Paula Squarzoni da Silveira

Padrões de atrofia cortical e declínio cognitivo associado ao
envelhecimento saudável: um estudo de seguimento por
ressonância magnética estrutural

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

Programa de: Psiquiatria

Orientador: Prof.^a Dr.^a Tânia Côrrea de Toledo
Ferraz Alves

São Paulo

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Silveira, Paula Squarzoni da

Padrões de atrofia cortical e declínio cognitivo associado ao envelhecimento
saudável: um estudo de seguimento por ressonância magnética estrutural / Paula
Squarzoni da Silveira. -- São Paulo, 2016.

Tese (doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Psiquiatria.

Orientadora: Tania Córrea de Toledo Ferraz Alves.

Descritores: 1.Envelhecimento 2.Envelhecimento cognitivo 3.Doenças
cardiovasculares 4.Apolipoproteínas E 5.Imagem por ressonância magnética 6.Estudos
longitudinais

USP/FM/DBD-404/16

Ao meu pai (*in memoriam*)

Quando comecei este sonho você estava aqui presente e mais uma vez me apoiou, incentivou e torceu. A vida não traz só alegrias e no meio dessa minha jornada você partiu, mas depois de um longo período de adaptação sem a sua presença, termino essa etapa com a certeza que de onde estiver está torcendo e vibrando com o meu sucesso.

À minha mãe

Não tenho palavras que definam o que sinto por você. Tenho uma gratidão enorme por você amar Amanda incondicionalmente, por sonhar o meu sonho, a incentivar e apoiar (mesmo que nem sempre concordando) as minhas decisões. Te amo infinitamente.

À Amanda

A razão da minha vida dedico a você esta conquista. Tão pequena soube compreender em muitos momentos minha ausência, meu nervosismo e meu cansaço.

AGRADECIMENTOS

A minha querida orientadora Tânia Correa de Toledo Alves meus sinceros agradecimentos pela oportunidade de trabalhar e conhecer o mundo da pesquisa, quando há 10 anos me convidou para o seu projeto de pesquisa. Sempre incentivou a prosseguir em novos trabalhos, a conquistar o meu pedacinho no Lim21 e a prosperar academicamente.

Ao Geraldo Busatto Filho agradeço pelos ensinamentos dados e incentivos para prosseguir a minha carreira acadêmica. Faz 10 anos que abriu as portas do Lim21, lembro perfeitamente dos meus medos e da minha falta de experiência com pesquisa, hoje confiou a mim a gestão do seu projeto temático e a chance do pós-doutorado sob sua supervisão.

Aos membros da Banca de Qualificação composta pela Profa. Dra. Sheila Caetano, Dr. Marcelo Hoexter e Dr. Ivan Aprahamian agradeço todas as sugestões e orientações dadas.

À minha irmã Daniela e meu cunhado Vinicius, que souberam compreender os momentos que me afastei e principalmente pelo apoio que me deram nesses anos.

À minha prima Camila Dale que em muitos momentos me ajudou cuidando da Amanda para que eu pudesse me dedicar a escrita desta tese.

À Luciana Cristina que nos momentos mais difíceis sempre me acolheu com um sorriso amigo, uma palavra de carinho e alguns puxões de orelha. A Jaqueline e o Fabio pelo apoio e coautorias nesses 10 anos de Lim. A Naomi, Pedro Paim, Ked, Marcia e Samuel que contribuíram de alguma forma para meu êxito, compartilhando meus ideais e incentivando-me a prosseguir

Às eternas amigas Ana Carolina, Gabriela Bonciani, Gabriela Bianchi, Simone Aloí e Juliana Crissie que sempre estão ao meu lado compartilhando das alegrias e das tristezas. A minha amiga Maria Carolina Damasceno, por ter compreendido minha ausência, chegou a hora de pagar minha promessa.

Ao “Repiáu” somos 7 mulheres juntas, 7 personalidades, 7 maneiras de falar, mas todas se respeitando e cada uma do seu jeito me deram força e incentivo para continuar. Ce e Verinha, sejam bem-vindas!!! Agora oficiais, mas não menos importante o apoio de vocês desde o momento que as conheci. O LIV me trouxe pessoas mais do que especiais.

À Julévola e seus discípulos que faziam minhas aulas ficarem mais suaves e animadas depois de um longo dia. Aguentaram minhas reclamações e chatices. Sem vocês a academia não faz o menor sentido.

À Maria Angelica e Daisy minhas mais novas companheiras de gordices, risadas e confissões, adorei cada encontro.

À Eliza e Isabel, pela dedicação e por tornar mais fácil toda burocracia da pós-graduação.

À toda equipe de radiologia do INRAD, pela ajuda nos dias de coleta do exame de Ressonância Magnética.

Aos idosos pela disponibilidade e contribuição a este trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo suporte financeiro mediante concessão de bolsa de Doutorado (processo 2013/03231-3).

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

Referencias: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valeria Vilhena, 2ª Ed. São Paulo. Serviço de Biblioteca e Documentação; 2011

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

SUMÁRIO

LISTA DE SIGLAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE FIGURAS

RESUMO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Estudos de ressonância magnética estrutural e o envelhecimento normal	2
1.1.1. Estudos transversais e envelhecimento saudável	6
1.2. Envelhecimento normal, declínio cognitivo e atrofia cerebral.....	7
1.3. A relevância de estudos longitudinais de ressonância magnética no envelhecimento cerebral	9
2. OBJETIVO	12
3. HIPOTESES	13
4. METODOLOGIA - DESENHO EXPERIMENTAL.....	14
4.1. Aspectos éticos	14
4.2. Desenho experimental	15
4.3. Poder estatístico.....	15
4.4. Amostra.....	16
4.4.1. Critérios de inclusão	18
4.4.2. Critérios de exclusão	18
4.5. Avaliações – Entrevistas e Testes.....	19
4.5.1. Triagem com contato telefônico	19
4.5.2. Avaliação clínica, cognitiva e demográfica.....	20
4.6. Cálculo do declínio cognitivo no seguimento	23

4.7. Cálculo do risco cardiovascular: escore <i>Framingham Risk Score for Coronary Heart Disease</i> (FRS)	23
4.8. APOE: método de genotipagem.....	27
4.9. Exame de RM – Aquisição das imagens.....	28
4.10. Processamento das imagens cerebrais de Ressonância Magnética:	29
4.10.1. Análise qualitativa das imagens de RM	29
4.10.2. Análise quantitativa das imagens de RM.....	29
4.11. Análise Estatística	32
5. RESULTADOS.....	35
5.1. Análise estatística da amostra total (n=55)	35
5.1.1. Dados clínicos, demográficos e cognitivos da amostra total (n= 55) ..	35
5.1.2. Análise quantitativa da amostra total: morfometria baseada em voxel	37
5.1.2.1. Comparação do volume de SC global entre os dois tempos (T0 x T1).....	37
5.1.2.2. Comparação do volume de SC regional entre os dois tempos (inicial e seguimento)	38
5.1.2.2.1. Análise em todo o volume cerebral	38
5.1.2.2.2. Análise em regiões específicas através de SVC em áreas não identificadas na análise global.....	40
5.2. Análise estatística da amostra com declínio e sem declínio cognitivo.	42
5.2.1. Dados clínicos, demográficos e cognitivos da amostra com declínio (n=19) e sem declínio cognitivo (n= 36).	42
5.2.2. Análise quantitativa da amostra com declínio e sem declínio cognitivo: morfometria baseada em voxel	44

5.2.2.1. Comparação do volume de SC entre voluntários com declínio cognitivo e sem declínio cognitivo ao longo do tempo.....	44
5.3. Análise estatística da amostra com a Influência da APOEε4 e volume cerebral ao longo dos anos.	45
5.3.1. Dados clínicos, demográficos e cognitivos da amostra com a presença da APOEε4 (n=11) e a ausência de APOEε4 (n= 44)	45
5.3.2. Análise quantitativa da amostra com a presença da APOEε4 (n=11) e a ausência de APOEε4 (n= 44): morfometria baseada em voxel	47
5.3.2.1. Comparação do volume de SC entre voluntários com a presença da APOEε4 (n=11) e a ausência de APOEε4 (n= 44)	47
5.4. Análise estatística da amostra com a Influência do alto risco cardiovascular e volume cerebral ao longo dos anos.....	47
5.4.1. Dados clínicos, demográficos e cognitivos da amostra com alto risco cardiovascular (n=21) e a baixo/médio risco (n= 34)	47
5.4.2. Análise quantitativa da amostra com alto risco cardiovascular (n=21) e a baixo/médio risco (n= 34): morfometria baseada em voxel.....	49
5.4.2.1. Comparação do volume de SC entre voluntários com alto risco cardiovascular (n=21) e a baixo/médio risco (n= 34).....	49
5.5. Correlação linear entre a testes cognitivos e volume de SC regional	51
6. DISCUSSÃO	52
6.1. Atrofia cortical.....	52
6.2. Declínio cognitivo	54
6.3. Influência da APOEε4	55
6.4. Risco cardiovascular	56
6.5. Limitações presente no estudo.....	56

7. CONCLUSÃO	58
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	59
9. ANEXO A	70
10. ANEXO B	90

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APOE ϵ 4 – Alelo 4 da Apolipoproteína E

CAPPESQ – Comitê de Ética do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

CCL – Comprometimento Cognitivo Leve

CDR – *Clinical Dementia Rating Scale*

CID-10 – Classificação Internacional de Doenças Mentais 10ª edição

CSF – Líquor cefalorraquidiano (*cerebrospinal fluid*)

CSI-D – Instrumento para Rastreamento de Demência na Comunidade (*Community Screening Instrument for Dementia*)

DA – Demência de Alzheimer

DSM-IV – 4ª Edição do Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais da Associação Psiquiátrica Americana

FRS – *Framingham Risk Score for Coronary Heart Disease Risk*

FWE – Family wise error

GMS – Estado Mental Geriátrico (*Geriatric Mental State*)

HC-FMUSP – Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

INRAD – Instituto de Radiologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

PET – Tomografia por emissão de Pósitrons (*positron emission tomography*)

QI – Coeficiente de inteligência

RM – Ressonância Magnética

ROI – Regiões de interesse (*regions of interest*)

SB – Substância branca

SC – Substância cinzenta

SKT – *The Short Cognitive Performance Test*

SPAH – *The São Paulo Ageing & Health Study*

SPGR – *Spoiled Gradient Recalled Acquisition*

SPM – *Statistical Parametric Mapping (Wellcome Department of Cognitive Neurology, UK)*

SVC – *Small volume correction*

VBM – Volumetria baseada em voxel (Voxel Based Morphometry)

WASI - *Wechsler Abbreviated Scale of Intelligence*

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Características clínicas e demográficas da amostra total.....	35
Tabela 2: Dados cognitivos da amostra total (inicial e seguimento).....	36
Tabela 3: Características cognitivas ao longo do tempo	37
Tabela 4: Comparação entre o volume de SC ao longo de 3 anos	41
Tabela 5: Variáveis clínicas na amostra dividida de acordo com a presença de declínio cognitivo na avaliação de segmento.....	43
Tabela 6: Características cognitivas na amostra dividida de acordo com a presença de declínio cognitivo na avaliação de segmento	44
Tabela 7: Variáveis clínicas na amostra dividida de acordo com a presença da APOEε4 e a ausência da APOEε4.....	45
Tabela 8: Características cognitivas na amostra dividida de acordo com a presença da APOEε4 e a ausência da APOEε4.	46
Tabela 9: Variáveis clínicas na amostra dividida de acordo com a influência do risco cardiovascular.	48
Tabela 10: Características cognitivas na amostra dividida de acordo com a influência do risco cardiovascular.	49
Tabela 11: Comparação do volume de SC entre voluntários com alto risco ao longo do tempo	50

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Cálculo do risco cardiovascular dividido por gênero (homens).	25
Figura 2: Cálculo do risco cardiovascular dividido por gênero (mulheres).	26
Figura 3: Comparação entre o volume de substância cinzenta entre os dois tempos (T0xT1).	39
Figura 4: Comparação entre o volume de SC ao longo de 3 anos.....	42
Figura 5: Comparação do volume de SC entre voluntários com alto risco ao longo do tempo.....	50

RESUMO

Silveira, PS. Padrões de atrofia cortical e declínio cognitivo associado ao envelhecimento saudável: um estudo de seguimento por ressonância magnética estrutural. [Tese]. São Paulo. Faculdade de Medicina. Universidade de São Paulo, 2016.

Diversos estudos de ressonância magnética (RM) em idosos saudáveis tem avaliado a relação entre envelhecimento, diminuições volumétricas de substância cinzenta (SC) e desempenho cognitivo, usando desenhos de corte transversal e testes de correlação. No entanto, poucos estudos de volumetria baseada em voxel (VBM) tem relatado a diminuição de SC em idosos saudáveis com medições repetidas de RM nos mesmos indivíduos, e nenhum desses estudos longitudinais investigaram a relação entre as mudanças de SC e desempenho cognitivo ao longo do tempo. Além disso, não está claro em achados longitudinais qual a extensão da influência do APOE ϵ 4 sobre as reduções de SC em idosos saudáveis. Foram inicialmente avaliados 187 sujeitos idosos (acima de 65 anos) da comunidade, e após 3 anos, uma subamostra de 55 sujeitos realizaram um segundo exame de RM estrutural em equipamento de 1,5 Tesla, bem como reavaliação cognitiva com instrumentos padronizados e validados transculturalmente. Todos os sujeitos foram genotipados para determinar a presença/ausência do alelo APOE ϵ 4, bem como a avaliação clínica do grau do risco cardiovascular de acordo com escores de Framingham (FRS). Usando a técnica de VBM, testamos as hipóteses de que: a progressão da perda do desempenho cognitivo está associada a diminuições volumétricas de SC ao longo de 3 anos, envolvendo a região hipocampal e os

neocórtices temporal e frontal; e perdas cognitivas associadas à diminuição progressiva de SC cerebral serão maiores em indivíduos com alto risco cardiovascular e em portadores de alelo da APOE ϵ 4. Foram encontradas reduções globais e regionais de SC no tálamo direito e giro parahipocampal esquerdo ($p < 0,05$, family-wise error corrigido para comparações múltiplas por todo o cérebro). Estes resultados não foram afetados pela influência da APOE ϵ 4. Foi detectada uma tendência ($p=0,093$) na correlação entre o grau de declínio cognitivo e redução volumétrica no tálamo direito. Este resultado se manteve quando um coeficiente parcial de correlação foi calculado levando em conta as variações nos escores FRS. Independentemente da APOE ϵ 4, as análises longitudinais de VBM mostraram que a região do hipocampo e tálamo são áreas críticas onde a redução de SC é maior que a redução volumétrica global em idosos saudáveis. Os resultados da associação entre a redução de SC no tálamo e a mudança no desempenho cognitivo ao longo do tempo, apoia o recente reconhecimento do papel do tálamo no declínio cognitivo sutil associado ao envelhecimento saudável.

Descritores: envelhecimento; envelhecimento cognitivo; doenças cardiovasculares; Apolipoproteínas E; imagem por ressonância magnética; estudo longitudinal.

ABSTRACT

SQUARZONI, PS. Patterns of cortical atrophy and cognitive decline associated with healthy aging: a structural magnetic resonance imaging study. **[Thesis]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2016.**

A number of magnetic resonance imaging (MRI) studies have investigated the relationship between aging, reduced gray matter (GM) volumes in the brain and cognitive performance, using cross-sectional designs and correlation tests. However, very few VBM studies have documented GM decrements in healthy elderly with repeated MRI measurements obtained in the same subjects, and none of these longitudinal studies investigated the relationship between GM deficits and changes in cognitive performance over time. Also, it is unclear the extent to which the APOE $\epsilon 4$ allele influences on longitudinal findings of GM reductions in healthy elderly. We initially evaluated 187 elderly subjects (over 65 years); after 3 years, a sub-sample of 55 individuals underwent a second MRI examination in a 1.5 Tesla equipment, and a cognitive re-evaluation using a structured, transculturally validated neuropsychological battery. All subjects also underwent genotyping for ascertainment of the presence of the APOE $\epsilon 4$ allele, as well as clinical assessment of cardiovascular risk according with Framingham scores (FRS). Using voxel-based morphometry (VBM), we will test the following hypotheses: the progression of cognitive decline will be associated with volumetric reductions of GM over three years, involving the hippocampal region and the temporal and frontal neocortices; cognitive decline associated with progressive GM volume reductions will be greater in individuals with higher cardiovascular

risk and carriers of the APOE ϵ 4 allele. We found global GM reductions as well as regional GM decrements that were significant in the right thalamus and left parahippocampal gyrus ($p < 0.05$, family-wise error corrected for multiple comparisons over the whole brain). These findings were not affected by APOE ϵ 4. A trend correlation ($p = 0.093$) was detected between the degree of cognitive decline over time and right thalamic volume shrinkage. This finding retained statistical significance when a partial coefficient of correlation was calculated taking into account variations in FRS scores. Irrespective of APOE ϵ 4, longitudinal VBM analyses show that the hippocampal region and thalamus are critical sites where GM shrinkage is significantly greater than the degree of global brain volume reduction in healthy elders. The trend towards an association between thalamic GM decrement and cognitive performance change over time supports the recently recognized role of the thalamus in the subtle cognitive decline associated with healthy human aging.

Descriptors: aging; cognitive aging; cardiovascular diseases; apolipoproteins E; magnetic resonance imaging; longitudinal studies.

1. INTRODUÇÃO

O envelhecimento da população é um fenômeno em franca expansão. No Brasil a participação de idosos na população geral aumentou significativamente nos últimos anos (IBGE, 2010). As projeções do IBGE sugerem que até 2025 teremos mais de 30 milhões de pessoas com idade superior a 60 anos (IBGE, 2010). Com isto, o principal desafio em termos de saúde pública para o século XXI será o de lidar com o aumento da prevalência de quadros de declínio cognitivo associados ao envelhecimento, incluindo a doença de Alzheimer ([DA], a principal causa de demência no idoso) e o comprometimento cognitivo leve ([CCL], que é o quadro de perda cognitiva, sendo considerado como o período de transição entre o envelhecimento normal e demência, apresentando índices de cerca de 12% ao ano de conversão para DA (Janoutová *et al.*, 2015; Huang *et al.*, 2016). Independentemente de outros elementos, déficits cognitivos associados ao envelhecimento são importantíssimos fatores preditivos de perda de qualidade de vida e autonomia, e aumento de mortalidade.

O envelhecimento normal também está associado a perdas cognitivas, afetando mais comumente os domínios da atenção, memória e funcionamento executivo (Dumas, 2015), interferindo com o funcionamento geral do idoso e afetando qualidade de vida (Ferreira *et al.*, 2014). Enquanto grandes esforços vêm sendo direcionados para elucidar a fisiopatologia da DA, menos atenção vem sendo dada para desvendar as bases neurobiológicas dos déficits cognitivos subjacentes ao envelhecimento saudável. Apesar das várias hipóteses propostas para explicar os déficits cognitivos presentes em idosos

saudáveis, não foram até hoje geradas informações científicas definitivas sobre como prevenir tais déficits, e as bases neurais dos mesmos não foram até hoje esclarecidas (Craik and Rose, 2011). O avanço do conhecimento o cérebro em envelhecimento e sobre os déficits cognitivos detectáveis em idosos saudáveis pode propiciar pistas importantes para aprofundar o conhecimento sobre as bases neurais de transtornos neurodegenerativos associados ao envelhecimento.

1.1. Estudos de ressonância magnética estrutural e o envelhecimento normal

Métodos de neuroimagem propiciam excelentes oportunidades para a investigação do envelhecimento do cérebro humano *in vivo* (Grady, 2008; Rolandi *et al.*, 2016). Entre as técnicas mais usadas para esta finalidade, destaca-se a ressonância magnética (RM) estrutural, que permite avaliações morfométricas quantitativas das diferentes estruturas cerebrais, com alto grau de resolução anatômica.

Ao longo de várias décadas, um grande número de estudos de RM tem avaliado a presença de alterações anatômicas cerebrais associadas à DA e ao CCL, gerando informações que contribuem significativamente para elucidar a fisiopatologia destes transtornos (Chetelat *et al.*, 2005; Bottino *et al.*, 2008; Risacher *et al.*, 2010; Habes *et al.*, 2016a). Tais estudos demonstraram consistentemente a presença de padrões de atrofia cortical desproporcional em portadores de DA e CCL, afetando inicialmente o hipocampo e outras estruturas têmporo-límbicas (Marquis *et al.*, 2002; Ferreira *et al.*, 2011; López

et al., 2016) com propagação progressiva para áreas de neocórtex temporal, parietal e subsequentemente para o lobo frontal à medida em que se agravam as perdas cognitivas (Busatto *et al.*, 2003; Alexander *et al.*, 2006; Petersen and Jack, 2009).

Ainda que com menor ênfase, tem-se empregado métodos de neuroimagem também para investigar as bases cerebrais do envelhecimento não-patológico e declínio cognitivo associado. Por exemplo, estudos de RM morfométrica avaliando populações saudáveis de diferentes faixas etárias, desde a juventude, apontam uma evolução diferente do volume de substância branca (SB) e de substância cinzenta (SC) ao longo da vida (Fjell and Walhovd, 2010; Salthouse, 2011; Matsuda, 2013; Yuan and Raz, 2014; Fraser and Nadeau, 2015). O volume da SC apresenta um declínio com o passar dos anos em regiões de neocórtex frontal e temporal (Alexander *et al.*, 2006; Abe *et al.*, 2008; Terribilli *et al.*, 2011). Já outras áreas cerebrais, como regiões límbicas e paralímbicas, parecem apresentar um grau relativo de preservação do volume de SC até fases avançadas do envelhecimento (Grieve *et al.*, 2005; Kalpouzos *et al.*, 2009; Terribilli *et al.*, 2011). O volume da SB tende a aumentar durante a vida adulta e atinge um pico entre os 40 e 50 anos de idade. Já a partir dos 60 anos, há uma perda significativa de SB, que supera o declínio de SC (Guttmann *et al.*, 1998). De forma geral, esses estudos dão suporte a uma noção de que mudanças anatômicas cerebrais associadas ao envelhecimento saudável se dão de maneira complexa, heterogênea, assíncrona, e seguindo padrões não lineares em diversas regiões cerebrais.

Recentemente, alguns estudos de RM morfométrica vêm sendo realizados especificamente com populações idosas, investigando as alterações

cerebrais associadas à passagem do tempo acima dos 60 anos de idade (Mosconi *et al.*, 2008; Chee *et al.*, 2009; Curiati *et al.*, 2009). Em um recente estudo de RM de base populacional com idosos saudáveis realizado pelo nosso grupo, Curiati *et al.* (2009) investigaram os padrões de correlação entre volumes de SC e idade. Foram observadas correlações negativas significativas entre idade e o volume de giro parahipocampal esquerdo, amígdala bilateralmente, neocórtex temporal direito (envolvendo os giros temporais, médio e superior) e regiões frontais específicas (envolvendo o córtex pré-frontal dorso medial direito e o córtex orbito frontal bilateralmente). Tais achados indicam a presença acelerada da diminuição do volume de SC nessas áreas cerebrais em proporção ao envelhecimento cronológico especificamente em idosos saudáveis (Curiati *et al.*, 2009). Além disso, quando feita à subdivisão da amostra por gênero foi observada uma perda acelerada de SC em homens, envolvendo o córtex temporal, o córtex pré-frontal e a região temporal medial. A respeito especificamente de áreas temporo-límbicas, os resultados deste estudo reforçaram a visão de que algum grau de atrofia destas regiões é compatível com o envelhecimento normal (Kramer *et al.*, 2007; Curiati *et al.*, 2009).

Diversos autores vêm investigando os fatores de risco e proteção que podem exercer influência significativa sobre os padrões de atrofia cortical associada ao envelhecimento saudável (Mosconi *et al.*, 2008; De Toledo Ferraz Alves *et al.*, 2011; Squarzoni *et al.*, 2012). Esses fatores de risco se dividem em imutáveis, como por exemplo gênero (Pal *et al.*, 2011), e os potencialmente modificáveis, como os fatores de risco cardiovasculares (Debette *et al.*, 2011; Erus *et al.*, 2015). Dentre esses fatores, potencialmente tratáveis e passíveis

de prevenção, temos: diabetes (Knopman *et al.*, 2009), hipertensão (Muller *et al.*, 2012) e dislipidemia (Enzinger *et al.*, 2005). Nosso grupo descreveu a presença de redução de SC regional envolvendo áreas parieto-occipitais e região límbica (hipocampo, amígdala e giros parahipocampal) em proporção ao grau de risco cardiovascular [*Framingham Risk Score for Coronary Heart Disease Risk* (FRS)] em idosos sem sinais de demência ou CCL (De Toledo Ferraz Alves *et al.*, 2011). Ainda levando em conta a associação entre alterações cerebrais e FRS nesta amostra, nosso grupo através de métodos de reconhecimento de padrões aplicados a RM a associação entre FRS e alterações cerebrais, verificamos mudanças estruturais nos padrões espacialmente distribuídos no cérebro permitem estatisticamente a previsão significativa do FRS, este resultado é ainda significativo quando controlando para a presença do Alelo 4 da Apolipoproteína E (APOE ϵ 4). Porém, ao considerar cada fator de FRS isoladamente, encontramos diferentes níveis de correlação entre real e fatores previsto, no entanto, quando consideramos a presença do APOE ϵ 4 como covariável os fatores individuais não foram significativamente previsíveis (Rondina *et al.*, 2014).

Mais recentemente, outro fator investigado foi o impacto do nível educacional sobre a relação entre o volume de SC e a idade, foi observado uma redução de volume de SC no grupo de baixa escolaridade quando comparado ao de alta escolaridade, envolvendo cíngulo anterior esquerdo e córtex pré-frontal dorso medial esquerdo, indicando que o nível educacional pode exercer efeitos protetores contra sutis alterações cerebrais relacionadas com a idade em idosos saudáveis (Rzezak *et al.*, 2015).

1.1.1. Estudos transversais e envelhecimento saudável

A maioria dos estudos de RM morfométrica que investigaram alterações cerebrais relacionadas ao envelhecimento saudável utilizaram desenho transversal, muitas vezes com amostra de grande porte, relataram correlações diretas significativas entre a idade avançada e redução do volume cerebral regional ou espessura cortical. A maioria dos estudos usaram técnicas manuais ou automatizadas para delimitar as regiões de interesse (ROI) selecionando regiões a priori, mais frequentemente na região do hipocampo e ventrículos (Mu *et al.*, 1999; Du *et al.*, 2006; Goodro *et al.*, 2012; Fraser and Nadeau, 2015).

Recentemente, estes estudos foram expandindo com o uso de software para a segmentação automatizada de todo o córtex e estruturas subcorticais com ROIs (Long *et al.*, 2012; Fjell *et al.*, 2013; Potvin *et al.*, 2016). Também recentemente, o uso do método de morfometria baseada em voxel (VBM) permitiu investigações voxelwise automáticas das alterações cerebrais volumétricas relacionadas com o envelhecimento em todo o cérebro sem a necessidade de definir as ROIs a priori (Grieve *et al.*, 2005; Kalpouzos *et al.*, 2009; Giorgio *et al.*, 2010; Terribilli *et al.*, 2011; Matsuda, 2013).

As investigações transversais de VBM com idosos confirmaram achados de redução de volume cerebral relacionadas à idade envolvendo o hipocampo, bem como em outras regiões cerebrais corticais e subcorticais (Tisserand *et al.*, 2004; Smith and Mizumori, 2006; Curiati *et al.*, 2009; Nyberg *et al.*, 2010).

1.2. Envelhecimento normal, declínio cognitivo e atrofia cerebral

Vários estudos de RM morfométrica até hoje procuraram correlacionar os padrões de desempenho cognitivo, idade e volume de estruturas cerebrais em populações saudáveis (Raz *et al.*, 2005; Zimmerman *et al.*, 2006; Mosconi *et al.*, 2008; Chiang *et al.*, 2011; Taki *et al.*, 2011). Entretanto, os achados destes estudos são frequentemente conflitantes quanto ao intervalo de tempo para a variação de volume ou quais estruturas cerebrais estão mais significativamente relacionadas a déficits cognitivos com a passagem do tempo.

