

NATANE MOREIRA DE CARVALHO

**RDW E O RISCO DE DOENÇA CARDIOVASCULAR EM
PARTICIPANTES DO ESTUDO LONGITUDINAL DE SAÚDE DO
ADULTO (ELSA – Brasil)**

Universidade Federal de Minas Gerais

Belo Horizonte – MG

2019

NATANE MOREIRA DE CARVALHO

**RDW E O RISCO DE DOENÇA CARDIOVASCULAR EM
PARTICIPANTES DO ESTUDO LONGITUDINAL DE SAÚDE DO
ADULTO (ELSA – Brasil)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Patologia - área de concentração em Patologia Investigativa.

Orientador: Prof. Dr. Pedro Guatimosim Vidigal

Co-orientadoras: Profa. Dra. Chams Bicalho Maluf

Profa. Dra. Sandhi Maria Barreto

Universidade Federal de Minas Gerais

Belo Horizonte – MG

2019

C331r Carvalho, Natane Moreira de.
RDW e o risco de Doença Cardiovascular em pacientes do Estudo Longitudinal de Saúde do Adulto (ELSA – Brasil) [manuscrito]. / Natane Moreira de Carvalho. - - Belo Horizonte: 2019.
96f.: il.
Orientador (a): Pedro Guatimosim Vidigal.
Coorientador (a): Chams Bicalho Maluf
Coorientador (a): Sandhi Maria Barreto
Área de concentração: Patologia Investigativa.
Tese (doutorado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. Índices de Eritrócitos. 2. Fatores de Risco. 3. Diabetes Mellitus. 4. Hipertensão. 5. Doenças Cardiovasculares. 6. Dissertações Acadêmicas. I. Vidigal, Pedro Guatimosim. II. Maluf, Chams Bicalho. III. Barreto, Sandhi Maria. IV. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. V. Título.

NLM: WG 120

Bibliotecário responsável: Fabian Rodrigo dos Santos CRB-6/2697

DEDICATÓRIA

Este trabalho é sem dúvida, o trabalho mais importante da minha vida. Tenho muito orgulho de tê-lo concluído e, como parte do processo, dedico esta experiência às pessoas mais importantes da minha vida.

Às minhas filhas Maria Fernanda e Ana Beatriz, meus maiores amores. Obrigada pela paciência e por entenderem os momentos de ausência.

À minha mãe, Maria das Graças, meu exemplo, meu alicerce. Dedico grande parte deste trabalho a ela, já que a conclusão deste, apenas foi possível devido à sua ajuda. Graças à ela pude ter tempo para concluir minhas atividades, pois, enquanto isso, ela cuidava dos meus tesouros. Além disso, minha amada mãe é meu exemplo de superação e força.

Também dedico este trabalho ao meu amado esposo Andrei. Andrei sempre me incentivou e me apoiou, ele me fez acreditar que era possível. Sua sinceridade, sensatez, racionalidade, objetividade e honestidade me ajudaram a ter os pés no chão, a me centrar e focar neste objetivo.

E por último dedico este trabalho ao meu irmão Herlon Charles (*in memoriam*). Dedico este trabalho a ele que não teve tempo de ser um Doutor, porque capacidade e competência ele sempre teve de sobra. Meu irmão, este título é para você!

AGRADECIMENTO

Agradeço às minhas filhas, ao Andrei, minha mãe, meus irmãos, Herlon e Cristiane e meus sobrinhos, obrigada pelo amor incondicional. Obrigada por terem me ajudado tanto e por entender os momentos de ausência! Obrigada pelo apoio, pela força, paciência, ajuda e inúmeros conselhos. Amo vocês!

Aos meus orientadores Pedro e Chams, agradeço-os infinitamente pela oportunidade. Pedro é uma pessoa incrível, muito humano, prudente, paciente, sincero e muito gentil. Como orientador é muito técnico, exigente e experiente. Chams, também é uma pessoa extraordinária, acima de tudo, humana, atenciosa, criteriosa, acolhedora e gentil. Como orientadora, muito exigente, sempre disposta e alerta para ajudar seus orientandos, positiva e técnica. Ambos são exemplos, despertaram em mim características que pretendo carregá-las pela vida. Quero ser como eles e transmitir aos meus alunos, ética, conhecimento, empatia, solidariedade, compreensão e positividade. Pedro e Chams me ensinaram que o aprendizado pode ser respeitoso, leve e ao mesmo tempo robusto e muito prazeroso, sem haver distanciamento, formalidades excessivas, atitudes negativas e opressivas. Chams e Pedro, obrigada pela oportunidade, pela confiança, pela convivência e por tantos conhecimentos compartilhados com tanta paciência e generosidade.

Profa. Dra. Sandhi Maria Barreto obrigada pelos breves e enriquecedores momentos, você é fonte inesgotável de conhecimento e inspiração.

Aos estatísticos Douglas e Rodrigo, que com excelência permitiram que pudéssemos investigar nossas hipóteses dentro do mais alto rigor científico.

Às queridas colegas, Dani Nolasco e Feli, minhas companheiras dos difíceis e encantadores momentos de estatística avançada e do software R. Vocês sempre morarão em meu coração! Gratidão.

Aos participantes e a todos os envolvidos no Estudo Longitudinal Saúde do Adulto (ELSA - Brasil), pela oportunidade de concluir a tese e até o momento, dois artigos. Meu respeito e gratidão.

A Universidade Federal de Minas Gerais e ao Programa de Pós-graduação em Patologia pela oportunidade. As agências financiadoras CAPES/CNPQ pelo financiamento do projeto e pela bolsa de estudos.

“Tudo que é seu encontrará uma maneira de chegar até você.”

Chico Xavier

RESUMO

Introdução: O RDW (do inglês *Red Cell Distribution Width*) é uma medida da variabilidade do tamanho dos eritrócitos. Estudos recentes mostraram que o RDW é um marcador preditivo e prognóstico de mortalidade e de doenças cardiovasculares (DCV). Este estudo teve como objetivos investigar a associação entre RDW e (i) o risco de DCV em 10 anos, (ii) a incidência de Hipertensão Arterial Sistêmica e (iii) a incidência de Diabetes Mellitus em participantes do Estudo Longitudinal de Saúde ELSA - Brasil.

Métodos: Uma subamostra de participantes da linha de base (2008 a 2010) e que compareceram à segunda visita (2012 a 2014) da coorte ELSA - Brasil foram incluídos (n = 4481). Na abordagem transversal, a análise de regressão múltipla foi utilizada para investigar a associação entre o RDW e o Escore de Risco de *Framingham* (ERF). Na análise longitudinal, foi utilizado o modelo de regressão linear misto para avaliar se o RDW na linha de base foi capaz de prever mudança no risco de DCV na segunda visita. A associação entre RDW e a incidência de hipertensão e diabetes foi investigada usando a regressão de riscos proporcionais de Cox. Nesses modelos, a variável resposta (incidência de hipertensão e diabetes) foi avaliada na segunda visita, enquanto o RDW foi medido na linha de base do estudo.

Resultados: Participantes no quarto quartil (Q4) da distribuição do RDW apresentaram um ERF 30% maior do que aqueles no primeiro quartil (Q1: $p < 0,001$), mostrando que o RDW foi associado com ERF avaliado na linha de base do estudo, mesmo após os ajustes das variáveis potenciais de confusão. Os modelos de regressão linear misto confirmaram os achados da análise transversal e mostraram associações significativas entre RDW e ERF avaliado na segunda visita. O termo de interação entre o RDW e a covariável tempo não foi estatisticamente significativo (Q4: $p = 0,577$), indicando que a inclinação da associação não mudou ao longo do tempo. O RDW não foi associado com a incidência de hipertensão ($e\beta = 1,077$; valor de $p = 0,192$; IC95% = 0,963 - 1,205) e diabetes mellitus na segunda visita ($e\beta = 0,999$; valor de $p = 0,991$; C95% = 0,841 - 1,186).

Conclusões: Nesta coorte de brasileiros adultos, o RDW foi independentemente associado com o aumento do risco de DCV, porém não foi capaz de prever uma piora do risco cardiovascular na trajetória longitudinal desses indivíduos ao longo de quatro anos. O RDW não se relacionou com a incidência de hipertensão e diabetes mellitus no período estudado. O acompanhamento prospectivo dessa população poderá auxiliar a esclarecer a relação entre RDW e risco de DCV em 10 anos, hipertensão e diabetes mellitus.

Palavras-chave: Índices de Eritrócitos; Fatores de risco; Diabetes mellitus; Hipertensão; Doenças cardiovasculares.

ABSTRACT

Background: Red cell distribution width (RDW) is a measure of erythrocyte size variability. Recent studies have shown that RDW is a predictive, diagnostic, and prognostic marker of mortality and cardiovascular diseases (CVD). The aim of this study is to investigate the association between RDW and (i) 10-year risk of CVD, (ii) the incidence of hypertension, and (iii) the incidence of diabetes mellitus in participants of the Longitudinal Health Study (ELSA - Brasil).

Methods: A subsample of baseline participants (2008-2010) and attending the second visit (2012 to 2014) of the ELSA - Brazil cohort was included (n = 4481). In the cross-sectional approach, multiple regression analysis was used to investigate the association between RDW and the Framingham Risk Score (FRS). In the longitudinal analysis, the linear mixed regression model was used to assess whether baseline RDW is able to predict change in CVD risk at the second visit. The association between RDW (explanatory variable) and incidence of hypertension and diabetes was investigated using cox proportional hazards regression. In these models, the response variable (incidence of hypertension and diabetes) was assessed at the second visit, while the RDW was measured at the study baseline.

Results: Participants in the fourth quartile of the RDW distribution had an FRS 30% higher than those in the first quartile (Q1: $p < 0.001$), showing that RDW was associated with FRS assessed at baseline of the study, even after adjustments of potential variables of confusion. Mixed linear regression model confirmed the findings of the cross-sectional analysis and showed significant associations between RDW and FRS assessed at the second visit. The interaction term between the RDW and the covariable time was not statistically significant (Q4: $p = 0,577$), indicating that the slope of the association did not change over time. The RDW was not associated with the incidence of hypertension ($e\beta = 1.077$; p -value = 0.192; 95% CI = 0,963-1,205) and diabetes mellitus ($e\beta = 0,999$; p -value = 0.991; C95% = 0,841-1,186) the follow-up time of the study.

Conclusions: In this cohort of adult Brazilians, RDW was independently associated with increased CVD risk, but it was not able to predict a worsening of cardiovascular risk in the longitudinal trajectory of these individuals over four years. The RDW was not related to the incidence of hypertension and diabetes mellitus in the period studied. The prospective follow-up of this population can help to clarify the relationship between RDW and 10-year CVD risk, hypertension and diabetes mellitus.

