

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

**POLIMORFISMO DA APOLIPOPROTEÍNA E E SUA  
ASSOCIAÇÃO COM INCAPACIDADE FUNCIONAL EM IDOSOS:  
PROJETO BAMBUÍ**

**por**

**Rodrigo Zunzarren Megale**

**Belo Horizonte  
Março/2014**

**DISSERTAÇÃO MSC-CPqRR**

**R.Z.MEGALE**

**2014**

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

**POLIMORFISMO DA APOLIPOPROTEÍNA E E SUA  
ASSOCIAÇÃO COM INCAPACIDADE FUNCIONAL EM IDOSOS:  
PROJETO BAMBUÍ**

**por**

**Rodrigo Zunzarren Megale**

**Dissertação apresentada com vistas à obtenção do  
Título Mestre em Ciências na área de concentração  
Saúde Coletiva.  
Orientação: Dr. Sérgio William Viana Peixoto**

**Belo Horizonte  
Março/2014**

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

M496p Megale, Rodrigo Zunzarren.  
2014

Polimorfismo da apolipoproteína E e sua associação com incapacidade funcional em idosos: Projeto Bambuí / Rodrigo Zunzarren Megale. – Belo Horizonte, 2014.

XIV, 56 f.: il.; 210 x 297mm.

Bibliografia: f.: 55 - 70

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

1. Idoso/fisiologia 2. Saúde do Portador de Deficiência ou Incapacidade 3. Apolipoproteína E2/genética I. Título. II. Peixoto, Sérgio William Viana (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**

**POLIMORFISMO DA APOLIPOPROTEÍNA E E SUA  
ASSOCIAÇÃO COM INCAPACIDADE FUNCIONAL EM IDOSOS:  
PROJETO BAMBUÍ**

**por**

**Rodrigo Zunzarren Megale**

**Foi avaliada pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:**

**Prof. Dr. Sérgio William Viana Peixoto (Presidente)**

**Prof. Dr. Érico de Castro e Costa**

**Prof. Dr. Rodrigo Ribeiro Santos**

**Suplente: Juliana Vaz de Melo Mambrini**

**Dissertação defendida e aprovada em: 25/03/2014**

## Dedicatórias

À Bárbara

## **Agradecimentos**

Em primeiro lugar agradeço ao meu orientador, o Dr. Sérgio William Viana Peixoto, que participou ativamente comigo de todas as etapas dessa jornada e sem o qual esse estudo jamais seria possível. Será sempre para mim um exemplo pela maneira elegante e prestativa com que me orientou durante esses dois anos.

Ao Dr. Antônio Ignácio de Loyola Filho, que tanto ajudou nas etapas iniciais desse projeto, contribuindo enormemente para o desenho do estudo.

À Dra. Maria Fernanda Lima-Costa, idealizadora do Projeto Bambuí, do qual foram extraídos os dados para elaboração desse estudo.

À Dra. Jussara Mendonça Alvarenga, pelo incentivo e, sobretudo por ser um exemplo de profissional a quem pretendo me espelhar durante toda minha carreira.

Ao Dr. Edgard Nunes Moraes, responsável por minha formação em geriatria, por abrir minha mente em relação a aspectos tão fundamentais da saúde do idoso. Jamais poderei retribuir tudo o que fez, e ainda faz, por mim.

Aos professores e colegas médicos que sempre me inspiraram não só pelo conhecimento técnico, mas pela paixão com que exercem a medicina – Dr. Athos Victor Gomes, Dr. Adebald de Andrade Filho, Dr. Renato Camargos Couto, Dra. Valéria Maria Augusto e Dr. Paulo Latorre.

À memória do professor Mario López, responsável pelos maiores ensinamentos que tive ao longo da minha formação acadêmica, ensinamentos que tento colocar em prática e difundir entre os que não tiveram a oportunidade de conhecê-lo.

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

À diretoria do Hospital Militar, especialmente ao Dr. Marcos Faria, e aos colegas da FHEMIG, em especial à Dra. Daniela Pagliari e à Dra. Raquel Valverde, que tornaram possível a conclusão dos créditos.

Aos meus irmãos, Eduardo, exemplo de criatividade e paixão pelo trabalho, Alexandre, exemplo de como viver a vida e João Luiz, que ainda não disse ao que veio, mas já me enche de orgulho pelo que vem se tornando ao longo dos seus 11 anos.

Ao meu pai, Luiz Megale, por ser mais que um exemplo de médico, um exemplo de homem e um exemplo de pai. Desejo ser para meu filho o que você foi e é para mim.

À minha mãe, Carime Zunzarren, que foi e tem sido a melhor mãe que um filho pode desejar. Não tenho palavras para agradecer tudo o que fez por mim.

Ao meu padrinho, José Guilherme Moreira dos Santos, em minha opinião, uma das maiores autoridades em saúde coletiva e um dos maiores cirurgiões que já tive oportunidade de conhecer. Agradeço pelo carinho com que cuida da minha família, jamais poderei retribuir tudo o que fez por nós.

Por fim, agradeço à minha esposa, Bárbara, por ser a única capaz de me compreender quando eu mesmo me sinto confuso, por ser a única capaz de sonhar meus sonhos comigo, por ser cúmplice nos momentos de incerteza e nos momentos de alegria, e por ser a pessoa mais importante da minha vida.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	x
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	xi
<b>RESUMO</b> .....	xiii
<b>ABSTRACT</b> .....	xiv
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	15
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	17
2.1 Genética e envelhecimento.....	17
2.1.1 Genes ligados ao eixo GH-IGF-insulina.....	19
2.1.2 Genes ligados à inflamação.....	20
2.1.3 Genes ligados à manutenção de telômeros.....	21
2.1.4 Genes ligados a enzimas antioxidantes.....	22
2.1.5 Genes responsáveis pela manutenção e reparação do DNA.....	22
2.1.6 Genes que atuam na regulação da pressão arterial.....	23
2.1.7 Genes ligados ao metabolismo de lipídeos.....	23
2.1.8 Genes mitocondriais.....	24
2.2 A apolipoproteína E e seu gene.....	25
2.2.1 Apolipoproteína E e doenças cardiovasculares.....	26
2.2.2 Papel da apolipoproteína E na neurobiologia.....	27
2.2.3 Apolipoproteína E, inflamação e doenças infecciosas.....	29
2.2.4 Apolipoproteína E e longevidade.....	31
2.2.5 Apolipoproteína E e incapacidade funcional em idosos .....	31
2.3 Envelhecimento populacional no Brasil e incapacidade funcional.....	32
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	35
3.1 Objetivo geral.....	35
3.2 Objetivos específicos.....	35

<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	36
<b>4.1</b> Área e população do estudo.....	36
<b>4.2</b> Avaliação funcional dos participantes do estudo.....	36
<b>4.3</b> Extração do DNA genômico e genotipagem da apoE.....	37
<b>4.4</b> Variáveis utilizadas para ajustamento.....	38
<b>4.5</b> Análise dos dados.....	40
<b>5 RESULTADOS</b> .....	41
<b>6 DISCUSSÃO</b> .....	49
<b>7 CONCLUSÃO</b> .....	54
<b>8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	55

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1 -</b>	Características dos participantes do estudo. Linha de base da Coorte de Idosos de Bambuí .....	43
<b>Tabela 2 -</b>	Prevalência de incapacidade funcional na amostra do estudo. Linha de base da Coorte de Idosos de Bambuí.....	44
<b>Tabela 3 -</b>	Grau de incapacidade funcional avaliado pelo número de tarefas comprometidas em AVDs, AIVDs e mobilidade. Linha de base da Coorte de Idosos de Bambuí.....	45
<b>Tabela 4 -</b>	Associação entre genótipos da apolipoproteína E e incapacidade funcional para tarefas relacionadas a mobilidade, AIVDs e AVDs. Linha de base da Coorte de Idosos de Bambuí.....	46
<b>Tabela 5 -</b>	Associação presença do alelo E4 e incapacidade funcional para tarefas relacionadas a mobilidade, AVDs e AIVDs. Linha de base da Coorte de Idosos de Bambuí.....	47
<b>Tabela 6 -</b>	Associação entre genótipos da apolipoproteína E e fenótipo de envelhecimento bem sucedido. Linha de base da Coorte de Idosos de Bambuí .....	48

## LISTA DE ABREVIATURAS

- AIT - ataque isquêmico transitório
- AIVDs - atividades instrumentais de vida diária
- apoE - apolipoproteína E
- AVDs - atividades de vida diária
- AVE – acidente vascular encefálico
- BHAS - Bambuí Health and Aging Study
- CETP - proteína de transferência de éster de colesterol (“*cholesterylester transfer protein*”)
- CMV - citomegalovírus
- CNVs – variações do número de cópias (“*copy number variations*”)
- DAC – doença arterial coronariana
- DAF – “*abnormal DAuer Formation*”
- DMRI - degeneração macular relacionada a idade
- DNA – ácido desoxirribonucleico (“*deoxyribonucleic acid*”)
- ECA – enzima conversora de angiotensina
- EPESE - “*Duke Established Population for Epidemiologic Studies of the Elderly*”
- EROs - espécies reativas de oxigênio
- FOXO – “*Forkhead Box O*”
- GH – hormônio do crescimento (“*growth hormone*”)
- GWAS - estudos de associação genética ampla (“*genome-wide association studies*”)
- HDL – lipoproteína de alta densidade (“*high density lipoprotein*”)
- HIV – vírus da imunodeficiência humana (“*human immunodeficiency virus*”)
- HLA-II - “*Human leukocyte antigen II*”
- IDL - lipoproteína de densidade intermediária (“*intermediate density lipoprotein*”)
- IGF - “*Insulin-like growth factor*”
- IGF1R – “*Insulin-like growth factor 1 receptor*”
- IL - interleucina
- LASA - “*Longitudinal Aging Study Amsterdam*”
- LDL – lipoproteína de baixa densidade (“*low density lipoprotein*”)
- LPS - lipopolissacarídeos
- MTTP - proteína microsomal de transferência de triglicérides
- NLTCS - “*National Long-Term Care Survey*”
- OMS – Organização Mundial de Saúde

OR – “*Odds Ratio*”

PA - pressão arterial

pb – pares de bases

PCR - proteína C reativa

PCR - reação em cadeia da polimerase (“*polymerase chain reaction*”)

PI3K - fosfatidilinositol 3-kinase

RFLP - “*restriction fragment length polymorphism*”

SDO - superóxido desmutase

SEBAS - “*Social Environment and Biomarkers of Aging Study*”

SNC – sistema nervoso central

SNPs - polimorfismos de nucleotídeo único (“*single nucleotide polymorphisms*”)

TCE - traumatismo crânio-encefálico

TNF - fator de necrose tumoral (“*tumoral necrosis factor*”)

VLDL - lipoproteína de muito baixa densidade (“*Very Low Density Lipoprotein*”)

VNTRs - polimorfismos de repetição em tandem (“*variable number tandem repeats*”)

WRN - gene da síndrome de Wener

## RESUMO

Vários estudos tem demonstrado o papel da genética no envelhecimento mas ainda não se sabe como os genes influenciam esse processo, sendo possível o envolvimento de vários genes, cada um deles com apenas um modesto efeito. Entre os genes potencialmente relacionados ao envelhecimento mais estudados, destaca-se o gene da apolipoproteína E. Além de participar do transporte de lipídeos, essa apolipoproteína tem papel importante na aterosclerose, no reparo e manutenção de células do sistema nervoso central e na inflamação. Inúmeros estudos tem associado o alelo  $\epsilon 4$  da apoE a doenças comuns em idosos como a doença arterial coronariana, o acidente vascular encefálico e a doença de Alzheimer. Mais recentemente, o gene da apolipoproteína E também tem sido considerado um gene da vulnerabilidade já que portadores de  $\epsilon 4$  apresentam um pior prognóstico em várias outras condições clínicas como traumatismo craniano, doença arterial periférica e diabetes. Idosos mais vulneráveis tendem a acumular mais incapacidades com o envelhecimento e, se o gene da apolipoproteína E for realmente um gene ligado a vulnerabilidade, é possível imaginar que existam variações genótipo-dependentes no desempenho funcional dos idosos.

Para avaliar a associação do genótipo da apolipoproteína E com incapacidade funcional e com um fenótipo de “envelhecimento bem sucedido” 1408 idosos incluídos na linha de base do Projeto Bambuí foram submetidos a genotipagem da apolipoproteína E e constituíram a amostra desse estudo. Os participantes responderam a um questionário para avaliação da funcionalidade e foram classificados de acordo com a presença ou ausência de incapacidades em atividades relacionadas à AVDs, AIVDs e mobilidade. Um subgrupo de idosos que não apresentavam nenhuma dificuldade nas tarefas avaliadas foram considerados idosos com “envelhecimento bem sucedido”. A associação do genótipo da apolipoproteína E e os fenótipos descritos foi avaliada pela regressão logística múltipla, considerando as possíveis variáveis de confusão.

Não houve diferenças significativas em relação a presença de incapacidades em AVDs e AIVDs e o genótipo da apoE mas a presença do alelo  $\epsilon 4$  foi associado a uma menor frequência de comprometimento na mobilidade, tanto quando comparado ao grupo  $\epsilon 3\epsilon 3$  (OR=0,71; IC95%=0,50-1,00), quando comparado aos idosos sem a presença do alelo  $\epsilon 4$  (OR=0,69; IC95%=0,49-0,97). A presença do alelo  $\epsilon 4$  também foi associada ao envelhecimento bem sucedido, aumentando a chance de um envelhecimento livre de incapacidades em cerca de 40% (OR=1,41; IC95%=1,02-1,94).

Em Bambuí a presença do alelo  $\epsilon 4$  esteve relacionada a um melhor desempenho funcional em idosos em relação às tarefas de mobilidade, ressaltando a importância de estudos sobre a associação desse genótipo com a funcionalidade de idosos em diferentes populações.

## ABSTRACT

The genetic influence in the aging process has been shown in several studies but it is still not known which genes play an important role in this process and how they work. The genetic architecture of this process is quite complex and involves a lot of genes, each one with just a small effect. There are several genetic polymorphisms potentially related to the aging process but the apolipoprotein E polymorphism deserves special attention. This apolipoprotein has a key function in lipid transport but also plays an important role in atherosclerosis, maintenance and repair of neurons, and inflammation. There is a strong association between the apoE  $\epsilon$ 4 allele and aging-related diseases like coronary heart disease, stroke, and Alzheimer's disease. Recently, the apoE gene has been viewed as a “frailty” gene.

Frailty elders tend to have more accumulated deficits and disabilities in aging. If the apolipoprotein E gene is really linked to frailty, it would be easy to imagine the presence of genotype-dependent variations on elderly's functional performance.

To analyze the apoE genotypes associations with functional disability considering ADL, IADL and mobility and with a “successful aging” phenotype the participants of the Bambui Health and Aging Study, 1408 elders were genotyped for apoE polymorphisms and were included in this study. They answered several questions about disabilities and were finally classified as dependent or independent in ADL, IADL and mobility. A subgroup of participants that didn't show any problems in assessed tasks was considered “successful aging” elders. The associations with apoE genotypes and the aforementioned phenotypes were assessed using logistic regression models.

No differences in genotypes distribution were found for ADL and IADL but the presence of  $\epsilon$ 4 allele decreased the odds ratio (OR=0,69; IC95%=0,49-0,97) of mobility impairment on the adjusted analysis. We unexpectedly found that the allele  $\epsilon$ 4 is associated with the “successful aging” phenotype. Individuals with  $\epsilon$ 3/ $\epsilon$ 4 or  $\epsilon$ 4/ $\epsilon$ 4 genotype have 40% more chances to reach a disability-free aging (OR=1,41; IC95%=1,02-1,94).

In Bambui Health and Aging Study, the presence of  $\epsilon$ 4 allele was associated with a better functional performance in mobility among the elderly. The importance of studies comparing apoE polymorphisms and functional performance in different populations was reinforced.

## 1 INTRODUÇÃO

O envelhecimento populacional é um fenômeno universal com importante impacto nos serviços de saúde. Apesar de grande parte de esse fenômeno ser atribuído à mudanças nos fatores de risco ambientais e socioeconômicos, não se pode negar a importância dos fatores genéticos no processo de envelhecimento (Vaupel *et al.*, 1998).

O conceito clássico de saúde da Organização Mundial de Saúde (OMS) mostra-se inadequado para descrever o universo de saúde do idoso, já que a grande maioria dessa população apresenta uma ou mais doenças crônicas (Ramos, 2003). Idosos que apresentam comorbidades, mas mantêm sua autonomia e independência podem ser considerados “saudáveis” sob uma ótica de capacidade funcional. Nesse contexto, a manutenção da capacidade funcional torna-se muito mais importante que a presença ou ausência de doenças.

O processo de envelhecimento e a expressão clínica das doenças relacionadas ao envelhecimento apresentam importantes variações entre indivíduos. Apesar de mesma idade e da mesma carga de morbidade, idosos podem apresentar diferentes graus de incapacidade. Além das características demográficas, sociais, estilo de vida, ambiente e suporte social, os fatores genéticos são fundamentais na expressão de um fenótipo de envelhecimento livre de incapacidades (Verbrugge, 1994 e Giacomini, 2008).