Chee *et al.* (2009) investigaram uma amostra de 248 participantes sem demência de 55 a 86 anos de idade e relataram correlações positivas e significativas entre a velocidade de processamento cognitivo e volume de SC envolvendo os córtices frontal, parietal e occipital bilaterais (Chee *et al.*, 2009). Mais recentemente, Taki *et al.* (2011) avaliaram a presença de correlações significativas entre os volumes globais/regionais e memória de curto prazo em 109 idosos saudáveis da comunidade, e encontraram uma relação direta entre o volume de SC e desempenho cognitivo envolvendo regiões temporais bilaterais (Taki *et al.*, 2011). Diversos estudos de RM sobre envelhecimento normal também indicaram uma relação entre o desempenho cognitivo em indivíduos saudáveis e redução de volume de SC envolvendo o hipocampo (Golomb *et al.*, 1996; Jack *et al.*, 2000; Kramer *et al.*, 2007), e no córtex pré-frontal (Golomb *et al.*, 1996; Zimmerman *et al.*, 2006; Kramer *et al.*, 2007).

O nosso grupo avaliou através de exames de RM 187 idosos saudáveis (entre 65 a 75 anos) pertencentes à comunidade do bairro de Butantã em São

Paulo (Squarzoni *et al.*, 2012). Além disso, avaliamos todos os indivíduos através de bateria cognitiva padronizada. Usando metodologia automatizada para processamento de imagens de RM e análises estatísticas voxel-a-voxel de dados volumétricos cerebrais, observamos correlações significativas entre volume de SC e desempenho cognitivo neste grupo representativo de idosos saudáveis, envolvendo o córtex orbito frontal direito e o giro parahipocampal bilateralmente (Squarzoni *et al.*, 2012), regiões cerebrais nas quais já havíamos detectado correlação entre volumes de SC e idade (Curiati *et al.*, 2009). Estes dados sugerem que déficits cognitivos observados em idosos saudáveis estão associados a diminuições volumétricas em regiões cerebrais específicas.

Um fator adicional, de natureza genética, que pode afetar tanto o volume cerebral como o desempenho cognitivo em idosos saudáveis é o polimorfismo do gene que codifica APOE ϵ 4 com suas três variáveis alélicas (alelo 2, 3 e 4) (Honea *et al.*, 2009; Taylor *et al.*, 2014; Yokoyama *et al.*, 2015; Dowell *et al.*, 2016). O alelo APOE ϵ 4 é conhecido por ser um fator de risco para o declínio cognitivo patológico. Além disso, estudos recentes também sugerem um papel "protetor" do alelo APOE ϵ 2 sobre o envelhecimento cerebral e a cognição (Risacher *et al.*, 2010; Fjell *et al.*, 2013; Taylor *et al.*, 2014). Nos nossos resultados de correlação direta entre redução de SC e pior desempenho cognitivo em idosos saudáveis se mantiveram significativos mesmo quando incluímos a presença/ausência do alelo APOE ϵ 4 como covariável de confusão (Squarzoni *et al.*, 2012) sugerindo que a associação entre a redução de volumes regionais cerebrais e pior desempenho cognitivo em nossos idosos estava presente, independentemente da influência do alelo APOE ϵ 4.

Especificamente em idosos saudáveis, não está claro até que ponto a tal variação genética é fundamental para resultados longitudinais de reduções volumétricas de SC ao longo do tempo. Os estudos recentes de RM longitudinais baseado em ROI com jovens adultos para saudáveis idosos têm relatado diversos achados da possível influência do alelo $\epsilon 4$ APOE sobre as taxas de atrofia cerebral regional no hipocampo e ventrículos laterais (Risacher *et al.*, 2010; Roussotte *et al.*, 2014; Taylor *et al.*, 2014).

1.3. A relevância de estudos longitudinais de ressonância magnética no envelhecimento cerebral

A grande maioria dos estudos revisados nos itens anteriores foi realizada usando desenhos de corte transversal, envolvendo o cálculo de correlações entre volumes cerebrais e dados de idade cronológica e cognitivos em indivíduos avaliados apenas em uma ocasião. Entretanto, tais estudos transversais com desenho de correlação fornecem uma visão relativamente superficial das alterações morfológicas cerebrais associadas ao envelhecimento. Já em estudos longitudinais, com medidas repetidas de RM e cognitivas nos mesmos sujeitos, pode-se investigar a progressão de alterações cerebrais ao longo dos anos na mesma amostra de indivíduos, bem como comparar os padrões de progressão da perda de tecido cerebral entre grupos diferentes de sujeitos.

As recentes investigações de RM longitudinais utilizando métodos baseados em ROI em amostras com idosos saudáveis relataram uma diminuição significativa do volume cerebral envolvendo a região do hipocampo

e de outras partes do cérebro em períodos de um ano ou mais (Ylikoski *et al.*, 2000a; b; Rodrigue and Raz, 2004; Du *et al.*, 2006; Fjell *et al.*, 2009; Murphy *et al.*, 2010; Salthouse, 2011; Fjell *et al.*, 2013; Jiang *et al.*, 2014).

Alguns poucos estudos longitudinais recentes têm demonstrado que é importante associar a taxa de declínio de volume cerebral de SC regional/global ao desempenho em testes neuropsicológicos para elucidar as bases cerebrais do declínio cognitivo ao longo do tempo em idosos saudáveis (Taki *et al.*, 2011b). Tais estudos tem sugerido que, no envelhecimento saudável, o declínio funcional em diferentes domínios cognitivos é acompanhado por alterações em estruturas cerebrais específicas (Fjell *et al.*, 2013; Crivello *et al.*, 2014).

Resnick *et al.* (2003) investigaram 92 indivíduos saudáveis com idades entre 59 e 85 anos, e os resultados sugeriram uma redução de SC envolvendo o córtex frontal inferior, cíngulo, córtex insular e parietal ao longo de 4 anos (Resnick *et al.*, 2003). Já Krammer *et al.* (2007) avaliaram 50 idosos saudáveis submetidos a exame de RM e testes cognitivos (memória episódica, funcionamento executivo) e novamente no seguimento com um intervalo médio de 45 meses. Os resultados sugeriram uma associação da diminuição no hipocampo a um declínio em memória e uma diminuição global de SC e aumento de hiperintensidade de SB a um declínio em funcionamento executivo ao longo do tempo (Kramer *et al.*, 2007).

Nyberg *et al.* (2010) identificaram vários focos de redução de SC regional depois de seis anos; a redução de volume mais significativa foi observada no tálamo, seguido pelo núcleo caudado, cerebelo, e porções corticais frontais-temporal (mas não na região do hipocampo) (Nyberg *et al.*, 2010).

Em um estudo longitudinal mais recente, de 4 anos de investigação utilizando morfométrica baseada em voxel (*voxel-based morphometry* [VBM]) em uma grande amostra de 1.172 idosos saudáveis (65-82 anos), Crivello et al (2014) relataram perdas mais significativas de SC regional envolvendo os córtices frontal e parietal, giro occipital médio, córtex temporal e hipocampo. (Crivello *et al.*, 2014). Finalmente, um estudo de RM utilizando o método de *vertex-wise* investigou alterações de espessura cortical em 132 idosos saudáveis (60-90 anos) após 1 ano, mostrou afinamento cortical mais proeminente nas regiões temporal e frontal (Fjell *et al.*, 2013). Apesar das informações valiosas levantadas nas avaliações longitudinais de RM discutidas acima, o número de estudos de neuroimagem utilizando tal desenho ainda é restrito, sendo sua maioria em populações com alta escolaridade e diferente níveis sócio econômicos do que a nossa população, e portanto passíveis de influências desses fatores (Rzezak *et al.*, 2015); bem como foi pouco investigado a influência de polimorfismo do gene que codifica a APOE ϵ 4 e dos fatores de risco cardiovasculares sobre as formas de progressão de déficits cognitivos associados ao envelhecimento cerebral normal.

As questões acima foi objeto de interesse deste estudo, cuja proposta foi caracterizar as alterações do volume regional de SC cerebral (através de RM estrutural) associadas a perdas cognitivas numa amostra de indivíduos acima dos 65 anos de idade, sem CCL ou demência, utilizando um desenho longitudinal com avaliações repetidas num intervalo médio de 3 anos.

2. OBJETIVO

Este projeto tem como objetivo caracterizar, usando métodos de análise voxel-a-voxel, as alterações do volume de substância cinzenta (com RM) associadas ao declínio cognitivo numa amostra de base populacional de indivíduos acima dos 65 anos de idade, sem demência recrutada na região oeste da cidade de São Paulo.

Objetivos específicos:

- (a) Investigar, utilizando desenho longitudinal com medidas repetidas de RM, as características da perda de SC cerebral ao longo de 3 anos em idosos saudáveis de uma comunidade da cidade de São Paulo;
- (b) Investigar a relação entre perda regional de SC cerebral e progressão do declínio no desempenho cognitivo ao longo de 3 anos.
- (c) Investigar a influência de polimorfismo do gene codificados da APOE e de fatores de risco cardiovascular sobre os padrões de perda de SC e declínios cognitivos ao longo de 3 anos em idosos saudáveis.

3. HIPÓTESES

As hipóteses do presente projeto foram investigar se:

- (a) A progressão da perda do desempenho cognitivo estará associada a diminuições volumétricas de SC ao longo do tempo;
- (b) A progressão de declínios cognitivos ao longo de 3 anos estará associada a perdas volumétricas em regiões cerebrais específicas, incluindo córtex temporal medial (incluindo o giro parahipocampal, amígdala e hipocampo); giro temporal superior, e córtices pré-frontal dorso medial, dorsolateral, e orbito frontal.
- (c) Perdas cognitivas associadas à diminuição progressiva de SC cerebral serão maiores em indivíduos com alto risco cardiovascular e em portadores de alelo APOE ϵ 4.

4. METODOLOGIA - DESENHO EXPERIMENTAL

4.1. Aspectos éticos

Este projeto constituiu de um subprojeto dos estudos “Alterações cerebrais associadas a fatores de risco cardiovascular: um estudo de base populacional usando morfometria voxel-a-voxel por ressonância magnética e medidas de metabolismo de glicose por tomografia por emissão de pósitrons” coordenado pelo Prof. Dr. Geraldo Busatto Filho e Profa. Tânia Correa de Toledo Ferraz Alves (processo FAPESP 2004/15336-5) e “Avaliação de anormalidades volumétricas do hipocampo usando morfometria baseada no voxel (*voxel-based morphometry* - VBM): o impacto de variações nos filtros de suavização num estudo usando o transtorno cognitivo leve como modelo”. (Programa CInAPCe - Cooperação Interinstitucional de Apoio a Pesquisas sobre o Cérebro) coordenado pelo Prof. Dr. Geraldo Busatto Filho aprovados pelo Comitê de ética e Pesquisa (CAPpesq) [protocolo 450/05 e 0251/05] e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. A amostra de base epidemiológica teve origem no estudo “A epidemiologia da demência e Doença de Alzheimer em populações miscigenadas no Brasil e em Cuba” dos profs. Márcia Scazufca, Paulo Rossi Menezes aprovado pela CAPpesq protocolo 257/02 CONEP 25000.079110/2002-03).

Todos os sujeitos da amostra foram convidados a participar e receberam, por escrito, informações detalhadas sobre a natureza, métodos e objetivos do estudo. Após esclarecimento de todas as dúvidas, foi solicitada a assinatura de termo de consentimento informado. Para as pessoas analfabetas

foi lida a folha de informação e o consentimento, e elas foram então convidadas a expressar o seu consentimento verbalmente, que foi testemunhado, mas não foi solicitado que assinem um termo que não podem ler. As informações serão confidenciais, e serão protegidas as identidades dos sujeitos nas publicações que decorrerem do estudo. Foi garantido o acesso às informações individuais e os sujeitos foram assegurados da possibilidade de interrupção de participação a qualquer momento, se assim o desejarem.

4.2. Desenho experimental

Este foi um estudo controlado de base populacional, longitudinal, que pretendeu caracterizar as alterações volumétricas de SC investigadas através da RM estrutural associadas à presença de declínio cognitivo não demencial ao longo de 3 anos, em uma amostra de idosos acima de 65 anos, sem queixas cognitivas ou neurológicas, da comunidade.

4.3. Poder estatístico

O tamanho da amostra foi calculado através do programa G*Power3 (Faul *et al.*, 2007; Eriksson *et al.*, 2009) dado que o presente estudo se trata de uma investigação de seguimento (teste t pareado), com direção unicaudal, tamanho de efeito moderado (0,4) e alpha de 0,05, a amostra de 55 sujeitos permite um poder estatístico de 0,96 (96%).

4.4. Amostra

A amostra de base populacional foi originada do projeto de pesquisa “Alterações cerebrais associadas a fatores de risco cardiovascular: um estudo de base populacional usando morfometria voxel-a-voxel por ressonância magnética e medidas de metabolismo de glicose por tomografia por emissão de pósitrons” coordenado pelos Profs. Dr. Geraldo Busatto Filho e Profa. Tânia Correa de Toledo Ferraz Alves, e constituída de 254 sujeitos idosos sem demência, sendo um total de 187 sujeitos que não apresentavam lesões cerebrais silenciosas detectáveis através de exames de RM e foram avaliados através de VBM(De Toledo Ferraz Alves *et al.*, 2011). Esta amostra foi selecionada a partir de um banco de dados com 2072 idosos avaliados em estudo epidemiológico e clínico realizado no bairro de Butantã em São Paulo, denominado *São Paulo Health and Aging Study* (SPAH) (Sczufca *et al.*, 2007). Após um período médio de 3 anos, através do projeto “Avaliação de anormalidades volumétricas do hipocampo usando morfometria baseada no voxel: o impacto de variações nos filtros de suavização num estudo usando o transtorno cognitivo leve como modelo” (Programa CInAPCe - Cooperação Interinstitucional de Apoio a Pesquisas sobre o Cérebro) coordenado pelo Prof. Dr. Geraldo Busatto Filho, os 187 sujeitos que fizeram RM anteriormente e não apresentavam lesões silenciosas (SI) foram novamente contatados e convidados a realizar uma segunda avaliação cognitiva e um segundo exame de RM estrutural. Apenas 65 aceitaram participar do estudo de seguimento (vide fluxograma abaixo), desses voluntários foram excluídos 10 sujeitos devido

à: presença de artefato (n=1); não completou o exame de RM (n=1), sem dados de APOE ϵ 4 (n=6) e avaliação cognitiva incompleta (n=2).

Fluxograma 1: Fluxograma de seleção da amostra do presente estudo

Sendo assim nossa amostra final de seguimento para o presente estudo foi de 55 idosos que realizaram dois exames de RM estrutural com diferença de

3 anos (2006-2008 [T0] e 2009-2011[T1]), todos provenientes de uma amostra de base populacional.

Todos os sujeitos foram entrevistados para avaliação cognitiva no tempo inicial (T0) e no seguimento (T1) através de uma bateria validada transculturalmente.

4.4.1. Critérios de inclusão

Os critérios de inclusão para o presente estudo de neuroimagem incluem:

- (a) Idosos da comunidade com 65 a 75 anos sem queixas cognitivas ou neurológicas primeira avaliação de RM (T0).
- (b) Com exame de RM de 2006/2008 (tempo inicial) sem lesões de SC.
- (c) Aceitaram participar da reavaliação após 3 anos

4.4.2. Critérios de exclusão

Os critérios de exclusão para o presente estudo de neuroimagem incluem:

- (a) Presença de quadro demencial primário de acordo com os critérios diagnósticos do DSM-IV e com base em algoritmo gerado pelo estudo SPAH para indivíduos entre 65 a 75 anos no T0;

- (b) Presença de CCL, definido pela identificação de declínios cognitivos desproporcionais em relação à média populacional (n=2072) de idosos da comunidade;
- (c) Presença de próteses de metal, marcapasso ou clip vascular;
- (d) História de claustrofobia;
- (e) Presença de outras condições médicas gerais clinicamente descompensadas, incluindo hipotireoidismo, doença hepática e insuficiência cardíaca grave (classe funcional III ou IV da NYHA), doença Cushing, neoplasias (exceto câncer de pele não-melanoma), insuficiência renal;

4.5. Avaliações – Entrevistas e Testes

4.5.1. Triagem com contato telefônico

Os idosos elegíveis (n=187) participantes do projeto “Alterações cerebrais associadas a fatores de risco cardiovascular: um estudo de base populacional usando morfometria voxel-a-voxel por ressonância magnética e medidas de metabolismo de glicose por tomografia por emissão de pósitrons” foram novamente contatados via telefone após dois anos com a finalidade de confirmar os critérios de inclusão e exclusão. Em seguida, foi feita a proposta para os sujeitos participarem do presente projeto de pesquisa. Tivemos 30 recusas e 66 sem resposta ao contato telefônico, 26 não elegíveis por preencherem critério de exclusão, levando a uma amostra total de 65 idosos saudáveis elegíveis para reavaliação através de exames de RM e bateria

cognitiva. Após o exame de RM, excluímos voluntários sem dados de APOE ϵ 4 ou SKT (n=8), claustrofobia (n=1) e artefato na RM (n=1), nossa amostra final é de 55 idosos saudáveis.

4.5.2. Avaliação clínica, cognitiva e demográfica

A identificação dos casos de demência e outros transtornos psiquiátricos seguiu o protocolo desenvolvido pelo “Grupo de Pesquisa em Demência 10/66” (Prince *et al.*, 2007; Scazufca *et al.*, 2007; Group, 2009). Este protocolo, desenvolvido para estudos transculturais, inclui uma avaliação estruturada neurológica, cardiológica, entrevista padronizada psiquiátrica com o instrumento 'Estado Mental Geriátrico' (*Geriatric Mental State* - GMS), e o 'Instrumento para Rastreamento de Demência na Comunidade' (*Community Screening Instrument for Dementia*; CSI-D). O CSI-D consiste em um teste cognitivo com 32 itens aplicado ao participante (20 minutos) e uma entrevista realizada com um informante com 26 itens, questionando o funcionamento geral e de saúde do participante (Hall *et al.*, 1993). Todos os protocolos foram aplicados antes do primeiro e do segundo exame de neuroimagem.

Três escores são gerados a partir do CSI-D: COGSCORE, uma pontuação ponderada do teste cognitivo do participante com 32 itens (sete itens de nomeação de objeto, quatro itens definição do objeto, duas tarefas categóricas de fluência verbal, repetição de palavra, identificação de pessoa famosa, orientação temporal e espacial, recordar três palavras, recordação de uma história curta, dois desenhos de interseção (círculos e pentágonos), e também a incorporação de duas tarefas do CERAD (*Consortium to Establish a*

Registry for Alzheimer's Disease): a lista de 10 palavras com aprendizagem e evocação tardia, e nomeação de animais (fluência verbal) (Copeland *et al.*, 1986); RELSCORE que consiste em uma pontuação total não ponderada da entrevista do informante; e o escore da função discriminante (DFSCORE), uma pontuação ponderada combinando COGSCORE e RELSCORE (Prince *et al.*, 2003). A aplicação anterior do algoritmo combinado (DFSCORE) para a identificação de sujeitos com demência resultou em sensibilidade de 94%, com especificidade de 94% (sujeitos com baixa educação) e 97% (alta educação) (Prince *et al.*, 2003). Os valores de referência para a validação transcultural foi descrita em detalhes em outro lugar (Prince *et al.*, 2003). O uso apenas do COGSCORE mostrou que a sensibilidade foi influenciada na identificação dos casos de demência (Prince *et al.*, 2003). Especificamente para a amostra total do SPAH (n = 2072), a utilização do algoritmo combinado levou à detecção de uma prevalência de demência de 5,1% (com um intervalo de confiança de 95%, de 4,1% a 6,0%), com uma frequência semelhante para homens e mulheres, e aumentando as taxas com a idade (Sczufca *et al.*, 2007). Os valores de referência para a amostra total do SPAH também foram descritos previamente, com sujeitos agrupados de 5 em 5 anos com idade entre 65 a 84 anos e um grupo com idosos a partir de 85 anos ou mais (Sczufca *et al.*, 2007). Foram excluídos os casos de demência com base no algoritmo composto gerado pelo estudo SPAH nos indivíduos entre 65 a 75 anos. Após a exclusão dos participantes com demência e aqueles com mais de 75 anos, a média do COGSCORE da amostra de idosos do SPAH com idade entre 65 a 75 anos (n= 1101) foi de 27.83 (DP = 3.23). A fim de excluir também aqueles indivíduos que apresentavam declínios cognitivos desproporcionalmente maiores do que seria

normalmente esperado para a faixa etária da amostra e seu meio ambiente, compatíveis com diagnóstico de CCL, utilizamos um limiar arbitrário definido como a média do desempenho cognitivo do COGSCORE de 1,5 desvio padrão abaixo do desempenho médio calculado para todos os sujeitos entre 65 e 75 anos de idade a partir da amostra original do SPAH ($\text{COGSCORE} [m - (1.5 \times DP) = 22.99]$) (Scazufca *et al.*, 2007). Dados de escolaridade para cada sujeito foram extraídos a partir do banco de dados do estudo SPAH. Em resumo, consideramos 4 anos de estudo se os indivíduos tivessem concluído a 4ª série, 8 anos se tivessem concluído a 8ª série, 11 anos se tivessem concluído o ensino médio, e 15 anos se tivessem concluído curso de graduação em faculdade.

Nas duas ocasiões em que os exames de RM foram adquiridos (T0 e T1), todos os indivíduos foram também submetidos a uma avaliação cognitiva curta (10 minutos) usando o Teste Breve de Performance Cognitiva [(*Short Cognitive Performance Test* (SKT))], validado no Brasil por Flaks *et al.* (2006) (Flaks *et al.*, 2006). O SKT dá pontuação de desempenho cognitivo global, bem como subescores de memória e atenção, os escores mais elevados indicam maior comprometimento cognitivo (Lehfeld and Erzigkeit, 1997a; Lehfeld *et al.*, 1997b). Finalmente, as estimativas de coeficiente de inteligência (QI) foram obtidas em todos os sujeitos utilizando o *Wechsler Abbreviated Scale of Intelligence* (WASI).

4.6. Cálculo do declínio cognitivo no seguimento

Nós dividimos a amostra (n=55) em dois grupos através do desempenho cognitivo do COGSCORE nas duas avaliações (inicial [T0] e de seguimento [T1]). No presente estudo consideramos como presença de declínio cognitivo um escore no COGSCORE avaliado no T1 inferior ao obtido pelo mesmo sujeito no T0. Assim sendo, os sujeitos que tiveram um pior desempenho cognitivo na avaliação de seguimento realizada em 2009-2011 (T1) em relação à primeira avaliação inicial realizada em 2006-2008 (T0) constituíram o grupo com declínio cognitivo (n= 36). Os sujeitos que tiveram um desempenho cognitivo igual, ou melhor, na avaliação de seguimento realizada em 2009-2011 (T1) em relação à primeira avaliação inicial realizada em 2006-2008 (T0) constituíram o grupo sem declínio cognitivo (n= 19).

4.7. Cálculo do risco cardiovascular: escore *Framingham Risk Score for Coronary Heart Disease* (FRS)

O escore de Framingham é um modelo de predição de risco para doença cardiovascular e tem sido utilizado em estudos epidemiológicos de população idosa (Jeerakathil *et al.*, 2004; Seshadri *et al.*, 2004; Debette *et al.*, 2011) em estudos de coorte transversais (Jefferson *et al.*, 2011) e longitudinais (Kaffashian *et al.*, 2011; Laughlin *et al.*, 2011) que investigam o declínio cognitivo no processo de envelhecimento associado ao risco cardiovascular e por fim em estudos com ressonância magnética estrutural avaliando a

associação entre as alterações cerebrais e doença cardiovascular (Williams *et al.*, 2010; Debette *et al.*, 2011).

O escore é uma medida combinada única (em porcentagem) indicativa do risco cardiovascular para os próximos 10 anos de um indivíduo (Wilson *et al.*, 1998) (vide abaixo as figuras 1 e 2) levando em conta vários fatores de risco, como: idade, gênero, pressão arterial (mmHg), tabagismo, diabetes mellitus e colesterol (frações de lipoproteínas de baixa densidade e de alta densidade) (Dawber, 1980; Farmer *et al.*, 1990). A fim de mensurar o grau de risco cardiovascular de todos os indivíduos foi calculado o FRS e divididos em baixo (<9%), médio (10 - 19%) e alto risco (>20%) (Wilson *et al.*, 1998; D'agostino *et al.*, 2008).

Figura 1: Cálculo do risco cardiovascular dividido por gênero (homens).

Coronary Disease Risk Prediction Score Sheet for Men Based on LDL Cholesterol Level

Step 1

Age	
Years	Points
30-34	-1
35-39	0
40-44	1
45-49	2
50-54	3
55-59	4
60-64	5
65-69	6
70-74	7

Step 2

LDL - Cholesterol		
(mg/dl)	(mmol/L)	Points
<100	<2.59	-3
100-129	2.60-3.36	0
130-159	3.37-4.14	0
160-189	4.15-4.91	1
≥190	≥4.92	2

Key	
Color	Risk
green	Very low
white	Low
yellow	Moderate
rose	High
red	Very high

Step 3

HDL - Cholesterol		
(mg/dl)	(mmol/L)	Points
<35	<0.90	2
35-44	0.91-1.16	1
45-49	1.17-1.29	0
50-59	1.30-1.55	0
≥60	≥1.56	-1

Step 4

Blood Pressure				
Systolic (mmHg)	Diastolic (mmHg)			
	<80	80-84	85-89	90-99
<120	0			
120-129		0 pts		
130-139			1	
140-159				2
≥160				3 pts

Note: When systolic and diastolic pressures provide different estimates for point scores, use the higher number

Step 5

Diabetes	
	Points
No	0
Yes	2

Step 6

Smoker	
	Points
No	0
Yes	2

Risk estimates were derived from the experience of the NHLBI's Framingham Heart Study, a predominantly Caucasian population in Massachusetts, USA

Step 7 (sum from steps 1-6)

Adding up the points	
Age	_____
LDL Cholesterol	_____
HDL Cholesterol	_____
Blood Pressure	_____
Diabetes	_____
Smoker	_____
Point Total	_____

Step 8 (determine CHD risk from point total)

Point Total	10 Yr CHD Risk
≤-3	1%
-2	2%
-1	2%
0	3%
1	4%
2	4%
3	6%
4	7%
5	9%
6	11%
7	14%
8	18%
9	22%
10	27%
11	33%
12	40%
13	47%
≥14	≥56%

Step 9 (compare to man of the same age)

Comparative Risk		
Age (years)	Average 10 Yr CHD Risk	Low* 10 Yr CHD Risk
30-34	3%	2%
35-39	5%	3%
40-44	7%	4%
45-49	11%	4%
50-54	14%	6%
55-59	16%	7%
60-64	21%	9%
65-69	25%	11%
70-74	30%	14%

*Low risk was calculated for a man the same age, normal blood pressure, LDL cholesterol 100-129 mg/dL, HDL cholesterol 45 mg/dL, non-smoker, no diabetes

Figura 2: Cálculo do risco cardiovascular dividido por gênero (mulheres).**Coronary Disease Risk Prediction Score Sheet for Women Based on LDL Cholesterol Level****Step 1**

Age	
Years	Points
30-34	-9
35-39	-4
40-44	0
45-49	3
50-54	6
55-59	7
60-64	8
65-69	8
70-74	8

Step 2

LDL - Cholesterol		
(mg/dl)	(mmol/L)	Points
<100	<2.59	-2
100-129	2.60-3.36	0
130-159	3.37-4.14	0
160-189	4.15-4.91	2
≥190	≥4.92	2

Key	
Color	Risk
green	Very low
white	Low
yellow	Moderate
rose	High
red	Very high

Step 3

HDL - Cholesterol		
(mg/dl)	(mmol/L)	Points
<35	≤0.90	5
35-44	0.91-1.16	2
45-49	1.17-1.29	1
50-59	1.30-1.55	0
≥60	≥1.56	-2

Step 4

Blood Pressure					
Systolic (mmHg)	Diastolic (mmHg)				
	<80	80-84	85-89	90-99	≥100
<120	-3 pts				
120-129		0 pts			
130-139			0 pts		
140-159				2 pts	
≥160					3 pts

Note: When systolic and diastolic pressures provide different estimates for point scores, use the higher number

Step 5

Diabetes	
No	Points
No	0
Yes	4

Step 6

Smoker	
No	Points
No	0
Yes	2

Risk estimates were derived from the experience of the NHLBI's Framingham Heart Study, a predominantly Caucasian population in Massachusetts, USA

Step 7 (sum from steps 1-6)

Adding up the points	
Age	_____
LDL Cholesterol	_____
HDL Cholesterol	_____
Blood Pressure	_____
Diabetes	_____
Smoker	_____
Point Total	_____

Step 8 (determine CHD risk from point total)

Point Total	10 Yr CHD Risk
≤-2	1%
-1	2%
0	2%
1	2%
2	3%
3	3%
4	4%
5	5%
6	6%
7	7%
8	8%
9	9%
10	11%
11	13%
12	15%
13	17%
14	20%
15	24%
16	27%
≥17	≥32%

Step 9 (compare to women of the same age)

Comparative Risk		
Age (years)	Average 10 Yr CHD Risk	Low* 10 Yr CHD Risk
30-34	<1%	<1%
35-39	1%	<1%
40-44	2%	2%
45-49	5%	3%
50-54	8%	5%
55-59	12%	7%
60-64	12%	8%
65-69	13%	8%
70-74	14%	8%

*Low risk was calculated for a woman the same age, normal blood pressure, LDL cholesterol 100-129 mg/dL, HDL cholesterol 55 mg/dL, non-smoker, no diabetes

4.8. APOE: método de genotipagem

Para a genotipagem da APOE, o ácido desoxirribonucleico (DNA) genômico foi extraído do sangue anticoagulado com EDTA (*ethylenediaminetetra-acetic acid*) utilizando um método padrão de *salting-out* padrão (Miller *et al.*, 1988). Os polimorfismos de um único nucleotídeo [*Single Nucleotide Polymorphism* (SNPs)] rs 429358 e rs7412 que determinam as três isoformas do APOE (APOE ϵ 2, APOE ϵ 3 e APOE ϵ 4) foram genotipadas pelo *Prevention Genetics* (www.preventiongenetics.org) utilizando o sistema de genotipagem SNP Amplifluor (Chemicon International, Temecula, California). Os testes para o desvio de Hardy-Weinberg Equilibrium (HWE) foram realizados para toda amostra do SPAH, e a distribuição para os dois loci que foram testados não desviaram do HWE.