Keywords: Erythrocyte Indices; Risk factors; Diabetes mellitus; Hypertension; Cardiovascular disease.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Exames, método e equipamento.....	35
Tabela 2. Resumo das características dos participantes do estudo	39
Tabela 3. Modelos de regressão múltipla para associação entre os quartis do RDW e o risco cardiovascular pelo ERF ajustado por diferentes variáveis.....	42
Tabela 4. Modelos de regressão mista para associação entre os quartis do RDW e o risco cardiovascular pelo ERF ajustado por diferentes variáveis.....	43
Tabela 5. Resumo das características dos participantes do estudo.....	44
Tabela 6. Incidência de Hipertensão Arterial Sistêmica em relação ao RDW ajustado por diferentes variáveis.....	46
Tabela 7. Incidência de diabetes mellitus em relação ao RDW ajustado por diferentes variáveis.....	47

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: RDW - CV (coeficiente de variação do RDW): distribuição do tamanho dos eritrócitos. Fonte: modificado do manual de operação da Symex, 2007.....	23
Figura 2: RDW - DP (desvio padrão do RDW): distribuição do tamanho dos eritrócitos. Fonte: modificado do manual de operação da Symex, 2007.....	23
Figura 3: Relação entre a distribuição do volume corpuscular médio (VCM) e a distribuição dos eritrócitos quanto ao tamanho (RDW) em dois sujeitos com VCM idênticos. Fonte: modificado de Lippe e Plebani, 2014.....	24
Figura 4- Fluxograma dos participantes elegíveis para população do estudo.....	31
Figura 5: Distribuição do RDW segundo Centro de investigação: ELSA - Minas Gerais e Rio Grande do Sul.....	41

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ADA: *American Diabetes Association*

AHA: *American Heart Association*

ANOVA: Teste de análise de variância

ATPIII: *Adult Treatment Panel III*

AVE: Acidente vascular encefálico

CKD - EPI: *Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration*

CLSI: *Clinical and Laboratory Standards Institute*

CONEP: Comitês de Ética em Pesquisa com Seres Humanos

CV: Coeficiente de variação

CVI: Doença cerebrovascular isquêmica

DAC: Doença arterial coronariana

DAP: Doença arterial periférica

DC: Débito cardíaco

DCNT: Doenças crônicas não transmissíveis

DCV: Doenças cardiovasculares

DCVI: Doença cardiovascular isquêmica

DM: Diabetes mellitus

DM1: Diabetes mellitus tipo 1

DM2: Diabetes mellitus tipo 2

DP: Desvio padrão

ECG: eletrocardiograma

EDTA: Ácido etilenodiamino tetra-acético

ELSA: Estudo Longitudinal da Saúde do Adulto

ERF: Escore de Risco de *Framingham*

eTFG: Estimativa da taxa de filtração glomerular

FA: Fibrilação atrial

FIOCRUZ : Fundação Osvaldo Cruz

HAS: Hipertensão Arterial Sistêmica

HbA1c: Hemoglobina glicada

IAM: Infarto agudo do miocárdio

IC: Insuficiência cardíaca

ID-MS: Diluição isotópica por espectrometria de massa

IMC: Índice de massa corporal

IPAQ: Questionário Internacional de Atividade Física

LDL: *Low-density-lipoproteins*

LDL-ox: *Oxidized Low-Density Lipoprotein*

MEC: Matriz extracelular

MET: Equivalente metabólico de tarefa

MS: Ministério da Saúde

NCEP: *National Cholesterol Education Program*

OMS: Organização Mundial de Saúde

ON: Óxido nítrico

PA: Pressão arterial

PCR: Proteína C reativa

PCRus: Proteína C reativa ultra sensível

PELM/Control-Lab: programa de excelência para laboratórios médicos

RDW: *Red cell distribution width*

RS: Resistência periférica

PN: Peptídeo natriurético

SBPC/ML: Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina laboratorial

SCA: Síndrome coronariana aguda

SNS: Sistema nervoso simpático

SRAA: Sistema renina-angiotensina-aldosterona

TCLE: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

UFBA: Universidade Federal da Bahia

UFES: Universidade Federal do Espírito Santo

UFMG: Universidade Federal de Minas Gerais

UFPML: Unidade Funcional de Patologia e Medicina Laboratorial

UFRGS: Universidade Federal do Rio Grande do Sul

USP: Universidade de São Paulo

VCM: Volume corpuscular médio

VS: Volume sistólico

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	14
1.1 Doença cardiovascular.....	14
1.2 Aterosclerose e doença cardiovascular.....	15
1.3 Hipertensão Arterial Sistêmica.....	16
1.4 Diabetes mellitus.....	18
1.5 Escore de Risco de Framingham.....	20
1.6 RDW: medida da amplitude da distribuição do tamanho dos eritrócitos.....	22
1.7 Associação entre o RDW e doenças não hematológicas.....	25
2 JUSTIFICATIVA.....	28
3 OBJETIVOS.....	29
3.1 Objetivo geral.....	29
3.2 Objetivos específicos.....	29
4.1 Estudo Longitudinal de Saúde do Adulto (ELSA - Brasil).....	30
4.2 Participantes.....	30
4.3 Variáveis sociodemográficas, clínicas e comportamentais.....	32
4.4 Variáveis laboratoriais.....	33
4.4.1 Amostra de sangue.....	33
4.4.2 Hemograma.....	34
4.4.3 <i>Red Cell Distribution Width</i>	34
4.4.4 Análises bioquímicas.....	35
4.5 Risco cardiovascular.....	36

4.6 Análise estatística	36
5 RESULTADOS	38
6 DISCUSSÃO	47
7 CONCLUSÃO	51
Apêndice 1	66
Apêndice 2 –	68
Apêndice 3	88
ANEXOS	89
Anexo 1	89
Anexo 2	90
Anexo 3	93

1 INTRODUÇÃO

1.1 Doença cardiovascular

A Organização Mundial da Saúde (OMS) afirma que das 50 milhões de mortes que ocorreram nas últimas décadas, 17 milhões foram decorrentes de doenças cardiovasculares (DCV). Estima-se que para 2020, este número possa aumentar para 40 milhões, sendo um importante problema de saúde pública (Beaglehole e Bonita, 2008; Serrano Jr. *et al.*, 2009; Butler, 2011; World Health Organization, 2015).

No Brasil, este contexto não é diferente. De acordo com o Ministério da Saúde (MS), em 2010, aconteceram 326 mil mortes devido às DCV, cerca de 1.000 mortes por dia, das quais 200 mil decorrentes das doenças arteriais coronarianas (DAC) e cardiovasculares, o que demonstra um cenário preocupante (Simão *et al.*, 2014).

São diversas condições que contribuíram para o aumento da prevalência das DCV no Brasil: a falta de conhecimento da população em relação às políticas públicas de controle das DCV, a falta de infraestrutura da atenção primária, a transição epidemiológica, o aumento da expectativa de vida, as mudanças nas condições socioeconômicas, urbanização, as mudanças no estilo de vida e o sedentarismo (Serrano Jr. *et al.*, 2009; Xavier *et al.*, 2013; Simão *et al.*, 2014). Essas condições estão de alguma forma, também relacionadas com as doenças crônicas não transmissíveis como: diabetes mellitus (DM), dislipidemia, Hipertensão Arterial Sistêmica (HAS), conhecidos fatores de risco independentes e determinantes para o desenvolvimento da aterosclerose e conseqüentemente das DCV (Grundy *et al.*, 1999; Bonetti *et al.*, 2003).

Além desses fatores de risco, a *American Heart Association* (AHA) ainda considera como fator de risco cardiovascular a idade, sexo, tabagismo, obesidade, obesidade abdominal, história familiar de doença coronariana, características étnicas, fatores psicossociais, homocisteína, fatores pró-trombóticos (por exemplo, fibrinogênio) e marcadores inflamatórios como, por exemplo, a proteína C-reativa (PCR) (Grundy *et al.*, 1999).

1.2 Aterosclerose e doença cardiovascular

A aterosclerose é considerada um distúrbio inflamatório crônico, de etiologia multifatorial que ocorre devido à agressão endotelial, principalmente, na camada íntima das artérias de médio e grande calibre, após a exposição aos diversos fatores de risco cardiovascular (Ross, 1999; Cesarino *et al.*, 2008).

A disfunção endotelial resultante da agressão leva a mecanismos compensatórios, que alteram as propriedades homeostáticas do endotélio. A permeabilidade é aumentada contribuindo para adesão de leucócitos e plaquetas. As lesões também induzem às propriedades pró-coagulantes ao invés de anticoagulantes, a produção de moléculas vasoativas, citocinas, fatores de crescimento, aderência leucocitária, ativação plaquetária, pro-oxidação, inflamação vascular e diminuição do óxido nítrico (ON), produto importante para manutenção do tônus e a reatividade vascular (Ross, 1999).

O aumento da permeabilidade vascular contribui para o acúmulo de lipoproteínas subendoteliais. O depósito de LDL (do inglês *low-density-lipoproteins*) acontece na mesma proporção à quantidade dessas lipoproteínas no plasma. No compartimento subendotelial, as lipoproteínas sofrem oxidação, formam neoepítomos, tornando-se imunogênicas. Essas LDL oxidadas (LDL-ox) estimulam o aparecimento de moléculas de adesão leucocitária na superfície endotelial, fato que contribui ainda mais para disfunção endotelial, já que ela atrai monócitos e linfócitos para a luz arterial. Atraídos quimiotaxicamente, os monócitos se dirigem para o subendotélio, tornam-se macrófagos, que fagocitam as LDL-ox, formando as células espumosas, principal elemento das estrias gordurosas que são lesões macroscópicas iniciais da aterosclerose (Xavier *et al.*, 2013).

Os macrófagos ativados secretam citocinas e enzimas proteolíticas que são capazes de intensificar o processo inflamatório e degradar o colágeno e demais tecidos, contribuindo desta forma para evolução da placa aterosclerótica. Os linfócitos T, apesar de presentes em menor quantidade que os macrófagos no interior da placa de ateroma, também estão envolvidos na patogênese da aterosclerose, já que eles podem se diferenciar, produzir citocinas e modular a inflamação (Hansson, 2005).

As células musculares lisas migram para a camada média das artérias sob estímulo de mediadores inflamatórios, e em decorrência disso começam a produzir citocinas, fatores de crescimento e matriz extracelular (MEC). Estes mecanismos contribuirão para a formação da

capa fibrosa do ateroma. A placa aterosclerótica inteiramente desenvolvida é composta de MEC, núcleo lipídico e necrótico, constituído de fragmentos de células mortas. O que definirá a estabilidade destas capas fibrosas serão os componentes celulares presentes na mesma. As placas estáveis são compostas de colágeno, pequeno núcleo lipídico e necrótico, pequena quantidade de células inflamatórias e capa fibrosa espessa. Já as placas instáveis possuem núcleo lipídico e necrótico relevante, importante atividade inflamatória e proteolítica e fina capa fibrótica. Por fim, a capa fibrosa pode se romper e exibir conteúdo lipídico, que é altamente trombogênico, proporcionando o desenvolvimento de um trombo plaquetário, mecanismo também conhecido como aterotrombose, e responsável pela oclusão vascular e complicações cardiovasculares (Libby e Theroux, 2005; Xavier *et al.*, 2013; Maluf, 2015).