A importância de se identificar os determinantes genéticos de um envelhecimento livre de incapacidades pode ser resumida em três razões principais: 1) facilitar a identificação de fatores não genéticos responsáveis por variações inexplicadas no fenótipo; 2) descobrir novos sistemas biológicos e mecanismos envolvidos na determinação do envelhecimento bem sucedido; 3) identificar de genes relacionados a uma maior vulnerabilidade e oferecer a portadores desses genes intervenções biológicas, comportamentais e ambientais para tentar melhorar seu processo de envelhecimento (Glatt *et al.*, 2007).

Entre os genes mais estudados, destaca-se o gene da apolipoproteína E que além de participar do transporte de lipídeos, tem papel importante na aterosclerose, no reparo e manutenção de células do sistema nervoso central (SNC) e na inflamação. Inúmeros estudos tem associado o alelo  $\epsilon 4$  da apolipoproteína E a doenças comuns no envelhecimento como doença arterial coronariana (DAC), acidente vascular encefálico (AVE) e doença de Alzheimer (Mahley *et al.*, 2000).

Mais recentemente, o gene da apolipoproteína E também tem sido considerado um gene de vulnerabilidade (Genders *et al.*, 2000; Christensen *et al.*, 2006, e Kulminski *et al.*, 2008) já que portadores de  $\epsilon 4$  também apresentam um pior prognóstico em várias outras condições clínicas como traumatismo craniano, doença arterial periférica e diabetes (Christensen *et al.*, 2006).

É possível supor, diante do exposto, que indivíduos portadores de  $\epsilon 4$  tenderiam a acumular mais morbidades ao longo de sua vida e apresentariam um pior desempenho funcional em idades avançadas. Poucos estudos foram publicados comparando o genótipo da apolipoproteína E e grau de incapacidade em idosos (Alber *et al.*, 1995; Bader *et al.*, 1998; Blazer *et al.*, 2001; Meizer *et al.*, 2005; Kulminski *et al.*, 2008; Lan *et al.*, 2009; Verghese *et al.*, 2013) e os resultados desses estudos ainda não permitem uma conclusão definitiva sobre a associação do alelo  $\epsilon 4$  com a incapacidade funcional.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Genética e envelhecimento

A longevidade extrema, embora desejável, não é suficiente para definir o fenótipo de um envelhecimento bem sucedido. Segundo Rowe e Kahn, esse fenótipo poderia ser caracterizado por ausência de incapacidade, manutenção da função cognitiva e física e engajamento em atividades sociais e produtivas em idade avançada (Rowe & Khan, 1987). Embora seja um conceito muito citado na literatura, ele apresenta grande dificuldade operacional e por isso a maioria dos estudos de associação genética trabalha com fenótipos de longevidade extrema e ausência de incapacidade para caracterizar um envelhecimento bem sucedido.

Modelos animais usando nematódeos, *Drosophila* e camundongos já demonstraram claramente que alguns genes tem papel importante no envelhecimento e na longevidade (Finch *et al.*, 1997). No caso do nematódeo *Caenorhabditis elegans*, uma simples mutação no gene *age-1* que codifica a fosfatidilinositol 3-kinase (PI3K) pode aumentar seu tempo médio de vida em cerca de 40% (Friedman & Jhonson, 1988).

A partir de inúmeros estudos realizados em animais foi possível concluir que: a) a maioria dos genes envolvidos no processo de envelhecimento são pleiotrópicos, ou seja, influenciam vários traços fenotípicos; b) muitos mutantes longevos apresentam um crescimento mais lento, com reduzida fecundidade e fertilidade, sugerindo uma oposição de rápido desenvolvimento e alta fecundidade com alta resistência ao stress e longevidade; c) existe um componente estocástico no processo de envelhecimento que faz com que indivíduos geneticamente idênticos, criados em um mesmo ambiente, apresentem diferentes padrões de envelhecimento (Christensen *et al.*, 2006).

Em humanos, síndromes progeróides como a síndrome de Werner também demonstram como a mutação de um único gene pode afetar o envelhecimento e a sobrevida, embora isso seja extremamente raro. Acredita-se que a arquitetura genética do envelhecimento humano envolva inúmeras e raras mutações em genes com características pleiotrópicas, todas com apenas um pequeno efeito sobre a longevidade. Essa complexidade provavelmente contribuiu para um lento progresso nessa área. Nesse sentido, o primeiro passo para se compreender a influência da genética no envelhecimento é saber se existe uma hereditariedade para determinado fenótipo, como por exemplo, o fenótipo da longevidade ou do envelhecimento livre de incapacidades. Os primeiros

estudos em genética do envelhecimento trabalharam com o fenótipo da longevidade (McGue *et al.*, 1993; Herskind *et al.*, 1996; Finch *et al.*, 1997).

Conforme demonstrado em inúmeros estudos epidemiológicos, familiares de indivíduos longevos têm uma maior chance de sobreviver em idades avançadas quando comparados com a população geral. A contribuição genética para a longevidade em humanos varia entre 20 e 30% quando estimada através de estudos com gêmeos (Migue *et al.*, 1993; Herskind *et al.*, 1996) e de 15 a 25% quando estimada através de estudos de base populacional (Kerber *et al.*, 2001 e Mitchell *et al.*, 2001), sugerindo uma modesta contribuição genética para o tempo de vida. Por outro lado, quando se trabalha com um fenótipo mais específico, como o do envelhecimento livre de incapacidade, essa contribuição genética parece ser mais importante. No “Framingham Heart Study” a hereditariedade da ausência de incapacidade em idosos de mais de 75 anos foi de 44% (Murabito *et al.*, 2012) e no estudo de gêmeos dinamarqueses foi de 34 a 47% para idosos acima de 80 anos e de 15 a 34% para idosos entre 75 e 80 anos (Christensen *et al.*, 2000 e 2002).

Uma vez confirmada a hereditariedade de características importantes de um envelhecimento bem sucedido como a longevidade e a ausência de incapacidades, o próximo passo seria estudar os genes específicos que influenciam esse fenótipo. No entanto, estudar a influência genética em um fenótipo específico é uma tarefa extremamente difícil já que a maioria dos traços fenotípicos são complexos e sua herança é baseada em uma combinação de múltiplos genes, fatores ambientais e a interação gene-ambiente.

Alguns genes apresentam variações em sua estrutura que podem ser raras (<1% da população) sendo então chamadas mutações, ou mais frequentes (>1% da população) sendo chamadas polimorfismos. Os diferentes tipos de polimorfismos incluem: i) polimorfismos de inserção/deleção; ii) polimorfismos de variação do número de cópias (CNVs); iii) polimorfismos de repetição em tandem (VNTRs) e iv) polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs), que são o tipo mais comum com mais de 3 milhões de SNPs já identificados (Frazer *et al.*, 2007). As diferentes formas que um polimorfismo particular pode assumir representam os alelos. Como os SNPs são responsáveis pela maior parte da variação genética em humanos e sua detecção é relativamente fácil e de menor custo, esse tipo de polimorfismo tem sido o principal foco dos estudos de associação gene-fenótipo (Attia *et al.*, 2009).

A sequência de pares de bases dos 25.000 genes que compõem o genoma humano é 99% idêntica em diferentes indivíduos e ainda assim existe cerca de 12 milhões de variações potenciais entre genomas de diferentes indivíduos, o que pode explicar como indivíduos de mesma idade, sexo e hábitos de vida apresentam diferenças tão importantes (Lander *et al.*, 2001).

Estudos de associação de genes candidatos testam a associação de uma ou mais variações genéticas com fenótipos de interesse. A maioria dos estudos publicados no passado escolhia um gene candidato baseado no seu papel biológico em determinada doença ou expressão fenotípica da doença. Atualmente uma abordagem mais “agnóstica” através de estudos de associação genética ampla (GWAS) tem se mostrado muito útil. GWAS examinam a associação de variações genéticas com uma condição ou fenótipo de interesse analisando de 100.000 a milhões de SNPs em todo o genoma, sem levar em consideração nenhuma hipótese pré-estabelecida sobre algum mecanismo potencial. Estudos de associação genética e GWAS não são excludentes, sendo que muitas vezes o GWAS ajuda a selecionar genes para os estudos de associação (Garatachea & Lucia, 2013).

Existem várias abordagens para identificação de genes potencialmente relacionados ao processo de envelhecimento. Certas classes de genes têm sido citadas com base nos mecanismos biológicos e teorias do envelhecimento. Outros genes são identificados a partir de modelos animais, embora nem sempre exista um gene homólogo em humanos. Existe ainda a possibilidade de seleção de gene baseada em estudos da variação da expressão genética com o envelhecimento (Karasik *et al.*, 2005).

Genes relacionados ao envelhecimento podem ser classificados de acordo com suas vias biológicas de ação, apesar de existir alguma sobreposição entre vias e/ou grupos (Kirkwood, 2005; Willcox *et al.*, 2006; Christensen *et al.*, 2006). As seguintes vias contêm os mais promissores genes estudados : 1) eixo GH-IGF-insulina, 2) inflamação; 3) manutenção de telômeros; 4) enzimas antioxidantes; 5) manutenção e reparo do DNA; 6) regulação da pressão arterial e 7) metabolismo lipídico. O genes mitocondriais também são promissores candidatos e tem recebido grande importância nos estudos mais recentes.

### 2.1.1 Genes ligados ao eixo GH-IGF-insulina

Um dos fenômenos mais amplamente estudados nas pesquisas sobre envelhecimento e conhecido por mais de 70 anos é o efeito da restrição dietética no aumento da expectativa de vida de roedores e outras espécies. Esse efeito é substancial e aumenta em até 50% a vida de roedores. Uma das

explicações para isso é a redução dos níveis de glicose e/ou insulina/IGF através da restrição calórica (Kirkwood, 2005).

Voltando ao exemplo do nematódeo *Caenorhabditis elegans*, cuja alteração no gene que codifica a PI3K tem grande impacto no tempo de vida dessa espécie, observa-se que a PI3K tem um papel de sinalização em uma via que é homóloga a via insulina/IGF-1 em humanos. Um dos alvos dessa via é o fator de transcrição DAF-16 (FOXO), que regula a expressão de numerosos genes que atuam na resistência ao stress, imunidade inata, processos metabólicos e degradação de toxinas. Mutações nessa via provocam efeitos notáveis na longevidade tanto em invertebrados quanto em mamíferos (Murphy *et al.*, 2003).

Uma importante característica fenotípica relacionada a longevidade é a redução do estímulo para produção de insulina, aumento da sua sensibilidade e redução dos níveis plasmáticos de IGF-1 (Longo & Frabrizio, 2002; Tatar *et al.*, 2003 e Bluher *et al.*, 2003). Esse perfil metabólico leva a uma redução do dano oxidativo e do stress citotóxico. Em humanos, os poucos estudos que foram realizados sobre a associação de genes do eixo insulina/IGF e longevidade são concordantes com os achados em modelos animais (Bonafe *et al.*, 2003 e van Heemst *et al.*, 2005).

A presença de pelo menos uma cópia de um alelo específico do IGF1R que resulta em níveis séricos mais baixos de IGF livre é mais frequente em indivíduos longevos (Bonafe *et al.*, 2003). Tem sido sugerido também que variações genéticas que causam redução da ativação da via insulina-IGF1 se associam a um aumento da sobrevida em mulheres. Entre os polimorfismos analisados, a associação foi mais importante para um SNP no gene que codifica o hormônio do crescimento 1 (GH1) (van Heemst *et al.*, 2005).

### 2.1.2 Genes ligados à inflamação

A inflamação crônica e de leve intensidade tem importante papel no processo de envelhecimento humano. Altos níveis de citocinas circulantes como interleucina 6 (IL-6), proteína C reativa (PCR) e fator de necrose tumoral (“*tumoral necrosis factor*” - TNF) têm sido associados a inúmeras doenças relacionadas à idade e que podem levar a incapacidade e mortalidade precoce.

A IL-6 tem um papel fundamental na inflamação e sua expressão é aumentada em muitas condições como artrite reumatoide, osteoporose, Alzheimer, doenças cardiovasculares e diabetes tipo 2,

fazendo com que exista uma associação dos níveis dessa interleucina com o declínio funcional e mortalidade. Existem pelo menos quatro polimorfismos na região promotora do gene da IL-6 que alteram sua transcrição genética sendo que um deles – o 174G/C – tem sido associado à longevidade (Christiansen *et al.*, 2004), à susceptibilidade a doença arterial coronariana (Humphries *et al.*, 2001) e a cânceres (de Michele *et al.*, 2003), mas com resultados ainda conflitantes (Nauk *et al.*, 2002).

Alélos particulares do locus HLA-II no cromossomo 6 também apresentam uma variação significativa entre jovens e idosos de um mesmo grupo étnico, sugerindo que esse locus possa ter alguma influência no envelhecimento (Willcox *et al.*, 2006).

Outra observação relevante é que existem várias modificações na resposta imune celular e humoral entre indivíduos descendentes de longevos quando comparados a controles. O menor status pró-inflamatório em descendentes de longevos infectados com CMV (citomegalovírus) pode representar uma grande vantagem no processo de envelhecimento (Balisteri *et al.*, 2012).

### 2.1.3 Genes ligados a manutenção de telômeros

Telômeros são estruturas protetoras localizadas ao final dos cromossomos que consistem em seis bases de nucleotídeos ocorrendo de forma repetitiva. Uma pequena quantidade dessa sequência terminal é perdida em cada divisão celular. A enzima telomerase compensa essa perda reconstruindo os telômeros. Uma correlação negativa entre o comprimento dos telômeros e a habilidade de replicar das células somáticas, além da redução no comprimento dos telômeros com a idade, sugerem que os telômeros também tenham um papel importante no processo de envelhecimento (Aviv, 2004).

O comprimento do telômero é um caráter hereditário e varia entre indivíduos de uma mesma idade. Na disceratose congênita, doença genética na qual o encurtamento dos telômeros é acelerado, os indivíduos apresentam, além das alterações dermatológicas características da doença, sinais de envelhecimento precoce e início prematuro de muitas doenças relacionadas a idade (Vulliamy *et al.*, 2001).

Durante o processo normal de envelhecimento, a perda do DNA telomérico das células somáticas em divisão pode levar a apoptose, senescência replicativa ou transformação neoplásica. Além disso,

os telômeros parecem ser mais curtos em indivíduos com aterosclerose, doença de Alzheimer, osteoporose, alguns tipos de câncer e até mesmo transtornos de humor (Bekaert *et al.*, 2005). Não são todos os estudos, no entanto, que suportam a relação do comprimento do telômero com a longevidade (Bischoff *et al.*, 2006). Na verdade, ainda não se sabe se o telômero é apenas um marcador de mecanismos fundamentais que determinam o envelhecimento ou se é um fator chave nesse processo (Aviv, 2004).

#### 2.1.4 Genes ligados a enzimas antioxidantes

As células possuem vários mecanismos de resposta ao stress que induzem a expressão de genes codificadores de proteínas protetoras como proteínas do choque térmico (“heat shock proteins”), fatores de crescimento e enzimas antioxidantes.

Apesar dos polimorfismos de genes ligados a enzimas antioxidantes não terem sido suficientemente bem estudados para se chegar a uma conclusão a respeito da sua influência na longevidade, o polimorfismo do gene da superóxido desmutase (SOD) merece atenção especial. O superóxido é uma das mais abundantes espécies reativas de oxigênio (EROs) produzidas pela mitocôndria e, assim como outras espécies reativas do oxigênio, pode causar dano em estruturas celulares através do stress oxidativo. A enzima SOD catalisa a quebra do superóxido em peróxido de hidrogênio e água e por isso é importante reguladora desse stress oxidativo (Sohal *et al.*, 2002).

Mutações deletérias nesse gene têm sido associadas a doenças neurológicas como esclerose lateral amiotrófica (Turner *et al.*, 2006), mas a literatura é controversa e existem dúvidas se os polimorfismos do gene da SOD estariam ligados apenas a um menor risco para algumas doenças ou se teriam uma ligação direta com a longevidade (De Benedicts *et al.*, 1998).

#### 2.1.5 Genes responsáveis pela manutenção e reparação do DNA

O dano do DNA vai sendo acumulado com a idade e defeitos em genes responsáveis pelo processo de reparação do DNA podem levar a fenótipos observados nas síndromes progeróides como síndrome ataxia-telangectasia, disceratose congênita, síndrome de Huntchinson-Gilford, síndrome de Rothmund-Thomson e síndrome de Werner (Martin *et al.*, 1999).

O gene mais estudado desse grupo é o gene da síndrome de Wener (WRN) e apesar do pouco conhecimento a respeito do seu papel no envelhecimento normal, acredita-se que deficiências menores na função desse gene possam influenciar o envelhecimento na população geral (Castro *et al.*, 1999). Alguns autores sugerem que SNPs desse gene podem ser fatores de proteção contra algumas doenças, como a doença arterial coronariana (Bohr *et al.*, 2004).

#### 2.1.6 Genes que atuam na regulação da pressão arterial

A presença ou ausência de um fragmento de 287 pares de base no gene que codifica a enzima conversora de angiotensina (ECA) determina uma variante de inserção/deleção desse gene, possibilitando três genótipos: DD, ID e II. Esse polimorfismo pode estar ligado a longevidade uma vez que a frequência de homozigotos para deleção (DD) foi significativamente mais elevada em octogenários alemães (Luft, 1999), achado também observado no estudo longitudinal de gêmeos dinamarqueses (Frederiksen *et al.*, 2003). No entanto, é importante notar que dois outros grandes estudos com centenários não conseguiram reproduzir essa associação (Bladbjerg *et al.*, 1999 e Blanche *et al.*, 2001). Além disso, o polimorfismo da ECA pode estar envolvido em doenças renais e cardiovasculares devido aos efeitos negativos relacionados a vasoconstrição (Jeunemaritre *et al.*, 1992).