Em relação aos procedimentos para o controle de qualidade, a genotipagem de todos os sujeitos foi realizada no laboratório do Programa de Genética e Farmacogenética (PROGENE, Departamento de Psiquiatria da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo), antes do envio para o *Prevention Genetics*. O grau de discrepância entre a genotipagem da Progene e a da *Prevention Genetics* foi abaixo de 2% e neste estudo utilizamos as análises feita pela *Prevention Genetics*.

Foi considerado o status positivo para APOE ϵ 4 com a presença de no mínimo um alelo ϵ 4 no genótipo, incluindo tanto portadores heterozigotos como homozigotos. Dados referentes à distribuição e impacto da APOE ϵ 2 e 4 na amostra inicial podem ser obtidos no nosso artigo "*Relationship between*

regional brain volumes and cognitive performance in the healthy aging: an MRI study using voxel-based morphometry” (Squarzoni et al., 2012).

4.9. Exame de RM – Aquisição das imagens

Todos os sujeitos do presente estudo foram submetidos a dois exames de RM estrutural seguindo exatamente o mesmo protocolo de aquisição de imagens, usando o mesmo aparelho. Os dados de RM estrutural foram adquiridos no Setor de Ressonância Magnética do Instituto de Radiologia (InRad) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP), usando aparelho GE Signa 1,5T. O protocolo de aquisição consiste em uma sequência de imagens em eco gradiente 3D (*Spoiled Gradient Recalled Acquisition – SPGR*) volume, com TE 5,2 ms, TR 21,7 ms, ângulo 20 graus, campo de visão (FOV) 22 cm, espessura de corte 1,5 mm, número de medidas (NEX) de 1; tamanho da matriz de aquisição 256 X 192, para obter 124 imagens englobando todo o cérebro; uma sequência axial T2 *fast spin echo* com 88 imagens; e uma sequência de eco em duplo spin para obtenção de imagens no plano axial em T2 e em densidade de prótons com 120 imagens, com o intuito de detectar lesões neurorradiológicas grosseiras (axial PD/T2).

4.10. Processamento das imagens cerebrais de Ressonância Magnética:

4.10.1. Análise qualitativa das imagens de RM

Os dados de neuroimagem (SPGR, T2 e PD) foram rapidamente reconstruídos e visualmente verificado por uma radiologista, cego para o diagnóstico neuropsiquiátrico, para a identificação de maiores artefatos e a presença de qualquer lesão cerebral, como tumores e lesões silenciosos de SNC (AVC, lesão de SB, ou infarto lacunar).

4.10.2. Análise quantitativa das imagens de RM

Para o presente estudo, foi usada a metodologia de morfometria baseada em voxel, com imagens de RM processadas através do programa SPM 8 [(*Statistical Parametric Mapping*), *Wellcome Department of Imaging Neuroscience Group*, London, UK; (<http://www.fil.ion.ucl.ac.uk/spm>)], executado no Matlab 2012a (www.mathworks.com/products/matlab/). Primeiramente, as imagens foram orientadas para a convenção neurológica e tiveram a comissura anterior definida como ponto de origem adequado ao padrão tridimensional de coordenadas (x,y,z) do MNI (*Montreal Neurological Institute*). Todas as imagens foram segmentadas (SC, SB e líquido cefalorraquidiano) utilizando os parâmetros do protocolo de segmentação unificada (Ashburner and Friston, 2005). Em seguida as imagens foram processadas utilizando a caixa de ferramenta “Dartel” [(*The diffeomorphic anatomical registration using exponentiated lie algebra*) (<http://dbm.neuro.uni-jena.de/vbm/>)]. O registro de

imagens difeomórfico implementado, prevê uma melhor precisão anatômica comparada aos métodos anteriores de VBM (Ashburner, 2007). Outro passo adicional que foi realizado é a “modulação” que consiste em aplicar o determinante Jacobiano a cada imagem de SC normalizada espacialmente para o seu volume relativo antes da normalização, que garante que a quantidade total de SC em cada voxel seja preservada. Por último, as imagens resultantes foram suavizadas com filtro gaussiano isotrópico de 8 mm *full-width at half-maximum* (FWHM) para assegurar uma distribuição normal dos dados como exigido pelos testes estatísticos paramétricos. Nós também suavizamos as imagens usando um filtro 4 mm-FWHM especificamente com a finalidade de achados observados em estruturas cerebrais menores, tais como: amígdala, hipocampo e giro parahipocampal (Kubicki *et al.*, 2002). Após a etapa de processamento das imagens, foi extraído o cálculo do volume total de SC (*globals*) para cada sujeito da amostra.

Para cada mapa estatístico foi usada a ferramenta SVC (*small volume correction*), para verificar a presença de alterações volumétricas em regiões preditas *a priori* incluindo giro temporal medial (hipocampo, giro parahipocampal, amígdala), giro temporal superior, e córtices pré-frontal dorsomedial, dorsolateral, e orbito frontal foram reportadas diferenças significativas que sobrevivesse comparação múltipla ($p < 0,05$).

Assim sendo, para verificar a presença de achados significativos nas regiões cerebrais, para as quais foram formuladas hipóteses *a priori*, as máscaras para córtex temporal medial incluindo o giro parahipocampal (4741 voxels), amígdala (1069 voxels) e hipocampo (4337 voxels); giro temporal superior (12591 voxels); e córtices frontal dorsomedial (10408 voxels),

dorsolateral (31331 voxels) e orbito frontal (18699 voxels) foram desenvolvidas a fim de restringir o número total de voxels a serem inspecionados.

Os resultados das análises se apresentam sob a forma de mapas estatísticos paramétricos em espaço anatômico padronizado de Talairach e Tournoux (Talairach and Tournoux, 1998), mostrando a localização cerebral e extensão dos agrupamentos de voxel nos quais forem observados achados estatisticamente significativos (Good *et al.*, 2002) e o cluster envolvia número superior a 50 voxels.

Por fim, utilizamos o SPSS para calcular índices de correlação linear entre as taxas de variação do desempenho cognitivo e a taxa de variação do volume de SC nas regiões do cérebro onde foi detectado diminuição do volume de SC ao longo do tempo. A taxa de variação desempenho cognitivo foram calculadas como a diferença nos resultados dos testes cognitivos entre os dois tempos (inicial e seguimento) divididos pelos índices cognitivos iniciais. A taxa de variação do volume de SC foi calculada como a diferença nos valores de SC regionais (normalizados para volumes cerebrais globais) entre os dois tempos (inicial e seguimento) no voxel de significância estatística de pico em cada região do cérebro onde foi detectado diminuição do volume ao longo do tempo, dividido pelo valor de pico normalizado do voxel no tempo inicial.

4.11. Análise Estatística

Foram realizadas análises descritivas dos dados clínicos, demográficos e cognitivos da amostra total através do programa *Statistical Package for Social Sciences* (SPSS) para Windows em sua versão 17.0. Após a análise da amostra total (n=55), dividimos a amostra em dois grupos, com declínio cognitivo (n=36) e sem declínio cognitivo (n=19) de acordo com o desempenho no COGSCORE do T0 e T1, realizamos análises descritivas dos dados clínicos, demográficos e cognitivos utilizando ANOVA, para todas as análises adotamos um nível de significância estatística (alpha) de 5% ($p < 0,05$) num intervalo de confiança de 95%.

Além disso, utilizando ANOVA com medidas repetidas, realizamos comparações do desempenho cognitivo entre os seguintes subgrupos: portadores do alelo APOE ϵ 4 (n=11) versus não portadores do alelo APOE ϵ 4 (n=44); e alto FRS (n=21) versus baixo/médio FRS (n=34). Os níveis de significância estatística foi fixado em $p < 0,05$, bicaudal.

Em relação as análises dos dados de neuroimagem (VBM) foi primeiramente realizado uma comparação entre o volume de SC global entre os dois tempos (t-testes pareados com direção bicaudal), a fim de verificar se houve alterações volumétricas em SC global ao longo do tempo. Devido à grande variabilidade interindividual entre as duas aquisições de RM (variação = 477-1729 dias, média de 1191 ± 289 dias, mediana = 1121 dias) o tempo entre as duas aquisições foi usado como uma covariável de confusão. Subsequentemente, para as áreas nas quais foram feitas hipóteses a priori e não foram identificadas na análise do cérebro como um todo, foi aplicada a

ferramenta *small volume correction* (SVC) que permite delimitar essas regiões e identificar áreas para as quais a correlação para comparação múltipla do cérebro como um todo levaria a falso negativo.

Em seguida, usando a divisão dos grupos (com e sem declínio cognitivo) investigamos se houve mudança longitudinal de SC entre os grupos por meio da realização de medidas repetidas de análise de covariância (ANCOVA) das diferenças regionais de SC usando o modelo linear geral, com o grupos e tempo como fatores. Uma segunda análise, dividimos os grupos pela presença/ausência da APOE ϵ 4 e investigamos se houve mudança longitudinal de SC entre os grupos por meio da realização de medidas repetidas de análise de covariância (ANCOVA) das diferenças regionais de SC usando o modelo linear geral, com o grupos e tempo como fatores. Finalmente, dividimos os grupos de acordo com a presença de fatores de risco cardiovascular (alto risco X médio/baixo risco) e investigamos se houve mudança longitudinal de SC entre os grupos por meio da realização de medidas repetidas de análise de covariância (ANCOVA) das diferenças regionais de SC usando o modelo linear geral, com o grupos e tempo como fatores. Nestas análises, foi incluído o valor global de SC como uma covariável, extraído do volume total de SC correspondente a cada sujeito. Todas as análises reportamos em forma de mapas estatísticos paramétricos com nível de significância estatística de $Z = 3,09$ ($p < 0,001$) não corrigido para comparações múltiplas e cluster acima de 50 voxels. Nos mapas estatísticos paramétricos, as coordenadas dos voxels com pico de significância estatística serão descritas de acordo com o espaço anatômico padronizado do Atlas de Talairach e Tournoux (Talairach and Tournoux, 1998; Brett *et al.*, 2002).

Os resultados serão reportados como significativos somente os que sobreviverem à correção para comparações múltiplas ao nível de voxel individual ou cluster (*Family-Wise Error* - FWE), com $p_{FWE} < 0,05$ (Friston *et al.*, 1995)

5. RESULTADOS

5.1. Análise estatística da amostra total (n=55)

5.1.1. Dados clínicos, demográficos e cognitivos da amostra total (n= 55)

A amostra de seguimento analisada no presente estudo foi de 55 voluntários que realizaram exame de RM estrutural em dois tempos (2006/2008 – 2009/2011). A tabela 1 apresenta os dados clínicos e demográficos, sendo que 42 (76,4%) pertencem ao grupo de médio e alto risco cardiovascular, 39 (70,9%) tem hipertensão arterial e 44 (80%) não tem a presença da APOE ϵ 4. Mais da metade da amostra 36 (65,5%) apresentou declínio cognitivo entre as duas avaliações. O intervalo de aquisição entre os exames foi de 1191 dias ($\pm$ 289,68 - intervalo de 477 a 1729 dias).

Tabela 1: Características clínicas e demográficas da amostra total

Amostra total (n=55)	
Homens (%)	27 (49,1) ^a
Anos de escolaridade ($\pm$ DP)	5,05 ($\pm$ 3,525) ^b
Classe Socioeconômica (%) (A/ B/ C/ D)	1 (1,8) / 17 (30,9) / 29 (50,9) / 9 (16,4) ^a
Framingham (%) (Baixo, médio e alto risco)	13 (23,6) / 21 (38,2) / 21 (38,2) ^a
Presença do Alelo da APOE ϵ 4 (%)	11 (20%) ^a
Teve declínio cognitivo (%)	36 (65,5%) ^a
Tempo entre as RMs (dias) ($\pm$ DP)	1191,36 ($\pm$ 289,68) ^b

Legenda: DP: desvio padrão; APOE ϵ 4: presença do Alelo 4 da Apolipoproteína

E; RM: ressonância magnética: ^a x2 test (Pearson); ^b t-test.

A avaliação cognitiva inicial (T0) gerou o coeficiente de inteligência (QI), conforme mostra a tabela 2, sendo a média de 77,15 ($\pm 7,723$) para amostra de total.

Tabela 2: Dados cognitivos da amostra total (inicial e seguimento)

Amostra total (n=55)	Média	Diferença do intervalo de confiança de 95%.
WASI vocabulário ($\pm$ DP)	32,42 ($\pm 8,027$) ^a	(30,25 – 34,59) ^b
WASI matriz ($\pm$ DP)	36,35 ($\pm 7,636$) ^a	(34,28 – 38,41) ^b
QI estimado ($\pm$ DP)	77,15 ($\pm 7,723$) ^a	(75,06 – 79,23) ^b

Legenda: DP: desvio padrão; WASI: QI: coeficiente de inteligência. ^a t-test; ^b

Realizamos uma análise entre as avaliações iniciais e as avaliações do seguimento e observamos que no período entre as avaliações a amostra apresentou declínio cognitivo, avaliado através do COGSCORE ($p=0,001$) e atrofia cortical (avaliado pelo volume cerebral total estimado pelo globals) ($p<0,001$), conforme apresentado na tabela 3.

Tabela 3: Características cognitivas ao longo do tempo

	T0 (n=55)	T1 (n=55)	P
COGSCORE	29,67 ($\pm 1,64$)	28,78 ($\pm 1,70$)	0,001
Fluência Verbal	15,27 ($\pm 3,78$)	13,91 ($\pm 3,45$)	0,009
SKT – Total *	5,65 ($\pm 3,37$)	5,89 ($\pm 3,85$)	0,459
Subscore memória *	0,91 ($\pm 1,09$)	0,98 ($\pm 1,16$)	0,659
Subscore Atenção *	4,75 ($\pm 3,07$)	4,91 ($\pm 3,29$)	0,513
Volume SC (Globals)	613,07 ($\pm 63,30$)	607,66 ($\pm 62,4$)	<0,001

Legenda: teste pareado; COGSCORE: escore cognitivo; T0: avaliação inicial; T1: avaliação longitudinal; SC: substância cinzenta; Globals: volume total cerebral de substância cinzenta; SKT: Short Cognitive Performance Test *

5.1.2. Análise quantitativa da amostra total: morfometria baseada em voxel

5.1.2.1. Comparação do volume de SC global entre os dois tempos (T0 x T1)

O volume cerebral total (avaliado pelo volume de globals) foi de 613,10 ($\pm 63,30$) mm³ na inicial, tendo reduzido significativamente para 607,70 ($\pm 62,4$) mm³ no seguimento ($p < 0,001$), indicando atrofia cerebral global ao longo dos anos.

O gráfico 1 apresenta visualmente a diferença entre os volumes cerebrais totais nos dois tempos.

LEGENDA: O volume cerebral de SC na avaliação de seguimento (media=613,07) é menor do que o volume cerebral de SC na avaliação inicial (media=607,66) indicando que houve uma redução do volume cerebral de SC ($p < 0,001$) ao longo do tempo.

5.1.2.2. Comparação do volume de SC regional entre os dois tempos (inicial e seguimento)

5.1.2.2.1. Análise em todo o volume cerebral

Na pesquisa exploratória de todo o cérebro na comparação entre o volume de SC e os dois tempos de RM (incluindo o tempo entre as aquisições de RM como covariável de confusão e o volume total cerebral de SC), observamos focos de redução de SC ao longo do tempo envolvendo a região

do tálamo direito ($k=330$; $z=5,01$; $p=0,016$ e coordenadas $x,y,z= 20 -19 4$) e a região do giro parahipocampal esquerdo ($k=131$; $z=4,79$; $p=0,041$ e coordenadas $x,y,z= -20 -22 -33$).

Figura 3: Comparação entre o volume de substância cinzenta entre os dois tempos (T0xT1).

Focos de significância estatística visualizados sobre cortes axiais cerebrais normalizados espacialmente para o Atlas Estereotático do Cérebro Humano (Talairach e Tournoux, 1988). Os números associados a cada corte do cérebro correspondem à coordenada do eixo X no padrão MNI. A escala corresponde ao valor do escore Z de pico de maior significância estatística. Os focos destacados em amarelo mostram onde foram encontradas diferenças estatísticas com limiar de $p<0.001$ (não corrigido para comparações múltiplas). Os focos mostram alteração em substância cinzenta na região: (a) do tálamo direito ($Z=5,01$) e (b) giro parahipocampal esquerdo ($Z=4,79$).

5.1.2.2.2. Análise em regiões específicas através de SVC em áreas não identificadas na análise global

A tabela 4 apresenta os resultados obtidos através da comparação das mudanças de SC ao longo do tempo (T0 x T1) (incluindo o tempo entre as aquisições de RM como covariável de confusão e o volume total cerebral de SC nas duas aquisições), após repetir a análise utilizando a ferramenta SVC para delimitar as regiões preditas a priori não identificadas na avaliação do cérebro como um todo (amígdala, hipocampo, giro temporal superior, e córtices pré-frontal dorsomedial, dorsolateral e orbito frontal). Os resultados apresentados na tabela foram os que sobreviveram as comparações múltiplas ($p < 0,05$) e o cluster envolvia número superior a 50 *voxels*.

Nós observamos perda do volume de SC envolvendo especificamente a região do córtex temporal superior direito ($p = 0,005$). Observamos também preservação relativa da região do córtex pré-frontal dorsolateral esquerdo ($p = 0,010$) significando que houve uma perda menor de volume de SC desta região quando comparado com a perda do volume total de SC.

Tabela 4: Comparação entre o volume de SC ao longo de 3 anos

Região cerebral	Tamanho do Cluster ^a	Pico Z Score ^b	Coordenadas x,y,z (MNI) ^c	PFWE corrigido ^d
<i>Comparação entre o volume de SC regional entre os dois tempos (T0 x T1)</i>				
<i>Atrofia cortical ao longo do tempo</i>				
Córtex temporal superior direito	485	4,29	62 -40 16	0,005
		3,83	66 -52 18	0,027
		3,71	71 -35 22	0,040
		3,69	68 -48 15	0,042
<i>Preservação cortical ao longo do tempo</i>				
Córtex frontal dorsolateral direito	391	4,40	31 60 9	0.010

Legenda: FWE family-wise error; ^a Numero de voxels contíguos que ultrapassam o limiar inicial de $p < 0,001$ (não corrigido) nos mapas estatísticos; ^b Valor do escore Z para o voxel de maior significância estatística dentro do cluster; ^c Coordenadas em MNI do voxel de máxima significância estatística dentro de cada cluster; ^d Significância estatística após correção para comparações múltiplas; inferência feita ao nível de voxels individualmente (FWE corrigido).

Figura 4: Comparação entre o volume de SC ao longo de 3 anos

Focos de significância estatística visualizados sobre cortes axiais cerebrais normalizados espacialmente para o Atlas Estereotático do Cérebro Humano (Talairach e Tournoux, 1988). Os números associados a cada corte do cérebro correspondem à coordenada do eixo X no padrão MNI. A escala corresponde ao valor do escore Z de pico de maior significância estatística. Os focos destacados em amarelo mostram onde foram encontradas diferenças estatísticas com limiar de $p < 0.001$ (não corrigido para comparações múltiplas). Os focos mostram alteração em substância cinzenta na região: (a) do córtex temporal superior direito ($Z=4,29$) e (b) córtex frontal dorsolateral direito ($Z=4,40$).

5.2. Análise estatística da amostra com declínio e sem declínio cognitivo.

5.2.1. Dados clínicos, demográficos e cognitivos da amostra com declínio ($n=19$) e sem declínio cognitivo ($n=36$).

Após dividir a amostra de seguimento ($n=55$) em dois grupos através do desempenho cognitivo do COGSCORE nas duas avaliações (inicial e de seguimento), consideramos como declínio cognitivo que teve um pior desempenho na avaliação de seguimento em relação a avaliação inicial (T0-

T1), com isso obtivemos o grupo sem declínio cognitivo (n=19) e com declínio cognitivo (n=36). A tabela 5 apresenta os dados demográficos, clínicos e cognitivos dos dois grupos de acordo com a presença/ausência de declínio cognitivo. O grupo com declínio apresentou menor escolaridade ($p=0.014$) e maior presença da APOE ϵ 4 ($p=0.047$). Gênero, idade, escore original de Framingham e tempo entre RM não foram significativas entre os grupos.

Tabela 5: Variáveis clínicas na amostra dividida de acordo com a presença de declínio cognitivo na avaliação de segmento.

	Com declínio (n=36)	Sem declínio (n=19)	P
Homens (%)	19 (52,8%)	8 (42,1%)	0,452 ^a
Idade ($\pm$ DP)	70,56 ($\pm$ 2,40)	69,89 ($\pm$ 2,30)	0,331 ^b
Anos de escolaridade ($\pm$ DP)	4,22 ($\pm$ 3,07)	6,63 ($\pm$ 3,86)	0,014 ^b
Framingham (%) (Baixo, médio e alto risco)	9 / 12 / 15	4 / 9 / 6	0,590 ^a
Presença do Alelo da APOE ϵ 4 (%)	10 (27,8%)	1 (5,3%)	0,047 ^a
Tempo entre as RMs (dias) ($\pm$ DP)	1183,61 ($\pm$ 263,09)	1206,05 ($\pm$ 341,76)	0,788 ^b

Legenda: DP: desvio padrão; APOE: presença do Alelo 4 da Apolipoproteína;

RM: ressonância magnética: ^a x2 test (Pearson); ^b t-test.

A tabela 6 apresenta as comparações cognitivas entre os grupos com declínio e sem declínio cognitivo. Nós observamos diferença estatisticamente significativa no COGSCORE ($p<0,001$) e na fluência verbal ($p=0,027$)

Tabela 6: Características cognitivas na amostra dividida de acordo com a presença de declínio cognitivo na avaliação de segmento

		Sem declínio (n=19)	Com declínio (n=36)	P
COGSCORE	T0	28,58 ($\pm 1,67$)	30,25 ($\pm 1,31$)	<0,001
	T1	29,53 ($\pm 1,38$)	28,39 ($\pm 1,75$)	0,017
Verbal	T0	15,79 (2,78)	15,00 ($\pm 4,23$)	0,468
	T1	15,32 ($\pm 3,36$)	13,17 ($\pm 3,30$)	0,027
SKT - Total	T0	5,11 ($\pm 3,78$)	5,94 ($\pm 3,15$)	0,385
	T1	6,05 ($\pm 4,28$)	5,81 ($\pm 3,67$)	0,824
Subscore memória	T0	0,74 ($\pm 1,04$)	1,00 ($\pm 1,12$)	0,401
	T1	1,00 ($\pm 1,02$)	0,97 ($\pm 1,58$)	0,934
Subscore Atenção	T0	4,37 ($\pm 3,56$)	4,94 ($\pm 2,81$)	0,514
	T1	5,05 ($\pm 3,77$)	4,83 ($\pm 3,06$)	0,817
Globals	T0	602,07 ($\pm 79,10$)	618,91 ($\pm 53,52$)	0,353
	T1	596,76 ($\pm 80,50$)	613,47 ($\pm 50,77$)	0,418

Legenda: COGSCORE: escore cognitivo; T0: avaliação inicial; T1: avaliação do segmento (longitudinal); SC: substância cinzenta; Globals: volume total cerebral de substância cinzenta; SKT: Short Cognitive Performance Test*

5.2.2. Análise quantitativa da amostra com declínio e sem declínio cognitivo: morfometria baseada em voxel

5.2.2.1. Comparação do volume de SC entre voluntários com declínio cognitivo e sem declínio cognitivo ao longo do tempo

Realizamos uma análise de covariância (Ancova) entre voluntários com declínio (n=36) e sem declínio cognitivo (n=19) com 2 fatores (grupos x tempo) e com o volume total de SC (globals) incluído como covariável. Não foi

observado resultado estatisticamente significativo que sobrevivesse à comparação múltipla na análise exploratória e com a ferramenta SVC.

5.3. Análise estatística da amostra com a Influência da APOE ϵ 4 e volume cerebral ao longo dos anos.

5.3.1. Dados clínicos, demográficos e cognitivos da amostra com a presença da APOE ϵ 4 (n=11) e a ausência de APOE ϵ 4 (n= 44)

Após dividir a amostra pela presença da APOE ϵ 4 (n=11) e a ausência da APOE ϵ 4 (n=44), todos os portadores da APOE ϵ 4 (20%) eram heterozigotos. A tabela 7 apresenta os dados demográficos e clínicos dos dois grupos de acordo com a presença/ausência da APOE ϵ 4. O grupo com a presença da APOE ϵ 4 apresentou maior presença de declínio cognitivo ($p=0.045$). Gênero, idade e escore original de Framingham não foram significativas entre os grupos.

Tabela 7: Variáveis clínicas na amostra dividida de acordo com a presença da APOE ϵ 4 e a ausência da APOE ϵ 4.

	Presença	Ausência	P
	APOE ϵ 4 (n=11)	APOE ϵ 4 (n=44)	
Homens (%)	7 (12,7%)	20 (36,4%)	0,230 ^a
Idade ($\pm$ DP)	69,82 ($\pm$ 2,13)	70,45 ($\pm$ 2,43)	0,431 ^b
Anos de escolaridade ($\pm$ DP)	5,00 ($\pm$ 2,53)	5,07 ($\pm$ 3,75)	0,955 ^b
Framingham (%) (Baixo, médio e alto risco)	4 / 4 / 3	9 / 17 / 8	0,501 ^a
Presença de declínio cognitivo (%)	10 (18,2%)	26 (47,3%)	0,045 ^a

Legenda: DP: desvio padrão; APOE ϵ 4: presença do Alelo 4 da Apolipoproteína;

^a x2 test (Pearson); ^b t-test.