1.3 Hipertensão Arterial Sistêmica

A HAS é caracterizada por níveis elevados e sustentados de pressão arterial (PA) $\geq 140/90$ mmHg. Está relacionada a alterações da função e estrutura de órgãos alvo como, coração, cérebro, rins e vasos sanguíneos além de alterações metabólicas, com aumento do risco de eventos cardiovasculares fatais e não-fatais (Malachias *et al.*, 2016). A HAS primária ou essencial, responsável por 90 a 95% dos casos, tem etiologia multifatorial, sendo desencadeada pelas diversas interações entre fatores genéticos e ambientais (Oparil *et al.*, 2018). A HAS secundária tem prevalência de 3% a 5%, e tem como principais causas o hiperaldosteronismo, a estenose da artéria renal, o feocromocitoma e paragangliomas, o hipo e hipertireoidismo, a síndrome de *Cushing* e a acromegalia (Malachias *et al.*, 2016; Oparil *et al.*, 2018).

Dados do estudo *Global Burden of Disease* (2015) demonstraram que a HA ocasionou 9,4 milhões de mortes e que 212 milhões de indivíduos perdem anos de vida saudável a cada ano e, além disso, cerca de um em cada quatro adultos são hipertensos (Forouzanfar *et al.*, 2016). No Brasil, inquéritos populacionais indicam nos últimos vinte anos uma prevalência de HAS superior a 30%. Nos indivíduos com idade entre 60 a 69 anos, a prevalência foi superior a 50% e em indivíduos com idade acima de 70 anos, está acima de 75% (Rosário *et al.*, 2009; Cesarino *et al.*, 2013). No Elsa - Brasil a prevalência de HAS foi maior entre os homens do

que entre as mulheres (40,1% vs. 32,2%), sendo observado um aumento dessa prevalência com a idade (Chor et al., 2015).

Os principais fatores de risco para HAS são: idade, sexo, etnia, sobrepeso e obesidade, ingestão de sódio e álcool, sedentarismo, além de fatores socioeconômicos e genéticos. (Poulter et al., 2015; Malachias et al., 2016). Em relação a idade, os níveis de PA sobem de forma contínua e constante com a idade, tanto em homens quanto em mulheres. Com o aumento da idade, os indivíduos ficam mais expostos a inúmeros fatores que aumentam a PA ao longo do tempo, como consumo excessivo de sódio, ingestão insuficiente de potássio, sobrepeso e obesidade, consumo de álcool e inatividade física (Oparil et al., 2018). Além de fatores como o enrijecimento progressivo das artérias, as alterações do colágeno vascular e o aumento da aterosclerose favorecem a HAS (Steppan et al., 2011; Mikael et al., 2017).

A prevalência global de HAS entre homens e mulheres é similar, apesar de ser mais elevada nos homens até os 50 anos, invertendo-se a partir da quinta década. Em negros, é duas vezes maior. Entretanto, no Brasil, não se conhece com exatidão o impacto da miscigenação sobre a HAS. No ELSA - Brasil, os participantes que se auto declararam negros apresentaram maior prevalência de HA (49,3%) (Chor et al., 2015; Malachias et al., 2016).

Em relação ao sobrepeso e obesidade, o aumento de $2,4 \text{ kg/m}^2$ no IMC (índice de massa corporal) está associado ao maior risco de adquirir HAS (Campana et al., 2014). Hábitos como, consumo de álcool e inatividade física também são fatores de risco para a HAS na população brasileira, e possuem relação direta com a PA e a mortalidade cardiovascular em geral, independente das características demográficas (Scherr e Ribeiro, 2009; Malachias et al., 2016).

O status socioeconômico é um indicador robusto de HAS. Estudos na população brasileira mostram que indivíduos com menor escolaridade apresentaram maior prevalência de HAS (Cesarino et al., 2008; Conen et al., 2009). O mesmo foi observado na coorte ELSA - Brasil, a prevalência foi maior entre os participantes que não completaram ensino médio (44%) do que entre aqueles com pós-graduação (28,4%) (Chor et al., 2015).

A contribuição de fatores genéticos para a gênese da HAS tem sido descrita em estudos que identificaram polimorfismos de nucleotídeos únicos e genes envolvidos na expressão de peptídeos natriuréticos (PN) e vias de sinalização do ON (óxido nítrico) (Schmidt et al., 2009; Ehret et al., 2011).

A PA é determinada pela força que o sangue exerce nas paredes dos vasos, dependendo principalmente do produto decorrente de dois mecanismos, a resistência periférica (RP) e o débito cardíaco (DC) ($PA = DC \times RP$). O DC é caracterizado pela quantidade de sangue que o coração libera na circulação a cada contração ($DC = \text{volume sistólico} \times \text{frequência cardíaca}$) e a RP é caracterizada como a resistência exercida pelos vasos durante a passagem do sangue (Aires, 1999). A manutenção dos níveis fisiológicos da PA abrange uma interação complexa envolvendo diversos elementos do sistema neuro-humoral como o sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA), os PN, sistema nervoso simpático (SNS), além do endotélio vascular e do sistema imunológico. O mau funcionamento ou a cessação de qualquer um dos mecanismos envolvidos na manutenção da PA pode diretamente ou indiretamente causar uma variabilidade dos valores da PA, e ao longo do tempo ocasionar danos aos órgãos alvos (George e Matthew, 2018).

A relação entre PA e o aumento do risco de DCV é linear, contínua e independente, a partir dos níveis pressóricos de 115/75 mmHg. Dessa forma, a prevenção e o tratamento da HAS são essenciais para reduzir a carga de doenças e promover longevidade da população (Stamler, 1993; Lewington et al., 2002; Blood Pressure Lowering Treatment Trialists' Collaboration, 2014; Mills et al., 2016; Forouzanfar et al., 2017).

1.4 Diabetes mellitus

O DM é caracterizado por hiperglicemia crônica, devido à redução ou ausência da produção de insulina, resistência à ação da insulina ou ambos (Kharroubi e Darwish, 2015).

Segundo dados da *International Diabetes Federation* (2017) cerca de 425 milhões (8,8%) da população mundial com idade entre 20 a 79 anos possuem DM, sendo que 79% vivem em países de baixa e média renda. Pode-se estimar que em 2045 serão mais de 629 milhões indivíduos com DM. O Brasil está no quarto lugar entre os dez países com maior número de diabéticos do mundo, com 12,5 milhões de indivíduos diabéticos. Em 2045 a expectativa é que este número aumente para 20,3 milhões (International Diabetes Federation, 2017). O aumento da prevalência do diabetes está associado a diversos fatores, tais como, transição epidemiológica, nutricional e demográfica, inatividade física, sobrepeso e obesidade, crescimento e envelhecimento populacional e, também, à maior sobrevivência dos indivíduos com DM (Diretrizes Sociedade Brasileira De Diabetes, 2017).

O DM tipo 1 (DM1) é uma doença autoimune, poligênica, que ocorre devido a destruição das células β pancreáticas, o que ocasiona deficiência completa na produção de insulina. Corresponde a apenas 5 a 10% de todos os casos de DM. O diagnóstico é mais frequente em crianças, adolescentes e adultos jovens, afetando igualmente homens e mulheres (Diretrizes Sociedade Brasileira De Diabetes, 2017).

O DM tipo 2 (DM2) corresponde a 90 a 95% de todos os casos de DM. Tem etiologia multifatorial, abrangendo fatores genéticos e ambientais. Geralmente, o DM2 acomete indivíduos a partir da quarta década de vida, embora, em alguns países, haja o crescimento do número de casos em crianças e jovens, principalmente devido à mudança no estilo de vida das crianças, como sedentarismo e ingestão de alimentos menos saudáveis (Kharroubi e Darwish, 2015).

Indivíduos com DM2 não apresentam sintomas específicos da doença, pode ser assintomático ou oligossintomático por longo período, sendo muitas vezes diagnosticado através de dosagens laboratoriais de rotina ou devido ao aparecimento das complicações crônicas decorrentes do DM (Kharroubi e Darwish, 2015; Diretrizes Sociedade Brasileira De Diabetes, 2017).

Estima-se que metade de todos os casos de DM em adultos não sejam diagnosticados e que 84,5% de todos os casos não diagnosticados estejam em países de média e baixa renda (Diretrizes Sociedade Brasileira De Diabetes, 2017; International Diabetes Federation., 2017).

O DM está associado a maiores taxas de hospitalizações, assim como maior utilização dos serviços de saúde, e maior incidência de DCV e doenças cerebrovasculares isquêmicas (CVD), cegueira, insuficiência renal e amputações não traumáticas de membros inferiores. Estas complicações impõem um impacto econômico significativo aos sistemas de saúde e principalmente, aos indivíduos com DM e suas famílias (International Diabetes Federation., 2017). O estudo *Global Burden of Disease* (2015) aponta que a carga representada pelo DM, em termos de sistema de saúde e sociedade, principalmente nos países em desenvolvimento, gere custos diretos para o sistema de saúde e para a sociedade (Vos *et al.*, 2016).

Em 80 a 90% dos casos, o DM2 está associado ao excesso de peso, história familiar, envelhecimento, sedentarismo, diagnóstico prévio de pré-diabetes ou diabetes mellitus gestacional e a presença de componentes da síndrome metabólica, tais como HA, obesidade

abdominal e dislipidemia. Em muitos casos, devido à demora do aparecimento dos sinais e sintomas, o diagnóstico do DM2 pode passar despercebido por anos, principalmente nos países onde as consultas regulares não fazem parte da rotina, o que pode retardar o início do tratamento e aumentar a incidência de complicações em longo prazo (Kharroubi e Darwish, 2015; Diretrizes Sociedade Brasileira De Diabetes, 2017).

1.5 Escore de Risco de Framingham

O *The Framingham Heart Study* é um importante estudo longitudinal, que teve seu início em 1948 e é desenvolvido até os dias de hoje. O estudo que acontece há setenta e um anos, selecionou inicialmente 5.209 voluntários com idade entre 28 a 62 anos e, posteriormente, seus descendentes a fim de se avaliar o desenvolvimento da DCV em habitantes da comunidade de *Framingham*, USA (Mahmood *et al.*, 2014).

Em 1957, após aproximadamente uma década de acompanhamento dos participantes, foi descrito o primeiro e principal resultado do estudo que definiu a HA como pressão sanguínea maior ou igual a 160/95 mmHg. Além disso, os pesquisadores descreveram a relação do tabagismo e dislipidemia com aumento da incidência de Infarto Agudo do Miocárdio (IAM) não fatal e morte por DAC, notaram, também, o aumento de quase quatro vezes na incidência de DAC a cada 1000 participantes e a ocorrência de acidente vascular encefálico (AVE), ambas, como consequência da HA (Dawber *et al.*, 1957; Kannel *et al.*, 1965).

Em 1998 *The Framingham Heart Study* publicou um instrumento para predizer eventos coronarianos em indivíduos sem o diagnóstico prévio de aterosclerose clínica. Esse instrumento foi adaptado e incorporado pelo *National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III - ATP III)*, programa americano de controle da pressão arterial e dislipidemia, sendo bastante utilizado. Posteriormente, esse escore foi revisado e incluído na avaliação de outros desfechos, além dos eventos coronarianos, incluindo: insuficiência cardíaca (IC) e claudicação intermitente (Wilson *et al.*, 1998; Expert Panel on Detection Evaluation and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults, 2001; D'agostino *et al.*, 2008).