#### 2.1.7 Genes ligados ao metabolismo de lipídeos

Indivíduos longevos e seus descendentes têm níveis elevados de HDL, níveis baixos de LDL, menor prevalência de hipertensão, acidente vascular encefálico (AVE) e síndrome metabólica. A homozigose para a variante I405V da proteína de transferência de éster de colesterol (CETP) pode estar ligada a esse fenótipo (Barzilai *et al.*, 2003).

Outro gene potencialmente relacionado à longevidade, a proteína microssomal de transferência de triglicérides (MTTP), foi identificado a partir de um estudo de varredura genômica-ampla realizado na população norte-americana que mostrou um locus no cromossomo 4 associado a longevidade extrema. Dois SNPs são responsáveis pela maior parte das variações do locus da MTTP e o genótipo que contém ambas as variações parece ser menos frequente em indivíduos longevos (Puca *et al.*, 2001).

De todos os outros genes potencialmente relacionados ao envelhecimento, o gene da apolipoproteína E (apoE) é sem dúvida o mais estudado. Em centenários, a frequência do seu alelo épsilon 4 ( $\epsilon 4$ ), considerado o tipo deletério, é cerca de metade da frequência encontrada em adultos jovens de diferentes grupos étnicos. Além do seu possível papel no envelhecimento, o alelo  $\epsilon 4$  confere um risco maior de doenças cardiovasculares e doença de Alzheimer enquanto o alelo  $\epsilon 2$  é considerado fator de proteção. O risco também parece estar aumentado para os portadores de  $\epsilon 4$  que são expostos a outras condições clínicas como traumatismo crânio-encefálico (TCE), diabetes ou doença arterial periférica (Christensen *et al.*, 2006).

#### 2.1.8 Genes mitocondriais

Variantes de genes mitocondriais estão entre os mais cotados candidatos a associação com fenótipos de envelhecimento. Existem vários motivos para isso: 1) a mitocôndria é o maior sítio de produção de energia e o balanço energético é muito importante no envelhecimento; 2) a mitocôndria tem papel fundamental na produção de radicais livres; e 3) o DNA mitocondrial e seus subcomponentes, devido a sua proximidade com o local de produção dos radicais, estão em maior risco de dano e subsequente disfunção (Willcox *et al.*, 2006).

Variações genéticas do DNA mitocondrial podem levar a alterações tanto no funcionamento da cadeia respiratória quanto na produção de radicais livres. Nas células somáticas, mutações do DNA mitocondrial são 25 vezes mais frequentes que no DNA nuclear e essas mutações se acumulam com a idade (Merriwether *et al.*, 2001). Mais de 250 pontos de mutação patogênicos já foram descritos para o genoma mitocondrial. Essas mutações são ligadas a um grande espectro de doenças, principalmente ligadas ao músculo e sistema nervoso central (Greaves & Taylor, 2006).

Em resumo, a grande quantidade de teorias do envelhecimento sugere que vários tipos de dano vão se acumulando em paralelo dentro da célula ao longo desse processo. Apesar de múltiplos mecanismos de envelhecimento serem atualmente conhecidos, a natureza reducionista das técnicas experimentais faz com que, na prática, a maioria das pesquisas continuem focadas em um único mecanismo. Isso é altamente limitante pois, apesar de ser possível encontrar para cada um dos grupos de genes citados algum tipo de polimorfismo associada ao envelhecimento, para nenhum deles haverá evidências de que esse polimorfismo seja, por si só, suficiente para explicar a fragilidade, a incapacidade e as doenças relacionadas ao envelhecimento.

O mais pertinente é acreditar que ao longo de toda a vida existe um acúmulo de dano molecular. Esse dano é aleatório mas a taxa de acúmulo é regulado por mecanismos genéticos de manutenção e reparo. A medida que os defeitos celulares se acumulam, o indivíduo passa a expressar condições como fragilidade e incapacidade. Fatores ambientais incluindo nutrição e estilo de vida podem tanto aumentar quanto ajudar a reduzir o acúmulo do dano molecular e assim, em conjunto com os fatores genéticos, são parcialmente responsáveis por moldar a expressão fenotípica do envelhecimento (Kirkwood *et al.*, 2005).

## 2.2. A apolipoproteína E e seu gene

Originalmente chamada “proteína rica em arginina”, a apolipoproteína E (apoE) foi identificada há cerca de 40 anos, associada a partículas de lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL - “Very Low Density Lipoprotein”) ricas em éster de colesterol (Shore & Shore, 1974). Desde então um enorme progresso foi feito na compreensão do seu papel na regulação da homeostase do colesterol plasmático. Seu papel no sistema nervoso, no entanto, só foi descrito mais recentemente.

Com 299 aminoácidos, a apoE é uma proteína sintetizada principalmente pelo fígado mas outros órgãos como cérebro, baço, pulmões, ovários, glândulas suprarrenais, rins, músculos e macrófagos são responsáveis por 20 a 40% da produção dessa proteína. Sua expressão em diferentes órgãos e tecidos sugere que a apoE participa de outros processos biológicos além daqueles relacionados ao transporte de lipídeos. De fato muitos estudos tem relacionado a apoE à imunidade inata, ao funcionamento cerebral normal e a inúmeras doenças neurodegenerativas (Orth & Bellosta, 2012).

O gene que codifica a apoE está localizado no cromossomo 19q13.2 e contém quatro exons e três introns. É um gene polimórfico que apresenta três alelos ( $\epsilon 2$ ,  $\epsilon 3$  e  $\epsilon 4$ ), produzindo três isoformas da proteína (apoE2, apoE3 e apoE4), que se diferem apenas pelo aminoácido na posição 112 e/ou 158. A apoE3 contém uma cistina na posição 112 e uma arginina na posição 158 enquanto a apoE2 tem cistina na posição 112 e 158 e a apoE4 tem arginina nessas posições (Mahley, 1984). Devido a presença de arginina na posição 112, a conformação da cadeia lateral da ARG-61 (região N-terminal) é alterada, resultando na maior exposição deste resíduo e, conseqüentemente, sua maior aproximação para interagir com o resíduo GLU-255 (no domínio C-terminal). Isso faz com que a apoE4 se ligue preferencialmente a grandes partículas de lipoproteínas como VLDL (Saito *et al.*, 2004) e torna essa apolipoproteína mais propensa a formar “molten globules”, o que pode contribuir para a neuropatologia da doença de Alzheimer (Zhong & Weisgraber, 2009).

O alelo  $\epsilon 3$  é considerado o tipo selvagem devido a alta frequência e ausência de associação com doenças. O alelo  $\epsilon 4$ , por sua vez, está relacionado a níveis mais elevados de colesterol e LDL e a um risco mais elevado para doenças cardiovasculares e neurodegenerativas (Mahley *et al.*, 1988).

### 2.2.1 Apolipoproteína E e doenças cardiovasculares

Utermann *et al.* foram os primeiros a observarem que em uma população normal, indivíduos portadores de  $\epsilon 2$  apresentavam menores níveis de colesterol LDL comparados aos indivíduos  $\epsilon 3/\epsilon 3$  (Utermann *et al.*, 1979). Por outro lado, Bouthillier *et al.* (1983) e Davignon *et al.* (1988) foram os primeiros a mostrar que indivíduos portadores do alelo  $\epsilon 4$  tinham níveis de colesterol LDL mais elevados que os homozigotos para o alelo  $\epsilon 3$  (Bouthillier *et al.*, 1983; Davignon *et al.*, 1988). Desde então esses estudos tem sido replicados em várias populações confirmando seus resultados.

O polimorfismo da apoE tem sido estudado também em indivíduos com vários tipos de dislipidemias. A associação mais descrita é a do genótipo  $\epsilon 2/\epsilon 2$  com a presença de hiperlipoproteinemia tipo III. Essa hiperlipoproteinemia é caracterizada pelo acúmulo de partículas lipoproteicas ricas em triglicérides no plasma. Ela tem sido ligada a várias anormalidades genéticas que afetam o metabolismo das lipoproteínas incluindo diferentes mutantes da apoE (algumas das quais parecem levar a uma hiperlipoproteinemia tipo III herdada de forma dominante), deficiência de apoE, deficiência de lipase hepática e possíveis defeitos em receptores de lipoproteínas. Apesar de na maioria das vezes a hiperlipoproteinemia tipo III estar associada ao genótipo  $\epsilon 2/\epsilon 2$ , o contrário não é verdadeiro, ou seja, menos de 5% dos indivíduos  $\epsilon 2/\epsilon 2$  tem hiperlipoproteinemia tipo III. Isso quer dizer que o genótipo  $\epsilon 2/\epsilon 2$  é uma condição necessária mas não suficiente para a expressão dessa hiperlipoproteinemia em humanos.

Em indivíduos  $\epsilon 2/\epsilon 2$  que são normolipidêmicos, a presença de apoE2 resulta em um acúmulo de lipoproteína de densidade intermediária (“intermediate density lipoproteína” - IDL) e redução da concentração plasmática de LDL. Entre indivíduos com hipercolesterolemia, o alelo  $\epsilon 4$  ou fenótipo E4/E4 é observado com maior frequência (Davignon *et al.*, 1988).

A observação do impacto da variação do alelo da apoE nas lipoproteínas plasmáticas de indivíduos normais e hiperlipidêmicos levou a hipótese de que o polimorfismo da apoE poderia estar ligado a susceptibilidade à aterosclerose no homem. Apesar do alelo  $\epsilon 2$  poder estar ligado a

hiperlipoproteinemia tipo III conforme já mencionado, na maioria dos indivíduos esse alelo está associado a níveis mais baixos de LDL e por isso poderia ter um efeito protetor enquanto o alelo  $\epsilon 4$ , associado a níveis mais altos de LDL, poderia favorecer o desenvolvimento de aterosclerose (Sing & Davignon, 1985).

Essa hipótese foi testada em indivíduos que já tiveram infarto do miocárdio, pacientes com doença arterial coronariana (DAC) documentada por angiografia, octogenários e outros grupos de risco para doença aterosclerótica. Apesar de ainda existir alguma controvérsia a respeito dessa associação, cada vez é mais aceito que os dois alelos menos prevalentes do gene da apoE,  $\epsilon 2$  e  $\epsilon 4$ , tem diferentes efeitos no desenvolvimento da aterosclerose (Davignon *et al.*, 1988).

Uma meta-análise incluindo nove estudos caso-controle e longitudinais foi realizada para determinar a relação do polimorfismo da apolipoproteína E com a DAC e nessa meta-análise o alelo  $\epsilon 4$  foi associado com um risco 1,26 vezes maior de DAC comparado com o alelo  $\epsilon 3$  (Wilson *et al.*, 1996). Ainda assim, existem tanto estudos que confirmam a associação do alelo  $\epsilon 4$  com a DAC (Stengerd *et al.*, 1995) quanto estudos em que essa associação não foi observada (Kuusito *et al.*, 1995).

Um estudo longitudinal comparou a frequência dos alelos da apoE, níveis de LDL colesterol e a mortalidade por DAC em nove países. Mesmo após ajustamento para níveis de LDL, o alelo  $\epsilon 4$  ainda apresentou significativa associação com o risco de morte por DAC (Stengard *et al.*, 1998). Esse estudo sugere que outros fatores além do aumento do LDL colesterol podem ser responsáveis pelos efeitos do alelo  $\epsilon 4$  na aterosclerose.

Em outro estudo, indivíduos de 15 a 34 anos portadores do alelo  $\epsilon 4$  que morreram de causas externas tinham maior grau de aterosclerose aórtica quando comparados aos portadores de  $\epsilon 2$ , mesmo quando ajustado para níveis de colesterol (Hixson, 1991).

Em relação a doença cerebrovascular, uma meta-análise que avaliou a associação do alelo  $\epsilon 4$  com o AVE isquêmico e o ataque isquêmico transitório (AIT) encontrou um risco 1,68 vezes maior para o alelo  $\epsilon 4$  quando comparado com  $\epsilon 3$  (McCarron *et al.*, 1999).

### 2.2.2 Papel da apolipoproteína E na neurobiologia

Apesar de o cérebro corresponder a somente 5% do peso corporal, ele contém cerca de 20-25% do total de colesterol do corpo sendo o órgão mais rico em colesterol. No cérebro, o colesterol é o maior componente da mielina, está presente na membrana de neurônios e células da glia e também está ligado a lipoproteínas. A meia vida do colesterol no cérebro é de 6 meses a 1 anos, muito maior que a meia-vida do colesterol no plasma, que é de algumas horas. Enquanto a apoE plasmática é sintetizada pelo fígado e por macrófagos, a apoE do SNC é sintetizada localmente pelo cérebro. Não existe intercâmbio entre a apoE do SNC com a apoE plasmática devido a presença da barreira hemato-encefálica (Mahley & Rall, 2000).

O colesterol é fundamental para o desenvolvimento de sinapses, formação de dendritos e direcionamento axonal. Ao carrear o colesterol para os neurônios, as lipoproteínas contendo apoE promovem o aumento da formação de sinapses. Sem colesterol, os neurônios sofrem degeneração dendrítica e sináptica, causando falha na neurotransmissão e redução da neuroplasticidade (Chaves & Narayanaswami, 2008).

A apolipoproteína E tem um papel importante na manutenção e reparo neuronal, mas suas três isoformas se diferenciam na capacidade de desempenhar essa tarefa crítica.

Ao longo da vida e acima de tudo com o envelhecimento, os neurônios precisam ser remodelados e reparados para manter as conexões sinapto-dendríticas. Através do seu papel no transporte de lipídeos, a apoE é um fator importante nesse processo. A apoE2 e apoE3 são mais eficientes que a apoE4 em manter e reparar as células nervosas (Mahley *et al.*, 2006).

Dessa forma, a apoE4 é um importante fator de risco para a doença de Alzheimer (Sauders *et al.*, 1993 e Danik *et al.* 1999). Em indivíduos que manifestam a doença de Alzheimer de início tardio, o alelo  $\epsilon 4$  é duas a três vezes mais comum que na população geral. Alguns estudos mostraram que em até 65% dos casos de Alzheimer diagnosticados clinicamente, pelo menos um alelo  $\epsilon 4$  estava presente. Os mecanismos moleculares pelos quais essa apolipoproteína leva a doenças neurodegenerativas ainda não são bem elucidados e continua sendo alvo de vários estudos (Hauser *et al.*, 2011).

Os principais mecanismos propostos para os efeitos da apoE na doença de Alzheimer são: 1) efeitos no metabolismo da proteína beta-amiloide; 2) efeitos diretos nos neurônios e células da glia,

incluindo efeitos sobre a proteína tau, manutenção neural e extensão de neurítica; 3) efeitos relacionados a aterosclerose, fluxo sanguíneo cerebral e barreira hemato-encefálica (Smith, 2002).

A apoE4 está ligada tanto a uma redução do clearance de proteína beta-amiloide como ao aumento de sua produção, o que contribui para sua associação com a doença de Alzheimer (Huang *et al.*, 2004).

Acredita-se também que, uma vez sintetizadas, as apolipoproteínas podem ser clivadas por proteases e que os fragmentos de apoE são deletérios para o processo de manutenção e reparo celular. Devido a sua conformação e reatividade única, a apoE4 é muito mais susceptível à proteólise que a apoE3. A apoE4 exerce um papel neurotóxico em culturas de neurônios além de causar alterações degenerativas em neurônios do hipocampo e de regiões corticais de camundongos transgênicos. É possível que essa neurotoxicidade esteja ligada a capacidade dos fragmentos de apoE entrarem no citosol e interagirem com o citoesqueleto ou mitocôndria (Mahley *et al.*, 2006).

Outro potencial mecanismo pelo qual a apoE leva a neuropatologia é sua ligação com a proteína tau já que a apoE e seus fragmentos foram encontrados em emaranhados neurofibrilares de cérebros com doença de Alzheimer (Huang *et al.*, 2001) e a expressão neuronal de apoE4 leva a hiperfosforilação da proteína tau em camundongos transgênicos (Buttini *et al.*, 2010).

Por fim, uma vez que  $\epsilon 4$  é associada a DAC e AVE isquêmico, é razoável pensar que as alterações no fluxo sanguíneo cerebral e outras alterações vasculares possam ser um dos mecanismos pelos quais o alelo  $\epsilon 4$  é associado à doença de Alzheimer e declínio cognitivo, embora seja importante lembrar que o risco associado a  $\epsilon 4$  é muitas vezes maior para doença de Alzheimer que para DAC e AVE.

### 2.2.3 Apolipoproteína E, inflamação e doenças infecciosas

A apolipoproteína E influencia a resposta inflamatória e apresenta propriedades antioxidantes que são genótipo-dependentes - o alelo  $\epsilon 2$  apresenta maior propriedade antioxidante e  $\epsilon 4$  apresenta menor propriedade antioxidante comparados a  $\epsilon 3$ . De uma maneira geral, o alelo  $\epsilon 4$  tem sido associado a um risco aumentado de doenças caracterizadas por stress oxidativo e status pró-inflamatório. A força dessa associação varia enormemente entre diferentes populações indicando

uma influência de outras variantes genéticas e variáveis ambientais na associação apoE-doença (Jofre-Monseny *et al.*, 2008).

