of the American Geriatrics Society</i>
Manuscript ID:	JAGS-0245-BR-Feb-14
Wiley - Manuscript type:	Brief Reports
Date Submitted by the Author:	24-Feb-2014
Complete List of Authors:	Quintino-Santos, Sandra; CPqRR/Fiocruz, LEAM Diniz, Breno; UFMG, Mental Health Firmo, Joselia; centro de Pesquisa Rene Rachou, laboratorio de Epidemiologia Moriguchi, Emilio; University of Vale dos Sinos, Moinho de Vento Hospital Lima-Costa, M.Fernanda; Oswaldo Cruz Foundation, Epidemiology Castro-Costa, Erico; CPqRR/Fiocruz, LEAM
Key Words:	APOE, cognitive impairment, MMSE, ageing, population-based

7 REFERENCIAS

WHO – World Health Organization (1998) *Life in the 21 st Century: A Vision for All* (World Health Report). Geneva.

Bachman DL, Wolf PA, Linn RT, Knoefel JE, Cobb JL, Belanger AJ, White LR, D'Agostino RB: Incidence of dementia and probable Alzheimer's disease in a general population: The Framingham Study. *Neurology* 1993; 43: 515–519

Farrer LA, Cupples LA, Haines JL, Hyman BT, Kukull WA, Mayeux R, et al. Effects of age, sex, and ethnicity on the association between apolipoprotein E genotype and Alzheimer disease: a meta-analysis. *JAMA*, 1997; 278, 1349-1356

Poirier J, Davignon J, Bouthillier D, et al. Apolipoprotein E polymorphism and Alzheimer's disease. *Lancet* 1993;342:697–9.

Strittmatter WJ, Saunders AM, Schmechel D, et al. Apolipoprotein E: high-avidity binding to beta -amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993;90:1977-1981.

Hulette C, Welsh-Bohmer K, Murray M, Saunders A, Mash D, McIntyre L. Neuropathological and neuropsychological changes in “normal” aging: evidence for preclinical Alzheimer disease in cognitively normal individuals. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1998;57:1168-1174.

Knopman D, Parisi J, Salvati A, et al. Neuropathology of cognitively normal elderly. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2003;62:1087-1095.

Corder EH, Saunders AM, Strittmatter WJ, et al. Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science* 1993;261:921-3

Dupuy AM, Mas E, Ritchie K, Descomps B, Badiou S, Cristol JP, et al. The relationship between apolipoprotein E4 and lipid metabolism is impaired in Alzheimer's disease. *Gerontology*, 2001; 47: 213-218.

Sohrabi HR, Bates KA, Rodrigues M, et al. The relationship between memory complaints, perceived quality of life and mental health in Apolipoprotein E ϵ 4 carriers and non-carriers. *J Alzheimer's Disease*. 2009, 17(1):69-79

Gene Chen J, Edwards CL, Vidyarthi S, et al. Learning and recall in subjects at genetic risk for Alzheimer's disease. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 14:1, 2002

Caselli RJ, Reiman EM, Locke DE, Hutton ML, Hentz JG, Hoffman- Snyder C, et al. Cognitive domain decline in healthy apolipoprotein E epsilon4 homozygotes before the diagnosis of mild cognitive impairment. *Arch Neurol* 2007;64:1306–11.

Christensen C, Batterham P, Mackinnon AJ, et al. The association of APOE genotype and cognitive decline in interaction with risk factors in a 65-69 year old community sample. *BMC geriatrics* 2008; 8-14

Jorm AF, Mather KA, Butterworth P, Anstey KJ, Christensen H, and Easteal S. APOE genotype and cognitive functioning in a large age-stratified population sample. *Neuropsychology* 2007, Vol. 21, No. 1, 1–8

Anstey K & Christensen H. Education, activity, health, blood pressure, and apolipoprotein E as predictors of cognitive change in old age: A review. *Gerontology*, 2000; 46: 163-177

Lautenschlager NT, Flicker L, Vasikaran S, Leedman P, Almeida OP. Subjective memory complaints with and without objective memory impairment: relationship with risk factors for dementia. *Am J Geriatr Psychiatry*, 2005; 8:731-734

Bretsky P, Guralnik JM, Launer L, Albert M & Seeman TE. The role of APOE ε4 in longitudinal cognitive decline: MacArthur studies of successful aging. *Neurology*, 2003; 60:1077-1081

Roberts RO, Geda YE, Knopman DS et al. The Mayo Clinic Study of Aging: Design and Sampling, Participation, Baseline Measures and Sample Characteristics. *Neuroepidemiology* 2008;30:58–69

Wilson RS, Bienias JL, Berry-Kravis E, Evans DA & Bennet DA. The apolipoprotein E e2 allele and decline in episodic memory. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 2002; 672-677.

Small BJ, Graves AB, McEvoy CL, Crawford FC, Mullan M, Mortimer JA. Is APOE4 ε4 a risk factor for cognitive impairment in normal aging? *Neurology*, 2000; 54: 2082-2088.