O principal objetivo do Escore de Risco de *Framingham* (ERF) consiste em avaliar o risco geral de DCV e o risco individual de eventos cardiovasculares tais como, DCVI, doença arterial periférica (DAP), DAC e IC no período de 10 anos. Atualmente o ERF contempla as seguintes variáveis: idade, sexo, pressão sanguínea sistólica, colesterol total, HDL colesterol, tabagismo, DM e uso ou não de medicação anti-hipertensiva. Para maiores informações, consultar a atualização da diretriz brasileira de dislipidemia e prevenção da aterosclerose (Wilson *et al.*, 1998; D'agostino *et al.*, 2008; Faludi *et al.*, 2017).

Uma das vantagens do ERF em relação a outros instrumentos de predição de risco cardiovascular, é que ele contempla não somente um risco isolado, mas o somatório de riscos decorrentes de múltiplos fatores, possibilitando a estimativa do risco global de forma individual. Essa característica é de extrema importância, já que os fatores de risco para DCV se associam e interagem entre si para promover o dano cardiovascular. Além disso, o ERF permite que os indivíduos sejam estratificados de acordo com os diferentes perfis de riscos cardiovasculares possibilitando medidas preventivas e terapêuticas individualizadas. Além dos benefícios já mencionados, o ERF foi um dos instrumentos de predição mais testados em relação à sua acurácia em outras coortes. Já foi validado em diferentes grupos étnicos/raciais e pode ser aplicado em diversas populações (D'agostino *et al.*, 2008; Cesarino *et al.*, 2013; Simão *et al.*, 2014; Faludi *et al.*, 2017).

Além do ERF, existem diversos escores de predição do risco de eventos cardiovasculares, como o Escore de Risco de *Reynolds*, o QRISK, o SCORE (do inglês, *Systematic Coronary Risk Evaluation*), Escore de Risco Global e o Escore de Risco pelo Tempo de Vida. Estes instrumentos possuem as mesmas variáveis do ERF, com a diferença de que muitas delas foram adaptadas às diferentes características das populações ou devido ao fato de contemplarem outras variáveis como: história familiar, índice de massa corporal (IMC), proteína C reativa ultrasensível (PCRus) e hemoglobina glicada (HbA1c). Apesar dessas diferenças, estes escores de predição mantêm o enfoque preventivo, possibilitando a diminuição do risco de futuros eventos cardiovasculares e os gastos com a saúde, trazendo inúmeros benefícios à população (Conroy *et al.*, 2003; Ridker *et al.*, 2008; Berger *et al.*, 2010).

Os escores de predição do risco de eventos CV são instrumentos validados e de extrema importância no controle das DCV. Entretanto, esses escores nem sempre são capazes de prever o risco com acurácia, indicando que os tradicionais fatores de risco incluídos nos

atuais escores, nem sempre são capazes de explicar todos os processos responsáveis pelas lesões arteriais, envolvidos na patogênese da aterosclerose. Assim, a busca por novos marcadores de risco cardiovascular pode fornecer pistas de outros mecanismos que direta ou indiretamente estão envolvidos no processo e que possam contribuir para novas medidas preventivas a fim de diminuir esta condição pandêmica.

1.6 RDW: medida da amplitude da distribuição do tamanho dos eritrócitos

Desde a descoberta dos eritrócitos por Antonie van Leeuwenhoek's, em 1674, diversos estudos vêm relatando observações à respeito da variação do tamanho dos eritrócitos. Em 1718, James Jurin realizou a primeira aferição do diâmetro de eritrócitos e somente em 1773, William Hewson caracterizou o eritrócito em seu formato bicôncavo. Após mais de um século, em 1910, o patologista britânico Cecil Price-Jones realizou a primeira mensuração da variabilidade do diâmetro dos eritrócitos, sugerindo o emprego desta medida no auxílio diagnóstico em pacientes com anemia (Pierre, 2002; Caporal e Comar, 2013). A medida da amplitude da distribuição do tamanho dos eritrócitos (RDW, do inglês *Red Cell Distribution Width*) somente foi disponibilizada para os laboratórios clínicos, no final da década de 70, com a introdução do analisador hematológico *Coulter Counter Model S Plus* (Coulter Electronics, Hialeah, FL) (Rowan *et al.*, 1979). Em 1980, Bessman *et al.*, propuseram uma classificação para anemia, baseada nos valores do volume corpuscular médio (VCM) e no RDW. Além disso, propuseram a classificação em microcítica, normocítica e macrocítica. Os autores ainda caracterizaram os eritrócitos de acordo com a homogeneidade (RDW dentro dos valores de referência) e heterogeneidade (RDW com valores de referência aumentados) (Buttarelli e Plebani, 2008).

A variabilidade da distribuição do tamanho dos eritrócitos pode ser obtida de duas maneiras, pelo coeficiente de variação do RDW (RDW - CV) ou através do desvio padrão do RDW (RDW - DP). O RDW - CV é calculado em relação ao VCM e seus valores são obtidos através da equação, $RDW = L2 - L1 / L2 + L1$, onde L1 refere-se ao CV um e L2 ao CV dois (Figura 1). Os valores são expressos em porcentagem, podendo variar os menores valores de referência entre 10,7% e 12,9% e o maior valor de referência entre 13,8% e 15,3%, dependendo do analisador hematológico utilizado. Já o RDW - DP é calculado obtendo-se a média dos tamanhos dos eritrócitos distribuídos até 20% acima do histograma do eritrograma

automatizado, pois é na base do histograma que se localiza a maior variabilidade dos eritrócitos (Figura 2) (Nascimento, 2003). Nesse caso, os resultados são expressos em fL, com valores de referência podendo variar de 38,6 a 49,1 fL. As diferentes metodologias utilizadas para aferição do RDW podem interferir nos valores de referência encontrados na literatura. Isto pode acontecer entre os diferentes fabricantes e até mesmo, entre diferentes modelos do mesmo fabricante. Importante destacar que na rotina laboratorial o RDW - CV é mais comumente utilizado do que o RDW - DP (Van Den Bossche *et al.*, 2002; Nascimento, 2003; Buttarello e Plebani, 2008; Caporal e Comar, 2013; Danese *et al.*, 2015)

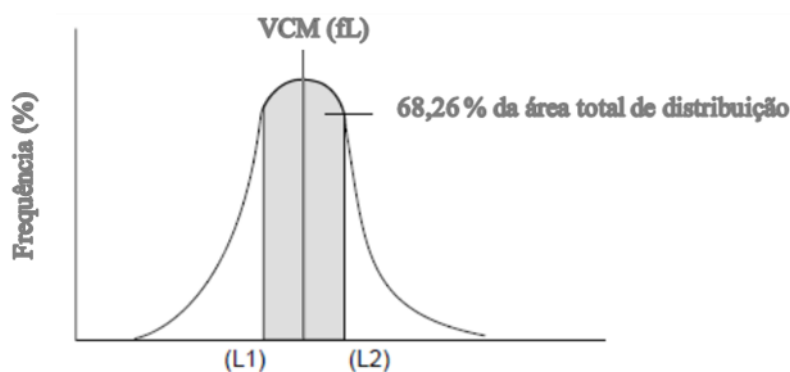


Figura 1: RDW - CV (coeficiente de variação do RDW): distribuição do tamanho dos eritrócitos. Fonte: modificado do manual de operação da Symex, 2007.

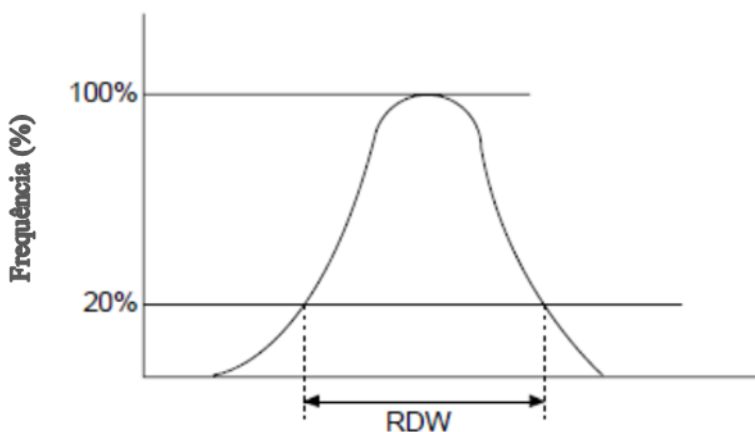


Figura 2: RDW - DP (desvio padrão do RDW): distribuição do tamanho dos eritrócitos. Fonte: modificado do manual de operação da Symex, 2007

O RDW - DP e o RDW - CV são mais precisos do que a análise microscópica da anisocitose, já que são obtidos a partir de modelos estatísticos e matemáticos (Nascimento, 2003). Contudo, o RDW - CV pode ser influenciado pela presença de

microcitose intensa, já que é inversamente proporcional ao volume corpuscular médio (Walters, 1993). Além disso, a análise microscópica da anisocitose pode ser influenciada pela avaliação subjetiva do analisador.

Os menores valores do RDW representam a população de eritrócitos mais homogênea, enquanto os maiores valores representam maior heterogeneidade dos eritrócitos (Figura 3).

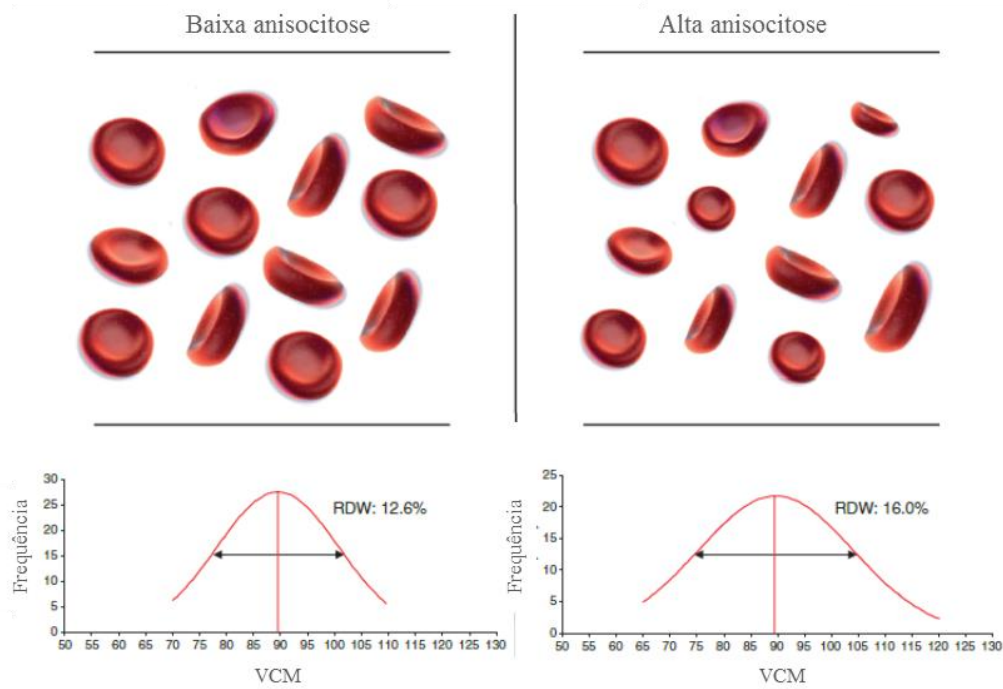


Figura 3: Relação entre a distribuição do volume corpuscular médio (VCM) e a distribuição dos eritrócitos quanto ao tamanho (RDW) em dois sujeitos com VCM idênticos. Fonte: modificado de Lippi e Plebani, 2014.