As propriedades imunossupressoras da apoE foram inicialmente descritas na década de oitenta a partir de investigações de sua associação com a proliferação de células T (Kelly *et al.*, 1994). Posteriormente foi demonstrado que a deficiência de apoE prejudicava a resposta imune para *Listeria monocytogenes*, *Klebsiella pneumoniae* e lipopolissacarídeos (LPS) (Roselaar & Daugherty, 1998 e de Bont *et al.*, 1999).

A apoE tem importante papel na captação de antígenos lipídicos no sangue e sua apresentação ao compartimento endossomal de células apresentadoras de antígenos. Também pode ser secretada pelas células apresentadoras de antígenos como um mecanismo de varredura do microambiente local para a captura de antígenos, ou para a transferência de antígenos lipídicos microbianos de células infectadas para células apresentadoras de antígenos (Van den Elzen *et al.*, 2005).

Em humanos, um número limitado de estudos revela tanto efeitos pró como anti-inflamatórios relacionados ao genótipo da apoE. Um estudo de pacientes submetidos a revascularização miocárdica, procedimento que induz um aumento transitório de citocinas pró-inflamatórias, liberadas principalmente por linfócitos ativados, mostrou que a presença do alelo  $\epsilon 4$  estava associada a um aumento de IL-8 e TNF-alfa (Drabe *et al.*, 2001). Em pacientes com síndrome coronariana aguda, níveis significativamente inferiores de IL-10 foram observados entre os portadores do alelo  $\epsilon 4$  e essa tendência também foi observada em pacientes com angina estável (Tziakas *et al.*, 2006).

Os níveis de proteína C reativa (PCR) também têm sido fortemente associados ao genótipo da apolipoproteína E. Indivíduos portadores do alelo  $\epsilon 4$  apresentam os menores níveis de PCR e os portadores de  $\epsilon 2$  o maiores níveis quando comparados com indivíduos  $\epsilon 3/\epsilon 3$ . Isso parece contraditório já que níveis mais elevados de PCR estão associados a um maior risco de doença cardiovascular assim como a presença do alelo  $\epsilon 4$ . Esse achado pode, no entanto, refletir diferenças fisiológicas ligadas a evolução da espécie humana. Como as doenças mais prevalentes nos portadores do alelo  $\epsilon 4$  afetam principalmente idosos, pode ser que o alelo  $\epsilon 4$  tenha conferido alguma vantagem durante a idade reprodutiva em circunstâncias ambientais associadas aos ancestrais humanos. Acredita-se que esse possível benefício possa estar ligado a uma resistência a

doenças infecciosas, processo que envolve componentes da resposta imune inata incluindo a PCR (Chasman *et al.*, 2006).

Indivíduos portadores do alelo  $\epsilon 4$  e infectados pelo HIV têm um risco maior de infecções oportunistas (Burt *et al.*, 2008), progressão para demência (Corder *et al.*, 1998) e morte. Além disso, esse alelo tem sido associado à psoríase, um doença inflamatória crônica da pele (Campalani *et al.*, 2006). Por outro lado, a apoE4 confere proteção contra a degeneração macular relacionada a idade (DMRI). Apesar do mecanismo ainda ser desconhecido, acredita-se que as diferentes conformações genótipo-mediadas da apoE determinam alterações no transporte de lipídeos e colesterol, o que poderia levar, nos portadores de  $\epsilon 4$ , a um menor risco de formação de drusas, estruturas características formadas na DMRI (Thakinstian *et al.*, 2006).

A apoE4 também tem um papel de proteção contra algumas doenças infecciosas, estando associada a formas mais leves de parasitoses intestinais em crianças de cidades mais carentes do Brasil e com uma proteção contra os efeitos negativos da diarreia na infância (Oriá *et al.*, 2010). Na hepatite pelo vírus C, a apoE4 também está associada a um menor dano hepático (Wozniak *et al.*, 2002).

#### 2.2.4 Apolipoproteína E e longevidade

Entre os genes candidatos para o fenótipo da longevidade, o gene da apoE é sem dúvida o que tem uma associação mais forte e mais reproduzida. Em 325 centenários franceses a frequência do alelo  $\epsilon 4$  foi 5,8% comparado com 11,2% no grupo controle composto por adultos jovens. Ao contrário, a frequência de  $\epsilon 2$  em centenários foi quase o dobro, 12,8% contra 6,8% (Schachter *et al.*, 1994). Associação semelhante foi observada em populações dos Estados Unidos (Cauley *et al.*, 1993), Suécia (Corder *et al.*, 1996), China (Jian-Gang *et al.*, 1998), Japão (Hirose *et al.*, 1997), Finlândia (Frisoni *et al.*, 2001) e Irlanda (Rea *et al.*, 2001).

É possível que a associação do alelo  $\epsilon 4$  com o aumento do risco para DAC e doença cerebrovascular, duas das principais causas de morte nos países ocidentais, possa ser responsável por grande parte do efeito do polimorfismo da apoE na longevidade.

#### 2.2.5 Apolipoproteína E e incapacidade funcional em idosos

A presença do alelo  $\epsilon 4$  não é somente um fator de risco independente para doenças cardiovasculares e Alzheimer, mas os portadores desse alelo também são mais susceptíveis a desfechos negativos após uma exposição a fatores externos. Alguns estudos mostraram que portadores de  $\epsilon 4$  apresentavam um prognóstico pior (morte ou estado vegetativo) após traumatismo crânio-encefálico grave (Horsburgh *et al.*, 2000). Além disso,  $\epsilon 4$  é um fator de risco para declínio cognitivo 6 semanas após cirurgia de revascularização miocárdica (Shiefermeier *et al.*, 2000). Indivíduos com aterosclerose, doença arterial periférica ou diabetes também tem maior risco de declínio cognitivo se forem portadores desse alelo (Christensen *et al.*, 2006), e existem ainda estudos conflitantes em relação a uma possível associação da  $\epsilon 4$  com um aumento de incidência de fratura de colo de fêmur em idosos (Cauley *et al.*, 1999 e von Muhlen *et al.*, 2001).

Diante do exposto, o gene da apolipoproteína E tem sido visto recentemente muito mais como um “gene da vulnerabilidade” do que um “gene da longevidade”. (Christensen *et al.* 2006, Genders *et al.*, 2000 e Kulminski *et al.*, 2008). Se isso é realmente verdade, pode-se esperar que portadores do alelo  $\epsilon 4$  tenderiam acumular mais doenças e incapacidades com o envelhecimento quando comparados aos que não são portadores desse alelo.

Alguns estudos tentaram provar essa hipótese com resultados ainda conflitantes (Alber *et al.*, 1995; Bader *et al.*, 1998; Blazer *et al.*, 2001; Meizer *et al.*, 2005; Kulminski *et al.*, 2008; Lan *et al.*, 2009; Verghese *et al.*, 2013).

### 2.3. Envelhecimento populacional no Brasil e incapacidade funcional.

O rápido envelhecimento da população brasileira a partir da década de 60 vem determinando profundas modificações nos seus padrões de morbidade, invalidez e morte. As doenças infecciosas, antigamente principal causa de morte no Brasil, foram superadas de longe pelas doenças crônicas não transmissíveis, levando a um deslocamento da carga de morbimortalidade para a população mais idosa (Chaimovicz, 1997).

Os serviços de saúde que tradicionalmente eram direcionados para a saúde materno-infantil e para as doenças infecciosas estão mudando seu enfoque em virtude da progressão dessa transição epidemiológica e uma maior atenção está sendo dada às doenças crônicas que, sem o acompanhamento médico devido, muito frequentemente geram incapacidades (Wong *et al.*, 2006).

O processo que leva a incapacidade inicia-se com a patologia (interrupção ou interferência no estado ou no processo normal do organismo). A patologia gera deficiências (anormalidades ou perdas anatômicas, psicológicas, mentais ou funcionais), levando a limitações funcionais (restrição ou falta de habilidade no desempenho de ações ou atividades) e causando incapacidade (inabilidade ou limitação no desempenho de atividades socialmente definidas e de papéis esperados dentro do ambiente social e físico do indivíduo) (Vergrugge & Jette, 2004).

O conceito de incapacidade, entretanto, tem passado por uma enorme evolução nas últimas décadas. Embora se reconheça que a incapacidade funcional compreenda três dimensões, a física, a cognitiva e a emocional, há um predomínio de pesquisas que utilizam apenas medidas físicas e instrumentais. Ainda não há uma definição de modelo para se trabalhar com incapacidade em idosos. Existem instrumentos de medida específicos que fornecem um escore ou perfil de incapacidade, mas que variam muito entre pesquisas. As AVDs, as AIVDs e a mobilidade são indicadores preferencialmente utilizados entre os autores e universalmente aceitos na literatura (Alves *et al.*, 2008).

A incapacidade funcional refere-se, portanto, a dificuldade ou dependência em realizar as atividades essenciais para uma vida independente (Rubenstein *et al.*, 1988). As atividades mais estudadas são classificadas como atividades de vida diária (AVDs) e atividades instrumentais de vida diária (AIVDs). As AVDs são as tarefas necessárias para o auto cuidado como tomar banho, trocar de roupa, usar o banheiro, realizar transferência e alimentar (Katz *et al.*, 1963). As tarefas que permitem a vida independente em comunidade como fazer compras, telefonar, utilizar o transporte, realizar tarefas domésticas, preparar uma refeição e cuidar do próprio dinheiro são chamadas atividades instrumentais de vida diária (AIVDs) (Lawton & Brody, 1969).

Estima-se que 20 a 30% dos idosos maiores de 70 anos que vivem em comunidade convivam com alguma incapacidade em AVDs e/ou AIVDs (Fried *et al.*, 2004). Em sua maioria, ela é resultado de doenças clínicas e alterações fisiológicas do envelhecimento associadas a fatores sociais, econômicos e comportamentais, bem como ao acesso aos serviços de saúde. Aproximadamente metade dos casos de incapacidade se desenvolve de maneira crônica e progressiva, em associação com a gravidade de doenças, comorbidades e fragilidade. Na outra metade ela é determinada por eventos catastróficos como acidente vascular encefálico ou fratura de fêmur (Ferruci *et al.*, 1996).

Alguns estudos tem mostrado que a incapacidade em idosos pode ser prevenida através de programas de intervenção (Fiatrone *et al.*, 1994, Fried & Guralnik, 1997, Stuck *et al.*, 1997 e 1999 e Tinetti *et al.*, 1994), o que desperta um grande interesse na identificação do grupo de idosos com maior risco de adquirir incapacidades ao longo da vida.

Vários fatores podem contribuir para o desenvolvimento da incapacidade funcional, podendo ser classificados em: 1) Fatores predisponentes – existentes antes do processo de incapacidade ser instalado como características demográficas, sociais, estilo de vida, ambiente e fatores genéticos; - 2) fatores intra-individuais – mudanças no estilo de vida e comportamento que alteram o curso natural da doença, atributos psicossociais, maneiras de lidar com as dificuldades e modificação das atividades; - 3) Fatores extra-individuais – acesso a serviços de saúde e reabilitação, acesso a medicamentos, dispositivos assistivos, suporte social e adaptação de ambiente (Verbrugge & Jette, 1994 e Giacomini, 2008).

A funcionalidade global é a base do conceito de saúde do idoso. O declínio funcional e a incapacidade ocorrem quando há perda da autonomia ou da independência, restringindo a participação social do indivíduo. A independência e a autonomia, por sua vez, estão intimamente relacionadas ao funcionamento integrado de vários sistemas funcionais, e entre eles a cognição e a mobilidade são fundamentais (Moraes, 2012).

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Avaliar a influência do polimorfismo da apolipoproteína E no desempenho funcional em uma população de idosos residentes na comunidade.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- Verificar a associação entre o genótipo da apolipoproteína E e medidas de incapacidade funcional, considerando os potenciais fatores de confusão.
- Verificar a associação entre o genótipo da apolipoproteína E e um fenótipo caracterizado por ausência de qualquer dificuldade ao realizar atividades básicas e instrumentais de vida diária e tarefas relacionadas a mobilidade.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Área e população do estudo

O município de Bambuí está localizado na mesorregião centro-oeste do Estado de Minas Gerais, a 215 km da capital Belo Horizonte, sendo que na época de realização do estudo (1997) possuía cerca de 15.000 habitantes. Essa população tinha como características principais a baixa taxa de migração, o baixo nível de escolaridade, a baixa renda e o fato de ter sido uma área endêmica para doença de Chagas. Em relação ao perfil de mortalidade, o acidente vascular encefálico era a principal causa de morte nessa população, seguido da doença de Chagas, doença arterial coronariana e doença pulmonar obstrutiva crônica (Lima-Costa *et al.*, 2000 e 2011).

Os participantes da Coorte de Idosos de Bambuí foram identificados por meio de um censo realizado na cidade, entre novembro e dezembro de 1996. Nessa ocasião, todos os 1742 residentes com idade maior ou igual a 60 anos foram selecionados para participarem da linha de base do estudo. Desses, 1606 (92,2%) foram entrevistados, 1496 (85,9%) foram examinados e em 1408 (80,8%) foi realizada a genotipagem da apolipoproteína E.

O Projeto Bambuí foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Oswaldo Cruz no Rio de Janeiro, sendo que todos os participantes do estudo assinaram consentimento livre e esclarecido.

### 4.2 Avaliação funcional dos participantes do estudo

A incapacidade funcional foi avaliada considerando as atividades básicas de vida diária (AVD), as atividades instrumentais de vida diária (AIVD) e a mobilidade.

A avaliação de AVDs foi baseada em perguntas referentes ao grau de dificuldade para tomar banho, vestir roupa, realizar transferência e alimentar sozinho. Idosos que eram capazes de realizar tais tarefas, ainda que com algum grau de dificuldade, foram consideradas independente para AVDs. As AIVDs foram avaliadas pelas perguntas referentes a capacidade de fazer compras sozinho, administrar seu dinheiro, realizar trabalhos domésticos e preparar seu próprio alimento. Da mesma forma, aqueles que conseguiam realizar as tarefas avaliadas sem ajuda foram considerados independentes para AIVDs.

A mobilidade foi avaliada por perguntas referentes a capacidade de caminhar 2 ou 3 quarteirões, subir degraus, inclinar, agachar e ajoelhar, levantar ou carregar peso de 5 kg, caminhar de um quarto a outro, levantar da cadeira sem apoio e se locomover sem auxílio de órtese. Foram considerados indivíduos sem comprometimento em mobilidade aqueles capazes de realizar todas essas tarefas.

A prevalência de incapacidade foi avaliada para as três dimensões consideradas (AVDs, AIVDs e mobilidade). Posteriormente, os idosos foram classificadas quanto ao número de tarefas que não conseguiram realizar (nenhuma, uma, duas ou mais) em cada grupo (AVDs, AIVDs e mobilidade).

Em outra análise, os idosos que, além de serem capazes de realizar todas as tarefas relacionadas a AVDs, AIVDs e mobilidade, não apresentavam nenhum grau de dificuldade ao realizá-las foram considerados idosos com “envelhecimento bem sucedido” e foram comparados àqueles que apresentavam algum grau de dificuldade em pelo menos um dos quesitos avaliados.

#### 4.3 Extração do DNA genômico e genotipagem da apoE.

O DNA genômico foi extraído das amostras de sangue utilizando-se o kit de extração de DNA Wizard (Promega – Madison, Wisconsin, EUA). O DNA extraído foi armazenado a -70° C até o uso.

Para a genotipagem da apoE as amostras de DNA foram submetidas à amplificação pela reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando como primer forward 5' TAA GCT TGG CAC GGC TGT CCA AGG A 3' e como primer reverse 5' ACA GAA TTC GCC CCG GCC TGG TAC AC 3'. As misturas para PCR foram submetidas a uma desnaturação inicial de cinco minutos a 95°C, seguida de 35 ciclos de amplificação com anelamento a 60°C por um minuto, extensão a 72°C por dois minutos e desnaturação a 95°C por um minuto e, por fim, por uma extensão final a 72°C por dez minutos.

A sequência de DNA amplificada foi submetida à técnica de polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição ("restriction fragment length polymorphism" - RFLP), com digestão com 10 unidades da enzima *HhaI*, a 37°C “overnight” (Hixson & Vernier, 1990). Essa enzima cliva o DNA sempre que encontra a sequência GCGC. Para o alelo ε4, existem 6 sítios de clivagem, determinando 7 fragmentos de DNA. Na apoE3 existe a substituição da arginina pela cistina na

posição 112 alterando um dos sítios de clivagem que deixa de ter a sequência GCGC e passa a ter a sequência GTGC. Assim, a enzima *HhaI* não consegue clivar o DNA nesse ponto e temos apenas 6 fragmentos de DNA. A apoE2 além da substituição da arginina por cistina na posição 112 tem essa mesma substituição na posição 158 alterando o último sítio de clivagem. Diferenças nos sítios de clivagens determinam fragmentos de restrição com diferentes números de pares de base (pb) permitindo a genotipagem da apoE. A visualização dos fragmentos de restrição foi feita após corrida em géis de agarose a 4%, tratamento com brometo de etídio e visualização com luz ultravioleta.

Os fragmentos de restrição gerados pelos sítios polimórficos da *HhaI* permitiram a genotipagem da apoE. O genótipo  $\epsilon 2/\epsilon 2$  apresentava fragmentos com 91 e 83 pb, o  $\epsilon 3/\epsilon 3$  fragmentos com 91, 48 e 35 pb, o  $\epsilon 4/\epsilon 4$  fragmentos com 72, 48 e 35 pb, o  $\epsilon 2/\epsilon 3$  fragmentos com 91, 83 e 48 pb o  $\epsilon 2/\epsilon 4$  fragmentos com 91, 83, 72 e 48 pb e o  $\epsilon 3/\epsilon 4$  fragmentos com 91, 72 e 48 pb. A avaliação dos fragmentos de restrição foi feita por comparação com um padrão de DNA de 100 pb.