A tabela 8 apresenta as comparações cognitivas entre os grupos com a presença da APOE ϵ 4 e a ausência da APOE ϵ 4. Nós observamos diferença estatisticamente significativa na avaliação inicial do COGSCORE ($p=0,048$) e no subscore de memória ($p=0,030$), na fluência verbal ($p=0,039$).

Tabela 8: Características cognitivas na amostra dividida de acordo com a presença da APOE ϵ 4 e a ausência da APOE ϵ 4.

		Presença	Ausência	P
		APOE ϵ 4 (n=11)	APOE ϵ 4 (n=44)	
COGSCORE	T0	30,55 ($\pm 1,21$)	29,45 ($\pm 1,67$)	0,048
	T1	28,82 ($\pm 0,89$)	28,77 ($\pm 1,85$)	0,938
Fluência Verbal	T0	14,73 ($\pm 3,06$)	15,41 ($\pm 3,96$)	0,598
	T1	12,00 ($\pm 2,64$)	14,39 ($\pm 3,49$)	0,039
SKT - Total	T0	6,36 ($\pm 3,61$)	5,48 ($\pm 3,33$)	0,441
	T1	5,64 ($\pm 4,00$)	5,95 ($\pm 3,86$)	0,809
Subscore memória	T0	1,55 ($\pm 1,57$)	0,75 ($\pm 0,89$)	0,030
	T1	1,00 ($\pm 1,18$)	0,98 ($\pm 1,17$)	0,954
Subscore Atenção	T0	4,82 ($\pm 3,02$)	4,73 ($\pm 3,12$)	0,931
	T1	4,64 ($\pm 3,35$)	4,98 ($\pm 3,31$)	0,762
Volume SC (Globals)	T0	621,17 ($\pm 51,59$)	611,04 ($\pm 66,27$)	0,639
	T1	614,79 ($\pm 52,08$)	605,86 ($\pm 65,15$)	0,675

Legenda: COGSCORE: escore cognitivo; T0: avaliação inicial; T1: avaliação do segmento (longitudinal); SC: substância cinzenta; Globals: volume total cerebral de substância cinzenta; SKT: Short Cognitive Performance Test*

5.3.2. Análise quantitativa da amostra com a presença da APOE ϵ 4 (n=11) e a ausência de APOE ϵ 4 (n= 44): morfometria baseada em voxel

5.3.2.1. Comparação do volume de SC entre voluntários com a presença da APOE ϵ 4 (n=11) e a ausência de APOE ϵ 4 (n= 44)

Realizamos uma análise de covariância (Ancova) entre voluntários com a presença da APOE ϵ 4 (n=11) e ausência da APOE ϵ 4 (n=44) com 2 fatores (grupos x tempo) e com o volume total de SC (globals) incluído como covariável. Não foi observado resultado estatisticamente significativo que sobreviesse à comparação múltipla na análise exploratória e com a ferramenta SVC.

5.4. Análise estatística da amostra com a Influência do alto risco cardiovascular e volume cerebral ao longo dos anos

5.4.1. Dados clínicos, demográficos e cognitivos da amostra com alto risco cardiovascular (n=21) e a baixo/médio risco (n= 34)

Dividimos a amostra pelo FRS em dois grupos: alto risco cardiovascular (n=21) e baixo/médio risco cardiovascular (n=44). A tabela 9 apresenta os dados demográficos e clínicos dos dois grupos de acordo com a influência do risco cardiovascular. O grupo com maior risco cardiovascular apresentou mais homens ($p < 0,001$). Idade, escolaridade e presença de declínio cognitivo não foram significativas entre os grupos.

Tabela 9: Variáveis clínicas na amostra dividida de acordo com a influência do risco cardiovascular.

	Presença Alto FRS (n=21)	Baixo/ médio risco (n=34)	P
Homens (%)	18 (32,7%)	9 (16,4%)	<0,001 ^a
Idade (± DP)	70,62 (±2,39)	70,15 (±2,37)	0,479 ^b
Anos de escolaridade (± DP)	4,24 (±3,49)	5,56 (±3,50)	0,179 ^b
Presença de declínio cognitivo (%)	15 (27,3%)	21 (38,2%)	0,332 ^a
Presença da APOEε4 (%)	3 (5,5%)	8 (14,5%)	0,319 ^a

Legenda: DP: desvio padrão; APOE: presença do Alelo 4 da Apolipoproteína; FRS: *Framingham Risk Score for Coronary Heart Disease Risk* ^a x2 test (Pearson); ^b t-test.

A tabela 10 apresenta as comparações cognitivas entre os grupos com alto risco cardiovascular e baixo/médio risco cardiovascular. Nós observamos diferença estatisticamente significativa no volume de SC (p=0,006)

Tabela 10: Características cognitivas na amostra dividida de acordo com a influência do risco cardiovascular.

		Alto risco (n=21)	Baixo/Médio risco (n=34)	P
COGSCORE	T0	29,52 ($\pm 1,75$)	29,76 ($\pm 1,59$)	0,602
	T1	28,52 ($\pm 1,60$)	28,94 ($\pm 1,77$)	0,417
Fluência verbal	T0	15,38 ($\pm 4,36$)	15,21 ($\pm 3,45$)	0,870
	T1	13,62 ($\pm 3,90$)	14,09 ($\pm 3,19$)	0,469
SKT - Total	T0	5,57 ($\pm 4,21$)	5,71 ($\pm 2,80$)	0,887
	T1	5,57 ($\pm 4,19$)	6,09 ($\pm 3,68$)	0,517
Subscore memória	T0	0,95 ($\pm 1,11$)	0,88 ($\pm 1,09$)	0,820
	T1	0,86 ($\pm 0,96$)	1,06 ($\pm 1,27$)	0,202
Subscore Atenção	T0	4,62 ($\pm 3,74$)	4,82 ($\pm 2,63$)	0,813
	T1	4,71 ($\pm 3,71$)	5,03 ($\pm 3,06$)	0,315
Volume SC (Globals)	T0	644,04 ($\pm 65,07$)	593,93 ($\pm 54,81$)	0,003
	T1	636,63 ($\pm 64,63$)	586,75 ($\pm 54,57$)	0,006

Legenda: COGSCORE: escore cognitivo; T0: avaliação inicial; T1: avaliação do segmento (longitudinal); SC: substância cinzenta; Globals: volume total cerebral de substância cinzenta; SKT: *Short Cognitive Performance Test**

5.4.2. Análise quantitativa da amostra com alto risco cardiovascular (n=21) e a baixo/médio risco (n= 34): morfometria baseada em voxel

5.4.2.1. Comparação do volume de SC entre voluntários com alto risco cardiovascular (n=21) e a baixo/médio risco (n= 34)

Realizamos uma análise de covariância (Ancova) entre voluntários com alto risco cardiovascular (n=21) e sem alto risco cardiovascular (n=34) com 2

fatores (risco cardiovascular x tempo) e com o volume total de SC (globals) incluído como covariável

Tabela 11: Comparação do volume de SC entre voluntários com alto risco ao longo do tempo

Região cerebral	Tamanho do Cluster ^a	Pico Z Score ^b	Coordenadas x,y,z (MNI) ^c	PFWE corrigido ^d
Córtex frontal dorsolateral direito	84	4,05	33 26 54	0,030

Legenda: FWE family-wise error; ^a Número de voxels contíguos que ultrapassam o limiar inicial de $p < 0,001$ (não corrigido) nos mapas estatísticos; ^b Valor do escore Z para o voxel de maior significância estatística dentro do cluster; ^c Coordenadas em MNI do voxel de máxima significância estatística dentro de cada cluster; ^d Significância estatística após correção para comparações múltiplas; inferência feita ao nível de voxels individualmente (FWE corrigido).

Figura 5: Comparação do volume de SC entre voluntários com alto risco ao longo do tempo

Focos de significância estatística visualizados sobre cortes axiais cerebrais normalizados espacialmente para o Atlas Estereotático do Cérebro Humano (Talairach e Tournoux, 1988). Os números associados a cada corte do cérebro correspondem à coordenada do eixo X no padrão MNI. A escala corresponde ao valor do escore Z de pico de maior significância estatística. Os focos destacados em amarelo mostram onde foram encontradas diferenças estatísticas com limiar de $p < 0,001$ (não corrigido para comparações múltiplas). Os focos mostram alteração em substância cinzenta na região do córtex frontal dorsolateral direito ($Z=4,05$)

5.5. Correlação linear entre a testes cognitivos e volume de SC regional

Os índices de correlação linear foram calculados entre a taxa de variação do teste cognitivo e taxa de variação do volume de SC regional do tálamo direito e giro parahipocampal esquerdo. Como determinado pela diferença dos valores de SC regional entre os dois pontos de tempo (inicial e seguimento) no voxel de maior significância estatística (pico) em cada uma dessas duas regiões cerebrais (normalizados para volumes cerebrais globais), dividido pelo valor de pico do tempo inicial normalizado.

Nesta correlação encontramos uma tendência entre a taxa de variação do volume de SC regional no tálamo direito e a taxa de variação do COGSCORE ($r=0,229$, $p=0,093$). Esta tendência se manteve quando um coeficiente parcial de correlação foi calculado levando em conta as variações nos escores FRS ($r=0,231$, $p=0,093$). O coeficiente de correlação parcial era igual a $0,224$ ($p=0,103$) quando levamos em conta a presença da APOE $\epsilon 4$.

Não foram encontradas correlações significativas entre a taxa de variação do volume de SC do tálamo e outros índices da taxa de variação do desempenho cognitivo ($p>0,205$). Quanto a correlações entre a taxa de variação do volume de SC do giro parahipocampal e qualquer índice da taxa de variação desempenho cognitivo ($p>0,295$).

Finalmente, encontramos uma correlação direta significativa entre a taxa de declínio de fluência verbal e taxa de redução global de volume de SC ($r=0,293$, $p=0,030$). Este resultado permanece com significância estatística quando levamos em conta, tanto a presença do alelo APOE $\epsilon 4$ ($p=0,289$, $p=0,034$), quanto a influência do FRS ($p=0,281$, $p=0,040$).

6. DISCUSSÃO

Até o presente momento, este é o primeiro estudo longitudinal de morfometria baseada no voxel que avaliou a presença de reduções volumétricas globais e regionais de substância cinzenta ao longo do tempo em idosos saudáveis e investigou diretamente a relação entre a redução volumétrica cerebral e as alterações no desempenho cognitivo, presença do alelo 4 da APOE e influência dos fatores cardiovasculares.

6.1. Atrofia cortical

O nosso principal achado foi de redução global de SC durante o período médio de 3 anos no seguimento, mais especificamente a redução regional de SC envolvendo o tálamo direito e giro parahipocampal esquerdo.

O tálamo é uma estrutura cerebral localizada no diencéfalo, é um centro de organização cerebral que passam diversas vias neuronais. Suas ligações mais abundantes se dão entre o sistema extrapiramidal e o córtex motor. Suas principais funções são: a transmissão de sinais motores e sensitivos para o córtex e a regulação da consciência, sono e estado de alerta.

O hipocampo está localizado nos lobos temporais e está particularmente envolvido com fenômenos da memória, sendo importante para converter a memória de curto prazo em memória a longo prazo. Além disso atua em interação com a amígdala

A relevância das mudanças estruturais do tálamo durante o envelhecimento saudável tem sido descrita (Fama and Sullivan, 2015) e este

resultado está de acordo com três investigações anteriores de VBM longitudinal com idosos saudáveis (Resnick *et al.*, 2003; Nyberg *et al.*, 2010). Nossos achados envolvendo o tálamo também são consistentes com recentes resultados de investigações longitudinais de RM baseados em ROI avaliando os volumes de estruturas subcorticais em idosos saudáveis (Fjell *et al.*, 2013).

Nós também confirmamos a predição de que as reduções de volume de SC relacionadas com o envelhecimento em idosos saudáveis estaria particularmente proeminente na região do hipocampo. Nossos achados no giro parahipocampal confirmam que as mudanças estruturais significativas na região do hipocampo em uma população idosa são detectáveis em investigações longitudinais de RM em curtos períodos entre 1 a 3 anos.

Nossos resultados também são consistentes com resultados de diversos estudos longitudinais de RM realizados com jovens adultos saudáveis para amostras de idosos, utilizando métodos baseado em ROI ou de VBM (Thambisetty *et al.*, 2010; Crivello *et al.*, 2014; Fraser and Nadeau, 2015).

Quando usamos o SVC para investigar as regiões preditas *a priori*, encontramos uma perda do volume de SC ao longo do tempo envolvendo a região do córtex temporal superior direito e também uma preservação relativa da região do córtex pré-frontal dorsolateral esquerdo. Além disso, nós não encontramos reduções de volume de SC relacionadas com o envelhecimento saudável em regiões preditas *a priori* envolvendo os córtices pré-frontal dorsomedial e orbito frontal.

Vale destacar que todos os voluntários do nosso estudo foram recrutados em uma área circunscrita, economicamente desfavorecidos de uma região de São Paulo, enquanto a maioria dos outros estudos longitudinais de

RM com idosos saudáveis foram realizados em países de alta renda. Porém, ao produzir resultados de redução de SC consistentes com os resultados de investigações anteriores realizados em países de alta renda, o nosso estudo VBM indica que houve uma redução do volume no tálamo e região do hipocampo em idosos saudáveis são igualmente detectáveis através de diferentes ambientes e culturas.

6.2. Declínio cognitivo

Duas medidas diferentes de desempenho cognitivo (COGSCORE e SKT) foram empregados no atual estudo. A facilidade para aplicar a SKT nos permitiu usar esta bateria cognitiva rápida no dia da RM, enquanto intervalos variáveis de tempo decorrido entre o teste COGSCORE e RM na avaliação inicial. No seguimento repetimos a bateria COGSCORE e SKT no dia do exame de RM. A média do QI da nossa amostra foi de 77,15 ($\pm 7,723$) o que significa uma capacidade intelectual limítrofe para faixa etária, entretanto o COGSCORE foi validado para uso em populações de ambientes diferentes e com níveis variáveis de educação (Prince *et al.*, 2011), de forma que se apresenta como instrumento mais sensível para detectar mudanças mais sutis no desempenho cognitivo e nas correlações entre neuroimagem e escores nos testes cognitivos.

Vale ressaltar na nossa amostra que o declínio cognitivo ao longo do tempo não foi significativamente associado com as alterações de volume de SC na região do hipocampo. Em estudos anteriores de RM com idosos saudáveis encontraram tanto resultado positivo (Rodrigue and Raz, 2004; Kramer *et al.*,

2007; Murphy *et al.*, 2010; Persson *et al.*, 2012; Fjell *et al.*, 2013; Korthauer *et al.*, 2016), quanto negativo (Ylikoski *et al.*, 2000b; Du *et al.*, 2006; Moffat *et al.*, 2007; Walhovd *et al.*, 2010; Korthauer *et al.*, 2016)) em relação a redução do volume do hipocampo associado ao declínio cognitivo.

6.3. Influência da APOE ϵ 4

Na nossa amostra obtivemos 20% de sujeitos portadores de APOE4, sendo todos heterozigotos. Nas análises realizadas entre voluntários com a presença da APOE ϵ 4 não influenciou a perda de SC ao longo dos anos. A influência da APOE ϵ 4 é complexa e multifatorial, podendo relacionar-se a maior risco cardiovascular. Além disso, está associada a uma maior redução do volume de SC e afinamento cortical ao longo do tempo, em idosos com DA ou até mesmo na progressão de CCL para DA, como demonstrado em vários estudos longitudinais de RM (Kim *et al.*, 2015; Löwe *et al.*, 2016).

No entanto, em estudos longitudinais de RM com idosos saudáveis, alguns autores têm relatado um maior grau de alargamento ventricular e redução do volume hipocampal em idosos portadores da APOE ϵ 4 (Jak *et al.*, 2007; Morra *et al.*, 2009; Risacher *et al.*, 2010; Roussotte *et al.*, 2014), enquanto outros não encontraram nenhuma influência da APOE ϵ 4 na mudança de volume cerebral (Du *et al.*, 2006; Taylor *et al.*, 2014). Estudos transversais de RM que avaliaram os volumes cerebrais em idosos saudáveis levando em conta a influência da APOE também produziram resultados controversos (Habes *et al.*, 2016b). Portanto, ainda não está claro os efeitos moderados da

APOE em idosos, se somente são exercidas sobre processos cerebrais patológicos relacionados a DA, ou ainda, se influenciam as mudanças cerebrais associadas com o envelhecimento saudável.

6.4. Risco cardiovascular

Na presente investigação, cerca de 38,2% da amostra apresentava alto risco cardiovascular de acordo com a pontuação FRS (com mais de 61,9% dos indivíduos que apresentaram hipertensão arterial e 14,3% diabetes tipo II).

Identificamos uma influência dos fatores de risco cardiovascular e redução do volume cerebral ao longo do tempo envolvendo o córtex frontal dorsolateral direito.

Embora não tenhamos encontrado nenhuma interação significativa entre subgrupo e tempo na ANOVA investigar diferenças cerebrais regionais no padrão longitudinal das reduções de substância cinzenta entre indivíduos com alto risco cardiovascular contra os demais indivíduos, é interessante notar que as comparações longitudinais emparelhados dentro de cada subgrupo mostrou redução dos volumes de matéria cinzenta no hipocampo ao longo do tempo predominantemente nos indivíduos que tiveram maior risco cardiovascular.

6.5. Limitações presente no estudo

Duas limitações do nosso estudo devem ser destacadas. Em primeiro lugar, embora tenhamos conseguido recrutar um grupo bem caracterizado de idosos saudáveis cognitivamente preservados que era maior do que as

amostras recrutadas em alguns dos estudos de ressonância magnética longitudinais anteriores realizados em faixas etárias semelhantes (Nyberg *et al.*, 2010), devemos reconhecer que o tamanho da amostra era ainda relativamente modesto e, possivelmente, insuficiente para evitar o risco de erros de tipo II. Estudos futuros com amostras maiores são, portanto, necessários para confirmar os resultados aqui relatados.

Em segundo lugar, o equipamento 3 Tesla foi recentemente disponibilizado para os estudos de imagens do cérebro e pode supostamente proporcionar maior contraste nas imagens do cérebro, em comparação com equipamento de 1,5 Tesla, como aqui usado (Tanenbaum, 2006; Ho *et al.*, 2010). A maioria dos estudos longitudinais de envelhecimento saudável com RM até a presente data, têm utilizado o equipamento de 1,5 Tesla, e continua demonstrando diferentes mudanças de padrões de volume de SC ao longo do tempo. No entanto, tem sido claramente demonstrada um desempenho melhor do equipamento de 3 Tesla em estudos utilizando RM funcional, em vez de aquisições morfométricas de RM (Wardlaw *et al.*, 2012).

7. CONCLUSÃO

Este é um estudo de corte longitudinal que procurou investigar com medidas repetidas de RM as alterações cerebrais ao longo do tempo (média de 3 anos), numa amostra epidemiológica em idosos saudáveis, usando métodos automatizados de quantificação *voxel-a-voxel*.

Nós observamos a presença de reduções volumétricas de SC globais ao longo do tempo em idosos saudáveis envolvendo o tálamo direito e giro parahipocampal esquerdo. Além disso observamos reduções regionais de SC envolvendo o córtex temporal superior direito e também uma preservação relativa da região do córtex pré-frontal dorsolateral esquerdo.

Estudos futuros de RM com maiores amostras de idosos saudáveis e protocolos de aquisição de imagem multimodais são necessários para estender os resultados aqui apresentados, no que diz respeito tanto a análise cerebral total e característica microestrutural, quanto de padrões de conectividade funcionais e estruturais. Estes estudos de imagens multimodais devem esclarecer melhor o substrato biológico dos declínios cognitivos sutis associados com o envelhecimento saudável, bem como o fornecimento de biomarcadores válidos para a avaliação do cérebro modificando as propriedades de intervenções destinadas a minimizar o impacto de tal declínio cognitivo.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE, O. et al. Aging in the CNS: comparison of gray/white matter volume and diffusion tensor data. **Neurobiol Aging**, v. 29, n. 1, p. 102-16, Jan 2008. Available at: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17023094 >.

ALEXANDER, G. E. et al. Regional network of magnetic resonance imaging gray matter volume in healthy aging. **Neuroreport**, v. 17, n. 10, p. 951-6, Jul 17 2006. Available at: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16791083 >.

ASHBURNER, J. A fast diffeomorphic image registration algorithm. **Neuroimage**, v. 38, n. 1, p. 95-113, Oct 15 2007. Available at: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17761438 >.

ASHBURNER, J.; FRISTON, K. J. Unified segmentation. **Neuroimage**, v. 26, n. 3, p. 839-51, Jul 2005. ISSN 1053-8119. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15955494> >.

BOTTINO, C. M. et al. Estimate of dementia prevalence in a community sample from Sao Paulo, Brazil. **Dement Geriatr Cogn Disord**, v. 26, n. 4, p. 291-9, 2008. Available at: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18843181 >.

BRETT, M.; JOHNSRUDE, I. S.; OWEN, A. M. The problem of functional localization in the human brain. **Nat Rev Neurosci**, v. 3, n. 3, p. 243-9, Mar 2002. Available at: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11994756 >.

BUSATTO, G. F. et al. A voxel-based morphometry study of temporal lobe gray matter reductions in Alzheimer's disease. **Neurobiol Aging**, v. 24, n. 2, p. 221-31, Mar-Apr 2003. Available at: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12498956 >.

CHEE, M. W. et al. Cognitive function and brain structure correlations in healthy elderly East Asians. **Neuroimage**, v. 46, n. 1, p. 257-69, May 15 2009. Available at: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19457386 >.

CHETELAT, G. et al. Using voxel-based morphometry to map the structural changes associated with rapid conversion in MCI: a longitudinal MRI study. **Neuroimage**, v. 27, n. 4, p. 934-46, Oct 1 2005. Available at: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15979341 >.

CHIANG, G. C. et al. Identifying Cognitively Healthy Elderly Individuals with Subsequent Memory Decline by Using Automated MR Temporoparietal Volumes. **Radiology**, v. 259, n. 3, p.

844-851, Jun 2011. Available at: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=21467255 >.

COPELAND, J. R.; DEWEY, M. E.; GRIFFITHS-JONES, H. M. A computerized psychiatric diagnostic system and case nomenclature for elderly subjects: GMS and AGE CAT. **Psychol Med**, v. 16, n. 1, p. 89-99, Feb 1986. ISSN 0033-2917. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3515380> >.

CRAIK, F. I.; ROSE, N. S. Memory encoding and aging: a neurocognitive perspective. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 36, n. 7, p. 1729-39, Aug 2011. Available at: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=22155274 >.

CRIVELLO, F. et al. Longitudinal assessment of global and regional rate of grey matter atrophy in 1,172 healthy older adults: modulation by sex and age. **PLoS One**, v. 9, n. 12, p. e114478, 2014. ISSN 1932-6203. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25469789> >.

CURIATI, P. K. et al. Brain Structural Variability due to Aging and Gender in Cognitively Healthy Elders: Results from the Sao Paulo Ageing and Health Study. **American Journal of Neuroradiology**, v. 30, n. 10, p. 1850-1856, NOV-DEC 2009 2009. ISSN 0195-6108.

D'AGOSTINO, R. B. et al. General cardiovascular risk profile for use in primary care: the Framingham Heart Study. **Circulation**, v. 117, n. 6, p. 743-53, Feb 2008. ISSN 1524-4539. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18212285> >.

DAWBER, R. P. The ultrastructure and growth of human nails. **Arch Dermatol Res**, v. 269, n. 2, p. 197-204, 1980. ISSN 0340-3696. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6161584> >.

DE TOLEDO FERRAZ ALVES, T. C. et al. Subtle Gray Matter Changes in Temporo-Parietal Cortex Associated with Cardiovascular Risk Factors. **Journal of Alzheimers Disease**, v. 27, n. 3, p. 575-589, 2011 2011. ISSN 1387-2877.

DEBETTE, S. et al. Midlife vascular risk factor exposure accelerates structural brain aging and cognitive decline. **Neurology**, v. 77, n. 5, p. 461-8, Aug 2 2011. Available at: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=21810696 >.

DOWELL, N. G. et al. Structural and resting-state MRI detects regional brain differences in young and mid-age healthy APOE-e4 carriers compared with non-APOE-e4 carriers. **NMR Biomed**, v. 29, n. 5, p. 614-24, May 2016. ISSN 1099-1492. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26929040> >.

DU, A. T. et al. Age effects on atrophy rates of entorhinal cortex and hippocampus. **Neurobiol Aging**, v. 27, n. 5, p. 733-40, May 2006. ISSN 1558-1497. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15961190> >.

DUMAS, J. A. What is Normal Cognitive Aging? Evidence from Task-Based Functional Neuroimaging. **Curr Behav Neurosci Rep**, v. 2, n. 4, p. 256-261, Dec 2015. ISSN 2196-2979. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26925366> >.

ENZINGER, C. et al. Risk factors for progression of brain atrophy in aging: six-year follow-up of normal subjects. **Neurology**, v. 64, n. 10, p. 1704-11, May 24 2005. Available at: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15911795 >.

ERIKSSON, S. H. et al. Cortical neuronal loss and hippocampal sclerosis are not detected by voxel-based morphometry in individual epilepsy surgery patients. **Hum Brain Mapp**, v. 30, n. 10, p. 3351-60, Oct 2009. Available at: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19347875 >.

ERUS, G. et al. Spatial patterns of structural brain changes in type 2 diabetic patients and their longitudinal progression with intensive control of blood glucose. **Diabetes Care**, v. 38, n. 1, p. 97-104, Jan 2015. ISSN 1935-5548. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25336747> >.

FAMA, R.; SULLIVAN, E. V. Thalamic structures and associated cognitive functions: Relations with age and aging. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 54, p. 29-37, Jul 2015. ISSN 1873-7528. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25862940> >.

FARMER, M. E. et al. Longitudinally measured blood pressure, antihypertensive medication use, and cognitive performance: the Framingham Study. **J Clin Epidemiol**, v. 43, n. 5, p. 475-80, 1990. ISSN 0895-4356. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2324788> >.

FAUL, F. et al. G*Power 3: a flexible statistical power analysis program for the social, behavioral, and biomedical sciences. **Behav Res Methods**, v. 39, n. 2, p. 175-91, May 2007. Available at: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17695343 >.

FERREIRA, L. K. et al. Neurostructural predictors of Alzheimer's disease: a meta-analysis of VBM studies. **Neurobiol Aging**, v. 32, n. 10, p. 1733-41, Oct 2011. Available at: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=20005012 >.

_____. The link between cardiovascular risk, Alzheimer's disease, and mild cognitive impairment: support from recent functional neuroimaging studies. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 00, n. ahead, p. 000, 2014-06 2014. ISSN 1516-4446.

FJELL, A. M. et al. Brain changes in older adults at very low risk for Alzheimer's disease. **J Neurosci**, v. 33, n. 19, p. 8237-42, May 2013. ISSN 1529-2401. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23658162> >.

FJELL, A. M.; WALHOVD, K. B. Structural brain changes in aging: courses, causes and cognitive consequences. **Rev Neurosci**, v. 21, n. 3, p. 187-221, 2010. ISSN 0334-1763. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20879692> >.

FJELL, A. M. et al. One-year brain atrophy evident in healthy aging. **J Neurosci**, v. 29, n. 48, p. 15223-31, Dec 2009. ISSN 1529-2401. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19955375> >.

FLAKS, M. K. et al. The Short Cognitive Performance Test (SKT): a preliminary study of its psychometric properties in Brazil. **Int Psychogeriatr**, v. 18, n. 1, p. 121-33, Mar 2006. ISSN 1041-6102. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16255841> >.

FRASER, S. L.; NADEAU, L. Experience and representations of health and social services in a community of Nunavik. **Contemp Nurse**, v. 51, n. 2-3, p. 286-300, 2015 Oct-Dec 2015. ISSN 1037-6178. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27063599> >.

FRISTON, K. J. et al. Statistic parametric maps in functional imaging: A general linear approach. **Hum Brain Mapp**, v. 2, p. 189-210, 1995.

GIORGIO, A. et al. Age-related changes in grey and white matter structure throughout adulthood. **Neuroimage**, v. 51, n. 3, p. 943-51, Jul 2010. ISSN 1095-9572. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20211265> >.