A anisocitose não é uma condição específica de uma patologia, valores aumentados do RDW podem ser observados nas anemias e, também, em algumas condições não hematológicas. Pacientes com anemias atribuíveis à deficiência de ferro, ácido fólico e vitamina B12 poderão ter os valores de RDW aumentados. As doenças autoimunes, as síndromes mielodisplásicas, as anemias hemolíticas, a insuficiência hepática e até as transfusões de sangue, também são condições que podem ocasionar o aumento dos valores de RDW (Sahli *et al.*, 2013; Huang *et al.*, 2014).

1.7 Associação entre o RDW e doenças não hematológicas

Inicialmente, o RDW era utilizado como auxiliar no diagnóstico diferencial das anemias, mas atualmente tem-se mostrado um marcador de morbidade e mortalidade em várias condições, incluindo: câncer, doenças autoimunes, doenças respiratórias, demência, doença renal em estágio terminal e DM (Viswanath *et al.*, 2001; Patel *et al.*, 2009; Hu *et al.*, 2013; Engstrom *et al.*, 2014; Huang *et al.*, 2014; Weuve *et al.*, 2014; Yoon *et al.*, 2015). Além dessas, diversos estudos tem mencionado a existência da associação entre o grau de anisocitose e DCV, incluindo: DAC, insuficiência cardíaca (IC), AVE, Fibrilação atrial (FA) e DAP (Montagnana *et al.*, 2012; Adamsson Eryd *et al.*, 2014; Su *et al.*, 2014; Danese *et al.*, 2015; Kaya *et al.*, 2015).

O primeiro estudo a citar uma associação não hematológica com RDW foi publicado por Felk *et al.*, em 2007. Eles avaliaram a associação do RDW em pacientes com IC e acharam uma importante associação entre o RDW e mortes por DCV, hospitalização por IC e com outras causas de mortalidade nessa população. Desde então diversos pesquisadores têm encontrado novas aplicações do RDW, grande parte delas associadas às doenças cardiovasculares (Felker *et al.*, 2007; Danese *et al.*, 2015; Patel *et al.*, 2015; Shao *et al.*, 2015). Recentemente a anisocitose tem sido relacionada com pior prognóstico em pacientes com DCV e como fator de risco para o aumento da mortalidade na população de forma geral (Chen *et al.*, 2010; Danese *et al.*, 2015).

A associação entre o RDW e as DCV foi investigada por meio de uma revisão sistemática com meta análise que incluiu 22 estudos e mais de 80.000 participantes. Os autores concluíram que o aumento do RDW está associado ao maior risco de mortalidade e a eventos cardiovasculares (Su *et al.*, 2014). Outra revisão contendo cerca de 30 estudos com aproximadamente 180.000 participantes avaliou a associação do aumento do RDW com diversas DCV como, síndrome coronariana aguda (SCA), DAP, FA, IC e HAS. Os autores concluíram que, apesar do papel da anisocitose na patogenia das DVC ainda ser desconhecido, existem evidências de que o RDW possa ser útil clinicamente, em particular para auxiliar o prognóstico em pacientes com DCV (Danese *et al.*, 2015).

O fato do RDW ser obtido de forma fácil e barata, estar amplamente disponível para os profissionais de saúde, ser de fácil interpretação e apresentar baixa variação biológica,

faz com que ele seja interessante como biomarcador para prognóstico de pacientes com DCV podendo ser utilizado associado ou não aos marcadores convencionais (Lippi e Plebani, 2014; Lippi e Mattiuzzi, 2015).

Em relação ao DM, alguns trabalhos já avaliaram a associação entre RDW e DM, assim como fatores de risco para o DM como, circunferência da cintura, HbA1c, IMC, entre outros (Veeranna *et al.*, 2012; Dada *et al.*, 2014; Engstrom *et al.*, 2014; Gang e Lifang, 2016; Xanthopoulos *et al.*, 2017). Um estudo conduzido na China em 2016, envolvendo 2688 participantes saudáveis com idade entre 49 a 66 anos avaliaram a associação entre RDW - CV e a incidência de DM em um período de quatro anos e constataram que, após os fatores de ajuste de confusão, os indivíduos pertencentes ao IV Quartil do RDW (13.0-17.3%) possuíam maior risco de adquirir DM (RR= 1.8 IC= 1.1-3.4) (Gang e Lifang, 2016). Em contrapartida, outro estudo que também avaliou a relação do RDW - DP e a incidência de DM, numa população da Suécia, com idade entre 43 a 73 anos, constatou que os indivíduos com menores valores de RDW na linha de base tinham maior risco de desenvolver DM, mesmo após os ajustes das variáveis de confusão (Engstrom *et al.*, 2014). Os resultados desses dois estudos envolvendo a associação entre RDW e DM utilizaram medidas diferentes do RDW (CV vs DP) na metodologia, o que pode explicar, pelo menos, em parte esses resultados, porém a condução de novos estudos com metodologia adequada podem contribuir para o esclarecimento desta possível relação.

Wen (2010) avaliou o RDW - CV (%) nos grupos pré-hipertensos, hipertensos e controle, encontrando valores (média \pm DP) de $15,26 \pm 0,82$; $16,54 \pm 0,91$ e $13,87 \pm 0,94$ respectivamente ($p < 0,05$). A pressão arterial sistólica e diastólica foram fortemente correlacionadas com RDW ($r = 0,848$ e $r = 0,748$, respectivamente; $p < 0,01$). Já que cerca de 1/3 dos eventos cardiovasculares que são atribuíveis à elevação de PA ocorrem em indivíduos com pré-hipertensão (PAS entre 121 e 139 e/ou PAD entre 81 e 89 mmHg) os autores discutem a necessidade dos indivíduos serem monitorados com o objetivo de prevenir a HAS e suas complicações (Tanindi *et al.*, 2012).

O aumento do RDW parece estar relacionado ao estado inflamatório, estresse oxidativo e disfunção endotelial, condições presentes em situações clínicas como, DM, dislipidemia, HAS, tabagismo e obesidade, conhecidos fatores de risco para o

desenvolvimento da aterosclerose (Zalawadiya *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2015; Mozos, 2015).

O processo inflamatório pode elevar o RDW por meio de diversos mecanismos: (i) mielossupressão direta das células precursoras eritróides; (ii) redução da biodisponibilidade do ferro (iii) redução da produção renal de eritropoietina; (iv) bloqueio da atividade da eritropoietina; e (v) aumento da resistência das células precursoras eritróides à ação da eritropoietina (Tonelli *et al.*, 2008; Makhoul *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2015).

Para Patel *et al.* (2015) a taxa de renovação dos eritrócitos é controlada em indivíduos saudáveis e pode ser alterada em diversas situações clínicas adversas. Como os eritrócitos se tornam menores à medida que envelhecem um atraso na taxa de renovação “*turnover* eritrocitário” permite que células menores continuem circulando, o que levaria ao aumento do RDW. A vida útil prolongada dos eritrócitos é uma adaptação homeostática provavelmente relacionada às reduções sutis na produção eritropoietica, capaz de manter a massa de eritrócitos em uma ampla gama de condições patológicas (Patel *et al.*, 2015).

Durante o tempo de vida dos eritrócitos, em média de 100 a 120 dias, eles são expostos a uma variedade de agressões que incluem estresse mecânico, oxidativo e hiperosmótico (Crawford *et al.*, 2004). Existem hipóteses de que os eritrócitos possuam enzimas antioxidantes que ajudam a controlar o estresse oxidativo, em condições fisiológicas normais, como também enzimas pró-oxidantes que levam ao desequilíbrio redox dos eritrócitos, resultando em dano oxidativo e inflamação. Assim, acredita-se que os eritrócitos atuem como células pró-oxidantes, com propriedades de sinalização, modificando e regulando a função endotelial (Yelinova *et al.*, 1996; Minetti *et al.*, 2007). O estresse oxidativo pode ocasionar o rearranjo do citoesqueleto, perda de lipídeos e assimetria da membrana dos eritrócitos deixando-os mais rígidos e com diferentes tamanhos, ocasionando a anisocitose. Eritrócitos oxidados tem maior agregabilidade e adesividade ao endotélio, levando ao ciclo vicioso de indução de danos oxidativos e disfunção endotelial (Minetti e Malorni, 2006).

A anisocitose pode ocasionar aumento da viscosidade do sangue, comprometimento do fluxo sanguíneo através da microcirculação, podendo causar isquemia e trombose. Além

disso, pode promover o maior acúmulo de eritrócitos na lesão aterosclerótica, favorecendo a neutralização de mediadores da vasodilatação, acúmulo de lípidos, ulceração e trombose da capa fibrosa (Salvagno *et al.*, 2015).

Os mecanismos fisiopatológicos exatos que envolvem todas essas doenças e o aumento do RDW não são conhecidos. Também não está claro se a associação entre o RDW e as DCV tem uma relação causal, ou se a anisocitose ocorre em decorrência de distúrbios metabólicos comuns também aos pacientes com DCV (Lippi *et al.*, 2014; Danese *et al.*, 2015; Lippi *et al.*, 2016). Novos estudos que ajudem a esclarecer os mecanismos envolvidos no aumento do RDW podem contribuir para inferir sobre a causalidade, embora a demonstração da utilidade do RDW como critério de prevenção primária ou secundária possa ocorrer independente de sua associação causal.

2 JUSTIFICATIVA

As DCV representam um importante problema de saúde pública no Brasil e no mundo devido à alta prevalência, elevadas taxas de morbimortalidade e gastos com a saúde.

Diversos estudos têm investigado a existência de correlação entre o aumento do RDW e DCV e seus fatores de risco, incluindo DM e HA. Embora não se tenha estabelecido de maneira definitiva se um aumento no valor de RDW é um fator de risco ou simplesmente um epifenômeno decorrente de um desequilíbrio biológico e metabólico subjacente às DCV, parece razoável sugerir que a avaliação desse parâmetro seja ampliada para muito além do diagnóstico diferencial de anemias (Salvagno *et al.*, 2015). O fato do RDW ser um parâmetro fácil de ser obtido, já que faz parte de um exame hematológico amplamente utilizado na prática clínica, de baixo custo, de fácil acesso e que apresenta pouca variação biológica, torna-o um marcador biológico vantajoso na predição do risco da DCV que merece ser bem avaliado.

Não é do nosso conhecimento estudos que tenham investigado a associação entre o aumento do RDW e o risco cardiovascular na população brasileira. O ELSA - Brasil oferece a oportunidade de contribuir para essa temática, por se tratar de um estudo longitudinal, multicêntrico, conduzido de forma padronizada, com grande número de

participantes, com uma rica base de dados contendo características demográficas, comportamentais, clínicas e laboratoriais relacionadas ao risco cardiovascular, cujos parâmetros laboratoriais foram adquiridos por meio de protocolos pré-analíticos e analíticos rigorosos.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar se o RDW está associado a fatores de risco e ao escore de risco cardiovascular, de forma independente, em uma subamostra do ELSA - Brasil.