Considerando os seis genótipos possíveis para o polimorfismo da apoE ( $\epsilon 2\epsilon 2$ ,  $\epsilon 3\epsilon 3$ ,  $\epsilon 4\epsilon 4$ ,  $\epsilon 2\epsilon 3$ ,  $\epsilon 2\epsilon 4$  e  $\epsilon 3\epsilon 4$ ), os indivíduos foram classificados em três grupos: i) portadores do alelo  $\epsilon 3$  ( $\epsilon 3\epsilon 3$ ), ii) portadores do alelo  $\epsilon 2$  ( $\epsilon 2\epsilon 2$ ,  $\epsilon 2\epsilon 3$ ), iii) portadores do alelo  $\epsilon 4$  ( $\epsilon 4\epsilon 4$ ,  $\epsilon 4\epsilon 3$ ). Em todas as análises o genótipo homocigoto ( $\epsilon 3\epsilon 3$ ) foi considerado como grupo de referência. Além disso, a população também foi dividida quanto à presença ou não do alelo  $\epsilon 4$ .

#### 4.4 Variáveis utilizadas para ajustamento

Variáveis demográficas como a idade, sexo, cor da pele e escolaridade e variáveis que apresentavam relação direta tanto com o genótipo da apolipoproteína E quanto com a incapacidade funcional como presença de incapacidade cognitiva, tabagismo, hipertensão, diabetes, doença arterial coronariana (DAC) considerando angina e/ou infarto, passado de acidente vascular encefálico (AVE) e níveis de HDL, LDL e triglicérides foram selecionadas para ajustamento no modelo de regressão logística.

O Mini-Exame do Estado Mental foi utilizado para avaliação da presença de incapacidade cognitiva. Estudo prévio realizado nessa população definiu um ponto de corte utilizando a distribuição de quartis. O escore menor que 22 correspondeu ao quartil inferior e foi considerado o ponto de corte (Castro-Costa *et al.*, 2008).

Foram considerados tabagistas os indivíduos que relataram ter fumado no mínimo 100 cigarros durante a vida e continuavam fumando no momento da entrevista.

Para avaliação de hipertensão arterial, a pressão arterial (PA) foi medida no mínimo 30 minutos após a última ingestão de cafeína ou cigarro fumado, usando esfigmomanômetros de coluna de mercúrio (Tycos 5097-30, EUA) e estetoscópios Littman Cardiology II (EUA). Foram realizadas três medidas, após cinco minutos de repouso, com intervalos de dois minutos. A pressão arterial foi considerada como a média aritmética da segunda e terceira medidas. Foram considerados hipertensos os idosos que apresentaram valores médios de pressão diastólica maior que 90 mmHg e/ou média de pressão sistólica  $> 140$  mmHg e/ou que referiram o uso de medicamentos anti-hipertensivos.

Os níveis séricos de glicemia de jejum, LDL, HDL e triglicérides foram determinados após um jejum de 12 horas, utilizando um analisador automático (Eclipse Vitalab, Merck, Holanda). Foram considerados diabéticos os idosos que apresentaram glicemia de jejum maior ou igual a 126 mg/dL ou referiram tratamento para a doença.

A história de AVE foi avaliada através de um questionário estruturado no qual o indivíduo responde às seguintes perguntas: a) "Você já teve alguma fraqueza ou paralisia em algum lado do seu rosto/face, um braço ou uma perna, que durou mais de cinco minutos?"; b) "Você já teve perda marcante da visão em um olho ou pronunciado escurecimento ou embaralhamento da visão em ambos os olhos, que durou mais de cinco minutos?"; c) "Você já teve uma grande tonteira ou desmaio que durou mais de cinco minutos?"; d) "Você já teve um período em que você perdeu a fala ou a capacidade de entender o que uma pessoa estava dizendo a você?" ("Plan and operation of the Third National Health and Nutrition Examination Survey", 1988-94, 1994). Também foi considerado o relato de passado de AVE.

A presença DAC foi verificadas pela utilização de instrumento padronizado, o questionário de angina OMS/Rose (Rose, 1962), além de ter sido considerada também a história de diagnóstico médico para infarto.

As entrevistas foram realizadas na residência dos participantes por entrevistadores treinados e foram respondidas pelo próprio idoso ou por um respondente próximo, quando havia impossibilidade por motivos de saúde. A avaliação da pressão arterial e coleta de amostras de sangue para análises

bioquímicas e extração de DNA foram realizadas na clínica de campo do projeto. Para os exames bioquímicos, os participantes foram orientados a realizarem jejum mínimo de 12 horas. As amostras foram centrifugadas, refrigeradas e, posteriormente, encaminhadas ao Laboratório de Epidemiologia e Antropologia Médica do Centro de Pesquisas René Rachou/FIOCRUZ em Belo Horizonte (Lima-Costa *et al.*, 2011)

#### 4.5 Análise dos dados

Primeiramente foi realizada a análise descritiva das características dos participantes do estudo, além do genótipo da apoE e das atividades consideradas na avaliação das AVDs, AIVDs e mobilidade.

A existência de associação entre as variáveis dependentes (AVDs, AIVDs e mobilidade) e os grupos de genótipos (ou a presença do alelo  $\epsilon 4$ ) foi avaliada pelo cálculo do *odds ratio* e respectivos intervalos de confiança (95%), utilizando modelo de regressão logística. Essa análise foi ajustada pelas variáveis de ajustamento descritas anteriormente (idade, sexo, cor da pele, escolaridade, incapacidade cognitiva, tabagismo, hipertensão, diabetes, DAC, AVE, HDL, LDL e triglicérides). O nível de significância adotado na testagem de hipóteses de associação foi de 5%.

Essa mesma análise também foi realizada considerando como variável resposta o fenótipo de “envelhecimento bem sucedido”. Todos os modelos logísticos gerados foram adequados segundo a estatística de Hosmer-Lemeshow e técnicas de análise gráfica de resíduos.

Foi utilizada a versão 10.0 do programa Stata (Stata Corporation, College Station, Texas) para a análise estatística dos dados.

## 5 RESULTADOS

Dos 1606 indivíduos que participaram do BHAS, 1408 (80,8%) foram genotipados para os polimorfismos do gene da apolipoproteína E e foram incluídos no presente estudo. A Tabela 1 descreve as principais características dessa população.

Pode-se observar que a população estudada tem uma média de idade de  $69,1 \pm 7,1$  anos e é composta predominantemente por mulheres (60,4%). É importante notar também que se trata de uma população com baixa escolaridade (65,3% tem menos de quatro anos de ensino formal). Em relação ao genótipo da apolipoproteína E, existe uma frequência maior do genótipo  $\epsilon 3/\epsilon 3$  (63,3%), seguido do  $\epsilon 3/\epsilon 4$  (22,0%) e  $\epsilon 2/\epsilon 3$  (11,4%). Os homozigotos  $\epsilon 4/\epsilon 4$  corresponderam a 1,8% da amostra.

As tabelas 2 e 3 mostram a prevalência de incapacidade para cada domínio funcional avaliado e o número de tarefas comprometidas em AVDs, AIVDs e mobilidade, respectivamente. Observa-se que 8,3% dos idosos apresentavam incapacidade em pelo menos uma das AVDs avaliadas. A incapacidade para tomar banho (6,9%) e vestir roupa (3,8%) foram as mais frequentes.

Apenas 64,9% dos idosos foram considerados totalmente independente para AIVDs. As tarefas com maiores prevalências de incapacidade foram fazer compras (31,9%) e realizar tarefas domésticas (9,0%). Entre os indivíduos com comprometimento em AIVDs, a maioria apresentava comprometimento em apenas uma tarefa (24,2%). Apenas 11,0% apresentavam incapacidade em duas ou mais tarefas avaliadas.

Observa-se que 25,1% dos idosos do estudo tinham algum comprometimento na mobilidade, sendo que a incapacidade para inclinar, agachar e ajoelhar foi a mais prevalente (15,4%). Também foram prevalentes as incapacidades para levantar ou carregar 5 Kg (12,8%) e subir degraus (10,1%). No caso da mobilidade, ao contrário do que foi visto para AIVDs, a incapacidade em realizar mais de uma tarefa (13,5%) foi mais comum quando comparada a incapacidade em uma única tarefa (11,6%).

A associação entre os genótipos da apolipoproteína E e a incapacidade funcional para tarefas relacionadas a AIVDs, AVDs e mobilidade foi verificada através de modelos de regressão logística e os resultados não ajustados e ajustados pelas variáveis de confusão são apresentados nas Tabelas 4

e 5. Foi observada uma associação da presença do alelo  $\epsilon 4$  com um melhor desempenho nas tarefas relacionadas a mobilidade, mesmo após ajuste pelos fatores de confusão considerados, tanto quando comparado com o genótipo de referência  $\epsilon 3/\epsilon 3$  (OR=0,71; IC95%=0,50-1,00) (Tabela 4) quanto quando comparado com a população que não apresentava esse alelo (OR=0,69; IC95%=0,49-0,97) (Tabela 5).

Foi testada também a associação dos polimorfismos da apolipoproteína E com a independência para realizar todas as tarefas consideradas na avaliação de AVD, AIVDs e mobilidade. A Tabela 6 mostra os resultados da associação desse fenótipo de envelhecimento livre de incapacidades ou “envelhecimento bem sucedido” com os genótipos da apolipoproteína E. Houve uma associação estatisticamente significativa entre o que foi considerado um fenótipo de “envelhecimento bem sucedido” e a presença do alelo  $\epsilon 4$  na população do estudo (OR=1,41; IC95%=1,02-1,94). Os genótipos  $\epsilon 3/\epsilon 4$  e  $\epsilon 4/\epsilon 4$  determinaram uma chance cerca de 40% maior de apresentar um “envelhecimento bem sucedido” quando comparado com o genótipo de referência ( $\epsilon 3/\epsilon 3$ ). Mesmo quando ajustado pela idade e demais variáveis de confusão a associação foi mantida. Chama atenção que, excluindo-se a avaliação de mobilidade, essa análise perde a significância, evidenciando que a associação observada acontece entre a presença do alelo  $\epsilon 4$  e os indicadores de mobilidade nessa população (dados não mostrados).

Tabela 1 – Características dos participantes do estudo. Linha de base da Coorte de Idosos de Bambuí.

Característica	Frequência ou média
Idade em anos, média ( $\pm$ DP)	69,1 ( $\pm$ 7,1)
Sexo, n (%)	
Homens	557 (39,6)
Mulheres	851 (60,4)
Cor da pele, n (%)	
Branca	849 (60,3)
Morena, mulata ou negra	559 (39,7)
Anos de estudo, n (%)	
0 a 3	883 (65,3)
4 ou mais	470 (34,7)
Mini-mental < 22, n (%)	282 (20,5)
Tabagismo atual, n (%)	245 (18,1)
Hipertensão, n (%)	862 (61,3)
Diabetes, n (%)	198 (14,1)
HDL, média ( $\pm$ DP)	49,2 ( $\pm$ 15,1)
LDL, média ( $\pm$ DP)	155,0 ( $\pm$ 45,4)
Triglicérides, média ( $\pm$ DP)	151,1 ( $\pm$ 100,3)
Angina, n (%)	123 (8,8)
Infarto, n (%)	70 (5,0)
AVE, n (%)	52 (3,7)
Genótipo apoE, n (%)	
$\epsilon$ 2/ $\epsilon$ 2	1 (0,1)
$\epsilon$ 2/ $\epsilon$ 3	161 (11,4)
$\epsilon$ 2/ $\epsilon$ 4	20 (1,4)
$\epsilon$ 3/ $\epsilon$ 3	892 (63,3)
$\epsilon$ 3/ $\epsilon$ 4	309 (22,0)
$\epsilon$ 4/ $\epsilon$ 4	25 (1,8)

Tabela 2 - Prevalência de incapacidade funcional na amostra do estudo. Linha de base da Coorte de Idosos de Bambuí.

Domínios funcionais avaliados	n (%)
AVDs	
Tomar banho	96 (6,9)
Vestir roupa	53 (3,8)
Realizar transferência	21 (1,5)
Alimentar-se	18 (1,3)
AIVDs	
Fazer compras	448 (31,9)
Administrar finanças	87 (6,2)
Realizar tarefas domésticas	126 (9,0)
Preparar o próprio alimento	117 (8,3)
Mobilidade	
Caminhar 2 ou 3 quarteirões	100 (7,1)
Subir degraus	142 (10,1)
Inclinar, agachar e ajoelhar	216 (15,4)
Levantar ou carregar peso de 5 Kg	180 (12,8)
Caminhar de um quarto a outro	21 (1,5)
Levantar da cadeira sem apoio	75 (5,3)
Deambular sem auxílio de órtese	76 (5,4)

Tabela 3 - Grau de incapacidade funcional avaliado pelo número de tarefas comprometidas em AVDS, AIVDs e mobilidade. Linha de base da Coorte de Idosos de Bambuí.

Número de tarefas comprometidas	Frequência (%)
AVDS	
Nenhum	1.289 (91,7)
1 tarefa	75 (5,3)
2 ou mais	42 (3,0)
AIVDs	
Nenhum	912 (64,9)
1 tarefa	340 (24,2)
2 ou mais	154 (11,0)
Mobilidade	
Nenhum	1.052 (74,9)
1 tarefa	163 (11,6)
2 ou mais	190 (13,5)

Tabela 4 - Associação entre genótipos da apolipoproteína E e incapacidade funcional para tarefas relacionadas a mobilidade, AIVDs e AVDs. Linha de base da Coorte de Idosos de Bambuí.

Incapacidade / ApoE	N (%)	OR (IC95%) Não ajustado	p	OR (IC95%) Ajuste por idade e sexo	p	OR (IC95%) Ajuste por idade, sexo, cor da pele e escolaridade	p	OR (IC95%) Ajuste por idade, sexo, cor da pele, escolaridade, presença de incapacidade cognitiva, DAC e AVE	p	OR (IC95%) Ajuste por idade, sexo, cor da pele, escolaridade, presença de incapacidade cognitiva, DAC, AVE, tabagismo, hipertensão, diabetes, HDL, LDL e triglicérides	p
<b>Mobilidade</b>											
ε2	43 (26,54)	0,97 (0,67 a 1,42)	0,894	1,03 (0,70 a 1,52)	0,869	1,11 (0,75 a 1,65)	0,607	1,16 (0,77 a 1,75)	0,473	1,23 (0,80 a 1,87)	0,346
ε3	241 (27,05)	1,00 (referência)		1,00 (referência)		1,00 (referência)		1,00 (referência)		1,00 (referência)	
ε4	68 (20,42)	0,69 (0,51 a 0,94)	0,018	0,69 (0,50 a 0,94)	0,018	0,71 (0,51 a 0,98)	0,035	0,70 (0,50 a 0,97)	0,035	0,71 (0,50 a 1,00)	0,050
<b>AIVDs</b>											
ε2	61 (37,65)	1,13 (0,80 a 1,59)	0,501	1,23 (0,86 a 1,76)	0,263	1,19 (0,82 a 1,72)	0,363	1,26 (0,86 a 1,86)	0,237	1,28 (0,86 a 1,90)	0,229
ε3	311 (34,90)	1,00 (referência)		1,00 (referência)		1,00 (referência)		1,00 (referência)		1,00 (referência)	
ε4	116 (34,83)	1,00 (0,77 a 1,30)	0,982	1,03 (0,78 a 1,35)	0,855	1,01 (0,76 a 1,34)	0,929	1,04 (0,78 a 1,40)	0,783	1,07 (0,78 a 1,44)	0,677
<b>AVDs</b>											
ε2	14 (8,64)	0,97 (0,54 a 1,76)	0,926	1,05 (0,58 a 1,93)	0,863	1,04 (0,56 a 1,95)	0,893	1,10 (0,57 a 2,12)	0,767	1,01 (0,51 a 2,00)	0,968
ε3	79 (8,87)	1,00 (referência)		1,00 (referência)		1,00 (referência)		1,00 (referência)		1,00 (referência)	
ε4	23 (6,91)	0,76 (0,47 a 1,24)	0,271	0,76 (0,47 a 1,25)	0,283	0,70 (0,42 a 1,16)	0,165	0,63 (0,35 a 1,12)	0,119	0,61 (0,33 a 1,11)	0,104

Tabela 5 - Associação presença do alelo E4 e incapacidade funcional para tarefas relacionadas a mobilidade, AVDs e AIVDs. Linha de base da Coorte de Idosos de Bambuí.