GOLOMB, J. et al. Hippocampal formation size predicts declining memory performance in normal aging. **Neurology**, v. 47, n. 3, p. 810-3, Sep 1996. Available at: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8797485 >.

GOOD, C. D. et al. Automatic differentiation of anatomical patterns in the human brain: validation with studies of degenerative dementias. **Neuroimage**, v. 17, n. 1, p. 29-46, Sep 2002. ISSN 1053-8119. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12482066> >.

GOODRO, M. et al. Age effect on subcortical structures in healthy adults. **Psychiatry Res**, v. 203, n. 1, p. 38-45, Jul 2012. ISSN 1872-7123. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22863654> >.

GRADY, C. L. Cognitive neuroscience of aging. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1124, p. 127-44, Mar 2008. Available at: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18400928 >.

GRIEVE, S. M. et al. Preservation of limbic and paralimbic structures in aging. **Hum Brain Mapp**, v. 25, n. 4, p. 391-401, Aug 2005. Available at: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15852381 >.

GROUP, D. R. Subjective memory deficits in people with and without dementia: findings from the 10/66 dementia research group pilot studies in low- and middle-income countries. **J Am Geriatr Soc**, v. 57, n. 11, p. 2118-24, Nov 2009. ISSN 1532-5415. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20121955> >.

GUTTMANN, C. R. et al. White matter changes with normal aging. **Neurology**, v. 50, n. 4, p. 972-8, Apr 1998. Available at: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9566381 >.

HABES, M. et al. Advanced brain aging: relationship with epidemiologic and genetic risk factors, and overlap with Alzheimer disease atrophy patterns. **Transl Psychiatry**, v. 6, p. e775, 2016a. ISSN 2158-3188. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27045845> >.

_____. Relationship between APOE Genotype and Structural MRI Measures throughout Adulthood in the Study of Health in Pomerania Population-Based Cohort. **AJNR Am J Neuroradiol**, v. 37, n. 9, p. 1636-42, Sep 2016b. ISSN 1936-959X. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27173368> >.

HALL, K. S.; HENDRIE, H. C.; BRITAIN, H. M. The development of a dementia screening interview in two distinct languages. **Int J Methods Psychiatr Res**, n. 3, p. 1–28, 1993.

HO, A. J. et al. Comparing 3 T and 1.5 T MRI for tracking Alzheimer's disease progression with tensor-based morphometry. **Hum Brain Mapp**, v. 31, n. 4, p. 499-514, Apr 2010. ISSN 1097-0193. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19780044> >.

HONEA, R. A. et al. Impact of APOE on the healthy aging brain: a voxel-based MRI and DTI study. **J Alzheimers Dis**, v. 18, n. 3, p. 553-64, 2009. Available at: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19584447 >.

HUANG, P. et al. Exercise-Related Changes of Networks in Aging and Mild Cognitive Impairment Brain. **Front Aging Neurosci**, v. 8, p. 47, 2016. ISSN 1663-4365. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27014055> >.

IBGE. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística** 2010.

JACK, C. R., JR. et al. Rates of hippocampal atrophy correlate with change in clinical status in aging and AD. **Neurology**, v. 55, n. 4, p. 484-89, Aug 22 2000. Available at: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10953178 >.

JAK, A. J. et al. Differential cross-sectional and longitudinal impact of APOE genotype on hippocampal volumes in nondemented older adults. **Dement Geriatr Cogn Disord**, v. 23, n. 6, p. 382-9, 2007. ISSN 1420-8008. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17389798> >.

JANOUTOVÁ, J. et al. Is Mild Cognitive Impairment a Precursor of Alzheimer's Disease? Short Review. **Cent Eur J Public Health**, v. 23, n. 4, p. 365-7, Dec 2015. ISSN 1210-7778. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26841152> >.

JEERAKATHIL, T. et al. Stroke risk profile predicts white matter hyperintensity volume: the Framingham Study. **Stroke**, v. 35, n. 8, p. 1857-61, Aug 2004. ISSN 1524-4628. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15218158> >.

JEFFERSON, A. L. et al. Relation of left ventricular ejection fraction to cognitive aging (from the Framingham Heart Study). **Am J Cardiol**, v. 108, n. 9, p. 1346-51, Nov 2011. ISSN 1879-1913. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21880293> >.

JIANG, J. et al. A longitudinal study of brain atrophy over two years in community-dwelling older individuals. **Neuroimage**, v. 86, p. 203-11, Feb 2014. ISSN 1095-9572. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23959201> >.

KAFFASHIAN, S. et al. Predictive utility of the Framingham general cardiovascular disease risk profile for cognitive function: evidence from the Whitehall II study. **Eur Heart J**, v. 32, n. 18, p. 2326-32, Sep 2011. ISSN 1522-9645. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21606085> >.

KALPOUZOS, G. et al. Voxel-based mapping of brain gray matter volume and glucose metabolism profiles in normal aging. **Neurobiol Aging**, v. 30, n. 1, p. 112-24, Jan 2009. Available at: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17630048 >.

KIM, J. et al. microRNA-33 Regulates ApoE Lipidation and Amyloid- β Metabolism in the Brain. **J Neurosci**, v. 35, n. 44, p. 14717-26, Nov 2015. ISSN 1529-2401. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26538644> >.

KNOPMAN, D. S. et al. Fourteen-year longitudinal study of vascular risk factors, APOE genotype, and cognition: the ARIC MRI Study. **Alzheimers Dement**, v. 5, n. 3, p. 207-14, May 2009. Available at: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19362884 >.

KORTHAUER, L. E. et al. Correlates of virtual navigation performance in older adults. **Neurobiol Aging**, v. 39, p. 118-27, Mar 2016. ISSN 1558-1497. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26923408> >.

KRAMER, J. H. et al. Longitudinal MRI and cognitive change in healthy elderly. **Neuropsychology**, v. 21, n. 4, p. 412-8, Jul 2007. Available at: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17605574 >.

KUBICKI, M. et al. Voxel-based morphometric analysis of gray matter in first episode schizophrenia. **Neuroimage**, v. 17, n. 4, p. 1711-9, Dec 2002. ISSN 1053-8119. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12498745> >.

LAUGHLIN, G. A. et al. Sex differences in the association of Framingham Cardiac Risk Score with cognitive decline in community-dwelling elders without clinical heart disease. **Psychosom Med**, v. 73, n. 8, p. 683-9, Oct 2011. ISSN 1534-7796. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21949428> >.

LEHFELD, H.; ERZIGKEIT, H. The SKT--a short cognitive performance test for assessing deficits of memory and attention. **Int Psychogeriatr**, v. 9 Suppl 1, p. 115-21, 1997a. Available at: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9447434 >.

LEHFELD, H. et al. Evidence of the cross-cultural stability of the factor structure of the SKT short test for assessing deficits of memory and attention. **Int Psychogeriatr**, v. 9, n. 2, p. 139-53, Jun 1997b. Available at: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9309487 >.

LONG, X. et al. Healthy aging: an automatic analysis of global and regional morphological alterations of human brain. **Acad Radiol**, v. 19, n. 7, p. 785-93, Jul 2012. ISSN 1878-4046. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22503890> >.

LÓPEZ, M. E. et al. Searching for Primary Predictors of Conversion from Mild Cognitive Impairment to Alzheimer's Disease: A Multivariate Follow-Up Study. **J Alzheimers Dis**, v. 52, n. 1, p. 133-43, Mar 2016. ISSN 1875-8908. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27060953> >.

LÖWE, L. C. et al. The Effect of the APOE Genotype on Individual BrainAGE in Normal Aging, Mild Cognitive Impairment, and Alzheimer's Disease. **PLoS One**, v. 11, n. 7, p. e0157514, 2016. ISSN 1932-6203. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27410431> >.

MARQUIS, S. et al. Independent predictors of cognitive decline in healthy elderly persons. **Arch Neurol**, v. 59, n. 4, p. 601-6, Apr 2002. Available at: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11939895 >.

MATSUDA, H. Voxel-based Morphometry of Brain MRI in Normal Aging and Alzheimer's Disease. **Aging Dis**, v. 4, n. 1, p. 29-37, Feb 2013. ISSN 2152-5250. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23423504> >.

MILLER, S. A.; DYKES, D. D.; POLESKY, H. F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. **Nucleic Acids Res**, v. 16, n. 3, p. 1215, Feb 11 1988. Available at: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3344216 >.

MOFFAT, S. D. et al. Extrahippocampal contributions to age differences in human spatial navigation. **Cereb Cortex**, v. 17, n. 6, p. 1274-82, Jun 2007. ISSN 1047-3211. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16857855> >.

MORRA, J. H. et al. Automated mapping of hippocampal atrophy in 1-year repeat MRI data from 490 subjects with Alzheimer's disease, mild cognitive impairment, and elderly controls. **Neuroimage**, v. 45, n. 1 Suppl, p. S3-15, Mar 2009. ISSN 1095-9572. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19041724> >.

MOSCONI, L. et al. Hippocampal hypometabolism predicts cognitive decline from normal aging. **Neurobiol Aging**, v. 29, n. 5, p. 676-92, May 2008. Available at: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17222480 >.

MU, Q. et al. A quantitative MR study of the hippocampal formation, the amygdala, and the temporal horn of the lateral ventricle in healthy subjects 40 to 90 years of age. **AJNR Am J Neuroradiol**, v. 20, n. 2, p. 207-11, Feb 1999. ISSN 0195-6108. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10094339> >.

MULLER, M. et al. Hypertension and longitudinal changes in cerebral blood flow: the SMART-MR study. **Ann Neurol**, v. 71, n. 6, p. 825-33, Jun 2012. Available at: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=22447734 >.

MURPHY, E. A. et al. Six-month atrophy in MTL structures is associated with subsequent memory decline in elderly controls. **Neuroimage**, v. 53, n. 4, p. 1310-7, Dec 2010. ISSN 1095-9572. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20633660> >.

NYBERG, L. et al. Longitudinal evidence for diminished frontal cortex function in aging. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 107, n. 52, p. 22682-6, Dec 2010. ISSN 1091-6490. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21156826> >.

PAL, D. et al. Quantification of age- and gender-related changes in diffusion tensor imaging indices in deep grey matter of the normal human brain. **J Clin Neurosci**, v. 18, n. 2, p. 193-6, Feb 2011. Available at: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=21183352 >.

PERSSON, J. et al. Longitudinal structure-function correlates in elderly reveal MTL dysfunction with cognitive decline. **Cereb Cortex**, v. 22, n. 10, p. 2297-304, Oct 2012. ISSN 1460-2199. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22065863> >.

PETERSEN, R. C.; JACK, C. R., JR. Imaging and biomarkers in early Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. **Clin Pharmacol Ther**, v. 86, n. 4, p. 438-41, Oct 2009. Available at: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19710641 >.

POTVIN, O. et al. Normative data for subcortical regional volumes over the lifetime of the adult human brain. **Neuroimage**, v. 137, p. 9-20, Aug 2016. ISSN 1095-9572. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27165761> >.

PRINCE, M. et al. Dementia diagnosis in developing countries: a cross-cultural validation study. **Lancet**, v. 361, n. 9361, p. 909-17, Mar 2003. ISSN 0140-6736. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12648969> >.

_____. A brief dementia screener suitable for use by non-specialists in resource poor settings-the cross-cultural derivation and validation of the brief Community Screening Instrument for Dementia. **Int J Geriatr Psychiatry**, v. 26, n. 9, p. 899-907, Sep 2011. ISSN 1099-1166. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21845592> >.

_____. The protocols for the 10/66 dementia research group population-based research programme. **BMC Public Health**, v. 7, p. 165, 2007. ISSN 1471-2458. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17659078> >.

RAZ, N. et al. Regional brain changes in aging healthy adults: general trends, individual differences and modifiers. **Cereb Cortex**, v. 15, n. 11, p. 1676-89, Nov 2005. Available at: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15703252 >.

RESNICK, S. M. et al. Longitudinal magnetic resonance imaging studies of older adults: a shrinking brain. **J Neurosci**, v. 23, n. 8, p. 3295-301, Apr 2003. ISSN 1529-2401. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12716936> >.

RISACHER, S. L. et al. Longitudinal MRI atrophy biomarkers: relationship to conversion in the ADNI cohort. **Neurobiol Aging**, v. 31, n. 8, p. 1401-18, Aug 2010. Available at: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=20620664 >.

RODRIGUE, K. M.; RAZ, N. Shrinkage of the entorhinal cortex over five years predicts memory performance in healthy adults. **J Neurosci**, v. 24, n. 4, p. 956-63, Jan 2004. ISSN 1529-2401. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14749440> >.

ROLANDI, E.; FRISONI, G. B.; CAVEDO, E. Efficacy of lifestyle interventions on clinical and neuroimaging outcomes in elderly. **Ageing Res Rev**, v. 25, p. 1-12, Jan 2016. ISSN 1872-9649. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26589097> >.

RONDINA, J. M. et al. Framingham coronary heart disease risk score can be predicted from structural brain images in elderly subjects. **Frontiers in Aging Neuroscience**, v. 6, DEC 1 2014 2014. ISSN 1663-4365.

ROUSSOTTE, F. F. et al. Combined effects of Alzheimer risk variants in the CLU and ApoE genes on ventricular expansion patterns in the elderly. **J Neurosci**, v. 34, n. 19, p. 6537-45, May 2014. ISSN 1529-2401. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24806679> >.

RZEZAK, P. et al. Relationship between Brain Age-Related Reduction in Gray Matter and Educational Attainment. **Plos One**, v. 10, n. 10, OCT 16 2015 2015. ISSN 1932-6203.

SALTHOUSE, T. A. Neuroanatomical substrates of age-related cognitive decline. **Psychol Bull**, v. 137, n. 5, p. 753-84, Sep 2011. ISSN 1939-1455. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21463028> >.

SCAZUFCA, M. et al. High prevalence of dementia among older adults from poor socioeconomic backgrounds in Sao Paulo, Brazil. **Int Psychogeriatr**, v. 20, n. 2, p. 394-405, Apr 2007. Available at: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17559708 >.

SESHADRI, S. et al. Stroke risk profile, brain volume, and cognitive function: the Framingham Offspring Study. **Neurology**, v. 63, n. 9, p. 1591-9, Nov 2004. ISSN 1526-632X. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15534241> >.

SMITH, D. M.; MIZUMORI, S. J. Learning-related development of context-specific neuronal responses to places and events: the hippocampal role in context processing. **J Neurosci**, v. 26, n. 12, p. 3154-63, Mar 2006. ISSN 1529-2401. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16554466> >.

SQUARZONI, P. et al. Relationship Between Regional Brain Volumes and Cognitive Performance in the Healthy Aging: An MRI Study Using Voxel-Based Morphometry. **Journal of Alzheimers Disease**, v. 31, n. 1, p. 45-58, 2012 2012. ISSN 1387-2877.

TAKI, Y. et al. Correlation between gray/white matter volume and cognition in healthy elderly people. **Brain Cogn**, v. 75, n. 2, p. 170-6, Mar 2011. Available at: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=21131121 >.

_____. Correlation between baseline regional gray matter volume and global gray matter volume decline rate. **Neuroimage**, v. 54, n. 2, p. 743-9, Jan 15 2011b. Available at: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=20920588 >.

TALAIRACH, J.; TOURNOUX, P. Co-planar Stereotaxic Atlas of the Human Brain. **Thieme Medical Publishers, Inc.**, 1998.

TANENBAUM, L. N. Clinical 3T MR imaging: mastering the challenges. **Magn Reson Imaging Clin N Am**, v. 14, n. 1, p. 1-15, Feb 2006. ISSN 1064-9689. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16530631> >.

TAYLOR, J. L. et al. APOE-epsilon4 and aging of medial temporal lobe gray matter in healthy adults older than 50 years. **Neurobiol Aging**, v. 35, n. 11, p. 2479-85, Nov 2014. ISSN 1558-1497. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24929969> >.

TERRIBILLI, D. et al. Age-related gray matter volume changes in the brain during non-elderly adulthood. **Neurobiol Aging**, v. 32, n. 2, p. 354-68, Feb 2011. Available at: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19282066 >.

THAMBISETTY, M. et al. Longitudinal changes in cortical thickness associated with normal aging. **Neuroimage**, v. 52, n. 4, p. 1215-23, Oct 2010. ISSN 1095-9572. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20441796> >.

TISSERAND, D. J. et al. A voxel-based morphometric study to determine individual differences in gray matter density associated with age and cognitive change over time. **Cereb Cortex**, v. 14, n. 9, p. 966-73, Sep 2004. ISSN 1047-3211. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15115735> >.

WALHOVD, K. B. et al. Multi-modal imaging predicts memory performance in normal aging and cognitive decline. **Neurobiol Aging**, v. 31, n. 7, p. 1107-21, Jul 2010. ISSN 1558-1497. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18838195> >.

WARDLAW, J. M. et al. A systematic review of the utility of 1.5 versus 3 Tesla magnetic resonance brain imaging in clinical practice and research. **Eur Radiol**, v. 22, n. 11, p. 2295-303, Nov 2012. ISSN 1432-1084. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22684343> >.

WILLIAMS, L. R. et al. Clinical correlates of cerebral white matter hyperintensities in cognitively normal older adults. **Arch Gerontol Geriatr**, v. 50, n. 2, p. 127-31, 2010 Mar-Apr 2010. ISSN 1872-6976. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19356807> >.

WILSON, P. W. et al. Prediction of coronary heart disease using risk factor categories. **Circulation**, v. 97, n. 18, p. 1837-47, May 1998. ISSN 0009-7322. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9603539> >.

YLIKOSKI, R. et al. Hippocampal and temporal lobe atrophy and age-related decline in memory. **Acta Neurol Scand**, v. 101, n. 4, p. 273-8, Apr 2000b. ISSN 0001-6314. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10770526> >.

YOKOYAMA, J. S. et al. Apolipoprotein $\epsilon 4$ is associated with lower brain volume in cognitively normal Chinese but not white older adults. **PLoS One**, v. 10, n. 3, p. e0118338, 2015. ISSN 1932-6203. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25738563> >.

YUAN, P.; RAZ, N. Prefrontal cortex and executive functions in healthy adults: a meta-analysis of structural neuroimaging studies. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 42, p. 180-92, May 2014. ISSN 1873-7528. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24568942> >.

ZIMMERMAN, M. E. et al. The relationship between frontal gray matter volume and cognition varies across the healthy adult lifespan. **Am J Geriatr Psychiatry**, v. 14, n. 10, p. 823-33, Oct 2006. Available at: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17001022 >.

9. ANEXO A

Artigo submetida à Clinics

**Titulo: High frequency of silent brain infarcts associated with cognitive deficits
in an economically disadvantaged population**

.

High frequency of silent brain infarcts associated with cognitive deficits in an economically disadvantaged population

Brain infarcts in a disadvantaged population

Paula Squarzoni¹; Jaqueline H. Tamashiro-Duran¹; Fabio L. S. Duran¹; Claudia C. Leite²
Mauricio Wajngarten³; Marcia Scazufca¹; Paulo R. Menezes⁵; Paulo A. Lotufo⁶; Tania C. T.
F. Alves¹; Geraldo F. Busatto¹.

¹ Department/Institute of Psychiatry, University of São Paulo, Brazil

² Department of Radiology and Oncology, University of São Paulo, Brazil

³ Heart Institute (InCor), University of São Paulo, Brazil

⁵ Department of Preventive Medicine, University of São Paulo, Brazil

⁶ Center for Clinical and Epidemiologic Research, University of São Paulo, Brazil

Correspondence to Geraldo F. Busatto, MD, PhD, Centro de Medicina Nuclear, 2º andar, LIM-21, Rua Dr. Ovídio Pires Campos 872, postal code 05403–010, São Paulo - SP - Brazil; e-mail: geraldo.busatto@hc.fm.usp.br

Electronic address: paula.squarzoni@gmail.com; fabio.duran@hc.fm.usp.br;
jhatsu@gmail.com; claudia.leite@hc.fm.usp.br; scazufca@gmail.com; pmenezes@usp.br;
palotufu@usp.br; tania.alves@hc.fm.usp.br

Abstract

Objective: Using magnetic resonance imaging, we aimed to assess the presence of silent brain vascular lesions in a sample of apparently healthy elderly individuals recruited in an economically disadvantaged urban region (São Paulo, Brazil). We also wished to investigate whether such findings were associated with worse cognitive performance. **Methods:** A sample of 250 non-demented elderly subjects (66-75 years) free from neuropsychiatric disorders recruited in predefined census sectors of an economically disadvantaged area of Sao Paulo underwent structural magnetic resonance imaging scanning and cognitive testing. A high proportion of individuals had very low levels of education (4 years or less, n=185; 21 with no formal education). **Results:** The prevalence of at least one silent vascular-related cortical or subcortical lesion was 22.8% (95% confidence interval, 17.7–28.5), with the basal ganglia as the most frequently affected site (63.14% of cases). The subgroup with brain infarcts presented significantly lower levels of previous education compared to the subgroup with no brain lesions, as well as significantly worse current performance in cognitive test domains including memory and attention ($p<0.002$). **Conclusions:** Silent brain infarcts had a substantially high frequency in our elderly sample from an economically disadvantaged urban region, and were significantly more prevalent in subjects with poorer levels of education. Covert cerebrovascular disease significantly contributes to cognitive deficits and in the absence of magnetic resonance imaging information, such cognitive impairment may be taken as simply related to ageing. Emphatic attention is needed to potential deleterious effects of vascular brain lesions in low-educated elderly individuals from economically disadvantaged environments.

Keywords: Framingham Coronary Heart Disease Risk, aging, educational level, cognition, silent brain infarction.

INTRODUCTION

Brain infarcts and lacunae are common in elderly populations and may be easily detected by high-resolution magnetic resonance imaging (MRI). Such lesions are typically associated with poor cognitive functioning and loss of activities of daily living, as well as predicting future risk of dementia(1). Many recent large-scale MRI studies of elderly populations have shown that a considerable proportion of such brain infarcts remain undetected due to the absence of overt clinical impairment (2-4). In contrast with a traditional view of cardiovascular diseases as the result of combined genetic, lifestyle and physiological risk factors, there is a recent trend to incorporate the social determinants of health as an additional, critical dimension of cardiovascular risk (5). Education is the most used indicator of socioeconomic position in the United States and it has been found to be the predictor of highest significance in regard to cardiovascular disease outcomes (5).

Elderly subjects with very low levels of education and socioeconomic conditions, such as seen in many low- and middle-income countries, present increased rates of cardiovascular risk factors, stroke and dementia (6-8). However, the frequency of silent brain infarcts specifically in such disadvantaged populations has been scarcely investigated in previous MRI studies (4), and no study to date has reported prevalence data specifically in groups with very low levels of education. It is also relevant to evaluate the profile of cognitive deficits associated with silent cerebrovascular lesions in populations with low levels of education; low education influences on a lesser degree of cognitive reserve and this may lead to greater cognitive deficits associated with brain lesions, whereas individuals with higher levels of education are expected to sustain better cognitive performance when suffering the same degree of brain damage(9).

In the present community-based study, we acquired structural MRI scans in a population-based sample of 250 elderly (66 to 75 year-old) subjects free from dementia and other neuropsychiatric disorders, including a high proportion of individuals with very low levels of

education (4 years or less). This sample was recruited in a circumscribed, economically disadvantaged catchment area of Sao Paulo, Brazil. We determined the frequency of silent brain infarcts in such sample and investigated the profile of cognitive deficits associated with those brain lesions. Our predictions were twofold: that the prevalence of silent brain infarcts would be higher in our disadvantaged population compared to the figures reported in previous studies of the same kind; and that the presence of silent brain infarcts would be more frequent in subjects with lesser years of formal education.

METHODS

The study received approval from the local Committee for Ethics and Research of the Faculty of Medicine, University of Sao Paulo (# 0450/05) and written consent was obtained from all subjects.

Participants were selected from a community-based sample of elderly individuals recruited for the Sao Paulo Ageing & Health (SPAH) study (10), an epidemiological investigation aimed at determining the prevalence of dementia, other mental disorders, and their risk factors (10). Residents aged 65 or above of pre-defined census sectors of an economically disadvantaged area of Sao Paulo were contacted to undergo a cognitive evaluation following the protocol developed by the 10/66 Dementia Research Group (10-12). This included a structured neurological assessment, a structured cardiological evaluation, the Geriatric Mental State (GMS) (a standardized psychiatric interview), and the Community Screening Instrument for Dementia (CSI-D) (10). The CSI-D consists of a 32-item cognitive test administered to the participant (approximately 20 minutes) and a 26-item informant interview, inquiring after the participant's daily functioning and general health (approximately 15 minutes) (13). Three summary scores can be generated from the CSI-D, namely: COGSCORE, an item-weighted summary score from the participant's 32-item cognitive test (seven-item object denomination,

four-item object definition, two verbal category fluency tasks, word repetition, identification of a famous person, temporal and spatial orientation, three orders, three-word recall, six-chunk story recall, two drawings of intersecting circles and pentagons), and also incorporating the Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease (CERAD) animal naming verbal fluency task and the modified CERAD 10 word-list learning task with delayed recall (14); informant score (RELScore), an unweighted total score from the informant interview; and discriminant function score (DFScore), a weighted score combining COGScore and RELScore(15). The SPAH composite cognitive algorithm was used to exclude subjects with dementia. All subjects were also ranked in regard to their cardiovascular risk using the 10-year Framingham Risk Score for Coronary Heart Disease Risk (FRS), a composite index comprising five clinical factors (age, blood pressure, diabetes mellitus, smoking status, and cholesterol levels) (16, 17). Subjects were classified into three subgroups according to their degree of cardiovascular risk (10-year risk): high-risk, $FRS \geq 13$; medium-risk, $FRS \leq 12$; and low-risk, $FRS \leq 10$ (18). From the initial SPAH databank ($n=2,072$), we excluded all subjects with a diagnosis of dementia ($n=105$), those aged above 75 years at the time of recruitment for MRI scanning ($n = 996$) and those with a history of major neurological disorders (such as epilepsy and Parkinson's disease) or lifetime diagnosis of major depressive disorder according to the International Statistical Classification-10th revision criteria (ICD-10) ($n=52$). This led to the identification of 812 potentially eligible individuals, after excluding those with missing clinical data ($n=107$). Telephone contacts were then made with the remaining potentially eligible subjects in order to check for the presence of contra-indications for MRI scanning and to screen out anyone who had a previous history of severe head trauma. We failed to successfully contact 103 subjects. From those who were reached, we excluded 206 subjects (132 females and 74 males) who fulfilled the above exclusion criteria, leaving us with 503 subjects who could be invited to undergo the brain imaging session. A total of 306 individuals were invited, but 52

refused to participate in the MRI investigation, thus resulting in a total of 254 dementia-free elderly subjects aged between 66–75 years (female/male [137/117]) who underwent MRI scanning.

Schooling data were extracted from the SPAH database. We considered subjects as having 4 years of education if they had completed the 4th grade, 8 years if they had completed the 8th grade, 11 years if they had completed high school, and 15 years if they had completed university. If information on education was not available, the number of years until exiting the education system was used as the estimate of the mean number of years of education. Current socioeconomic status was evaluated using the *Associação Brasileira de Anunciantes* criteria (19).