3.2 Objetivos específicos

Investigar se o RDW está associado ao Escore de Risco de *Framingham* na linha de base do ELSA - Brasil.

Investigar se o RDW está associado ao Escore de Risco de *Framingham*, longitudinalmente, na coorte ELSA - Brasil, após quatro anos de seguimento.

Investigar se o RDW da linha de base está associado à incidência de HAS, longitudinalmente, na coorte ELSA - Brasil, após quatro anos de seguimento.

Investigar se o RDW da linha de base está associado à incidência DM2, longitudinalmente, na coorte ELSA - Brasil, após quatro anos de seguimento.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Estudo Longitudinal de Saúde do Adulto (ELSA - Brasil)

O ELSA - Brasil é um estudo de coorte, prospectivo, multicêntrico, que inclui 15.105 homens e mulheres de 35 a 74 anos, servidores públicos de instituições de ensino superior e pesquisa de seis estados e três regiões do Brasil. O estudo tem como principal objetivo avaliar a incidência e os fatores de risco das doenças crônicas não transmissíveis (DCNT), principalmente as DCV e o DM. Os participantes foram submetidos a entrevistas, avaliações clínicas e exames laboratoriais na linha de base do estudo (2008 – 2010), em 2012 e 2014 (segunda visita) e uma terceira visita, iniciada em 2018 encontra-se em andamento (Apêndice 1 – O Estudo Longitudinal de Saúde do Adulto – ELSA - Brasil). Uma descrição detalhada desse estudo de coorte pode ser encontrada em outras publicações (Aquino *et al.*, 2012; Schmidt *et al.*, 2015)

O ELSA - Brasil foi aprovado pelos Comitês de Ética em Pesquisa com Seres Humanos de cada instituição envolvida e pelo Conselho Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) de acordo com o parecer número 186/06. Todos os voluntários assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Apêndice 1).

4.2 Participantes

A população incluída no presente estudo compreendeu uma subamostra da coorte ELSA - Brasil, composta de 5176 participantes pertencentes à UFMG (Universidade Federal de Minas Gerais) e a UFRGS (Universidade Federal do Rio Grande do Sul). As amostras pertencentes aos centros de Minas Gerais e Rio Grande do Sul foram escolhidas dentre os demais, por possuírem o mesmo método de medição do RDW. Dos 5176 voluntários, foram excluídos 40 participantes que não possuíam medidas de RDW ou que possuíam valores discrepantes (*outliers*) de RDW < 10% e > 21%, totalizando 5136 participantes. Destes 5136 participantes, ainda foram excluídos aqueles que realizaram cirurgia bariátrica, já que a absorção de nutrientes neste grupo de pessoas pode ser prejudicada e assim causar alterações nos valores de RDW. A Figura 4 ilustra os grupos estudados no presente estudo.

Para avaliar a associação do RDW com o ERF, 609 participantes foram excluídos devido à presença ou à falta de informações sobre a presença de DCV, e 46 participantes por terem feito cirurgia bariátrica, perfazendo uma amostra de 4481 participantes.

Para investigar a correlação entre RDW e incidência de DM2 e HAS foi utilizada a mesma subamostra da coorte ELSA - Brasil, entretanto, os critérios de exclusão foram diferentes, de acordo com os objetivos propostos. Para investigar a correlação entre RDW e incidência de DM2, do total de 5136 participantes, 799 foram excluídos por possuírem ou não saber informar a presença de DM2 e 42 indivíduos que realizaram cirurgia bariátrica, permanecendo para a análise 4295 participantes.

Finalmente para avaliar a correlação entre RDW e a incidência de HA, 1876 participantes foram excluídos do total de 5136 participantes, devido à presença ou devido à falta de informações sobre a presença de HAS e 36 indivíduos devido à realização de cirurgia bariátrica, permanecendo para análise 3224 participantes.

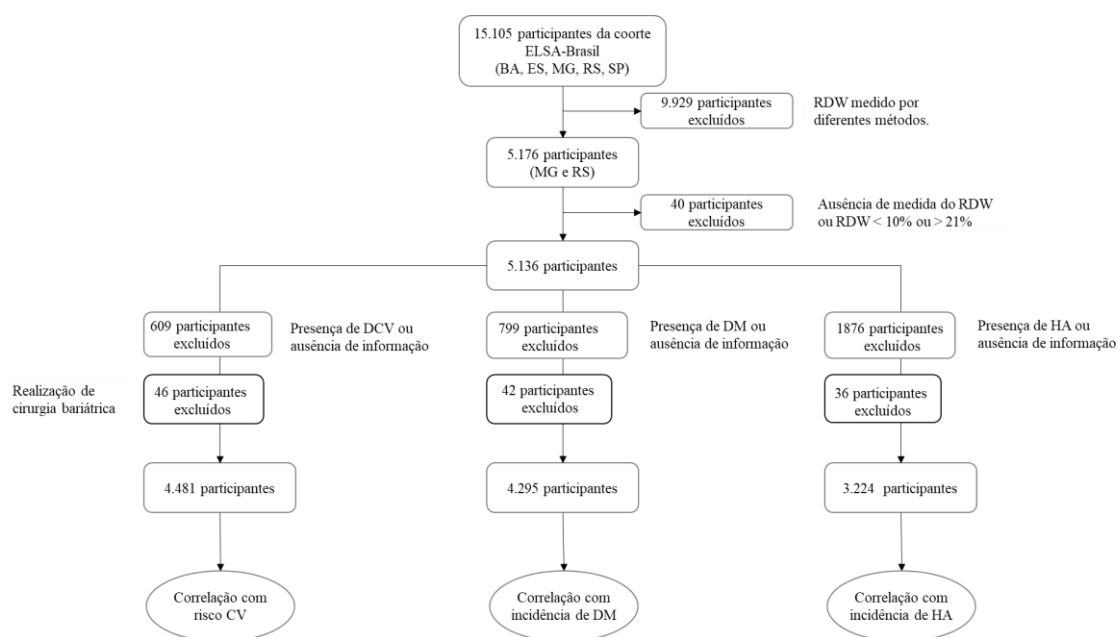


Figura 4- Fluxograma dos participantes elegíveis para o estudo. BA, Bahia; ES, Espírito Santo; MG, Minas Gerais; RS, Rio Grande do Sul; SP, São Paulo e DCV, doença cardiovascular.

4.3 Variáveis sociodemográficas, clínicas e comportamentais

As variáveis sociodemográficas como idade e escolaridade foram autodeclaradas. A atividade física foi definida de acordo com os critérios da versão resumida do Questionário Internacional de Atividade Física (IPAQ), instrumento validado em diversos países, inclusive no Brasil (Craig *et al.*, 2003). O IPAQ categoriza a atividade em: forte, moderada e leve, onde utiliza um escore específico MET (equivalente metabólico de tarefa) para pontuar cada tipo de atividade física (Coelho *et al.*, 2015). Em relação ao consumo de álcool, os participantes foram estratificados como bebedor excessivo, homens que ingerissem quantidades iguais e superiores a 210 g de álcool/semana e mulheres que ingerissem quantidades iguais e superiores a 140 g de álcool/semana (Schmidt *et al.*, 2015).

O índice de massa corporal (IMC), calculado por meio da medida do peso e altura de cada participante, foi incluído na análise como variável contínua (Abeso, 2009).

Para o diagnóstico do DM, o indivíduo teria que apresentar pelo menos uma das seguintes alterações laboratoriais: glicemia em jejum ≥ 126 mg/dL ou glicemia 2h após a sobrecarga de 75g de glicose anidra ≥ 200 mg/dL ou HbA1c $\geq 6,5\%$, ou caso o voluntário informasse diagnóstico médico de DM ou fizesse o uso de insulina ou hipoglicemiantes orais durante a entrevista. Os valores de corte para o diagnóstico de DM foram definidos segundo critérios da *American Diabetes Association (ADA)* (Standards of medical care in diabetes, 2014).

A HAS foi determinada pela presença de pelo menos um dos critérios: relato de diagnóstico médico de HAS ou uso de anti-hipertensivos ou pela PA igual ou superior a 140/90 mmHg, esta última de acordo com a Sociedade Brasileira de Cardiologia (VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão, 2010). Segundo as recomendações do sétimo relatório do *Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure*, para a aferição da PA, o voluntário foi mantido sentado em ambiente silencioso e a temperatura rigorosamente controlada entre 20-24° C. Além disso, a PA foi aferida em membro superior direito, depois de cinco minutos de descanso e em dois momentos, seguindo sempre a mesma metodologia, de três medições com intervalos de um minuto. O resultado da PA foi obtido utilizando a média das três medidas (Schmidt *et al.*, 2015).

Em relação às DCV, os voluntários autodeclararam possuir ou não: IC e AVE. A variável DAP foi categorizada em sim ou não de acordo com a presença ou ausência dos sintomas de claudicação intermitente. A prevalência de doença coronariana, também foi determinada pela à presença ou ausência de, pelo menos, um dos seguintes critérios: alterações do eletrocardiograma (ECG) compatíveis com IAM segundo o código de Minnesota (Blackburn *et al.*, 1960), ter autodeclarado a apresentação de algum episódio IAM, ter feito cirurgia de revascularização cardíaca. Todas as leituras de ECG dos voluntários foram centralizadas no centro de leitura ELSA - Brasil, seguindo sempre a mesma rotina de realização (Blackburn *et al.*, 1960).

Para estimativa da taxa de filtração glomerular (eTFG), optou-se pelo uso da fórmula *Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration* (CKD - EPI) sem correção para raça e com calibração rastreável ao método de referência ID - MS (Diluição isotópica por espectrometria de massa) (Levey *et al.*, 2009).

4.4 Variáveis laboratoriais

4.4.1 Amostra de sangue

Os participantes receberam as instruções sobre os preparos necessários para realização dos exames. Todas as recomendações seguiram os critérios da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina laboratorial-SBPC/ML (Sociedade Brasileira De Patologia Clínica/Medicina Laboratorial, 2005). Os participantes foram orientados a suspender o uso de polivitamínicos e vitamina C um dia antes da realização do exame; realizar jejum de 12 horas, não excedendo 14 horas; não realizar atividade física, não ingerir bebida alcoólica durante as 12 horas anteriores ao exame, e não interromper uso de medicamentos prescritos.