Incapacidade / ApoE	n (%)	OR (IC95%) Não ajustado	p	OR (IC95%) Ajuste por idade e sexo	p	OR (IC95%) Ajuste por idade, sexo, cor da pele e escolaridade	p	OR (IC95%) Ajuste por idade, sexo, cor da pele, escolaridade, presença de incapacidade cognitiva, DAC e AVE	p	OR (IC95%) Ajuste por idade, sexo, cor da pele, escolaridade, presença de incapacidade cognitiva, DAC, AVE, tabagismo, hipertensão, diabetes, HDL, LDL e triglicérides	p
<b>Mobilidade</b>											
Sem ε4	284 (26,97)	1,00 (referência)		1,00 (referência)		1,00 (referência)		1,00 (referência)		1,00 (referência)	
ε4	68 (20,42)	0,69 (0,52 a 0,94)	0,017	0,68 (0,50 a 0,93)	0,015	0,70 (0,51 a 0,96)	0,025	0,68 (0,49 a 0,95)	0,022	0,69 (0,49 a 0,97)	0,030
<b>AIVDs</b>											
Sem ε4	372 (35,33)	1,00 (referência)		1,00 (referência)		1,00 (referência)		1,00 (referência)		1,00 (referência)	
ε4	116 (34,83)	0,98 (0,76 a 1,27)	0,870	0,99 (0,76 a 1,30)	0,963	0,99 (0,75 a 1,30)	0,925	1,01 (0,75 a 1,34)	0,970	1,03 (0,77 a 1,38)	0,854
<b>AVDs</b>											
Sem ε4	93 (8,83)	1,00 (referência)		1,00 (referência)		1,00 (referência)		1,00 (referência)		1,00 (referência)	
ε4	23 (6,91)	0,77 (0,48 a 1,23)	0,270	0,76 (0,47 a 1,23)	0,261	0,69 (0,42 a 1,14)	0,152	0,62 (0,35 a 1,10)	0,102	0,61 (0,34 a 1,10)	0,098

Tabela 6 - Associação entre genótipos da apolipoproteína E e fenótipo de envelhecimento bem sucedido. Linha de base da Coorte de Idosos de Bambuí.

ApoE	Envelhecimento bem sucedido n(%)	OR (IC95%) Não ajustado	p	OR (IC95%) Ajuste por idade e sexo	p	OR (IC95%) Ajuste por idade, sexo, cor da pele e escolaridade	p	OR (IC95%) Ajuste por idade, sexo, cor da pele, escolaridade, presença de incapacidade cognitiva, DAC e AVE	p	OR (IC95%) Ajuste por idade, sexo, cor da pele, escolaridade, presença de incapacidade cognitiva, DAC, AVE, tabagismo, hipertensão, diabetes, HDL, LDL e triglicérides	p
Genótipo											
ε2	37 (22,84)	1,20 (0,80 a 1,79)	0,384	1,12 (0,74 a 1,70)	0,588	1,16 (0,76 a 1,77)	0,497	1,09 (0,71 a 1,69)	0,686	1,14 (0,73 a 1,78)	0,562
ε3	177 (19,84)	1,00 (referência)		1,00 (referência)		1,00 (referência)		1,00 (referência)		1,00 (referência)	
ε4	86 (25,75)	1,40 (1,04 a 1,88)	0,025	1,38 (1,02 a 1,87)	0,038	1,46 (1,07 a 2,00)	0,018	1,45 (1,05 a 1,99)	0,025	1,44 (1,03 a 2,00)	0,031
Alelo ε4											
Não	214 (20,30)	1,00 (referência)		1,00 (referência)		1,00 (referência)		1,00 (referência)		1,00 (referência)	
Sim	86 (22,75)	1,36 (1,02 a 1,81)	0,036	1,36 (1,01 a 1,82)	0,044	1,43 (1,05 a 1,94)	0,023	1,42 (1,04 a 1,95)	0,027	1,41 (1,02 a 1,94)	0,037

## 6 DISCUSSÃO

Deve-se ressaltar a importância de estudos que buscam uma melhor compreensão do papel do polimorfismo do gene da apolipoproteína E no envelhecimento, uma vez que a maior parte dos trabalhos explora a associação desse gene com doenças, como aquelas relacionadas às condições neurodegenerativas e cardiovasculares, mas poucos estão voltados para a influência desse polimorfismo na funcionalidade. Em idosos, o desempenho funcional é de longe mais importante que a ocorrência de doenças, sendo que o presente estudo considerou o desempenho em tarefas relacionadas a AVDs, AIVDs e mobilidade, caracterizando o fenótipo da funcionalidade dessa população. O principal resultado desse estudo foi o efeito protetor da presença do alelo  $\epsilon 4$  em relação à mobilidade, mesmo após o ajuste pelos principais fatores que poderiam confundir essa associação. Também foi observado que a presença do alelo  $\epsilon 4$  foi significativamente mais prevalente no subgrupo de idosos sem nenhum grau de comprometimento nas tarefas avaliadas para os três domínios.

Os resultados da literatura não são conclusivos sobre a associação entre o genótipo da apoE e a incapacidade funcional. Alguns estudos não mostraram associação significativa entre essas variáveis na população geral (Verghese *et al.*, 2013; Blazer *et al.*, 2001; Lan *et al.*, 2009; Bader *et al.*, 1998) ou evidenciaram relação entre a presença do alelo  $\epsilon 4$  e um pior desempenho funcional apenas em um dos sexos (Verghese *et al.*, 2013; Blazer *et al.*, 2001). O alelo  $\epsilon 4$  foi relacionado com pior funcionalidade em dois estudos (Melzer *et al.*, 2005; Albert *et al.*, 1995), mas se mostrou como fator de proteção para AVD em outro (Kulminski *et al.*, 2008). Em apenas uma população, a presença do alelo  $\epsilon 2$  foi positivamente associada ao pior desempenho em AIVDs (Kulminski *et al.*, 2008). Dessa forma, apesar das diferenças metodológicas para avaliação da funcionalidade observada nesses estudos, os resultados evidenciam uma forte inconsistência da associação entre o genótipo da apoE e a funcionalidade em idosos, chamando atenção para o fato que a maioria desses estudos foram realizados em países desenvolvidos.

O primeiro estudo a avaliar a associação do polimorfismo da apolipoprotina E com incapacidade em idosos foi o estudo de Albert que avaliou 218 idosos residentes na comunidade que não apresentavam critérios para demência ou doença de Parkinson e nem tinham passado de AVE. Os indivíduos foram recrutados para o estudo por três fontes: amostra aleatória de idosos da comunidade, registro comunitários de idosos que solicitaram serviços médicos ou sociais e indivíduos que foram avaliados no Columbia-Presbyterian Memory Disorder Clinic. A avaliação

funcional foi realizada utilizando a escala de Schwab e England para AVD, o Blessed Dementia Rating Scale (BDRS, parte 1) e o índice de Barthel. Nesse estudo a média do escore na escala de Schwab e England para AVD foi significativamente menor entre os portadores do alelo  $\epsilon 4$  (87,3 x 80,9,  $p < 0,05$ ). Metade (50%) dos não-portadores do alelo  $\epsilon 4$  relataram independência completa para AVDs comparado com somente 28% no grupo portador de  $\epsilon 4$  ( $p < 0,01$ ). Apesar de ser um estudo pequeno com apenas 60 indivíduos portadores de pelo menos um alelo  $\epsilon 4$ , esse foi o primeiro estudo que sugeriu a possibilidade da apolipoproteína E estar ligada ao desempenho funcional de idosos por uma via diferente da cognição (Albert *et al.*, 1995).

Em 1998, Bader e colaboradores publicaram um estudo caso-controle realizado entre os participantes do estudo italiano “Val Vibrata Aging Project”. Foram comparados 100 octo e nonagenários independentes e “saudáveis”, 62 octo e nonagenários com alto grau de incapacidade, definida pela escala de Katz, e 91 controles adultos saudáveis. Para a inclusão no grupo de “idosos saudáveis” foi considerado: 1) idade > 80 anos, 2) origem no vale Vibrata ou região de Abruzzo; 3) ausência de doença cardiovascular, respiratória, neurológica, neoplasia, diabetes, demência, artrite incapacitante, depressão maior ou alcoolismo; 4) ausência de alterações em parâmetros bioquímicos do sangue, análise de urina ou marcadores neoplásicos sugestivos de doença oculta e 5) ausência de incapacidade. Em cada grupo foi avaliado o genótipo da apolipoproteína E e não se evidenciou nenhuma diferença estatisticamente significativa na frequência do alelo  $\epsilon 4$  entre os grupos entretanto o alelo  $\epsilon 4$  foi mais prevalente em octo e nonagenários “saudáveis” (13,97%) comparado com idosos com incapacidades (7,4%) e controles adultos (5,95%). Potenciais fatores de confusão não foram considerados para ajuste. Os autores chamam atenção para a baixa frequência do alelo  $\epsilon 4$  (5,1%) e pelo consumo da típica “dieta Mediterrânea” por essa população, com pouca gordura e colesterol, o que poderia minimizar o efeito do genótipo da apoE (Bader *et al.*, 1998).

Em 2001, Blazer, Fillenbaum e Burchett avaliaram a associação entre a presença do alelo  $\epsilon 4$  e o declínio funcional, avaliado pela combinação de indicadores relacionados à AVD, AIVD e saúde física, em uma coorte de idosos americanos que participaram do “Duke Established Population for Epidemiologic Studies of the Elderly” (EPESE) e foram avaliados entre a terceira (1992-93) e quarta (1996-97) ondas desse estudo. 2550 idosos foram seguida por 4 anos, 1999 com informações a respeito do genótipo da apolipoproteína E. Nesse estudo a avaliação funcional utilizou a escala de Katz modificada para AVDs, a escala modificada da Old American Resources and Services (OARS) para AIVDs e escala abreviada de Rosow Breslau para saúde física. A idade avançada, sexo feminino, raça afro-americana, baixa escolaridade, pior condição de saúde, pior desempenho

cognitiva, sintomas depressivos e limitação funcional na terceira onda do estudo estiveram relacionados a um pior desempenho funcional quatro anos depois, entretanto, a presença do alelo  $\epsilon 4$  não foi associado ao declínio funcional (OR 1,16, IC95% 0,92-1,47). Mesmo em uma análise multivariada, considerando todas as possíveis variáveis de confusão, a associação do alelo  $\epsilon 4$  com o declínio funcional não foi observada. Houve, no entanto, uma interação significativa desse alelo com o sexo, tendo sido mais frequente o declínio funcional entre as mulheres portadoras do alelo  $\epsilon 4$  (Blazer *et al.*, 2001).

É interessante notar que na quanto se fazia uma análise transversal do associação do alelo  $\epsilon 4$  com status funcional na terceira onda desse do estudo EPESE, que foi considerada linha de base no trabalho de Blazer, esse alelo parecia conferir uma proteção contra o declínio funcional (Blazer *et al.*, 2001), achado também observado em nosso estudo.

Entre idosos participantes do “Longitudinal Aging Study Amsterdam” (LASA), que utilizou questionário (perguntas sobre capacidade de caminhar 5 minutos e subir 15 degraus sem parar) e medidas diretas (avaliação da velocidade de marcha e tempo necessário para levantar e sentar em uma cadeira cinco vezes sem ajuda das mãos) para avaliação da funcionalidade. Na linha de base do estudo, a presença do alelo  $\epsilon 4$  (em comparação aos homocigotos para  $\epsilon 3$ ) esteve significativamente associada ao pior desempenho nas medidas diretas, mas não nas auto referidas. Na análise longitudinal (cerca de 6 anos de acompanhamento) o alelo  $\epsilon 4$  aumentou o risco para óbito ou pior desempenho no teste da cadeira, mas não foi associado aos outros desfechos analisados, considerando o ajuste por fatores de confusão (Melzer *et al.*, 2005).

De forma semelhante, o estudo SEBAS (“Social Environment and Biomarkers of Aging Study”), realizado em Taiwan, também não observou associação significativa entre a presença dos alelos  $\epsilon 2$  e  $\epsilon 4$ , em comparação ao grupo  $\epsilon 3$ , e o declínio funcional em AIVDs, AVDs ou mobilidade, considerando o ajustamento pelo índice de massa corporal, atividade física, incapacidade cognitiva, doença cardíaca e AVE (Lan *et al.*, 2009).

Mais recentemente, um estudo avaliando 627 idosos americanos participantes do “Einstein Aging Study” acompanhados por cerca de três anos, não mostrou associação do alelo  $\epsilon 4$  com incapacidade para AVD ou declínio da velocidade de marcha na população geral. Por outro lado, os homens portadores do alelo  $\epsilon 4$  apresentaram maior risco para esses dois eventos durante o período de

acompanhamento do estudo (Verghese *et al.*, 2013). Entre idosos de Bambuí o sexo não apresentou interação significativa com o genótipo da ApoE na associação com os três desfechos avaliados.

Os resultados obtidos entre idosos residentes em Bambuí são congruentes com os dados do “National Long-Term Care Survey” (NLTC), importante estudo conduzido com 1805 idosos norte americanos, que mostrou resultados opostos aos estudos prévios sobre a associação entre o polimorfismo da apoE e a presença de incapacidades. Entre mulheres idosas com o genótipo  $\epsilon 4/\epsilon 4$  foi observada menor chance de apresentar incapacidades em AVDs (OR = 0,19; IC = 0,40-0,99). Por outro lado, homens com o genótipo  $\epsilon 2/\epsilon 3$  apresentaram maior chance de incapacidade para AIVDs (OR = 2,33; IC = 1,28-4,25). Nesse estudo não houve associação de polimorfismos da apoE com a mortalidade (Kulminski *et al.*, 2008). Portanto, esse era, até então, o único estudo que havia mostrado um efeito positivo do alelo  $\epsilon 4$  no desempenho funcional de idosos, como foi também observado em Bambuí para o domínio mobilidade.

O alelo  $\epsilon 4$  é considerado por muitos autores o alelo ancestral que ao longo da evolução humana foi sendo substituído pelo alelo  $\epsilon 3$ . Para explicar a persistência do alelo  $\epsilon 4$  na população humana, foi sugerido que os efeitos deletérios da apoE4 podem ter sido compensados em uma era de alta prevalência de doenças infecciosas por um possível aumento na resistência do hospedeiro, mas seus efeitos adversos foram ampliados com o atual aumento da longevidade (Finch & Morgan, 2007).

Pode-se observar em várias populações nas quais a incidência de doenças infecto-parasitárias ainda é muito elevada, que o alelo  $\epsilon 4$  é muito prevalente. Em negros africanos da Nigéria a prevalência de  $\epsilon 4$  é 29,6% (Sephernia *et al.*, 1988), na África sub-Saariana 29,1% (Hallman *et al.*, 1991) e nos Khoi-San da África do Sul 37%. (Sandholzer *et al.*, 1995). Portanto, parece que em regiões de baixo desenvolvimento humano e menor expectativa de vida, a presença de  $\epsilon 4$  pode ser vantajosa. Em Bambuí, 25,3% dos idosos apresentaram pelo menos um alelo  $\epsilon 4$ , chamando atenção também para a elevada prevalência de infecção pelo *Trypanosoma cruzi* (38,1%) nessa população (Lima-Costa *et al.*, 2011), apesar da doença de Chagas não ter sido associada ao genótipo da apoE (dados não mostrados). Pode-se supor que esses idosos também apresentavam fatores de risco para diversas outras doenças parasitárias no passado.

Estudos conduzidos em favelas do Ceará, nordeste brasileiro, mostraram que a diarreia e parasitoses intestinais em crianças de até dois anos são menos frequentes na presença do alelo  $\epsilon 4$ , sugerindo um papel protetor desse alelo contra esses agravos. Os mesmos autores também verificaram que entre

as crianças com elevada frequência de diarreia nos dois primeiros anos de vida, aquelas que apresentavam o alelo  $\epsilon 4$  tinham um melhor desempenho cognitivo no futuro (Oriá *et al.*, 2007; 2010).

Portanto, é possível imaginar que o melhor desempenho funcional dos idosos portadores do alelo  $\epsilon 4$  pode ser consequência da reserva funcional acumulada, que por sua vez pode estar ligada maior resistência a eventos estressores externos, ocorridos ao longo da vida, como doenças infecciosas.

O presente estudo, como sendo de delineamento seccional, está sujeito ao viés de sobrevivência, fazendo com que portadores do alelo  $\epsilon 4$  mais “frágeis” não fossem representados na amostra do estudo, uma vez que esse alelo tem sido associado a doença cardiovascular, doença cérebro vascular, doença de Alzheimer e declínio cognitivo. Em Bambuí, no entanto, a distribuição dos alelos da apolipoproteína E não é influenciada pela idade (Fuzikawa *et al.*, 2007) e não se mostrou associada à mortalidade geral nos nove primeiros anos de acompanhamento da coorte (Lima-Costa *et al.*, 2008), o que minimiza a influência desse possível viés na interpretação dos dados apresentados.

Outro ponto importante é a utilização de um instrumento com questões auto referidas para avaliação do desempenho funcional dos idosos, uma vez que estudo anterior mostrou associação entre a presença do alelo  $\epsilon 4$  e um pior desempenho em dois testes de mobilidade, mas não observou nenhuma associação quando a mobilidade foi avaliada por desempenho auto referido (Melzer *et al.*, 2005). Em Bambuí foi utilizado um questionário padronizado que permitiu avaliar quatro tarefas relacionadas à AVD, quatro que avaliaram as AIVDs e sete atividades relacionadas à mobilidade. A ausência de testes e medidas objetivas de mobilidade pode ser, em parte, compensada pelo grau de detalhamento do instrumento de avaliação utilizado.

Os resultados da associação negativa entre a presença do alelo  $\epsilon 4$  e o comprometimento na mobilidade foram reforçados na análise dos idosos considerados como “envelhecimento bem sucedido”, ou seja, aqueles que não apresentavam nenhuma dificuldade em nenhuma das tarefas avaliadas. De forma semelhante, apesar de não ter sido observada associação significativa, entre idosos italianos, o alelo  $\epsilon 4$  foi mais frequente na população considerada saudável, definida nesse estudo como: (1) idade acima de 80 anos; (2) ausência de doença cardiovascular, respiratória, demência, artrite grave, depressão maior ou alcoolismo; (3) ausência de alterações em exames bioquímicos, urinários ou marcadores tumorais e (4) ausência de incapacidade (Bader *et al.*, 1998).