Forlenza OV, Diniz BS, Talib LL, et al. Clinical and biological predictors of Alzheimer's disease in patients with amnesic mild cognitive impairment Rev Bras Psiquiatr, 2010;32(3): 216-222

Oliveira KCV, Barros ALS, Souza GFM. Mini-Exame do Estado Mental (MEEM) e Clinical Dementia Rating (CDR) em idosos com Doença de Alzheimer. Rev Neurocienc 2008;16/2:101-106

Bahia VS, Kok F, Marie SN, Shinjo SO, Caramelli P, Nitrini R. Polymorphisms of APOE and LRP genes in Brazilian individual with Alzheimer disease. Alzheimer Dis Assoc Disord, 2008; 22(1):61-5.

Charchat-Fichman H, Caramelli P, Sameshima K, Nitrini R. Declínio da capacidade cognitiva durante o envelhecimento. Rev Bras Psiquiatr. 2005;27(12):79-82

Ojopi EPB, Bertoncini AB, Dias Neto E. Apolipoproteína E e a doença de Alzheimer. Rev. Psiq. Clín. 31 (1);26-33, 2004

Garcia AN, Silva HA, Silva RC, et al. APOE-e4 polymorphism and cognitive deficit among the elderly population of Fernando de Noronha. Arq Neuropsiquiatr 2008; 66(2-B):298-302

Greenwood PM, Sunderland T, Friz JL, and Parasuraman R. Genetics and visual attention: Selective deficits in healthy adult carriers of the e4 allele of the apolipoprotein E gene. PNAS 2000; 97(21): 11661–11666

Greenwood PM, Lambert C, Sunderland T, and Parasuraman R. Effects of Apolipoprotein E genotype on spatial attention, working memory, and their interaction in healthy, middle-aged adults: results from the National Institute of Mental Health's BIOCARD Study. Neuropsychology. 2005 March; 19(2): 199–211.

Bondi MW, Salmon DP, Monsch AU, et al. Episodic memory changes are associated with the Apoe-eE4 allele in nondemented older adults. Neurology 1995; 45:2203–2206

Packard CJ, Westendorp RGJ, Stott DJ, Caslake MJ, Murray HM, Shepherd J, et al. Association between apolipoprotein E4 and cognitive decline in elderly adults. J Am Geriatr Soc 2007;55:1777–85.

Mortensen, EL & Høgh P. A gender difference in the association between APOE genotype and age-related cognitive decline. *Neurology* 2001,57, 89–95.

Swan GE, Lessov-Schlaggar CN, Carmelli D, Schellenberg GD, La Rue A. Apolipoprotein E epsilon4 and change in cognitive functioning in community-dwelling older adults. *J Geriatr Psychiatry Neurol* 2005; 18:196–201.

Small BJ, Rosnick CB, Fratiglioni L, and Backman L. Apolipoprotein E and cognitive performance: a meta-analysis. *Psychology and Aging* 2004, 19(4):592–600

Folstein MF, Folstein SE, McHugh PR. 'Mini-mental state' A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *J Psychiatr Res* 1975;12:189-98

Scazufca M, Almeida OP, Vallada HP, et al. Limitations of the Mini-Mental State Examination for screening dementia in a community with low socioeconomic status. Results from the Sao Paulo Ageing & Health Study. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* (2009) 259:8–15

Valle EA, Castro-Costa E, Firmo JOA, Uchoa E, Lima-Costa MF. Estudo de base populacional dos fatores associados ao desempenho no Mini Exame do Estado Mental entre idosos: Projeto Bambuí. *Cad. Saúde Pública*, 2009, 25(4):918-926

Brucki SMD, Nitrini R, Caramelli P, et al. Sugestões para o uso do mini-exame do estado mental no Brasil. *Arq Neuropsiquiatr* 2003;61(3-B):777-781

Bertolucci PH, Brucki SM, Campacci SR, Juliano Y. The mini-mental state examination in a general population: impact of educational status. *Arq Neuropsiquiatr* 1994, 52:1-7

Caramelli P, Herrera E Jr, Nitrini R. O mini-exame do estado mental no diagnóstico de demência em idosos analfabetos. *Arq Neuropsiquiatr* 1999;57(Supl 1):S7.

Laks J, Baptista EMR, Contino ALB, et al. Mini-Mental State Examination norms in a community-dwelling sample of elderly with low schooling in Brazil *Cad. Saúde Pública*, 2007, 23(2):315-319

Castro-Costa E, Fuzikawa C, Uchoa E, et al. Norms for the Mini-Mental State Examination. *Arq Neuropsiquiatr* 2008;66(3-A):524-528

Lima-Costa MFF, Uchoa E, Guerra HL, et al. The Bambuí health and ageing study (BHAS): methodological approach and preliminar results of a population-based cohort study of the elderly in Brazil. *Rev. Saúde Pública* 2000;34(2):126-35

Seabra MLV, Concilio G, Villares JB, et al: Avaliação do teste “Mini-mental state” em voluntários e pacientes brasileiros. *Revista ABP-APL* 1990; 12:1–29

Castro-Costa E, Fuzikawa C, Uchoa E, Firmo JOA, Lima-Costa MF. Norms for the Mini-Mental State Examination. Adjustments of the cut-off point in population-based studies (evidences from the Bambuí Health and Ageing Study). *Arq Neuropsiquiatr* 2008; 66(3-A):524-528

Castro-Costa E, Fuzikawa C, Ferri CP, Uchôa E, Firmo JOA, Lima-Costa MF, et al. Dimensions underlying the Mini-Mental State Examination in a sample with low-education levels: the Bambui Health and Aging Study. *Am J Geriatr Psychiatry* 2009; 17:863-72.