Ao chegar para realizar a coleta de sangue, o voluntário preencheu o formulário confirmando a realização do jejum entre 12 e 14 horas, uso de medicamentos e presença de doenças selecionadas. Os tubos de coleta foram identificados através de código de barra, mantendo o sigilo, segurança e a possibilidade localização. Em seguida, os

voluntários eram acomodados em poltronas específicas para realização da coleta, isto sempre no turno da manhã. Os torniquetes foram colocados e mantidos por no máximo 1 min, para em sequencia, submeter os voluntários à punção venosa, que foi realizada por meio de escalpes para coletas múltiplas de sangue à vácuo contendo ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), o tubo foi homogeneizado de 8 a 10 vezes. Amostras de soro e plasma foram armazenadas a -80 °C até a realização dos exames no laboratório central do ELSA - Brasil, localizado no Hospital Universitário da Universidade de São Paulo. Esse possui sistema de gestão da qualidade, participa do PELM/Control-Lab (programa de excelência para laboratórios médicos), e ainda é acreditado pela SBPC/ML. A realização dos exames laboratoriais do ELSA - Brasil seguiu as recomendações da *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)* e da SBPC/ML visando minimizar a variabilidade analítica e pré-analítica dos testes (Clsi, 2007; Fedeli, L. G. *et al.*, 2013)

4.4.2 Hemograma

O hemograma no ELSA - Brasil foi realizado em equipamentos automatizados, as amostras foram mantidas à temperatura ambiente, sendo em seguida acondicionadas em caixas térmicas sem refrigeração para o transporte até os setores de hematologia do Hospital das Clínicas da UFMG, para em sequencia serem processadas até duas horas após a realização da coleta. Todos os hemogramas, diferentes dos demais exames foram realizados localmente, para o controle pré-analítico da interferência do armazenamento da amostra. No RS, as amostras foram processadas seguindo o mesmo protocolo de MG, porém analisadas no Laboratório do H Clínicas da UFRGS.

4.4.3 *Red Cell Distribution Width*

O RDW é um dos parâmetros do hemograma que foi realizado por meio de analisadores hematológicos automáticos modelo SYSMEX XE 2100 D (Sysmex, Kobe, Japão), que utilizam o método de impedância elétrica para contagem e a avaliação do tamanho e volume dos eritrócitos. Nesse método, as células, dispersas em uma suspensão, são contadas ao passarem através um orifício, gerando assim um pulso elétrico proporcional

ao tamanho e volume da célula, resultando em um histograma com os dados (Jackson e Carter, 1993). A partir desse histograma, o coeficiente de variação da distribuição do volume dos eritrócitos (RDW - CV) em torno do VCM, e seus valores são obtidos através da equação, $RDW - CV\% = L2 - L1 / L2 + L1$, onde L1 refere-se ao CV um e L2 ao CV dois. Cada CV é igual a um desvio padrão (DP) dividido pelo VCM (fL) multiplicado por 100. Onde um DP em relação ao VCM, é obtido até uma altura de 68,2% acima da base de distribuição do volume de eritrócitos no histograma. Os valores são expressos em porcentagem, com o menor valor de referência variando entre 10,7 – 12,9% e o maior valor de referência entre 13,8 – 15,3%, dependendo do analisador hematológico utilizado (Van Den Bossche *et al.*, 2002; Nascimento, 2003; Buttarello e Plebani, 2008; Caporal e Comar, 2013).

4.4.4 Análises bioquímicas

Além do RDW, foram utilizadas neste estudo as seguintes variáveis laboratoriais: glicemia jejum e pós-sobrecarga de 75g de glicose anidra, colesterol total, HDL, PCR, eTFG. O objetivo do exame, método, equipamento, e valores de referência estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1- Exames, método e equipamentos.

Determinações	Método	Equipamento
Glicose ¹	Enzimático colorimétrico (hexoquinase)	ADVIA 1200 Siemens®
Colesterol total	Enzimático colorimétrico (colesterol oxidase)	ADVIA 1200 Siemens®
HDL-colesterol	Colorimétrico homogêneo sem precipitação	ADVIA 1200 Siemens®
PCR	Imunoquímica por nefelometria	Nefelômetro BN II Siemens®
HbA1c	Cromatografia líquida de alta eficiência	Variant, BioRad®

Fonte: Fedeli LG, et al, 2013.

HDL, do inglês *High Density Lipoproteins*; PCR, proteína C-reativa e HbA1c, hemoglobina glicada.

4.5 Risco cardiovascular

O ERF foi o instrumento utilizado neste estudo para estratificar a amostra segundo o risco cardiovascular. Este escore calcula a probabilidade de um evento cardiovascular ocorrer ao longo de 10 anos com o objetivo de propor ações individualizadas de prevenção para as DCV. Para proceder esta estratificação, o escore considera a presença das seguintes variáveis: idade, sexo, pressão sanguínea sistólica, colesterol total, HDL, tabagismo, DM e utilização de medicamentos anti-hipertensivos (D'agostino *et al.*, 2008).

4.6 Análise estatística

Os dados foram apresentados através de medianas e intervalos interquartílicos para as variáveis contínuas e como valores absolutos e frequências para as variáveis categóricas. As características da linha de base foram comparadas entre os quartis do RDW através do teste qui-quadrado para variáveis categóricas e do teste de análise de variância (ANOVA) para variáveis contínuas.

A regressão linear simples foi utilizada para avaliar a associação entre o ERF e as variáveis clínicas, sociodemográficas, de estilo de vida e laboratoriais. A partir dessa análise, foram identificados fatores de confusão e criados os modelos de ajuste para a regressão multivariada. As variáveis com potencial efeito de confusão foram aquelas que se correlacionaram com o RDW com $p < 0,1$ e que não faziam parte do ERF.

A associação independente entre RDW (variável explicativa) e ERF foi investigada usando análise de regressão múltipla para os dados da linha de base do estudo ELSA - Brasil (2008 - 2010). Nesta análise, o RDW foi analisado como uma variável categórica. Foram gerados os seguintes modelos de regressão, modelo 1: RDW e modelo 2: modelo 1 + cor da pele/raça, nível de escolaridade, IMC, PCR, hemoglobina e consumo de álcool. Os modelos foram ajustados para controle das potenciais variáveis de confusão, variáveis não incluídas no ERF, ou variáveis com valores de $p < 0,1$ em modelos lineares da associação entre RDW e fatores de risco para DCV.

Associações independentes entre RDW e variáveis contínuas ou categóricas foram investigadas usando modelos lineares mistos para os dados da segunda visita do estudo ELSA - Brasil (2012 - 2014). Nestes modelos, a variável resposta (ERF) foi avaliada na linha de base e durante a segunda visita, enquanto as variáveis explicativas foram medidas apenas na linha de base. Foram gerados os seguintes modelos, modelo 1: RDW ajustado pelo tempo de seguimento e modelo 2: modelo 1 adicionado das variáveis cor/raça, escolaridade, IMC, PCR, consumo de álcool, hemoglobina e interações (hemoglobina e tempo e IMC e Tempo). Os modelos lineares mistos acomodam facilmente observações desequilibradas e desigualmente espaçadas e, conseqüentemente, são ferramentas ideais para a análise de dados longitudinais (Verbeke, 2000). Em modelos lineares mistos, o termo de interação entre uma covariável de efeito fixo e o tempo avalia se esta covariável é um preditor das mudanças longitudinais na variável resposta (ERF). Assim, os termos de interação entre o tempo e todas as variáveis de efeito fixo supracitadas foram avaliados, mas apenas os estatisticamente relevantes ($p < 0,1$) foram incluídos nos modelos. Em todos os modelos, incluímos o intercepto como termo aleatório, o que permite que o valor de referência de cada participante varie de acordo com a média da população, mas mantivesse a inclinação fixa e igual a β_1 .

Em ambas as análises, transversal e longitudinal, a relação entre RDW e ERF foi analisada usando quartis como variáveis categóricas: Q1 = 11,1 - 12,69%; Q2 = 12,7 - 12,99%; Q3 = 13,0 - 13,49%; e Q4 = 13,5 - 20,5%. As suposições do modelo foram investigadas após os ajustes. Os resíduos dos modelos de regressão linear não foram distribuídos normalmente. O ERF (variável resposta) foi transformado em log para normalizar sua distribuição. O nível de significância foi estabelecido em $p < 0,05$. As análises estatísticas foram realizadas com o pacote de software estatístico R versão 3.4.2 (R Core Team, 2017).

Na investigação da correlação entre o RDW e a incidência de DM e HAS, os dados foram apresentados através de medianas e intervalos interquartílicos para as variáveis contínuas e como valores absolutos e frequências para as variáveis categóricas.

A associação independente entre RDW (variável explicativa) e incidência de HAS e DM após quatro anos de acompanhamento foi investigada usando a regressão de riscos

proporcionais de Cox. Nesses modelos, a variável resposta (incidência de HAS e DM) foi avaliada na segunda visita, enquanto as variáveis explicativas foram medidas apenas na visita inicial. Para analisar o tempo até a presença de HAS como variável resposta, foram utilizados os seguintes modelos de ajustes: Modelo 1: RDW; Modelo 2: modelo 1 adicionado das variáveis sexo, idade, cor da pele /raça, nível de escolaridade. Modelo 3: modelo 2 adicionado das variáveis DM, hemoglobina, VCM, colesterol total, HDL, PCR e estimativa da taxa de filtração glomerular. Modelo 4: modelo 3 adicionado das variáveis tabagismo, atividade física, consumo de álcool e IMC. Para a análise do tempo até o DM como variável resposta, foram executados os seguintes modelos de ajustes: Modelo 1: RDW; Modelo 2: modelo 1 adicionado das variáveis sexo, idade, cor da pele /raça, nível de escolaridade. Modelo 3: modelo 2 adicionado das variáveis hemoglobina, VCM, colesterol total, HDL, PCR e estimativa da filtração glomerular. Modelo 4: modelo 3 adicionado das variáveis atividade física e IMC. O modelo final manteve todas as variáveis que permaneceram associadas à incidência de DM e HA ao nível de $p < 0,05$. As suposições do modelo foram investigadas após os ajustes do modelo. O teste de Schoenfeld não mostrou violação. As análises estatísticas foram realizadas usando o pacote de software estatístico R versão 3.5.2 (R Core Team, 2018).

5 RESULTADOS

A mediana de idade variou de 51 a 53 anos, a maioria dos participantes era mulheres (54,47%), autodeclarados brancos (58,74%), com ensino superior completo (57,38%) e relataram nunca ter fumado (57,84%). As características sociodemográficas, de estilo de vida, clínicas e laboratoriais dos participantes na linha de base estratificadas de acordo com os quartis de RDW são mostradas na Tabela 2. Diferenças significativas foram observadas entre os quartis de RDW, houve um aumento gradual na proporção de pacientes com comorbidades, como DM e HA. Além disso, RDW foi significativamente maior em participantes que praticaram atividade física de baixa intensidade, fumantes e aqueles com maiores níveis de colesterol total (Tabela 2).

Tabela 2. Resumo das características dos participantes do estudo da associação entre os quartis do RDW e o risco cardiovascular pelo ERF.