## 7 CONCLUSÃO

O resultado do presente estudo evidenciou o efeito protetor do alelo  $\epsilon 4$  para a mobilidade de uma população idosa residente na comunidade, considerando o ajuste para os potenciais fatores de confusão. Essa evidência foi reforçada pela associação desse alelo com um fenótipo de “envelhecimento bem sucedido”, considerando a ausência de qualquer grau de comprometimento para realização de 15 tarefas relacionadas à AVD, AIVD e mobilidade. Apesar da inconsistência de resultados observados nos estudos prévios, os dados de Bambuí são semelhantes ao que foi observado no NLTCs, estudo norte americano que demonstrou o efeito protetor desse alelo entre mulheres idosas em relação às AVDs (Kulminski *et al.*, 2008). Esse resultado reforça a necessidade de estudos mais detalhados sobre a influência do genótipo da apoE na funcionalidade da população idosa, considerando o possível efeito das características de cada população investigada e incluindo outros genes relacionados ao processo de envelhecimento.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Albert SM, Gurland B, Maestre G, Jacobs DM, Stern Y, Mayeux R. APOE genotype influences functional status among elderly without dementia. *Am J Genet* 1995 Dec 18;60(6):583-7.

Alves LC, Leite IC, Machado CJ. Conceituando e mensurando a incapacidade funcional da população idosa: uma revisão da literatura. *Ciênc Saúde Coletiva* 2008 Ago;13(4):1199-207.

Attia J, Ioannidis JP, Thakkinstian A, McEvoy M, Scott RJ, Minelli C et al. How to use an article about genetic association: B: Are the results of the study valid? *JAMA*. 2009 Jan 14;301(2):191-7. doi: 10.1001/jama.2008.946.

Aviv A. Telomeres and human aging: facts and fibs. *Sci Aging Knowledge Environ*. 2004 Dec 22;2004(51):pe43.

Bader G, Zuliani G, Kostner GM, Fellin R. Apolipoprotein E polymorphism is not associated with longevity or disability in a sample of italian octo and nonagenarians. *Gerontology* 1998;44(5):293-9

Balistreri CR, Candore G, Accardi G, Bova M, Buffa S, Bulati M, et al. Genetics of longevity. Data from the studies on Sicilian centenarians. *Immun Ageing* 2012 Apr 23;9(1):8. doi: 10.1186/1742-4933-9-8.

Barzilai N, Atzmon G, Schechter C, Schaefer EJ, Cupples AL, Lipton R et al. Unique lipoprotein phenotype and genotype associated with exceptional longevity. *JAMA*. 2003 Oct 15; 290(15):2030–40.

Bekaert S, DeMeyer T, Van Oostveldt P. Telomere attrition as ageing biomarker. *Anticancer Res* Jul-Aug;25(4):3011–21.

Bischoff C, Petersen HC, Graakjaer J, Andersen-Ranberg K, Vaupel JW, Bohr VA, et al. No association between telomere length and survival among the elderly and oldest old. *Epidemiology* 2006 Mar;17(2):190–4.

Bladbjerg EM, Andersen-Ranberg K, de Maat MP, Kristensen SR, Jeune B, Gram J, et al. Longevity is independent of common variations in genes associated with cardiovascular risk. *Thromb Haemost* 1999 Sep;82(3):1100–5.

Blanche H, Cabanne L, Sahbatou M, Thomas G. A study of French centenarians: are ACE and APOE associated with longevity? *C R Acad Sci III* 2001 Feb;324(2):129-35.

Blazer DG, Fillenbaum G, Burchett B. The ApoE-E4 Allele and the Risk of Functional Decline in a Community Sample of African-American and White Older Adults. *Journal of Gerontology - J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2001 Dec;56(12):M785-9.

Bluher M, Kahn BB, Kahn CR. Extended longevity in mice lacking the insulin receptor in adipose tissue. *Science* 2003 Jan 24;299(5606):572–4.

Bohr VA, Metter EJ, Harrigan JA, von Kobbe C, Liu JL, Gray MD, et al. Werner syndrome protein 1367 variants and disposition towards coronary artery disease in Caucasian patients. *Mech. Ageing Dev.* 2004 Jul;125(7) 491–6.

Bonafè M, Barbieri M, Marchegiani F, Olivieri F, Ragno E, Giampeiri C, et al. Polymorphic variants of insulin-like growth factor I (IGF-I) receptor and phosphoinositide 3-kinase genes affect IGF-I plasma levels and human longevity: cues for an evolutionarily conserved mechanism of lifespan control. *J Clin Endocrinol Metab* 2003 Jul;88(7),3299–304.

Bonafè M, Barbieri M, Marchegiani F, Olivieri F, Ragno E, Giampieri C et al. Polymorphic variants of insulin-like growth factor I (IGF-I) receptor and phosphoinositide 3-kinase genes affect IGF-I plasma levels and human longevity: cues for an evolutionarily conserved mechanism of life span control. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003 Jul;88(7):3299-304.

Bouthllier D, Sing CF, Davignon J. Apolipoprotein E phenotyping with a single gel method — application to the study of informative matings. *J Lipid Res* 1983 Aug;24(8):1060-9

Boyles JK, Zoellner CD, Anderson LJ, Kosik LM, Pitas RE, Weisgraber KH , et al. A role for apolipoprotein E, apolipoprotein A-I, and low density lipoprotein receptors in cholesterol transport

during regeneration and remyelination of the rat sciatic nerve. *J Clin Invest* 1989 Mar;83(3): 1015–31.

Burt TD, Agan BK, Marconi VC, He W, Kulkarni H, Mold JE et al. 2008. Apolipoprotein (apo) E4 enhances HIV-1 cell entry in vitro, and the APOE  $\epsilon$ 4/ $\epsilon$ 4 genotype accelerates HIV disease progression. *Proc Natl Acad Sci U S A*.2008 Jun 24;105(25):8718-23. doi: 10.1073/pnas.0803526105. Epub 2008 Jun 18.

Buttini M, Masliah E, Yu GQ, Palop JJ, Chang S, Bernardo A et al. Cellular Source of Apolipoprotein E4 Determines Neuronal Susceptibility to Excitotoxic Injury in Transgenic Mice. *Am J Pathol*. 2010 Aug;177(2):563–9. doi: 10.2353/ajpath.2010.090973. Epub 2010 Jul 1.

Campalani E, Allen MH, Fairhurst D, Young HS, Mendonca CO, Burden AD et al. Apolipoprotein E gene polymorphisms are associated with psoriasis but do not determine disease response to acitretin. *Br J Dermatol*. 2006 Feb;154(2):345-52.

Castro E, Ogburn CE, Hunt KE, Tilvis R, Louhija J, Penttinen R, et al. Polymorphisms at the Werner locus: I. Newly identified polymorphisms, ethnic variability of 1367Cys/Arg, and its stability in a population of Finnish centenarians. *Am J Med Genet* 1999 Feb 19;82(5): 399–403.

Castro-Costa E, Lima-Costa MF, Carvalhais S, Firmo JO, Uchoa E. Factors associated with depressive symptoms measured by the 12-item General Health Questionnaire in Community-Dwelling Older Adults (The Bambuí Health Aging Study). *Rev Bras Psiquiatr*. 2008 Jun; 30(2): 104-9.Epub 2008 Apr 28.

Castro-Costa E, Fuzikawa C, Uchoa E, Firmo JO, Lima-Costa MF. Norms for the mini-mental state examination: adjustment of the cut-off point in population-based studies (evidences from the Bambuí health aging study). *Arq Neuropsiquiatr*. 2008 Sep;66(3A): 524-8.

Cauley JA, Eichner JE, Kamboh MI, Ferrell RE, Kuller LH. The apoE allele frequencies in younger (age 42–50) versus older (age 65–90) women. *Genet Epidemiol* 1993;10(1):27–34.

Cauley JA, Zmuda JM, Yaffe K, Kuller LH, Ferrell RE, Wisniewski SR, et al. Apolipoprotein E polymorphism: a new genetic marker of hip fracture risk—the study of osteoporotic fractures. *J Bone Miner Res* 1999 Jul;14(7):1175–81.

Chaimovicz F. A saúde dos idosos brasileiros às vésperas do século XXI: problemas, projeções e alternativas. *Rev Saúde Pública* 1997 Abr;31(2):184-200.

Chasman DI, Kozlowski P, Zee RY, Kwiatkowski DJ, Ridker PM. Qualitative and quantitative effects of APOE genetic variation on plasma C-reactive protein, LDL-cholesterol, and apoE protein. *Genes Immun*. 2006 Apr;7(3):211-9.

Chaves EP, Narayanaswami V. Apolipoprotein E and cholesterol in aging and disease of the brain. *Future Lipidol* 2008 Oct;3(5): 505-30.

Chistensen K, McGue M, Yashin A, Iachine I, Holm NV, Vaupel JW. Genetic and environmental influences on functional abilities in Danish twins aged 75 years and older. *J Gerontol A Med Sci* 2000 Aug;55(8):M446–52.

Christensen K, Gaist D, Vaupel JW, McGue M. Genetic contribution to rate of change in functional abilities among Danish twins aged 75 years or more. *Am J Epidemiol* 2002 Jan 15;155(2):132–9.

Chistensen K, Johnson TE, Vaupel JW. The quest for genetic determinants of human longevity: challenges and insights. *Nat Rev Genet* 2006 Jun;7(6):436-48.

Christiansen L, Bathum L, Andersen-Ranberg K, Jeune B, Christensen K. Modest implication of interleukin-6 promoter polymorphisms in longevity. *Mech Ageing Dev* 2004 May;125(5): 391–5.

Corder EH, Lannfelt L, Viitanen M, Corder LS, Manton KG, Winblad B, et al. Apolipoprotein E genotype determines survival in the oldest old (85 years or older) who have good cognition. *Arch Neurol* 1996 May;53(5):418–22.

Corder EH, Robertson K, Lannfelt L, Bogdanovic N, Eggertsen G, Wilkins J et al., HIV-infected subjects with the E4 allele for APOE have excess dementia and peripheral neuropathy. *Nat Med*. 1998 Oct: 4(10):1182–4.

Danik M, Champagne D, Petit-Turcotte C, Beffert U, Poirier J. Brain lipoprotein metabolism and its relation to neurodegenerative disease. *Crit Rev Neurobiol.* 1999;13(4):357–407.

Davignon J, Gregg RE, Sing CF. Apolipoprotein E polymorphism and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1988 Jan-Feb;8(1):1-21.

De Benedictis G, Carotenuto L, Carrieri G, De Luca M, Falcone E, Rose G et al. Gene/longevity association studies at four autosomal loci (REN, THO, PARP, SOD2). *Eur J Hum Genet.* 1998 Nov-Dec;6(6):534-41.

de Bont N, Netea MG, Demacker PN, Verschueren I, Kullberg BJ, van Dijk KW et al. Apolipoprotein E knock-out mice are highly susceptible to endotoxemia and *Klebsiella pneumoniae* infection. *J Lipid Res.* 1999 Apr;40(4):680 –5.

DeMichele A, Martin AM, Mick R, Gor P, Wray L, Klein-Cabral M, et al. Interleukin-6 -174G→C polymorphism is associated with improved outcome in high-risk breast cancer. *Cancer Res* 2003 Nov 15;63(22):8051–6

Drabe N, Zünd G, Grünenfelder J, Sprenger M, Hoerstrup SP, Bestmann L et al. Genetic predisposition in patients undergoing cardiopulmonary bypass surgery is associated with an increase of inflammatory cytokines. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2001 Sep; 20(3):609–13.

Ferrucci L, Guralnik JM, Simonsick E, Salive ME, Corti C, Langlois J. Progressive versus Catastrophic Disability: A Longitudinal View of the Disablement Process. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 1996 May;51(3):M123-30.

Fiatarone MA, O'Neill EF, Ryan ND, Clements KM, Solares GR, Nelson ME, et al. Exercise training and nutritional supplementation for physical frailty in very elderly people. *N Engl J Med* 1994 Jun 23;330(25):1769-75.

Finch CE, Tanzi RE, Rudolph E. Genetics of aging. *Sci* 1997 Oct 17;278(5337): 407–11.

Finch CE, Morgan TE. Systemic Inflammation, Infection, ApoE Alleles, and Alzheimer Disease: A Position Paper. *Curr Alzheimer Res.* 2007 Apr;4(2):185-9.

Frazer KA, Ballinger DG, Cox DR, Hinds DA, Stuve LL, Gibbs RA et al. A second generation human haplotype map of over 3.1 million SNPs. *Nature.* 2007 Oct 18;449(7164):851-61.

Frederiksen H, Gaist D, Bathum L, Andersen K, McGue M, Vaupel JW, et al. Angiotensin I-converting enzyme (ACE) gene polymorphism in relation to physical performance, cognition and survival-a follow-up study of elderly Danish twins. *Ann Epidemiol* 2003 Jan;13(1):57–65.

Fried LP, Guralnik JM. Disability in older adults: evidence regarding significance, etiology, and risk. *J Am Geriatr Soc* 1997Jan;45(1):92-100.

Fried LP, Ferrucci L, Darer J, Williamson JD, Anderson G. Untangling the Concepts of Disability, Frailty, and Comorbidity: Implications for Improved Targeting and Care. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2004 Mar;59(3):255-63.

Friedman DB, Johnson TE. A mutation in the age-1 gene in *Caenorhabditis elegans* lengthens life and reduces hermaphrodite fertility. *Genetics* 1988 Jan;118(1):75-86.

Frisoni GB, Louhija J, Geroldi C, Trabucchi M. Longevity and the  $\epsilon 2$  allele of apolipoprotein E: the Finnish centenarians study. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2001 Feb;56(2):M75–8.

Fuzikawa AK, Peixoto SV, Taufer 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 Nov;40(11):1429-34.

Garatachea N, Lucia A Genes. Physical fitness and ageing - *Ageing Res Rev.* 2013 Jan;12(1):90-102. doi: 10.1016/j.arr.2012.09.003. Epub 2012 Sep 26.

Gerdes LU, Jeune B, Ranberg KA, Nybo H, Vaupel JW. Estimation of Apolipoprotein E Genotype-Specific Relative Mortality Risks From the Distribution of Genotypes in Centenarians and Middle-Aged Men: Apolipoprotein E Gene Is a “Frailty Gene,” Not a “Longevity Gene”. *Genetic Epidemiology.* 2000 Oct;19(3):202-10.

Giacomin KC. Epidemiologia da incapacidade funcional em idosos na comunidade: Inquérito de Saúde de Belo Horizonte e tradução e confiabilidade do instrumento de avaliação funcional SMAF no Projeto Bambuí. [dissertation]. Belo Horizonte(MG): CpqRR; 2008.

Glatt SJ, Chayavichitsilp P, Depp C, Schork NJ, Jeste DV. Successful Aging: From Phenotype to Genotype. *Biol Psychiatry*. 2007 Aug 15;62(4):282–93. Epub 2007 Jan 8.

Greaves LC, Taylor RW. Mitochondrial DNA mutations in human disease. *IUBMB Life* 2006; 58(3):143–151.

Hallman DM, Boerwinkle E, Saha N, Sandholzer C, Menzel HJ, Csazar A et al. The apolipoprotein E polymorphism: A comparison of allele frequencies and effects in nine populations. *Am J Hum Genet*. 1991Aug;49(2):338-49.

Hauser PS, Narayanaswami V, Ryan RO. Apolipoprotein E: from lipid transport to neurobiology. *Prog Lipid Res* 2011 Jan;50(1):62-74. doi: 10.1016/j.plipres.2010.09.001. Epub 2010 Sep 18.

Herskind AM, McGue M, Holm NV, Sorensen TI, Harvald B, Vaupel JW. The heritability of human longevity: a population-based study of 2872 Danish twin pairs born 1870–1900. *Hum Genet* 1996 Mar; 97(3):319–23.

Hirose N, Homma S, Arai Y, Kawamura M, Hasegawa H, Ishida H, et al. Tokyo centenarian study. Part 4. Apolipoprotein E phenotype in Japanese centenarians living in the Tokyo metropolitan area. *Nippon Ronen Igakkai Zasshi* 1997 Apr;34(4):267–72.

Hixson JE, Vernier DT. Restriction isotyping of human apolipoprotein E by gene amplification and cleavage with *Hha*I. *J Lipid Res*. 1990 Mar; 31(3):545-8.

Hixson, JE. Apolipoprotein E polymorphisms affect atherosclerosis in young males: Pathobiological Determinants of Atherosclerosis in Youth (PDAY) research group. *Arterioscler Thromb* 1991 Sep-Oct;11(5):1237–44.

Horsburgh K, McCarron MO, White F, Nicoll JA. The role of apolipoprotein E in Alzheimer's disease, acute brain injury and cerebrovascular disease: evidence of common mechanisms and utility of animal models. *Neurobiol Aging* 2000 Mar-Apr 21;(2):245–55.

Huang Y, Liu XQ, Wyss-Coray T, Brecht WJ, Sanan DA, Mahley RW. Apolipoprotein E fragments present in Alzheimer's disease brains induce neurofibrillary tangle-like intracellular inclusions in neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001 Jul 17;98(15):8838-43. Epub 2001 Jul 10.