MRI datasets were acquired using a 1.5 T General Electric Signa LX CVi scanner (Milwaukee, USA) with the following acquisition protocol: a) a dual-spin echo sequence of 120 transaxial slices across the entire brain (axial PD/T2); b) a T2-weighted fast spin-echo transaxial sequence (88 slices); and c) a 3D Spoiled Gradient Recalled Acquisition sequence of 124 slices with TR/TE of 21.7/5.2 msec, a flip angle of 20 degrees, 220 mm field of view, 1.5 mm slice thickness, a number of measures of 1, and a 256×192 matrix. All MRI scans were examined by experienced radiologists unaware of the study aims, in order to identify the presence, number and location of silent brain infarcts. Infarcts were detected as low-signal-intensity lesions on the SPGR sequence and hyperintense lesions on the T2-weighted images. Vascular lesions with 3 to 15 mm in diameter were classified as lacunae (20, 21)

In order to briefly document the cognitive performance of subjects on the day of MRI scanning, all subjects underwent a short (approximately 10 minutes) evaluation using the Short Cognitive Performance Test (SKT) validated in Brazil by Flaks et al (22). The SKT affords a rapid evaluation of overall cognitive performance as well as in specific domains such as memory, attention and automatic inhibition, with higher scores indicating more severe cognitive

impairment(23). Thus measures of cognitive performance used in the present investigation comprised: total SKT scores; SKT-based attention and memory subscores; total COGSCORE; and category verbal fluency scores. Also, IQ estimates were obtained in all subjects who underwent MRI scanning with the Wechsler Abbreviated Scale of Intelligence (WASI) (24). For the statistical analyses, the Statistical Package for Social Sciences (SPSS) for Windows (17.0) was used. Comparisons of cognitive data between elderly individuals with and without silent brain infarcts were carried out using ANOVA (statistical significance set at $p < 0.05$). For each individual group comparison, subjects were automatically excluded when presenting missing values for the specific variable under evaluation. For the overall sample of 254 elderly subjects, there were missing data regarding FRS scores ($n=6$), IQ ($n=1$), and COGSCORE ($n=10$).

RESULTS

Frequency of silent brain infarcts

Four out of the 254 subjects assessed with MRI were excluded from the analyses due to artifacts during MRI scanning that prevented accurate detection of gross brain lesions, thus resulting in a total of 250 individuals selected for analysis. Fifty seven individuals had at least one silent vascular-related lesion, yielding a prevalence of 22.8% (95% confidence interval: 17.7 to 28.5). Details for these lesions and their brain location are provided in Table 1. An additional 4 subjects presented meningioma and 2 had vascular malformations.

When we restricted the MRI data inspection only to the subsample of individuals with very low levels of education (4 years or less, $n=185$), 25.41% ($n=47$) were found to present at least one silent vascular-related lesion.

Demographic and clinical differences between subjects with and without silent vascular-related brain lesions

After exclusion of individuals with meningioma or vascular malformations), the subgroup with silent vascular lesions (n=244) was found to be older ($p<0.001$) and with lower levels of previous education compared to the subgroup with no brain infarcts ($p=0.038$) (Table 2). There were no significant differences between individuals with and without silent infarcts in regard to gender distribution, current socioeconomic status or estimated IQ (Table 2). The proportion of individuals with high 10-year cardiovascular risk ($\text{FRS} \geq 13$) was greater in the subgroup with silent vascular lesions in the brain (Table 2).

When we restricted the analysis only to the subsample of individuals with very low levels of education (4 years or less, n=185; 21 with no formal education). We observed that the subgroup with silent brain infarcts (n=47) was older relative to those without silent brain infarcts (72.43 ± 3.41 vs 70.60 ± 2.68 , $t=-3.749$, $p<0.001$), and had a trend towards a greater proportion of individuals with high cardiovascular risk (55.3% vs 39.1%, $p=0.079$). Among this subsample with very low levels of education, there were no significant differences between individuals with and without silent infarcts in regard to gender distribution, current socioeconomic status or estimated IQ.

Cognitive performance comparisons between subjects with and without silent vascular-related brain lesions

The subgroup with silent vascular lesions had significantly worse performance in all cognitive measures except category verbal fluency (Table 3). Cohen's d values were larger than 0.40 for all cognitive measures except category verbal fluency (Table 3). Total raw SKT scores could not be transformed into norm values in 11 individuals with low estimated IQ measures.

Given the between-group differences in mean current age and level of education (Table 2), we repeated the above analyses entering age and years of education as confounding covariates. Significantly worse performance in the subgroup with brain lesions was again detected in regard to COGSCORE performance ($p=0.014$), total SKT scores ($p=0.015$), SKT-based memory subscores ($p=0.004$) and attention subscores ($p=0.038$).

Finally, we counted the number of individuals with COGSCORE performance 1.5 standard deviation below the mean performance of all subjects between 66 and 75 years of age from the original SPAH sample; this afforded a criterion for mild cognitive impairment (MCI) based on the actual mean cognitive profile of the elderly population from which the present sample was drawn(25). There were significantly more individuals ($n=5$) with silent vascular lesions who fulfilled such criterion (8.77%), with 4 individuals with MCI in the subgroup without such brain lesions (2.14%) (chi-square test = 5.41, $p=0.020$). Four individuals who fulfilled such MCI criterion in the subgroup with silent brain infarcts (80%) and 4 MCI subjects in the subgroup with no vascular brain lesions (100%) had less than four years of formal education.

DISCUSSION

This study characterized the frequency of silent brain infarcts as detected by MRI scanning in a relatively large sample of apparently healthy individuals aged 66-75 years, drawn from an economically disadvantaged elderly population from Sao Paulo, Brazil. The frequency of silent brain infarcts in our sample was considerably high, reaching a figure of approximately 23% of subjects from 66-75 years. The prevalence rate of silent brain infarcts reported herein is in the higher end of the range of prevalence estimates reported in MRI studies carried out with populations from high-income countries (2, 4). Also, it should be noted that our sample was restricted to ages 65-75 years, whereas many previous studies included older subjects among whom the frequency of such lesions is higher (26). Thus our study provides data suggesting

that the prevalence of silent brain vascular lesions in elderly subjects recruited in an economically disadvantaged urban center is substantially high.

It has been previously demonstrated that the FRS may underestimate cardiovascular disease risk in socioeconomically deprived individuals (27). Nevertheless, we did detect a significant direct relationship between silent brain infarcts and higher FRS in our economically disadvantaged cohort, replicating findings from studies carried out in higher-income environments (28, 29).

As predicted, we found that the presence of silent brain infarcts was associated with significantly worse cognitive performance. Such deficits were detected in memory and other cognitive domains, reinforcing the view that covert vascular lesions in elderly populations are related to several-domain cognitive deficits (30, 31). Cohen's *d* values were moderate (around 0.5) for the total and memory SKT scores, and larger than 0.40 for the COGSCORE and the SKT attention subscore. These effect sizes are not modest, thus suggesting that cognitive deficits associated with silent brain infarcts in elderly subjects recruited in an economically disadvantaged urban center should not be judged as subtle as it has been suggested previously to be the case in elderly subjects investigated in higher-income environments (32,33).

In consistency with previous investigations carried out in other populations as well as in Brazil, we detected more vascular brain lesions in less educated individuals (34,35). The overall sample investigated in the present study had predominantly low levels of education, with a large proportion of individuals (75.82%) having less than four years of formal education. The frequency of silent vascular-related brain infarcts surpassed the level of 25% in our sample when the inspection of MRI data was restricted to the individuals with very low levels of education (4 years or less). Given that the prevalence of silent brain infarcts reported herein was substantially high and greater than the average figures reported in a number of studies carried out with populations with higher mean levels of education (2, 4, 28), our findings

suggest that the frequency of silent brain infarcts in individuals with very low levels of education may be disproportionally large. This is consistent with the known association between unfavorable levels of education and cardiovascular risk factors (36). It is also interesting to note that the majority of individuals who fulfilled our MCI criterion presented silent brain infarcts and had very low levels of education (less than four years). This is consistent with the notion of lesser cognitive reserve increasing the risk of clinically significant cognitive deficits in the presence of brain damage (9).

The preferential location of silent brain infarcts in the basal ganglia in our study is highly consistent with the findings of previous studies (3), and supports the notion of a greater vulnerability of this brain region to cerebrovascular-related regions and associated multiple-domain cognitive deficits (33). Recent tractography MRI studies using diffusion tensor imaging have suggested that silent vascular basal ganglia lesions, even of small size, may affect the functioning of large-scale cortical white matter networks; this provides a potential explanation for the emergence of multiple-domain cognitive deficits in association with silent basal ganglia infarcts (31). Moreover, resting-state functional MRI investigations have revealed aberrant patterns of functional connectivity both intra-and between brain networks in patients with vascular basal ganglia lesions, in direct proportion to the degree of cognitive impairment (30). It should be noted that the subgroups with and without silent brain infarcts in our study did not differ in regard to category fluency scores. This is unlikely to be due to compensatory brain mechanisms recruited to sustain fluency performance in subjects presenting cerebral lesions, as other studies have reported verbal fluency deficits in elderly subjects with silent brain infarcts (32, 37). Category verbal fluency scores were relatively modest in both our elderly subgroups (possibly under the influence of the overall low level of education in the sample) (38). The scores obtained in our sample are lower than those reported with the same version of the task applied to populations of non-demented elderlies examined

in Latin-American countries, India and China (39). Therefore, floor effects may have prevented us from detecting subgroup differences in such task.

It should also be noted that the subgroup with silent vascular-related brain lesions in our study was older than the subgroup without such lesions. However, it is highly unlikely that such aspect weakened our reported association between significantly worse cognitive performance and silent vascular brain lesions, for two reasons: both subgroups had mean current ages above 70 years, with the between-group difference in mean age values being lesser than 2 years; and measures of cognitive performance remained significantly different between groups when we repeated the statistical analyses entering current age as a confounding covariate.

CONCLUSION

Our results obtained in a sample of predominantly poorly educated elderly individuals from an economically disadvantaged urban region indicate that covert cerebrovascular disease is highly frequent. As suggested by previous literature findings, covert vascular brain damage does have meaningful consequences, significantly contributing to cognitive performance deficits that would be taken as simply related to ageing in the absence of MRI information (4). Our findings reinforce the need to draw emphatic attention to the potential deleterious effects of vascular brain lesions in low-educated elderly individuals from economically-disadvantaged environments. Future longitudinal studies are warranted to investigate the long-term prognosis and rates of conversion to dementia in such individuals.

Authors contributions

GBF, conceived the study, participated in study design; PS, analyzed and interpreted data, drafted and revised the manuscript; JHT, FLSD, CCL, MW, MS, PRM, PAL and TCTF,

analyzed and interpreted data and revised the manuscript; All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

This work was supported by the São Paulo Research Foundation (FAPESP), reference numbers 2013/03231-3, 2012/50239-6 and 04/15336-5, the Wellcome Trust, UK (GR066133MA) and National Council for Scientific and Technological Development (CNPq).

SOURCES OF FUNDING

This research was funded by the Wellcome Trust, UK (GR066133MA) and by FAPESP (2004/15336-5, 2012/50329-6 and 2013/03231-3), Brazil. PS was supported by FAPESP-Brazil (2013/03231-3). GFB, MS, PRM, and TCTFA were supported by CNPQ-Brazil.

CONFLICT(S)-OF-INTEREST / DISCLOSURE(S)

None

REFERENCES

1. Kuller LH, Shemanski L, Manolio T, Haan M, Fried L, Bryan N, et al. Relationship between ApoE, MRI findings, and cognitive function in the Cardiovascular Health Study. *Stroke*. 1998 Feb;29(2):388-98. PubMed PMID: 9472879. eng.
2. Vermeer SE, Longstreth WT, Koudstaal PJ. Silent brain infarcts: a systematic review. *Lancet Neurol*. 2007 Jul;6(7):611-9. PubMed PMID: 17582361. eng.
3. Delgado P, Riba-Llena I, Tovar JL, Jarca CI, Mundet X, López-Rueda A, et al. Prevalence and associated factors of silent brain infarcts in a Mediterranean cohort of hypertensives. *Hypertension*. 2014 Sep;64(3):658-63. PubMed PMID: 24958500. eng.
4. Fanning JP, Wong AA, Fraser JF. The epidemiology of silent brain infarction: a systematic review of population-based cohorts. *BMC Med*. 2014;12:119. PubMed PMID: 25012298. PMCID: PMC4226994. eng.
5. Havranek EP, Mujahid MS, Barr DA, Blair IV, Cohen MS, Cruz-Flores S, et al. Social Determinants of Risk and Outcomes for Cardiovascular Disease: A Scientific Statement From the American Heart Association. *Circulation*. 2015 Sep;132(9):873-98. PubMed PMID: 26240271. eng.

6. Cox AM, McKevitt C, Rudd AG, Wolfe CD. Socioeconomic status and stroke. *Lancet Neurol.* 2006 Feb;5(2):181-8. PubMed PMID: 16426994. eng.
7. Kuper H, Adami HO, Theorell T, Weiderpass E. The socioeconomic gradient in the incidence of stroke: a prospective study in middle-aged women in Sweden. *Stroke.* 2007 Jan;38(1):27-33. PubMed PMID: 17138948. eng.
8. Xu W, Tan L, Wang HF, Tan MS, Li JQ, Zhao QF, et al. Education and Risk of Dementia: Dose-Response Meta-Analysis of Prospective Cohort Studies. *Mol Neurobiol.* 2015 May. PubMed PMID: 25983035. ENG.
9. Amieva H, Mokri H, Le Goff M, Meillon C, Jacqmin-Gadda H, Foubert-Samier A, et al. Compensatory mechanisms in higher-educated subjects with Alzheimer's disease: a study of 20 years of cognitive decline. *Brain.* 2014 Apr;137(Pt 4):1167-75. PubMed PMID: 24578544. eng.
10. Scazufca M, Menezes PR, Vallada HP, Crepaldi AL, Pastor-Valero M, Coutinho LM, et al. High prevalence of dementia among older adults from poor socioeconomic backgrounds in São Paulo, Brazil. *Int Psychogeriatr.* 2008 Apr;20(2):394-405. PubMed PMID: 17559708. eng.
11. Prince M, Ferri CP, Acosta D, Albanese E, Arizaga R, Dewey M, et al. The protocols for the 10/66 dementia research group population-based research programme. *BMC Public Health.* 2007;7:165. PubMed PMID: 17659078. PMCID: PMC1965476. eng.
12. Group DR. Subjective memory deficits in people with and without dementia: findings from the 10/66 dementia research group pilot studies in low- and middle-income countries. *J Am Geriatr Soc.* 2009 Nov;57(11):2118-24. PubMed PMID: 20121955. eng.
13. Hall KS, Hendrie HC, HM B. The development of a dementia screening interview in two distinct languages. *Int J Methods Psychiatr Res.* 1993:1-28.
14. Copeland JR, Dewey ME, Griffiths-Jones HM. A computerized psychiatric diagnostic system and case nomenclature for elderly subjects: GMS and AGECAT. *Psychol Med.* 1986 Feb;16(1):89-99. PubMed PMID: 3515380. eng.
15. Prince M, Acosta D, Chiu H, Scazufca M, Varghese M, Group DR. Dementia diagnosis in developing countries: a cross-cultural validation study. *Lancet.* 2003 Mar;361(9361):909-17. PubMed PMID: 12648969. eng.
16. Grundy SM, Balady GJ, Criqui MH, Fletcher G, Greenland P, Hiratzka LF, et al. Primary prevention of coronary heart disease: guidance from Framingham: a statement for healthcare professionals from the AHA Task Force on Risk Reduction. *American Heart Association. Circulation.* 1998 May;97(18):1876-87. PubMed PMID: 9603549. eng.
17. Wilson PW, D'Agostino RB, Levy D, Belanger AM, Silbershatz H, Kannel WB. Prediction of coronary heart disease using risk factor categories. *Circulation.* 1998 May;97(18):1837-47. PubMed PMID: 9603539. eng.
18. Grundy SM, Pasternak R, Greenland P, Smith S, Fuster V. Assessment of cardiovascular risk by use of multiple-risk-factor assessment equations: a statement for healthcare professionals from the American Heart Association and the American College of Cardiology. *Circulation.* 1999 Sep;100(13):1481-92. PubMed PMID: 10500053. eng.
19. ABA/ABIPEME. Critério de classificação sócio-econômica. Rio de Janeiro, ABA, 1978 [Portuguese] 1978 [
20. Wardlaw JM, Smith EE, Biessels GJ, Cordonnier C, Fazekas F, Frayne R, et al. Neuroimaging standards for research into small vessel disease and its contribution to ageing and neurodegeneration. *Lancet Neurol.* 2013 Aug;12(8):822-38. PubMed PMID: 23867200. PMCID: PMC3714437. eng.
21. Fanning JP, Wesley AJ, Wong AA, Fraser JF. Emerging spectra of silent brain infarction. *Stroke.* 2014 Nov;45(11):3461-71. PubMed PMID: 25293663. eng.

22. Flaks MK, Yassuda MS, Regina AC, Cid CG, Camargo CH, Gattaz WF, et al. The Short Cognitive Performance Test (SKT): a preliminary study of its psychometric properties in Brazil. *Int Psychogeriatr*. 2006 Mar;18(1):121-33. PubMed PMID: 16255841. eng.
23. Lehfeld H, Erzigkeit H. The SKT--a short cognitive performance test for assessing deficits of memory and attention. *Int Psychogeriatr*. 1997;9 Suppl 1:115-21. PubMed PMID: 9447434. eng.
24. Wechsler D. Wechsler Abbreviated Scale of Intelligence (WASI). Psychological Corporation; 1999.
25. Squarzoni P, Tamashiro-Duran J, Souza Duran FL, Santos LC, Vallada HP, Menezes PR, et al. Relationship Between Regional Brain Volumes and Cognitive Performance in the Healthy Aging: An MRI Study Using Voxel-Based Morphometry. *Journal of Alzheimers Disease*. 2012 2012;31(1):45-58. PubMed PMID: WOS:000306122900006.
26. DeCarli C, Massaro J, Harvey D, Hald J, Tullberg M, Au R, et al. Measures of brain morphology and infarction in the framingham heart study: establishing what is normal. *Neurobiol Aging*. 2005 Apr;26(4):491-510. PubMed PMID: 15653178. eng.
27. Brindle PM, McConnachie A, Upton MN, Hart CL, Davey Smith G, Watt GC. The accuracy of the Framingham risk-score in different socioeconomic groups: a prospective study. *Br J Gen Pract*. 2005 Nov;55(520):838-45. PubMed PMID: 16281999. PMCID: PMC1570792. eng.
28. Vermeer SE, Koudstaal PJ, Oudkerk M, Hofman A, Breteler MM. Prevalence and risk factors of silent brain infarcts in the population-based Rotterdam Scan Study. *Stroke*. 2002 Jan;33(1):21-5. PubMed PMID: 11779883. eng.
29. Das RR, Seshadri S, Beiser AS, Kelly-Hayes M, Au R, Himali JJ, et al. Prevalence and correlates of silent cerebral infarcts in the Framingham offspring study. *Stroke*. 2008 Nov;39(11):2929-35. PubMed PMID: 18583555. PMCID: PMC2712254. eng.
30. Chen Y, Wang J, Zhang J, Zhang T, Chen K, Fleisher A, et al. Aberrant functional networks connectivity and structural atrophy in silent lacunar infarcts: relationship with cognitive impairments. *J Alzheimers Dis*. 2014;42(3):841-50. PubMed PMID: 24946874. eng.
31. Tang J, Zhong S, Chen Y, Chen K, Zhang J, Gong G, et al. Aberrant white matter networks mediate cognitive impairment in patients with silent lacunar infarcts in basal ganglia territory. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2015 Sep;35(9):1426-34. PubMed PMID: 25873426. eng.
32. Blanco-Rojas L, Arboix A, Canovas D, Grau-Olivares M, Oliva Morera JC, Parra O. Cognitive profile in patients with a first-ever lacunar infarct with and without silent lacunes: a comparative study. *BMC Neurol*. 2013;13:203. PubMed PMID: 24341857. PMCID: PMC3866944. eng.
33. Chen Y, Wang A, Tang J, Wei D, Li P, Chen K, et al. Association of white matter integrity and cognitive functions in patients with subcortical silent lacunar infarcts. *Stroke*. 2015 Apr;46(4):1123-6. PubMed PMID: 25737316. eng.
34. Blomstrand A, Blomstrand C, Ariai N, Bengtsson C, Björkelund C. Stroke incidence and association with risk factors in women: a 32-year follow-up of the Prospective Population Study of Women in Gothenburg. *BMJ Open*. 2014;4(10):e005173. PubMed PMID: 25351597. PMCID: PMC4212180. eng.
35. Bensenor IM, Goulart AC, Szwarcwald CL, Vieira ML, Malta DC, Lotufo PA. Prevalence of stroke and associated disability in Brazil: National Health Survey - 2013. *Arq Neuropsiquiatr*. 2015 Sep;73(9):746-50. PubMed PMID: 26352491. eng.
36. Bruthans J, Mayer O, De Bacquer D, De Smedt D, Reiner Z, Kotseva K, et al. Educational level and risk profile and risk control in patients with coronary heart disease. *Eur J Prev Cardiol*. 2015 Aug. PubMed PMID: 26283652. ENG.
37. Fang M, Feng C, Xu Y, Hua T, Jin AP, Liu XY. Microbleeds and silent brain infarctions are differently associated with cognitive dysfunction in patients with advanced periventricular

leukoaraiosis. *Int J Med Sci.* 2013;10(10):1307-13. PubMed PMID: 23983590. PMCID: PMC3752718. eng.

38. Brewster PW, Tuokko H, MacDonald SW. Measurement equivalence of neuropsychological tests across education levels in older adults. *J Clin Exp Neuropsychol.* 2014;36(10):1042-54. PubMed PMID: 25396690. eng.

39. Sosa AL, Albanese E, Prince M, Acosta D, Ferri CP, Guerra M, et al. Population normative data for the 10/66 Dementia Research Group cognitive test battery from Latin America, India and China: a cross-sectional survey. *BMC Neurol.* 2009;9:48. PubMed PMID: 19709405. PMCID: PMC2744905. eng.

Tables

Table 1: Location of silent vascular brain lesions (n = 57)

Brain location	Number of subjects	%
Basal ganglia / thalamus	26	45.61
White matter	9	15.79
Basal ganglia / thalamus / cerebellum / brainstem	4	7.02
Cerebellum	4	7.02
Basal ganglia / thalamus / cerebellum /brainstem / frontal cortex	1	1.75
Basal ganglia / thalamus / white matter	1	1.75
Cerebellum / brainstem	3	5.26
Basal ganglia	2	3.51
Parietal cortex	2	3.51
Basal ganglia / thalamus / white matter / cerebellum / brain stem	1	1.75
Basal ganglia / thalamus / white matter / cerebellum / brain stem / occipital cortex	1	1.75
Frontal cortex	1	1.75
Occipital cortex	1	1.75
Temporo-occipital cortex	1	1.75

Table 2: Demographic, estimated intelligence and medical characteristics of the participants in the subgroups with and without silent vascular lesions

	with vascular brain lesions (n=57)	without vascular brain lesions (n=187)	P
Men	25 (43.9%)	88 (47.1%)	0.672 ^a
Mean years of education(± SD)	3.46 (± 2.66)	4.54 (± 3.63)	0.038 ^a
Mean age (± SD) in years	72.11 (± 3.36)	70.51 (± 2.57)	<0.001 ^a
Hypertension (%)	39 (68.4%)	114 (61.0%)	0.308 ^b
Diabetes (%)	19 (33.3%)	49 (26.3%)	0.304 ^b
High cardiovascular risk (%) *	30 (52.6%)	67 (35.8%)	0.034 ^b
Estimated IQ (± SD)	75.84 (± 11.33)	76.92 (± 10.19)	0.497 ^a

SD: *standard deviation*; IQ = *estimated coefficient of intelligence*.

*As given by Framingham Coronary Heart Disease Risk score (FRS). Subjects were classified as of: high-risk, $FRS \geq 13$; medium-risk, $FRS \leq 12$; and low-risk, $FRS \leq 10$.

^aUnpaired t-tests; ^bChi-square tests (Pearson).

Table 3: Cognitive test comparisons between individuals with and without silent vascular brain lesions

	with vascular brain lesions (n=57)	without vascular brain lesions (n=187)	Cohen d	P ^a
COGSCORE(± SD)	28.26 (± 3.18)	29.38 (±0.81)	0.42	0.002
Verbal fluency(± SD)	13.75 (± 5.07)	14.51 (± 4.60)	0.16	0.260
Total SKT score (± SD)	8.75 (± 6.19)	6.14 (± 4.15)	0.49	<0.001
Memory SKT subscale (±SD)	1.70 (± 1.89)	0.90 (± 1.08)	0.51	<0.001
Attention SKT subscale (±SD)	7.27 (± 4.90)	5.24 (± 3.82)	0.45	0.002

SD: *standard deviation*

^a Unpaired t-tests

10. ANEXO B

Artigo submetida à Journal of Alzheimer's Disease

Titulo: Reduced gray matter volume of the thalamus and hippocampal region in elderly healthy adults with no impact of APOE-epsilon4: a longitudinal voxel-based morphometry study

Reduced gray matter volume of the thalamus and hippocampal region in elderly healthy adults with no impact of APOE-epsilon4: a longitudinal voxel-based morphometry study

Running title: **Reduced thalamo-hippocampal volume in elders**

Paula Squarzoni^{1,2}; Fabio Luis Souza Duran^{1,2}; Geraldo F. Busatto^{1,2}; Tania Correa Toledo de Ferraz Alves^{1,2},

¹ Laboratory of Psychiatric Neuroimaging (LIM 21), Department of Psychiatry, Faculty of Medicine, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

² Núcleo de Apoio à Pesquisa em Neurociência Aplicada (NAPNA), University of São Paulo, São Paulo, Brazil

Correspondence to Tania Correa Toledo de Ferraz Alves, MD, PhD, Centro de Medicina Nuclear, 2º andar, LIM-21, Rua Dr. Ovídio Pires Campos 872, postal code 05403–010, São Paulo - SP - Brazil; e-mail: tania.ctfalves@hc.fm.usp.br

Electronic address: paula.squarzoni@gmail.com; fabio.duran@hc.fm.usp.br; geraldo.busatto@hc.fm.usp.br

ABSTRACT

BACKGROUND: Many cross-sectional voxel-based morphometry (VBM) investigations have shown significant inverse correlations between chronological age and gray matter (GM) volume in several brain regions in healthy humans. However, few VBM studies have documented GM decrements in healthy elderly with repeated MRI measurements obtained in the same subjects, and none of these longitudinal studies investigated the relationship between GM deficits and cognitive performance change over time. Also, it is unclear the extent to which the APOE ϵ 4 allele influences on longitudinal findings of GM reduction in healthy elderly.

METHODS: Structural MRI datasets were acquired in 55 cognitively intact elderly at two time-points separated by approximately three years. We searched for voxels showing significant GM reductions taking into account differences in APOE genotype, and investigated the presence of correlations between regional GM decrements and cognitive performance change. **RESULTS:** We found global GM reductions as well as regional GM decrements in the right thalamus and left parahippocampal gyrus ($p < 0.05$, family-wise error corrected for multiple comparisons over the whole brain). These findings were not affected by APOE ϵ 4. A trend significant correlation ($p < 0.10$) was detected between the degree of cognitive decline and right thalamic volumetric shrinkage. **CONCLUSIONS:** Irrespective of APOE ϵ 4, longitudinal VBM analyses show that the hippocampal region and thalamus are critical sites where GM shrinkage is greater than the degree of global volume reduction in healthy elderly. The trend association between thalamic GM decrement and cognitive performance change supports the recently recognized role of the thalamus in the subtle cognitive decline associated with healthy aging.

Keywords: longitudinal study, MRI, aging, cognition, cardiovascular risk, APOE4.

INTRODUCTION

Many morphometric magnetic resonance imaging (MRI) studies to date have demonstrated the presence of volumetric and cortical thickness changes over time in the brains of healthy human subjects across several stages of the life span, from infancy to old age (1-5). When assessing healthy individuals specifically during middle age and elderly life, such MRI studies are useful to help differentiating the brain structural changes that occur during normal aging from those that unfold over the course of neurodegenerative disorders such as Alzheimer's disease (AD) (6, 7)

Most morphometric MRI studies investigating aging-related brain changes in normal elderly life have employed cross-sectional designs. Using samples of healthy elderly subjects often of large size, these studies have repeatedly reported significant direct correlations between advanced age and reduced regional brain volumes or cortical thickness. The majority of volumetric MRI studies have used manual or automated techniques to measure brain volumes in regions-of-interest (ROIs) placed on selected cerebral portions defined *a priori*, most frequently the hippocampal region and ventricles (5, 8-10). These studies have been expanded recently with the use of software for automated segmentation of the entire cortex and subcortical structures with ROIs (11-13). Also recently, the use of voxel-based morphometry (VBM) methods has enabled automated voxelwise investigations of aging-related volume changes across the entire brain with no need to define borders of ROIs *a priori* (3, 14-17). Cross-sectional VBM investigations of elderly groups have confirmed findings of aging-related brain volume decrements in the hippocampal area, as well as detecting additional volume changes in other cortical and subcortical brain regions (18-21). Results of such VBM investigations have been complemented by MRI studies investigating significant correlations between age and reduced cortical thickness across the whole brain in healthy elderly using automated, vertex-wise methods that are also unconstrained by the use of ROIs (22, 23).