Huang Y, Weisgraber KH, Mucke L, Mahley RW. Apolipoprotein E: diversity of cellular origins, structural and biophysical properties, and effects in Alzheimer's disease. *J Mol Neurosci.* 2004; 23(3):189-204

Humphries SE, Talmud PJ, Hawe E, Bolla M, Day IN, Miller GJ. Apolipoprotein E4 and coronary heart disease in middle-aged men who smoke: A prospective study. *Lancet* 2001 Jul 14;358(9276):115–9.

Humphries SE, Luong LA, Ogg MS, Hawe E, Miller GJ. The interleukin-6 –174 G/C promoter polymorphism is associated with risk of coronary heart disease and systolic blood pressure in healthy men. *Eur Heart J* 2001 Dec;22(24): 2243–52.

International HapMap Consortium. A haplotype map of the human genome. *Nature.* 2005 Oct 27;437(7063):1299-320.

Jeunemaitre X, Soubrier F, Kotelevtsev YV, Lifton RP, Williams CS, Charru A et al. Molecular basis of human hypertension: role of angiotensinogen. *Cell* 1992 Oct 2;71(1):169-80.

Jian-Gang Z, Yong-Xing M, Chuan-Fu W, Pei-Fang L, Song-Bai Z, Nui-Fan G, et al. Apolipoprotein E and longevity among Han Chinese population. *Mech Ageing Dev* 1998 Aug 14;104(2):159-67.

Jofre-Monseny L, Minihane AM, Rimbach G. Impact of apoE genotype on oxidative stress, inflammation and disease risk. *Mol Nutr Food Res.* 2008 Jan;52(1):131–45. doi: 10.1002/mnfr.20070322.

Karasik D, Demissie S, Cupples LA, Kiel DP. Disentangling the Genetic Determinants of Human Aging: Biological Age as an Alternative to the Use of Survival Measures. *Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2005 May;60(5):574–87.

Katz S, Ford AB, Moskowitz RW, Jackson BA, Jaffe MW. Studies of illness in the aged: The index of ADL: A standardized measure of biological and psychosocial function. *JAMA*. 1963 Sep 21;185:914-9.

Kelly ME, Clay MA, Mistry MJ, Hsieh-Li HM, Harmony JA. Apolipoprotein E inhibition of proliferation of mitogen-activated T lymphocytes: Production of interleukin 2 with reduced biological activity. *Cell Immunol*. 1994 Dec;159(2):124–39.

Kerber RA, O'Brien E, Smith KR, Cawthon RM. Familial excess longevity in Utah genealogies. *J Gerontol A Biol Sci* 2001 Mar;56(3):B130–9.

Kirkwood TB. Understanding the odd science of aging. *Cell* 2005 Feb 25;120(4):437-47.

Kulminski A, Ukraintseva SV, Arbeev KG, Manton KG, Oshima J, Martin GM, et al. Association between APOE  $\epsilon$ 2/  $\epsilon$ 3 / $\epsilon$ 4 polymorphism in disability severity in a national long-term care survey sample. *Age Aging* 2008 May;37(3):288-93. doi: 10.1093/ageing/afn003. Epub 2008 Feb 4.

Kuusisto J, Mykkanen L, Kervinen K, Kesaniemi YA, Laakso M. Apolipoprotein E4 phenotype is not an important risk factor for coronary heart disease or stroke in elderly subjects. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995 Sep;15(9):1280-6.

Lan TY, Chang WC, Lan TH, Hurng BS. Apolipoprotein e Genotype and Risk of Developing Physical Limitations in Elderly People. *J Am Geriatr Soc*. 2009 Jul;57(7):1308-9. doi: 10.1111/j.1532-5415.2009.02292.x.

Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*. 2001 Feb 15;409(6822):860-921.

Lawton MP, Brody EM. Assessment of older people: Self-maintaining and instrumental activities of daily living. *Gerontologist*. 1969 Autumn;9(3):179-86.

Lima-Costa MF, Uchoa E, Guerra HL, Firmo JO, Vidigal PG, Barreto SM. The Bambuí health and ageing study (BHAS): methodological approach and preliminary results of a population-based cohort study of the elderly in Brazil. *Rev Saude Publica*. 2000 Apr;34(2): 126-35.

Lima-Costa MF, Firmo JOA, Uchôa E. The Bambuí Cohort Study of Aging: methodology and health profile of participants at baseline. *Cad Saude Publica*. 2011;27 Suppl 3:S327-35.

Longo VD, Fabrizio P. Regulation of longevity and stress resistance: a molecular strategy conserved from yeast to humans? *Cell Mol Life Sci* 2012 Jun;59(6):903–8.

Luft FC. Bad genes, good people, association, linkage, longevity and the prevention of cardiovascular disease. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1999 Jul;26(7):576-9.

Mahley RW, Innerarity TL, Rall SC Jr, Weisgraber KH. Plasma lipoproteins: Apolipoprotein structure and function. *J Lipid Res*. 1984 Dec 1;25(12):1277-94.

Mahley RW, Rall SC Jr. Apolipoprotein E: Far More Than a Lipid Transport Protein. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2000;1:507-37.

Mahley, RW, Weisgraber, KH, Huang Y. Apolipoprotein E4: A causative factor and therapeutic target in neuropathology, including Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Apr 11;103(15):5644-51.

Martin GM, Oshima J, Gray MD, Poot M. What geriatricians should know about the Werner syndrome. *J Am Geriatr Soc*. 1999 Sep;47(9):1136-44.

McCarron MO, DeLong D, Alberts MJ. The apoE genotype as a risk factor for ischemic cerebrovascular disease: a meta-analysis in process citation. *Neurology* 1999 Oct 12;53(6):1308–11.

McGue M, Vaupel JW, Holm N, Harvald B. Longevity is moderately heritable in a sample of Danish twins born 1870–1880. *J Gerontol*. 1993 Nov;48(6):B237-44.

Melzer D, Dik MG, van Kamp GJ, Jonker C, Deeg DJ. The Apolipoprotein E  $\epsilon$ 4 Polymorphism is Strongly Associated with Poor Mobility Performance Test Results But Not Self-Reported Limitation in Older People. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2005 Oct;60(10):1319-23.

Merriwether DA, Clark AG, Ballinger SW, Schurr TG, Soodyall H, Jenkins T, et al. The structure of human mitochondrial DNA variation. *J Mol Evol* 1991 Dec;33(6):543–55.

Mitchell BD, Hsueh WC, King TM, Pollin TI, Sorkin J, Agarwala R et al. Heritability of life span in the Old Order Amish. *Am J Med Genet* 2001 Sep 1;102(4):346–52.

Moraes EN. *Atenção à Saúde do Idoso: Aspectos Conceituais*. Brasília: Organização Pan-Americana da Saúde; 2012.

Murabito, JM, Yuan, R, Lunetta, KL. The Search for Longevity and Healthy Aging Genes: Insights From Epidemiological Studies and Samples of Long-Lived Individuas. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2012 May;67(5):470-9. doi: 10.1093/gerona/gls089. Epub 2012 Apr 12

Murphy, CT McCarroll SA, Bargmann CI, Fraser A, Kamath RS, Ahringer J, et al. Genes that act downstream of DAF-16 to influence the lifespan of *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 2003 Jul 17;424(6946):277-83. Epub 2003 Jun 29.

Nauck M, Winkelmann BR, Hoffmann MM, Böhm BO, Wieland H, März W, et al. The interleukin-6 G(-174)C promoter polymorphism in the LURIC cohort: no association with plasma interleukin-6, coronary artery disease, and myocardial infarction. *J Mol Med (Berl)* 2002 Aug;80(8):507-13. Epub 2002 Jun 21.

Oriá RB, Patrick PD, Blackman JA, Lima AA, Guerrant RL. Role of apolipoprotein E4 in protecting children against early childhood diarrhea outcomes and implications for later development. *Med Hypotheses*. 2007;68(5):1099-107. Epub 2006 Nov 13.

Oriá RB, Patrick PD, Oriá MO, Lorntz B, Thompson MR, Azevedo OG, et al. ApoE polymorphisms and diarrheal outcomes in Brazilian shanty town children. *Braz J Med Biol Res*. 2010 Mar;43(3):249-56.

Orth M, Bellosta S. Cholesterol: Its Regulation and Role in Central Nervous System Disorders. Cholesterol Volume 2012 (2012), doi:10.1155/2012/292598. Epub 2012 Oct 17.

Plan and operation of the Third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988-94. Series 1: programs and collection procedures. Vital Health Stat 1, 1994; (32):1-407.

Puca AA, Daly MJ, Brewster SJ, Matisse TC, Barrett J, Shea-Drinkwater M et al. A genome-wide scan for linkage to human exceptional longevity identifies a locus on chromosome 4. Proc Natl Acad Sci U S A. 2001 Aug 28;98(18):10505-8. Epub 2001 Aug 27.

Ramassamy C, Averill D, Beffert U, Theroux L, Lussier-Cacan S, Cohn JS et al. Oxidative insults are associated with apolipoprotein E genotype in Alzheimer's disease brain. Neurobiol. Dis. 2000 Feb;7(1):23-37.

Ramos LR. Fatores determinantes do envelhecimento saudável em idosos residentes em um centro urbano: Projeto Epidoso, São Paulo. Cad. Saúde Pública 2003 Jun;19(3):793-8.

Rea, IM, McDowell I, McMaster D, Smye M, Stout R, Evans A. Apolipoprotein E alleles in nonagenarian subjects in the Belfast elderly longitudinal free-living ageing study (BELFAST). Mech Ageing Dev 2001 Sep 15;122(13):1367-72.

Rose G. The diagnosis of ischaemic heart pain and intermittent claudication in field surveys. Bull World Health Organ. 1962;27:645-658.

Roselaar SE, Daugherty A. Apolipoprotein E-deficient mice have impaired innate immune responses to *Listeria monocytogenes* in vivo. J Lipid Res. 1998 Sep;39(9):1740-3.

Rowe JW, Khan RL. Human Aging: Usual and Successful. Science 1987 Jul 10; 237(4811):143-9.

Rubenstein LV, Calkins DR, Greenfield S, Jette AM, Meenan RF, Nevins MA, et al. Health status assessment for elderly patients. J Am Geriatr Soc 1988 Jun;37(6):562-9

Saito H, Lund-Katz S, Phillips MC. Contributions of domain structure and lipid interaction to the functionality of exchangeable human apolipoproteins. *Progress in Lipid Research* 2004 Jul;43(4):350-80.

Sandholzer C, Delport R, Vermaak H, Utermann G. High frequency of the apo  $\epsilon$ 4 allele in Khoi San from South Africa. *Hum Genet.* 1995 Jan;95(1):46-8.

Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel D, George-Hyslop PH, Pericak-Vance MA, Joo SH et al. Association of apolipoprotein E allele  $\epsilon$ 4 with late-onset familial and sporadic Alzheimer's disease. *Neurology.* 1993 Aug;43(8):1467-72.

Schachter F, Faure-Delanef L, Guenot F, Rouger H, Froguel P, Lesueur-Ginot L et al. Genetic associations with human longevity at the apoE and ACE loci. *Nat Genet* 1994 Jan;6(1):29–32.

Schiefermeier M, Kollegger H, Madl C, Schwarz C, Holzer M, Kofler J, Sterz F. Apolipoprotein E polymorphism: survival and neurological outcome after cardiopulmonary resuscitation. *Stroke* 2000 Sep;31(9)2068–73.

Sepehrnia B, Kamboh MI, Adams-Campbell LL, Nwankwo M, Ferrell RE. Genetic studies of human apolipoproteins. VII. Population distributions of polymorphisms of apolipoproteins A-I, A-II, A-IV, C-II, E and H in Nigeria. *Am J Hum Genet.* 1988 Dec;43(6):847-53.

Shore B, Shore V. An apolipoprotein preferentially enriched in cholesteryl ester-rich very low density lipoproteins. *Biochem Biophys Res Commun* 1974 May 7;58(1):1–7.

Sing CF, Davignon J. Role of the apolipoprotein E polymorphism in determining normal plasma lipid and lipoprotein variation. *Am J Hum Genet.* 1985 Mar;37(2):268-85.

Smith JD. Apolipoproteins and aging: emerging mechanisms. *Ageing Res Rev* 2002 Jun;1(3):345-65.

Sohal RS, Mockett RJ, Orr WC. Mechanisms of aging: an appraisal of the oxidative stress hypothesis. *Free Radic Biol Med.* 2002 Sep 1;33(5):575-86.

Stengard JH, Zerba KE, Pekkanen J, Ehnholm C, Nissinen A, Sing CF. Apolipoprotein E polymorphism predicts death from coronary heart disease in a longitudinal study of elderly Finnish men. *Circulation* 1995 Jan;91(2):265–9.

Stengard JH, Weiss KM, Sing CF. An ecological study of association between coronary heart disease mortality rates in men and the relative frequencies of common allelic variations in the gene coding for apolipoprotein E. *Hum Genet* 1998 Aug;103(2):234–41.

Stuck AE, Gerber EE, Mider CE, Beck JC. A Randomized Trial of In-Home Comprehensive Assessments in Older Persons: Final Results. *Gerontologist*. 1997; 37 (Suppl): 259.

Stuck AE, Walthert JM, Nikolaus T, Büla CJ, Hohmann C, Beck JC. Risk factors for functional status decline in community-living elderly people: a systematic literature review. *Soc Sci Med*. 1999 Feb; 48(4): 445-69.

Tatar M, Bartke A, Antebi A. The endocrine regulation of aging by insulin-like signals. *Science* 2003 Feb 28;299(5611):1346–51.

Thakkestian A, Bowe S, McEvoy M, Smith W, Attia J. Association between apolipoprotein E polymorphisms and age-related macular degeneration: A HuGE review and metaanalysis. *Am J Epidemiol*. 2006 Nov 1;164(9):813-22. Epub 2006 Aug 17.

Tinetti ME, Baker DI, McAvay G, Claus EB, Garrett P, Gottschalk M et al. A multifactorial intervention to reduce the risk of falling among elderly people living in the community. *N Engl J Med*. 1994 Sep 29; 331(13): 821-7.

Turner BJ, Atkin JD, Farg MA, Zang DW, Rembach A, Lopes EC, et al. Impaired extracellular secretion of mutant superoxide dismutase 1 associates with neurotoxicity in familial amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurosci* 2005 Jan 5;25(1):108–17.

Tziakas DN, Chalikias GK, Antonoglou CO, Veletza S, Tentis IK, Kortsaris AX et al. Apolipoprotein E genotype and circulating interleukin-10 levels in patients with stable and unstable coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol*. 2006 Dec 19; 48(12):2471–81. Epub 2006 Nov 22.

Utermann G, Pruhn N, Stelzmetz A. Polymorphism of apolipoprotein E. III. Effect of a single polymorphic gene locus on plasma lipld levels in man. *Clin Genet* 1979 Jan;15(1):63-72.

van den Elzen P, Garg S, León L, Brigl M, Leadbetter EA, Gumperz JE, et al. Apolipoprotein-mediated pathways of lipid antigen presentation. *Nature* 2005; 437: 906-10.

Van Heemst D, Beekman M, Mooijaart SP, Heijmans BT, Brandt BW, Zwaan BJ, et al. Reduced insulin/IGF-1 signalling and human longevity. *Aging Cell* 2005 Apr;4(2),79–85.

1

2 Vaupel JW, Carey JR, Christensen K, Johnson TE, Yashin AI, Holm NV. Biodemographic trajectories of longevity. *Science* 1998 May 8;280(5365):855-60.

Verbrugge LM, Jette AM. The Desablement Process. *Soc. Sci. Med.* 1994; 38(1): 1-14.

Vergheze J, Holtzer R, Wang C, Katz MJ, Barzilai N, Lipton RB . Role of APOE Genotype in Gait Decline and Disability in Aging. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2013 Nov;68(11):1395-401. doi: 10.1093/gerona/glt115. Epub 2013 Jul 31.

von Muhlen DG, Barrett-Connor E, Schneider DL, Morin PA, Parry P. Osteoporosis and apolipoprotein E genotype in older adults: the Rancho Bernardo study. *Osteoporos Int* 2001;12(4):332–35.

Vulliamy TJ, Knight SW, Mason PJ, Dokal I. Very short telomeres in the peripheral blood of patients with X-linked and autosomal dyskeratosis congenita. *Blood Cells Mol Dis.* 2001 Mar-Apr;27(2):353-7.

*Willcox DC, Willcox BJ, Hsueh WC, Suzuki M. Genetic determinants of exceptional human longevity: insights from the Okinawa Centenarian Study. Age (Dordr)* 2006 Dec;28(4):313-32. doi: 10.1007/s11357-006-9020-x. Epub 2006 Dec 8.

Wilson, PW, Schaefer, EJ, Larson, MG, Ordovas, JM. Apolipoprotein E alleles and risk of coronary disease: a meta-analysis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996 Oct;16(10):1250-5.

Wong LR, Carvalho JA. O rápido processo de envelhecimento populacional no Brasil: sérios desafios para as políticas públicas. *R Bras Est Pop* 2006 Jan-Jun;23(1):5-26.

Wozniak MA, Itzhaki RF, Faragher EB, James MW, Ryder SD, Irving WL et al. Apolipoprotein E-epsilon 4 protects against severe liver disease caused by hepatitis C virus. *Hepatology*. 2002 Aug;36(2):456-63.

Zhong N, Weisgraber KH. Understanding the association of apolipoprotein E4 with Alzheimer disease: clues from its structure. *J Biol Chem* 2009 Mar 6;284(10):6027-31. doi: 10.1074/jbc.R800009200. Epub 2008 Oct 22 .