The findings of the above cross-sectional studies have been extended in a number of morphometric MRI studies that employed longitudinal designs, with the same individual undergoing repeated MRI examinations at separate time points. Recent ROI-based longitudinal MRI investigations of aging effects in healthy elderly samples have reported significant brain volume decrements in the hippocampal region and other selected brain portions over periods of one year or more (2, 9, 12, 24-28). In a proportion of such longitudinal ROI-based MRI studies, the degree of progressive brain shrinkage was found to be directly related to decrements in cognitive performance (12, 25, 28-30), while others have not detected associations between reduced brain volumes and cognitive impairment over time (9, 26).

Very few whole-brain longitudinal VBM studies of healthy aging to date have assessed specifically middle-aged to elderly groups, and the topographical distribution of the findings reported has been variable. A pioneer study by Resnick et al (2003) investigated 92 healthy subjects aged from 59 to 85 years, and described findings of gray matter reductions in inferior frontal, cingulate, insular and parietal cortices over 4 years, using a flexible statistical threshold ($p < 0.001$) uncorrected for multiple comparisons (31). In a subsequent VBM investigation carried out with a smaller sample of 38 healthy individuals (55-84 years) but applying a more conservative statistical threshold ($p < 0.05$, corrected for multiple comparisons using the familywise error-FWE approach), Nyberg et al (2010) identified several foci of regional gray matter volume shrinkage after six years; the most significant volume reduction was seen in the thalamus, followed by the caudate nucleus, cerebellum, and frontal-temporal cortical portions (but not the hippocampal region) (21). In a more recent 4-year longitudinal VBM investigation of a highly large sample of 1,172 healthy elders (65–82 years), Crivello et al (2014) reported findings of regional gray matter loss that were most significant in the frontal and parietal cortices, middle occipital gyri, temporal cortex and hippocampal region (at a stringent 0.05 level, FWE-corrected for multiple comparisons) (32). Finally, two MRI studies used vertex-

wise methods to investigate cortical thickness changes in healthy elderlies across the entire brain. Thambisetty et al (2010) assessed 66 subjects (60 to 84 years) with an 8-year interval and found cortical thickness decrements that were widespread but with an antero-posterior gradient (ie. more prominent changes in frontal and parietal regions relative to the occipital and temporal lobes, including the parahippocampal cortex) (33). Fjell et al (2013) also showed widespread cortical thinning in 132 healthy elderlies (60–90 years) investigated 3 years apart, with most prominent changes in temporal and frontal regions (12). None of the voxel- or vertex-wise longitudinal MRI studies reviewed herein investigated patterns of correlation between aging-related structural brain deficits and changes in cognitive performance over time.

The epsilon4 allele of the apolipoprotein E (APOE) gene (APOE ϵ 4) is a known major risk factor for AD (34). Previous MRI studies in healthy samples spanning several decades of life have suggested that the presence of the APOE ϵ 4 allele may predict reductions in gray matter volumes in the human brain (35, 36), although recent investigations have reported negative results (37). Specifically in healthy elders, it is unclear the extent to which such genetic variation is critical to longitudinal findings of gray matter volumetric reductions over time. Recent ROI-based longitudinal MRI studies with middle-age to elderly healthy adults have reported variable findings in regard to the possible influence of the APOE ϵ 4 allele on rates of regional brain atrophy in the hippocampus and lateral ventricles (6, 38, 39). Moreover, none of the previous longitudinal VBM studies of healthy elders (21, 31, 32) have addressed whether aging-related gray matter volume changes in healthy elders are significantly influenced by the APOE ϵ 4 polymorphism. In the vertex-wise cortical thickness study of healthy elderlies by Fjell et al (2013), patterns of widespread cortical thinning after three year were confirmed in a subgroup ($n = 37$) of individuals that were negative for the APOE ϵ 4 polymorphism and had no cerebrospinal fluid biomarker changes compatible with the diagnosis of AD (12).

We report herein the results of the first longitudinal VBM study that assessed the presence of regional gray matter reductions over time in healthy elderlies and investigated the relationship between such volumetric decrements and changes in cognitive performance, taking into account differences in APOE genotype. We acquired repeated brain morphometric MRI data in a sample of 55 elderly individuals using exactly the same equipment and image acquisition protocols, at two time points separated by a mean period of approximately three years. Our aims were: to confirm previous findings of longitudinal volume reductions in the hippocampal region; to conduct a voxelwise, whole-brain search for additional foci of significant gray matter shrinkage over time using a conservative (FWE-based) multiple comparison correction approach; to verify whether regional volumetric brain changes are associated with significant decrements in cognitive performance; and to verify the extent to which aging-associated gray matter reductions in healthy elderlies are influenced by the presence of the APOE ϵ 4 allele. Finally, given previous VBM-based evidence of an influence of cardiovascular risk factors on brain volume deficits in elderly populations (40, 41), we also assessed whether subjects with high values in a composite score combining different cardiovascular risk factors would display significantly larger gray matter volume decrements over time.

METHODS

Study sample

The group of elderly individuals described herein was drawn from a population-based sample recruited for a morphometric MRI study evaluating the association between cardiovascular risk factors and gray matter volumes in elderly individuals aged from 65 to 75 years from a circumscribed, socio-economic disadvantaged area of São Paulo, Brazil (Sao Paulo Ageing & Health - SPAH study) (40). In the baseline SPAH MRI investigation, imaging

data were acquired in 248 elderly individuals after exclusion of those who: fulfilled lifetime diagnostic criteria for any neuropsychiatric disorder; had contra-indications for MRI scanning; fulfilled diagnosis of dementia or presented cognitive deficits that were disproportionately greater than what would be expected for the SPAH population; and/or presented gross brain lesions including silent infarcts (40). Four additional individuals had their baseline MRI data excluded due to artifacts during image acquisition. In order to briefly document the cognitive performance of subjects on the day of MRI scanning, all subjects underwent a short (approximately 10 minutes) evaluation using the Short Cognitive Performance Test (SKT) validated in Brazil by Flaks et al (42). The SKT affords a rapid evaluation of overall cognitive performance as well as in specific domains such as memory, attention and automatic inhibition, with higher scores indicating more severe cognitive impairment (43, 44). Thus measures of cognitive performance used in the present investigation comprised: total SKT scores; SKT-based attention, inhibition and memory subscores. Also, IQ estimates were obtained in all subjects with the Wechsler Abbreviated Scale of Intelligence (WASI) (45).

For the present longitudinal investigation, a total of 55 subjects were re-scanned within a range of 1 to 4 years after completion of the above baseline MRI study. Both the baseline and follow-up MRI investigations were approved by the ethics committee and informed consent forms were signed by all subjects before image acquisitions.

Clinical and cognitive evaluation

Elderly subjects recruited for the baseline MRI investigation underwent a medical and cognitive evaluation protocol developed by the 10/66 Dementia Research Group (46-48). This protocol, developed for use in cross-cultural studies, included a structured neurological assessment, a structured cardiological evaluation, the Geriatric Mental State (GMS) (a standardized psychiatric interview), and the Community Screening Instrument for Dementia

(CSI-D). The CSI-D consists of a 32-item cognitive test administered to the participant (approximately 20 minutes) and a 26-item informant interview, inquiring after the participant's daily functioning and general health (approximately 15 minutes) (49). Three summary scores can be generated from the CSI-D, namely: COGSCORE, an item-weighted summary score from the participant's 32-item cognitive test (seven-item object denomination, four-item object definition, two verbal category fluency tasks, word repetition, identification of a famous person, temporal and spatial orientation, three orders, three-word recall, six-chunk story recall, two drawings of intersecting circles and pentagons), and also incorporating the Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease (CERAD) animal naming verbal fluency task and the modified CERAD 10 word-list learning task with delayed recall (50); informant score (RELScore), an unweighted total score from the informant interview; and discriminant function score (DFSCORE), a weighted score combining COGSCORE and RELSCORE (51). The composite cognitive algorithm generated by the SPAH study was used to exclude subjects with dementia.

All SPAH subjects were also ranked in three levels (low, medium or high) in regard to their cardiovascular risk using the Framingham Risk Score for Coronary Heart Disease Risk (FRS), a composite index comprising five clinical factors (age, blood pressure, diabetes mellitus, smoking status, and cholesterol levels) (52, 53). Subjects were classified into three subgroups according to their degree of cardiovascular risk (10-year risk): high-risk, $FRS \geq 13$; medium-risk, $FRS \leq 12$; and low-risk, $FRS \leq 10$ (54). Schooling data for each subject were extracted from the SPAH study database. In brief, we considered subjects as having 4 years of education if they had completed the 4th grade, 8 years if they had completed the 8th grade, 11 years if they had completed high school, and 15 years if they had completed university. If information on education was not available, the number of years until exiting the education system was used as the estimate of the mean number of years of education. Current

socioeconomic status was evaluated using the criteria of the *Associação Brasileira de Anunciantes* (55). Estimates of intelligence (IQ) were obtained in all subjects who underwent MRI scanning with the Wechsler Abbreviated Scale of Intelligence (WASI) (45).

Cognitive performance according to COGSCORE measurements was assessed both at study entry and at the time individuals were invited for the second MRI evaluation. The time interval between COGSCORE measurements and MRI scanning equaled 6.17 months (SD= 6.36) for the baseline assessment. Also, in order to briefly document the cognitive performance of subjects on the actual day of the baseline MRI scanning session, all subjects underwent a short (approximately 10 minutes) evaluation using the Short Cognitive Performance Test (SKT) validated in Brazil by Flaks et al (42). The SKT affords a rapid evaluation of overall cognitive performance as well as in specific domains such as memory and attention, with higher scores indicating more severe cognitive impairment (43). At follow-up, both the COGSCORE and SKT assessments were carried out on the same day of MRI scanning in all subjects. Thus measures of cognitive performance used in the present investigation comprised: total SKT scores; SKT-based attention and memory subscores; total COGSCORE; and category verbal fluency scores.

APOE genotyping

Genomic DNA was extracted from ethylenediaminetetra-acetic acid (EDTA) anticoagulated venous blood using a standard salting-out method (56). The two single nucleotide polymorphisms (SNPs) rs429358 and rs7412 that determine the three APOE isoforms ($\epsilon 2$, $\epsilon 3$, and $\epsilon 4$) were genotyped by Prevention Genetics (<http://www.preventiongenetics.org>) using the Amplifluor SNPs genotyping system (Chemicon International, Temecula, California). Tests for deviation from Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) were performed for the whole sample of the SPAH, and the distribution

for the two loci did not deviate from HWE. In regard to quality control procedures, the genotyping of all individuals was also performed in our laboratory (Program of Genetics and Pharmacogenetics - PROGENE, University of Sao Paulo) before sending the samples to Prevention Genetics. The degree of discrepancy between our own genotyping and the one carried out by Prevention Genetics was below 2%, and we report herein the results obtained 284 in the analysis carried out by Prevention genetics. Individuals were considered positive for APOE ϵ 4 genotype if presenting at least one allele ϵ 4, including both heterozygous and homozygous carriers.

MRI data acquisition

Subjects underwent MRI scanning at baseline and after a mean interval of 1196 (± 289.68) days (range = 477-1729 days). Both structural MRI datasets were acquired using the same 1.5 T General Electric Signa LX CVi scanner (Milwaukee, WI, USA) and image acquisition protocol, as follows: a) a dual-spin echo sequence of 120 transaxial slices across the entire brain (axial PD/T2); b) a T2-weighted fast spin-echo transaxial sequence (88 slices); and c) a 3D Spoiled Gradient Recalled Acquisition sequence of 124 slices with TR/TE of 21.7/5.2 msec, a flip angle of 20 degrees, 220 mm field of view, 1.5 mm slice thickness, a number of measures of 1, and a 256 $\times$ 192 matrix. All MRI scans were examined by experienced radiologists unaware of the study aims, in order to identify the presence, number and location of silent brain infarcts. Infarcts were detected as low-signal-intensity lesions on the SPGR sequence and hyperintense lesions on the T2-weighted images.

Image processing: Voxel-based morphometry

Imaging data processing was carried out using optimized voxel-based morphometry (VBM) with the Statistical Parametric Mapping software (SPM8; Wellcome Department of

Imaging Neuroscience, London, UK), executed in Matlab Version r2012a (MathWorks, Natick, Mass). First, follow-up images were registered to baseline images and reoriented; the mm coordinate of the anterior commissure matched the origin xyz (0, 0, 0), and the orientation approximated Montreal Neurological Institute (MNI) space. Then, all images were segmented and classified into GM, white matter (WM) and cerebrospinal fluid (CSF) using the unified segmentation implemented in SPM8, which provides both the native space versions and Diffeomorphic Anatomical Registration using Exponentiated Lie algebra (DARTEL) imported versions of the tissues (57). A customized template was created from the subjects using the DARTEL protocol (58, 59). The deformation field was applied to the segmented images in sequence. Finally, the images created in the previous step were standardized to MNI space, re-sliced to 1.5x1.5x1.5mm voxels and smoothed using an 8-mm full width at half maximum (FWHM) Gaussian kernel. The total GM volumes were obtained from the modulated images. The choice to use a 8 mm Gaussian filtering size in the current study was based on the fact that such degree of smoothing provides an optimal degree of increment in signal-to-noise ratio and conformation of MRI data to a normal distribution (thus allowing the use of parametric tests in subsequent statistical comparisons), as well as compensating for some of the data loss incurred by spatial normalization (60, 61).

Statistical analysis

For the analysis of demographic and cognitive performance data, the calculation of means and their standard deviation (SD) was carried out using the Statistical Package for Social Sciences (SPSS) for Windows (17.0 version). Longitudinal comparisons of cognitive performance data in the overall sample were carried out using paired t-tests. Also, using repeated-measures ANOVA, comparisons of cognitive performance data were conducted between the following subgroups: APOE $\epsilon 4$ (n=11) *versus* non-APOE $\epsilon 4$ carriers (n=44); and

high FRS scores (n=21) *versus* low or moderate FRS scores (n=34). Levels of statistical significance were set at $p < 0.05$, two-tailed.

In regard to neuroimaging data, we initially carried out voxelwise comparisons of regional gray matter volumes between the two time-points in the overall sample using an ANCOVA model, including global gray matter volumes and inter-scanning interval as nuisance variables. The resulting statistics were thresholded at a Z value of ≥ 3.09 (corresponding to the two-tailed $p \leq 0.001$ level, uncorrected for multiple comparisons) and displayed as a statistical parametric map (SPM) in standard anatomical space, with a minimum cluster size of 50 voxels. Clusters were reported as significant if they survived FWE correction for multiple comparisons ($p < 0.05$) over the whole brain, with findings significant at the corrected $p < 0.05$ level being reported as trends.

Subsequently, we carried out investigations of gray matter volume change over time separately in the subgroups with and without the APOE $\epsilon 4$ allele, as well as in the subgroups with high FRS scores and those with low/moderate FRS scores. Also, we used the flexible factorial (ANOVA) model available in SPM to investigate whether there were significant interactions between the between-subjects (subgroup) factor and the within-subjects factors (presence of the APOE $\epsilon 4$ allele or high FRS score). The SPMs resulting from these analyses were inspected using the small volume correction (SVC) approach, whereby ROI masks were placed specifically over the brain structures found to present gray matter volume changes in the above longitudinal within-group comparison carried out in the overall sample. Such SVC-based statistical analyses were conducted using a FWE-corrected threshold of $p < 0.05$ over the volume of each ROI, with a cluster threshold of 50 contiguous voxels.

Finally, we used SPSS to calculate indices of linear correlation between the rates of cognitive performance change and the rate of gray matter volume change in the brain regions where the above within-group comparisons detected significant gray matter volume decrement

over time. Rates of cognitive performance change were calculated as the difference in cognitive test scores between the two time-points divided by the baseline cognitive indices. Rates of gray matter volume change were calculated as the difference in regional gray matter values (normalized to global brain volumes) between the two time-points in the voxel of peak statistical significance in each brain region where a change in volume change was detected over time, divided by the baseline normalized peak voxel value.

RESULTS

Demographic, clinical and cognitive performance data

Demographic, clinical and APOE genotype data for the elderly sample included in this study (n=55) are provided in Table 1. Cognitive testing data are described in Table 2. The repeated COGSCORE assessment was sensitive to uncover a significant decline over time, although mean follow-up scores were only mildly reduced (approximately 3%) compared to baseline cognitive ratings. No other cognitive measures showed significant decline over time (Table 2).

There were no significant differences in regard to the time interval between the two MRI scanning sessions between subgroups with and without the APOE ϵ 4 allele ($t=-0.62$, $p=0.538$). There was a trend towards a shorter interval between the two MRI scanning sessions in the subgroup with high FRS scores relative to the subgroup with low/moderate FRS scores (1096.38 ± 333.97 days *versus* 1250.03 ± 245.82 days, $t= 1.96$, $p=0.055$). There were trends towards worsening cognitive performance over time in the subgroup with the APOE ϵ 4 allele versus the subgroup without the APOE ϵ 4 allele in regard to COGSCORE ($t=1.75$, $p=0.085$) and the SKT memory subscore ($t=1.93$, $p=0.058$). None of the cognitive test scores showed significant differences in their rate of change over time between subgroups with high FRS scores and low/moderate FRS scores ($t<0.80$, $p>0.425$).

Analysis of gray matter changes over time in the overall sample

Estimates of global gray matter volumes (as given by the total sum of gray matter voxels in segmented images) was equal to 33,718.70 (SD = 63.30) at baseline and 33,420.95 (SD = 62.41) at the follow-up scanning ($t = 5.46$; $df = 54$, $p < 0.001$), indicating a significant decline in overall gray matter volume in the brain over time.

In the whole-brain search for foci of gray matter change between the two time-points under the strict threshold of $p < 0.05$ (FWE-corrected) and minimum cluster extent of 50 voxels, we detected two clusters of significantly reduced gray matter volume over time (see Figure 1). These foci were respectively located in: the right thalamus ($k=330$; $z=5.01$; $p_{FWE-corrected} = 0.016$, coordinates $x,y,z = 20 -19 4$); and the left parahippocampal gyrus ($k=131$; $z=4.79$; $p_{FWE-corrected} = 0.041$, coordinates $x,y,z = -20 -22 -33$). Two additional trend significant ($p < 0.10$, corrected) clusters of gray matter reduction were found respectively in the left cerebellar lobe ($k=270$; $z=4.63$; $p_{FWE-corrected} = 0.078$, coordinates $x,y,z = -6 -40 -53$) and the right parahippocampal gyrus extending towards the right amygdala, temporal pole and inferior temporal gyrus ($k=673$; $z=4.58$; $p_{FWE-corrected} = 0.095$, coordinates $x,y,z = 35 3 -33$).

Effects of APOE genotype and cardiovascular risk on gray matter changes over time

Changes in global gray matter volumes over time did not differ either between the subgroups with *versus* without the APOE $\epsilon 4$ allele ($F = 0.233$, $p = 0.631$) or between the FRS subgroups ($F = 2.56$, $p = 0.115$).

The SPMs for the analyses investigating longitudinal pattern of regional gray matter reductions in subjects with the APOE $\epsilon 4$ allele and those without this genetic risk factor were inspected using ROIs placed over the thalami and parahippocampal gyri. In the subgroup without the APOE $\epsilon 4$ allele, significant gray matter reductions ($p < 0.05$, with SVC-based

correction for multiple comparisons) were detected in the right thalamus ($Z=4.24$, $p<0.002$), left thalamus ($Z=4.13$, $p<0.004$) and right parahippocampal gyrus ($Z=3.45$, $p<0.045$), with an additional trend significant focus of gray matter reduction found in the left parahippocampal gyrus ($Z=3.15$, $p<0.090$). In the subgroup with the APOE $\epsilon 4$ allele, significantly reduced gray matter volume was detected in the left parahippocampal gyrus ($Z=4.07$, $p<0.015$). There was no significant interaction between subgroup and time in the ANOVA investigating regional brain differences in the longitudinal pattern of gray matter reductions between subjects with *versus* without the APOE $\epsilon 4$ allele.

In the subgroup with high FRS scores, significantly reduced gray matter volume was found in the right parahippocampal gyrus ($Z=3.80$, $p<0.019$, SVC-based corrected). In the subgroup with low/intermediate FRS scores, significant gray matter reductions were detected in the right ($Z=4.52$, $p<0.001$ corrected) and left thalami ($Z=3.99$, $p<0.006$ corrected). There was no significant interaction between subgroup and time in the ANOVA investigating regional brain differences in the longitudinal pattern of gray matter reductions between subjects with high FRS scores *versus* those with low/intermediate FRS scores.

The exploratory voxelwise search for additional findings using a strict threshold of $p<0.05$ (FWE-corrected) over the whole brain showed no additional foci of significant interaction in either of the two sets of analyses above.

Relationship between gray matter changes and cognitive performance

Indices of linear correlation were calculated between rates of cognitive test score change and rates of regional gray matter volume change in the right thalamus and left parahippocampal gyrus, as given by the difference in regional gray matter values between the two time-points in the voxel of peak statistical significance in each of those two brain regions (normalized to global brain volumes), divided by the baseline normalized peak voxel value.

We found a trend significant correlation between the normalized rate of regional gray matter change in the right thalamus and the mean rate of COGSCORE score change ($r=0.229$, $p=0.093$). This finding retained trend statistical significance when a partial coefficient of correlation was calculated taking into account variations in FRS scores ($r=0.231$, $p=0.093$). The partial coefficient of correlation was equal to 0.224 ($p=0.103$) when the presence of the APOE $\epsilon 4$ allele was taken into account. There were no significant correlations between thalamic volume change and other indices of cognitive performance change ($p>0.205$) nor between parahippocampal volume changes and any index of cognitive performance change ($p>0.295$).

Finally, we found a significant direct correlation between the rate of verbal fluency decline and rate of global gray matter volume reduction ($r=0.293$, $p=0.030$). This finding retained statistical significance when either the presence of the APOE $\epsilon 4$ allele ($p=0.289$, $p=0.034$) or FRS variations ($p=0.281$, $p=0.040$) were taken into account.

DISCUSSION

To the best of our knowledge, this is the first longitudinal VBM study that assessed the presence of regional gray matter volume reductions over time in healthy elderly and directly investigated the relationship between such brain volumetric decrements and changes in cognitive performance. We detected global gray matter reductions over the mean follow-up period of three years, as well as regional gray matter decrements that were significant in the right thalamus and left parahippocampal gyrus using a stringent statistical threshold corrected for multiple comparisons over the whole brain. Thus in the thalamus and parahippocampal cortex, gray matter shrinkage was significantly greater than the degree of global gray matter volume reduction over time.

The relevance of thalamic macrostructural changes during healthy human aging is being progressively recognized (62). Our findings of largest gray matter volumetric reduction in the

thalamus over time are in agreement with the results of one (21) out of the three previous longitudinal VBM investigations of healthy elderly samples carried out to date (21, 31, 32). Our findings in the thalamus are also consistent with the results of recent ROI-based longitudinal MRI investigations evaluating volumes of subcortical structures in healthy elderly subjects (12). Cross-sectional VBM studies investigating healthy elderly samples have not reported correlations between age and thalamic volumes (18, 20, 21), but this may be due to a lesser sensitivity of the cross-sectional approach relative to longitudinal VBM designs (2, 21). However, healthy elderly subjects did display decreased thalamic volumes relative to younger adults in a number of ROI-based cross-sectional comparisons (12, 62).

The thalamus is nowadays recognized as critical to several aspects of normal cognitive functioning, including memory, processing speed, attention and executive functions (62). In our VBM investigation, a trend significant correlation was found between reduced gray matter volume in the right thalamus and the degree of cognitive performance change over time, suggesting that gray matter volume shrinkage in this brain region may be relevant to explain the subtle cognitive deficits that progressively occur during healthy aging (62, 63).

There is a weakening of functionally specialized, large-scale patterns of connectivity in healthy aging (64), and changes in structural and functional connectivity are thought to be critical to aging-related cognitive deficits (18, 62, 65). The prominent role of the thalamus in cognition is thought to be subserved by the notably large number of functionally segregated structural interconnections of this brain region with other cortical, subcortical and cerebellar structures (62). The thalamus is, therefore, a critical brain site where macrostructural volume changes may be detected in proportion to aging-related large-scale connectivity deficits (62). Recent multimodal MRI investigations of subcortical brain structures in healthy subjects have shown that the thalamus is a key region displaying significant increases in mean diffusivity in

healthy older adults, possibly reflecting loss of microstructural neuronal integrity related to aging (65, 66)

We also confirmed the prediction that aging-related volume reductions in healthy elders would be particularly prominent in the hippocampal region. Our findings in the parahippocampal gyrus confirm the notion that significant macrostructural changes in the hippocampal region are detectable with MRI in elderly life over periods as short as 1 to 3 years. Our results are also consistent with the findings of a number of longitudinal MRI studies carried out with healthy middle-aged to elderly samples, using either ROI-based or VBM methods (5, 32, 33). The lack of significant hippocampal findings in some of the previous longitudinal VBM investigations similar to ours may relate to their recruitment of samples of more modest size (21).

The cellular and molecular mechanisms underlying regional gray matter volume deficits associated with healthy aging remain to be clarified. Recent investigations have reported reduced cell number in *post-mortem* hippocampal tissue of elderly subjects free from pathological cognitive decline and associated neurodegenerative processes (67), and there are also findings from animal studies indicating decreased hippocampal neurogenesis/neuroplasticity related to aging (68). The hippocampal region is vulnerable to pro-inflammatory and microvascular changes that may influence on impaired neural plasticity and reduced macroscopic volume of the aging brain (69, 70). Microvascular and pro-inflammatory changes detectable in the aging brain are likely to occur in direct proportion to the degree of cardiovascular risk and in relation to a higher prevalence of metabolic disorders such as type II diabetes in elderly patients (71). In the present investigation, approximately 38.2% of the sample had high cardiovascular risk according to FRS scores (with more than 61.9% of subjects presenting arterial hypertension and 14.3% with type II diabetes). Although we found no significant interaction between sub-group and time in the ANOVA investigating

regional brain differences in the longitudinal pattern of gray matter reductions between subjects with high cardiovascular risk *versus* the remaining individuals, it is interesting to note that paired longitudinal comparisons within each subgroup did show reduced hippocampal gray matter volumes over time predominantly in the subjects that had higher cardiovascular risk. The fact that cognitive performance deficits over time were not significantly associated with volume changes in the hippocampal region in our sample is worth noting. In previous MRI studies specifically evaluating healthy middle-aged to elderly samples, there have been both positive (12, 25, 28-30, 72-80) and negative findings (9, 26, 81-84) regarding associations between macrostructural volume deficits in the hippocampal region and cognitive deficits.

Either over the course of AD or in the progression from mild cognitive impairment (MCI) to dementia, the presence of the APOE ϵ 4 allele is associated with more rapid brain volume deficits and cortical thinning over time, as shown in several longitudinal MRI studies (85-87). In longitudinal MRI studies of healthy aging, however, some authors have reported a greater degree of ventricle enlargement and hippocampal volume deficits in APOE ϵ 4 carriers (6, 38, 88, 89), while others have found no influence of the APOE ϵ 4 allele on brain volume changes (9, 39). Cross-sectional MRI investigations that evaluated brain volumes in healthy elderlies taking into account the possible influence of the presence of the APOE ϵ 4 allele have also produced controversial results (37). It remains therefore unclear whether moderating effects of the APOE ϵ 4 allele in elderly life are exerted only over pathological brain processes related to dementia, or are also influential on brain changes associated with healthy aging. Our ANOVA comparing subjects with and without the APOE ϵ 4 allele showed no significant interaction between subgroup and time; also, our findings of longitudinal gray matter volume deficits in the thalamus and hippocampal region remained detectable when the analyses were restricted to non-carriers of the APOE ϵ 4 allele. These results are consistent with the findings of a recent vertex-wise cortical thickness investigation of repeated MRI datasets acquired in healthy elders

(12). Thus our results support a view that longitudinal regional gray matter reductions in healthy elderlies are not dependent on the presence of the APOE $\epsilon 4$ allele.

Finally, it is worth highlighting that all subjects in our study were recruited in a circumscribed, economically disadvantaged area of São Paulo, Brazil, while most other longitudinal morphometric MRI studies of healthy elders have been carried out in high-income countries. By producing findings of localized gray matter reductions consistent with the results of previous investigations conducted in high-income countries, our VBM study indicates that volume decrements in the thalamus and hippocampal region in healthy elderlies are similarly detectable across widely different environments and cultures. Two different measures of overall cognitive performance (COGSCORE and SKT) were employed in the current study. The easiness to apply the SKT allowed us to use this rapid cognitive battery on the actual day of MRI scanning, whereas variable intervals of time elapsed between COGSCORE testing and MRI scanning in the baseline assessment. Both the mild but significant cognitive decline over time and the trend significant correlations between rate of cognitive change and thalamic shrinkage were detected only when we used COGSCORE ratings in the statistical analyses. Thus the COGSCORE, validated for use across populations from different environments and with variable levels of previous education (90), tended to be more sensitive than SKT scores to highlight brain imaging-cognitive performance correlations in the longitudinal evaluation of our sample recruited in an economically disadvantaged area of Brazil.

Two limitations of our study should be highlighted. First, although we managed to recruit a well-characterized group of cognitively preserved healthy elders that was larger than the samples recruited in some of the previous longitudinal MRI studies conducted at similar age ranges (21), we must acknowledge that our sample size was still relatively modest and possibly insufficient to avoid the risk of type II errors. Future studies with larger samples are therefore warranted in order to confirm the findings reported herein. Second, 3 Tesla equipment recently

made available for brain imaging studies might supposedly afford greater contrast for brain imaging measurements in comparison to 1.5 Tesla scanners such as the one employed herein (91, 92). The majority of longitudinal MRI studies of healthy aging to date have employed 1.5 Tesla scanners, and it remains to be demonstrated whether different patterns of gray matter volume change over time will emerge in studies using equipment of higher magnetic field strength in large elderly samples. However, it should be noted that improved performance of 3 Tesla scanners has been more clearly demonstrated for functional rather than for morphometric MRI brain acquisitions to date (93)

In conclusion, the results of this longitudinal VBM investigation indicate that irrespective of the presence of the APOE ϵ 4 allele, the parahippocampal cortex and thalamus display significant gray matter reductions over time in healthy elderly individuals, which in the latter brain region tended to be significantly associated with subtle cognitive performance deficits at follow-up. Future MRI studies with larger healthy elderly samples and multimodal image acquisition protocols are warranted to extend the findings presented herein, in regard both to brain macro- and micro-structural features and to functional and structural connectivity patterns. These multimodal imaging studies should further clarify the biological substrate of subtle cognitive deficits associated with healthy aging, as well as providing valid biomarkers for the assessment of brain modifying properties of interventions aimed at minimizing the impact of such cognitive decline.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Dr. Claudia da Costa Leite and her team at the Instituto de Radiologia (InRad), HCFMUSP, for their invaluable assistance with the acquisition of MRI data. We also thank Dr. Marcia Scazufca, Prof. Paulo R. Menezes and Prof. Paulo A. Lotufo (coordinators of the SPAH study) for granting us access to demographic, clinical and COGSCORE data used in the

baseline evaluation of subjects, and for allowing us to contact those individuals for the follow-up assessment. We acknowledge Prof. Homero Vallada and his team for the analysis of genotype data. This work was supported by the São Paulo Research Foundation (FAPESP), reference numbers 2013/03231-3, 2012/50239-6, 2005/56464-9 and 2004/15336-5 and National Council for Scientific and Technological Development (CNPq).

REFERENCES

1. Fjell AM, Walhovd KB. Structural brain changes in aging: courses, causes and cognitive consequences. *Rev Neurosci*. 2010;21(3):187-221.
2. Salthouse TA. Neuroanatomical substrates of age-related cognitive decline. *Psychol Bull*. 2011;137(5):753-84.
3. Matsuda H. Voxel-based Morphometry of Brain MRI in Normal Aging and Alzheimer's Disease. *Aging Dis*. 2013;4(1):29-37.
4. Yuan P, Raz N. Prefrontal cortex and executive functions in healthy adults: a meta-analysis of structural neuroimaging studies. *Neurosci Biobehav Rev*. 2014;42:180-92.
5. Fraser SL, Nadeau L. Experience and representations of health and social services in a community of Nunavik. *Contemp Nurse*. 2015;51(2-3):286-300.
6. Risacher SL, Shen L, West JD, Kim S, McDonald BC, Beckett LA, et al. Longitudinal MRI atrophy biomarkers: relationship to conversion in the ADNI cohort. *Neurobiol Aging*. 2010;31(8):1401-18.
7. Habes M, Janowitz D, Erus G, Toledo JB, Resnick SM, Doshi J, et al. Advanced brain aging: relationship with epidemiologic and genetic risk factors, and overlap with Alzheimer disease atrophy patterns. *Transl Psychiatry*. 2016a;6:e775.
8. Mu Q, Xie J, Wen Z, Weng Y, Shuyun Z. A quantitative MR study of the hippocampal formation, the amygdala, and the temporal horn of the lateral ventricle in healthy subjects 40 to 90 years of age. *AJNR Am J Neuroradiol*. 1999;20(2):207-11.
9. Du AT, Schuff N, Chao LL, Kornak J, Jagust WJ, Kramer JH, et al. Age effects on atrophy rates of entorhinal cortex and hippocampus. *Neurobiol Aging*. 2006;27(5):733-40.
10. Goodro M, Sameti M, Patenaude B, Fein G. Age effect on subcortical structures in healthy adults. *Psychiatry Res*. 2012;203(1):38-45.
11. Long X, Liao W, Jiang C, Liang D, Qiu B, Zhang L. Healthy aging: an automatic analysis of global and regional morphological alterations of human brain. *Acad Radiol*. 2012;19(7):785-93.
12. Fjell AM, McEvoy L, Holland D, Dale AM, Walhovd KB, Initiative AsDN. Brain changes in older adults at very low risk for Alzheimer's disease. *J Neurosci*. 2013;33(19):8237-42.
13. Potvin O, Mouiha A, Dieumegarde L, Duchesne S, Initiative AsDN. Normative data for subcortical regional volumes over the lifetime of the adult human brain. *Neuroimage*. 2016;137:9-20.
14. Grieve SM, Clark CR, Williams LM, Peduto AJ, Gordon E. Preservation of limbic and paralimbic structures in aging. *Hum Brain Mapp*. 2005;25(4):391-401.

15. Kalpouzos G, Chetelat G, Baron JC, Landeau B, Mevel K, Godeau C, et al. Voxel-based mapping of brain gray matter volume and glucose metabolism profiles in normal aging. *Neurobiol Aging*. 2009;30(1):112-24.
16. Giorgio A, Santelli L, Tomassini V, Bosnell R, Smith S, De Stefano N, et al. Age-related changes in grey and white matter structure throughout adulthood. *Neuroimage*. 2010;51(3):943-51.
17. Terribilli D, Schaufelberger MS, Duran FL, Zanetti MV, Curiati PK, Menezes PR, et al. Age-related gray matter volume changes in the brain during non-elderly adulthood. *Neurobiol Aging*. 2011;32(2):354-68.
18. Tisserand DJ, van Boxtel MP, Pruessner JC, Hofman P, Evans AC, Jolles J. A voxel-based morphometric study to determine individual differences in gray matter density associated with age and cognitive change over time. *Cereb Cortex*. 2004;14(9):966-73.
19. Smith DM, Mizumori SJ. Learning-related development of context-specific neuronal responses to places and events: the hippocampal role in context processing. *J Neurosci*. 2006;26(12):3154-63.
20. Curiati PK, Tamashiro JH, Squarzoni P, Duran FLS, Santos LC, Wajngarten M, et al. Brain Structural Variability due to Aging and Gender in Cognitively Healthy Elders: Results from the Sao Paulo Ageing and Health Study. *American Journal of Neuroradiology*. 2009;30(10):1850-6.
21. Nyberg L, Salami A, Andersson M, Eriksson J, Kalpouzos G, Kauppi K, et al. Longitudinal evidence for diminished frontal cortex function in aging. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(52):22682-6.
22. Bakkour A, Morris JC, Wolk DA, Dickerson BC. The effects of aging and Alzheimer's disease on cerebral cortical anatomy: specificity and differential relationships with cognition. *Neuroimage*. 2013;76:332-44.
23. Dotson VM, Szymkowicz SM, Sozda CN, Kirton JW, Green ML, O'Shea A, et al. Age Differences in Prefrontal Surface Area and Thickness in Middle Aged to Older Adults. *Front Aging Neurosci*. 2015;7:250.
24. Fjell AM, Walhovd KB, Fennema-Notestine C, McEvoy LK, Hagler DJ, Holland D, et al. One-year brain atrophy evident in healthy aging. *J Neurosci*. 2009;29(48):15223-31.
25. Murphy EA, Holland D, Donohue M, McEvoy LK, Hagler DJ, Dale AM, et al. Six-month atrophy in MTL structures is associated with subsequent memory decline in elderly controls. *Neuroimage*. 2010;53(4):1310-7.
26. Ylikoski R, Salonen O, Mäntylä R, Ylikoski A, Keskivaara P, Leskelä M, et al. Hippocampal and temporal lobe atrophy and age-related decline in memory. *Acta Neurol Scand*. 2000;101(4):273-8.
27. Jiang J, Sachdev P, Lipnicki DM, Zhang H, Liu T, Zhu W, et al. A longitudinal study of brain atrophy over two years in community-dwelling older individuals. *Neuroimage*. 2014;86:203-11.
28. Rodrigue KM, Raz N. Shrinkage of the entorhinal cortex over five years predicts memory performance in healthy adults. *J Neurosci*. 2004;24(4):956-63.
29. Kramer JH, Mungas D, Reed BR, Wetzel ME, Burnett MM, Miller BL, et al. Longitudinal MRI and cognitive change in healthy elderly. *Neuropsychology*. 2007;21(4):412-8.
30. Persson J, Pudas S, Lind J, Kauppi K, Nilsson LG, Nyberg L. Longitudinal structure-function correlates in elderly reveal MTL dysfunction with cognitive decline. *Cereb Cortex*. 2012;22(10):2297-304.
31. Resnick SM, Pham DL, Kraut MA, Zonderman AB, Davatzikos C. Longitudinal magnetic resonance imaging studies of older adults: a shrinking brain. *J Neurosci*. 2003;23(8):3295-301.

32. Crivello F, Tzourio-Mazoyer N, Tzourio C, Mazoyer B. Longitudinal assessment of global and regional rate of grey matter atrophy in 1,172 healthy older adults: modulation by sex and age. *PLoS One*. 2014;9(12):e114478.
33. Thambisetty M, Wan J, Carass A, An Y, Prince JL, Resnick SM. Longitudinal changes in cortical thickness associated with normal aging. *Neuroimage*. 2010;52(4):1215-23.
34. Tsai MS, Tangalos EG, Petersen RC, Smith GE, Schaid DJ, Kokmen E, et al. Apolipoprotein E: risk factor for Alzheimer disease. *Am J Hum Genet*. 1994;54(4):643-9.
35. Shaw P, Lerch JP, Pruessner JC, Taylor KN, Rose AB, Greenstein D, et al. Cortical morphology in children and adolescents with different apolipoprotein E gene polymorphisms: an observational study. *Lancet Neurol*. 2007;6(6):494-500.
36. Wishart HA, Saykin AJ, McAllister TW, Rabin LA, McDonald BC, Flashman LA, et al. Regional brain atrophy in cognitively intact adults with a single APOE epsilon4 allele. *Neurology*. 2006;67(7):1221-4.
37. Habes M, Toledo JB, Resnick SM, Doshi J, Van der Auwera S, Erus G, et al. Relationship between APOE Genotype and Structural MRI Measures throughout Adulthood in the Study of Health in Pomerania Population-Based Cohort. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2016b;37(9):1636-42.
38. Roussotte FF, Gutman BA, Madsen SK, Colby JB, Thompson PM, Initiative AsDN. Combined effects of Alzheimer risk variants in the CLU and ApoE genes on ventricular expansion patterns in the elderly. *J Neurosci*. 2014;34(19):6537-45.
39. Taylor JL, Scanlon BK, Farrell M, Hernandez B, Adamson MM, Ashford JW, et al. APOE-epsilon4 and aging of medial temporal lobe gray matter in healthy adults older than 50 years. *Neurobiol Aging*. 2014;35(11):2479-85.
40. de Toledo Ferraz Alves TC, Scazufca M, Squarzoni P, de Souza Duran FL, Tamashiro-Duran JH, Vallada HP, et al. Subtle Gray Matter Changes in Temporo-Parietal Cortex Associated with Cardiovascular Risk Factors. *Journal of Alzheimers Disease*. 2011;27(3):575-89.
41. Erus G, Battapady H, Zhang T, Lovato J, Miller ME, Williamson JD, et al. Spatial patterns of structural brain changes in type 2 diabetic patients and their longitudinal progression with intensive control of blood glucose. *Diabetes Care*. 2015;38(1):97-104.
42. Flaks MK, Yassuda MS, Regina AC, Cid CG, Camargo CH, Gattaz WF, et al. The Short Cognitive Performance Test (SKT): a preliminary study of its psychometric properties in Brazil. *Int Psychogeriatr*. 2006;18(1):121-33.
43. Lehfeld H, Erzigkeit H. The SKT--a short cognitive performance test for assessing deficits of memory and attention. *Int Psychogeriatr*. 1997;9 Suppl 1:115-21.
44. Lehfeld H, Rudinger G, Rietz C, Heinrich C, Wied V, Fornazzari L, et al. Evidence of the cross-cultural stability of the factor structure of the SKT short test for assessing deficits of memory and attention. *Int Psychogeriatr*. 1997;9(2):139-53.
45. Wechsler D. Wechsler Abbreviated Scale of Intelligence (WASI). Psychological Corporation; 1999.
46. Prince M, Ferri CP, Acosta D, Albanese E, Arizaga R, Dewey M, et al. The protocols for the 10/66 dementia research group population-based research programme. *BMC Public Health*. 2007;7:165.
47. Scazufca M, Menezes PR, Vallada HP, Crepaldi AL, Pastor-Valero M, Coutinho LM, et al. High prevalence of dementia among older adults from poor socioeconomic backgrounds in São Paulo, Brazil. *Int Psychogeriatr*. 2008;20(2):394-405.
48. Group DR. Subjective memory deficits in people with and without dementia: findings from the 10/66 dementia research group pilot studies in low- and middle-income countries. *J Am Geriatr Soc*. 2009;57(11):2118-24.

49. Hall KS, Hendrie HC, Brittain HM. The development of a dementia screening interview in two distinct languages. *Int J Methods Psychiatr Res.* 1993(3):1–28.
50. Copeland JR, Dewey ME, Griffiths-Jones HM. A computerized psychiatric diagnostic system and case nomenclature for elderly subjects: GMS and AGECAT. *Psychol Med.* 1986;16(1):89-99.
51. Prince M, Acosta D, Chiu H, Scazufca M, Varghese M. Dementia diagnosis in developing countries: a cross-cultural validation study. *Lancet.* 2003;361(9361):909-17.
52. Grundy SM, Balady GJ, Criqui MH, Fletcher G, Greenland P, Hiratzka LF, et al. Primary prevention of coronary heart disease: guidance from Framingham: a statement for healthcare professionals from the AHA Task Force on Risk Reduction. *American Heart Association. Circulation.* 1998;97(18):1876-87.
53. Wilson PW, D'Agostino RB, Levy D, Belanger AM, Silbershatz H, Kannel WB. Prediction of coronary heart disease using risk factor categories. *Circulation.* 1998;97(18):1837-47.
54. Andreasen NC, Nopoulos P, Magnotta V, Pierson R, Ziebell S, Ho BC. Progressive brain change in schizophrenia: a prospective longitudinal study of first-episode schizophrenia. *Biol Psychiatry.* 2011;70(7):672-9.
55. ABA/ABIPEME. Critério de classificação sócio-econômica. Rio de Janeiro, ABA, 1978 [Portuguese] 1978 [
56. Pearlson GD, Wong DF, Tune LE, Ross CA, Chase GA, Links JM, et al. In vivo D2 dopamine receptor density in psychotic and nonpsychotic patients with bipolar disorder. *Arch Gen Psychiatry.* 1995;52(6):471-7.
57. Ashburner J, Friston KJ. Unified segmentation. *Neuroimage.* 2005;26(3):839-51.
58. Ashburner J. A fast diffeomorphic image registration algorithm. *Neuroimage.* 2007;38(1):95-113.
59. Matsuda H, Mizumura S, Nemoto K, Yamashita F, Imabayashi E, Sato N, et al. Automatic voxel-based morphometry of structural MRI by SPM8 plus diffeomorphic anatomic registration through exponentiated lie algebra improves the diagnosis of probable Alzheimer Disease. *AJNR Am J Neuroradiol.* 2012;33(6):1109-14.
60. Mechelli A, Friston KJ, Frackowiak RS, Price CJ. Structural covariance in the human cortex. *J Neurosci.* 2005;25(36):8303-10.
61. Salmond CH, Ashburner J, Vargha-Khadem F, Connelly A, Gadian DG, Friston KJ. Distributional assumptions in voxel-based morphometry. *Neuroimage.* 2002;17(2):1027-30.
62. Fama R, Sullivan EV. Thalamic structures and associated cognitive functions: Relations with age and aging. *Neurosci Biobehav Rev.* 2015;54:29-37.
63. Catheline G, Amieva H, Dilharreguy B, Bernard C, Duperron MG, Helmer C, et al. Semantic retrieval over time in the aging brain: Structural evidence of hippocampal contribution. *Hippocampus.* 2015;25(9):1008-16.
64. Ferreira LK, Regina AC, Kovacevic N, Martin MaG, Santos PP, Carneiro CeG, et al. Aging Effects on Whole-Brain Functional Connectivity in Adults Free of Cognitive and Psychiatric Disorders. *Cereb Cortex.* 2016;26(9):3851-65.
65. Hughes LE, Rowe JB. The impact of neurodegeneration on network connectivity: a study of change detection in frontotemporal dementia. *J Cogn Neurosci.* 2013;25(5):802-13.
66. Cherubini A, Péran P, Caltagirone C, Sabatini U, Spalletta G. Aging of subcortical nuclei: microstructural, mineralization and atrophy modifications measured in vivo using MRI. *Neuroimage.* 2009;48(1):29-36.
67. Oliveira-Pinto AV, Santos RM, Coutinho RA, Oliveira LM, Santos GB, Alho AT, et al. Sexual dimorphism in the human olfactory bulb: females have more neurons and glial cells than males. *PLoS One.* 2014;9(11):e111733.

68. Jinno S. Aging affects new cell production in the adult hippocampus: A quantitative anatomic review. *J Chem Neuroanat.* 2015.
69. Barrientos RM, Kitt MM, Watkins LR, Maier SF. Neuroinflammation in the normal aging hippocampus. *Neuroscience.* 2015;309:84-99.
70. Papenberg G, Ferencz B, Mangialasche F, Mecocci P, Cecchetti R, Kalpouzos G, et al. Physical activity and inflammation: effects on gray-matter volume and cognitive decline in aging. *Hum Brain Mapp.* 2016;37(10):3462-73.
71. Singhal G, Jaehne EJ, Corrigan F, Toben C, Baune BT. Inflammasomes in neuroinflammation and changes in brain function: a focused review. *Front Neurosci.* 2014;8:315.
72. Golomb J, de Leon MJ, George AE, Kluger A, Convit A, Rusinek H, et al. Hippocampal atrophy correlates with severe cognitive impairment in elderly patients with suspected normal pressure hydrocephalus. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 1994;57(5):590-3.
73. Zimmerman ME, Pan JW, Hetherington HP, Katz MJ, Verghese J, Buschke H, et al. Hippocampal neurochemistry, neuromorphometry, and verbal memory in nondemented older adults. *Neurology.* 2008;70(18):1594-600.
74. Chen KH, Chuah LY, Sim SK, Chee MW. Hippocampal region-specific contributions to memory performance in normal elderly. *Brain Cogn.* 2010;72(3):400-7.
75. Alexander GE, Chen K, Merkle TL, Reiman EM, Caselli RJ, Aschenbrenner M, et al. Regional network of magnetic resonance imaging gray matter volume in healthy aging. *Neuroreport.* 2006;17(10):951-6.
76. Shing YL, Rodrigue KM, Kennedy KM, Fandakova Y, Bodammer N, Werkle-Bergner M, et al. Hippocampal subfield volumes: age, vascular risk, and correlation with associative memory. *Front Aging Neurosci.* 2011;3:2.
77. Alves TC, Tamashiro JH, Squarzone P, Wanjgarten M, Andrei A, Duran FL, et al. Regional gray matter reductions in elderly subjects with cardiovascular risk factors: A possible link between microvascular lesions and Alzheimer's disease. *Journal of the Neurological Sciences.* 2009;283(1-2):311-2.
78. Squarzone P, Tamashiro-Duran J, Souza Duran FL, Santos LC, Vallada HP, Menezes PR, et al. Relationship between regional brain volumes and cognitive performance in the healthy aging: an MRI study using voxel-based morphometry. *J Alzheimers Dis.* 2012;31(1):45-58.
79. Korthauer LE, Nowak NT, Moffat SD, An Y, Rowland LM, Barker PB, et al. Correlates of virtual navigation performance in older adults. *Neurobiol Aging.* 2016;39:118-27.
80. Oosterman JM, Vogels RL, van Harten B, Gouw AA, Scheltens P, Poggesi A, et al. The role of white matter hyperintensities and medial temporal lobe atrophy in age-related executive dysfunctioning. *Brain Cogn.* 2008;68(2):128-33.
81. Van Petten C. Relationship between hippocampal volume and memory ability in healthy individuals across the lifespan: review and meta-analysis. *Neuropsychologia.* 2004;42(10):1394-413.
82. Moffat SD, Kennedy KM, Rodrigue KM, Raz N. Extrahippocampal contributions to age differences in human spatial navigation. *Cereb Cortex.* 2007;17(6):1274-82.
83. Walhovd KB, Fjell AM, Dale AM, McEvoy LK, Brewer J, Karow DS, et al. Multi-modal imaging predicts memory performance in normal aging and cognitive decline. *Neurobiol Aging.* 2010;31(7):1107-21.
84. Ziegler DA, Piguet O, Salat DH, Prince K, Connally E, Corkin S. Cognition in healthy aging is related to regional white matter integrity, but not cortical thickness. *Neurobiol Aging.* 2010;31(11):1912-26.

85. Chiang GC, Insel PS, Tosun D, Schuff N, Truran-Sacrey D, Raptentsetsang ST, et al. Impact of apolipoprotein E4-cerebrospinal fluid β -amyloid interaction on hippocampal volume loss over 1 year in mild cognitive impairment. *Alzheimers Dement*. 2011;7(5):514-20.
86. Kim J, Yoon H, Horie T, Burchett JM, Restivo JL, Rotllan N, et al. microRNA-33 Regulates ApoE Lipidation and Amyloid- β Metabolism in the Brain. *J Neurosci*. 2015;35(44):14717-26.
87. Löwe LC, Gaser C, Franke K, Initiative AsDN. The Effect of the APOE Genotype on Individual BrainAGE in Normal Aging, Mild Cognitive Impairment, and Alzheimer's Disease. *PLoS One*. 2016;11(7):e0157514.
88. Jak AJ, Houston WS, Nagel BJ, Corey-Bloom J, Bondi MW. Differential cross-sectional and longitudinal impact of APOE genotype on hippocampal volumes in nondemented older adults. *Dement Geriatr Cogn Disord*. 2007;23(6):382-9.
89. Morra JH, Tu Z, Apostolova LG, Green AE, Avedissian C, Madsen SK, et al. Automated mapping of hippocampal atrophy in 1-year repeat MRI data from 490 subjects with Alzheimer's disease, mild cognitive impairment, and elderly controls. *Neuroimage*. 2009;45(1 Suppl):S3-15.
90. Prince M, Acosta D, Ferri CP, Guerra M, Huang Y, Jacob KS, et al. A brief dementia screener suitable for use by non-specialists in resource poor settings--the cross-cultural derivation and validation of the brief Community Screening Instrument for Dementia. *Int J Geriatr Psychiatry*. 2011;26(9):899-907.
91. Tanenbaum LN. Clinical 3T MR imaging: mastering the challenges. *Magn Reson Imaging Clin N Am*. 2006;14(1):1-15.
92. Ho AJ, Hua X, Lee S, Leow AD, Yanovsky I, Gutman B, et al. Comparing 3 T and 1.5 T MRI for tracking Alzheimer's disease progression with tensor-based morphometry. *Hum Brain Mapp*. 2010;31(4):499-514.
93. Wardlaw JM, Brindle W, Casado AM, Shuler K, Henderson M, Thomas B, et al. A systematic review of the utility of 1.5 versus 3 Tesla magnetic resonance brain imaging in clinical practice and research. *Eur Radiol*. 2012;22(11):2295-303.
94. Talairach J, Tournoux P. Co-planar Stereotaxic Atlas of the Human Brain. Thieme Medical Publishers, Inc. 1998.

Table 1: Demographic, clinical and APOE genotype data for the elderly sample included in this study (n=55)

Overall Sample (n=55)	
Male (%)	27 (49.1) ^a
Mean years of education ($\pm$ SD)	5.05 ($\pm$ 3.525) ^b
Socioeconomic Status (%) (A/ B/ C/ D)	1 (1.8) / 17 (30.9) / 29 (50.9) / 9 (16.4) ^a
Framingham Risk Score (%) (low, medium, high)	13 (23.6) / 21 (38.2) / 21 (38.2) ^a
Presence of the APOE ϵ 4 (%)	11 (20%) ^a
Presence cognitive decline (%)	36 (65.5%) ^a
Time interval between the two MRI (days) ($\pm$ SD)	1191.36 ($\pm$ 289.68) ^b

Legend: SD: standard deviation; APOE ϵ 4: the presence of the apolipoprotein E4 allele; MRI: magnetic resonance imaging: ^a x2 test (Pearson); ^b t-test.

Table 2: neuropsychological characteristics for the overall sample over time

	T0 (n=55)	T1 (n=55)	p
Total cognitive score (cogscore) ($\pm$ SD)	29.67 ($\pm$ 1.64)	28.78 ($\pm$ 1.70)	0.001
Verbal fluency ($\pm$ SD)	15.27 ($\pm$ 3.78)	13,91 ($\pm$ 3.45)	0.009
Total SKT score ($\pm$ SD)*	5.65 ($\pm$ 3.37)	5.89 ($\pm$ 3.85)	0.459
Memory subscale ($\pm$ SD)*	0.91 ($\pm$ 1.09)	0,98 ($\pm$ 1.16)	0.659
Attention subscale ($\pm$ SD)*	4.75 ($\pm$ 3.07)	4,91 ($\pm$ 3.29)	0.513
Global gray matter volume	613.07 ($\pm$ 63.30)	607.66 ($\pm$ 62.4)	<0.001

Legend: paired test; T0: baseline; T1: follow-up; GM: gray matter; SKT: Short Cognitive Performance Test *

Figure 1. Results for the voxel-based investigation of gray matter changes over time in healthy elderly individuals. Foci of significance were overlaid on axial brain slices spatially normalized into an approximation to the Talairach and Tournoux stereotactic atlas (94). The numbers associated with each frame represent standard coordinates in the z-axis, indicated in MNI (Montreal Neurological Institute). Such findings reached significance at the $p < 0.001$ level uncorrected for multiple comparisons. (1) Two clusters (highlighted in yellow) of gray matter volume reduction over time was detected in: (a) the right thalamus ($p = 0.019$); (b) the left parahippocampal gyri ($p = 0.041$).