Características	Quartis RDW (%)				Valor de p
	Q1	Q2	Q3	Q4	
	11,1–12,69 N= 1362	12,7–12,99 N= 887	13,0–13,49 N= 1198	13,5–20,5 N= 1034	
Sexo, mulheres, n (%)	50,44%	53,10%	53,51%	62,09%	<0,001
	51,00	51,00	52,00	53,00	
Idade, mediana [IQ]	[44,00- 58,00]	[45,00- 59,00]	[46,00- 58,00]	[46,00- 59,50]	<0,001
Raça/cor da pele, n (%)					<0,001
Branca	63,73%	62,34%	60,10%	47,49%	
Parda	23,35%	24,01%	23,54%	28,53%	
Preta	8,88%	9,24%	13,27%	21,47%	
Outros ¹	4,04%	4,40%	3,09%	2,51%	
Escolaridade, n (%)					0,002
Ensino superior	59,62%	58,62%	58,85%	51,64%	
fundamental					
incompleto	3,60%	5,07%	5,26%	6,19%	
Fundamental					
completo	5,73%	6,76%	6,18%	6,38%	
Ensino médio	31,06%	29,54%	29,72%	35,78%	
Tabagismo, n (%)					<0,001
Nunca fumou	60,35%	56,82%	58,51%	54,64%	
Ex-tabagista	28,71%	32,81%	28,96%	28,53%	
Tabagista	10,94%	10,37%	12,52%	16,83%	
Atividade física ² , n (%)					0,457
Baixa	74,06%	73,73%	74,37%	75,80%	
Moderada	18,15%	18,94%	17,45%	18,37%	
Alta	7,79%	7,33%	8,18%	5,83%	
Consumo de álcool ³ ,	9,18%	8,34%	9,02%	7,93%	0,688

sim, n (%)					
IMC (kg/m ²), mediana [IQ]	25,41 [23,05- 28,05]	25,86 [23,44- 29,97]	26,23 [23,57- 29,41]	27,01 [24,18- 30,54]	<0,001
Diabetes mellitus ⁴ , n (%)	13,88%	15,14%	14,94%	19,34%	0,002
Hipertensão Arterial Sistêmica ⁵ , n= 4427	10,35%	10,48%	10,77%	13,64%	0,050
Hemoglobina (g/dL), mediana [IQ]	14,30 [13,50- 15,40]	14,20 [13,30- 15,20]	14,20 [13,30- 15,20]	13,70 [12,70- 14,70]	<0,001
VCM (fL), mediana [IQ]	89,40 [87,00- 91,80]	88,60 [86,30- 90,80]	88,20 [85,50- 90,80]	86,70 [82,90- 89,70]	<0,001
Colesterol total (mg/dL), mediana [IQ]	206,00 [185,00- 232,00]	210,00 [183,00- 240,00]	212,00 [188,00- 240,00]	213,00 [186,00- 241,00]	0,005
HDL colesterol (mg/dL), mediana, [IQ]	53,00 [45,00- 63,00]	54,00 [45,20- 64,00]	55,00 [46,00- 65,00]	56,00 [47,00- 67,00]	<0,001
PCR (mg/dL), mediana [IQ]	1,17 [0,61-2,51]	1,32 [0,70-2,67]	1,46 [0,74-3,20]	2,05 [0,91-4,31]	<0,001
eTFG ⁶ > 60 mL/min, mediana [IQ]	96,55%	95,71%	95,16%	95,16%	0,267

¹Indígena, oriental e indivíduos que não declararam raça/cor; ²Atividade física, segundo Questionário Internacional de Atividade Física (IPAQ); ³Bebedor excessivo (homens \geq 210 g de álcool /semana; mulheres \geq 140 g de álcool /semana); ⁴Diabetes mellitus: definido de acordo com os critérios da *American Diabetes Association* (ADA) ou por auto relato de diagnóstico prévio de DM e/ou uso de insulina ou hipoglicemiantes orais; ⁵Hipertensão Arterial Sistêmica: definida como qualquer um dos seguintes critérios: auto relato de diagnóstico prévio de HA, ou uso de agentes anti-hipertensivos, ou pressão arterial \geq 140 \times 90 mmHg de três medidas; ⁶Estimativa da Taxa de Filtração Glomerular pela equação da *Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration* (CKD - EPI).

RDW, do inglês *red cell distribution width*; IMC, Índice de massa corporal; VCM, volume corpuscular médio; HDL, do inglês *High Density Lipoproteins*; PCR, proteína C - reativa; eTFG, estimativa da Taxa de Filtração Glomerular.

Não foram encontradas diferenças significativas entre as medianas e intervalos interquartílicos das populações MG (13,1%, $12,7 \pm 13,6\%$) e RS (13,0%, $12,7 \pm 13,5\%$) ($p = 0,18$) (Figura 5).

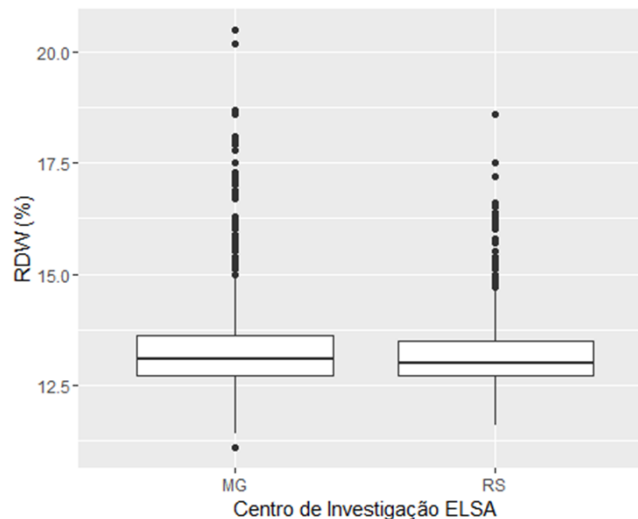


FIGURA 5- Distribuição do RDW segundo Centro de investigação: ELSA - Minas Gerais (MG) e Rio Grande do Sul (RS). Valores foram apresentados como medianas. Teste *Mann-Whitney*. RDW, do inglês *red cell distribution width*;

Modelos de regressão múltipla revelaram uma associação independente entre RDW e ERF, mesmo após os ajustes dos potenciais fatores de confusão. Esta associação obteve um gradiente ascendente, já que o ERF aumenta de acordo com o aumento dos quartis do RDW, embora apenas o terceiro e quarto quartil tenham permanecido estatisticamente significativo nos modelos um e totalmente ajustado (modelo 2). Assim, o modelo 2 explicou cerca de 30% da variabilidade do ERF na amostra do estudo (Tabela 3).

Tabela 3. Modelos de regressão múltipla para associação entre os quartis do RDW e o risco cardiovascular pelo ERF ajustado por diferentes variáveis.

	ERF				R ² Aj
	Q1	Q2	Q3	Q4	
Quartis de RDW	11,1 - 12,69 N = 1362	12,7 - 12,99 N = 887	13,0 - 13,49 N = 1198	13,5 - 20,5 N = 1034	
Modelos	e ^β ; valor de p [IC 95%]	e ^β ; valor de p [IC 95%]	e ^β ; valor de p [IC 95%]	e ^β ; valor de p [IC 95%]	
1 ¹	Referência	1,062; 0,079 [0,993 - 1,136]	1,083; 0,011 [1,018 - 1,153]	1,290; ≤ 0,001 [1,206 - 1,380]	0,299
2 ²	Referência	1,060; 0,088 [0,991 - 1,134]	1,087; 0,008 [1,021 - 1,153]	1,299; ≤ 0,001 [1,215 - 1,390]	0,298

Coefficientes de regressão (β) foram log-transformados.

¹Modelo 1: RDW; ²Modelo 2: modelo 1+ cor da pele/raça, escolaridade, IMC, PCR, hemoglobina e consumo de álcool.

RDW, do inglês red cell distribution width; ERF, do inglês *Framingham Risk Score*; e^β, coeficiente exponencial Beta; IC, intervalo de confiança; IMC, índice de massa corpórea; PCR, proteína C-reativa; Valores significativos se p≤0,05. Regressão Linear Múltipla;

Os modelos de regressão linear misto também confirmaram os achados da análise transversal. Mostraram associações significativas entre RDW e ERF mesmo após os ajustes das variáveis potenciais de confusão. Dessa forma, em média, indivíduos pertencentes ao quarto quartil do RDW têm em média 29% mais risco cardiovascular do que aqueles indivíduos pertencentes ao primeiro quartil do RDW. O termo de interação entre o RDW e a covariável tempo não foi estatisticamente significativo, indicando que a inclinação da associação não mudou ao longo do tempo. Assim, o RDW não conseguiu prever uma piora do risco cardiovascular na trajetória longitudinal desses indivíduos ao longo de quatro anos (Tabela 4).

Tabela 4. Modelos de regressão mista para associação entre os quartis do RDW e o risco cardiovascular pelo ERF ajustado por diferentes variáveis.

	ERF			
	Q1	Q2	Q3	Q4
Quartis do RDW	11,1 - 12,69 N = 1362	12,7 - 12,99 N = 887	13,0 - 13,49 N = 1198	13,5 - 20,5 N = 1034
Modelos	e ^β ; valor de p [IC 95%]	e ^β ; valor de p [IC 95%]	e ^β ; valor de p [IC 95%]	e ^β ; valor de p [IC 95%]
1 ¹	Referência	1,051; 0,122 [0,986–1,121]	1,083; 0,007 [1,021–1,149]	1,280; ≤ 0,001 [1,201–1,364]
2 ²	Referência	1,062; 0,070 [0,994 – 1,134]	1,085; 0,008 [1,021 – 1,153]	1,290; ≤ 0,001 [1,208 – 1,377]
2 ²	Termo de interação Tempo	(valor de p) 0,236	(valor de p) 0,455	(valor de p) 0,577

Coefficientes de regressão (β) foram log-transformados.

¹Modelo 1: modelo bruto ajustado pelo tempo de seguimento e RDW; ²Modelo 2: modelo 1 + cor da pele/raça, escolaridade, IMC, PCR, consumo de álcool e interações: hemoglobina \times tempo e IMC \times tempo.

RDW, do inglês *red cell distribution width*; ERF, do inglês *Framingham Risk Score*; e^β, exponencial coeficiente exponencial Beta; IC, intervalo de confiança; IMC, índice de massa corpórea; PCR, proteína C-reativa; Regressão Linear Mista; Valores significativos se $p \leq 0,05$.

Os participantes incluídos na investigação da correlação entre o RDW e a incidência de HAS e DM apresentaram mediana de idade de 49 e 51 anos, respectivamente. A maioria da amostra são mulheres (em torno de 57%), 61% se autodeclaram brancos e aproximadamente 60% possuem ensino superior completo. A maioria da amostra, aproximadamente 74%, relata nível de atividade física fraca e cerca de 60% relatam nunca ter fumado. A Tabela 5 apresenta as características sociodemográficas, comportamentais, clínicas e laboratoriais da população estudada.

Tabela 5. Resumo das características dos participantes do estudo da associação entre RDW e a incidência de Hipertensão Arterial Sistêmica e Diabetes .

Características	Incidência de HAS (N = 3224)	Incidência de DM (N = 4.295)
RDW, mediana [IQ]	13,00 [12,60 - 13,50]	13,00 [12,70 - 13,50]
Sexo, feminino, n (%)	1834,13 (56,89)	2403 (55,95)
Idade, mediana [IQ]	49,00 [44,00 - 56,00]	51,00 [45,00 - 58-00]
Raça/cor da pele, n (%)		
Branca	1970,87 (61,88)	2607,8 (61,36)
Preta	352,89 (11,08)	498 (11,72)
Parda	768,85 (24,14)	1036,15 (24,38)
Outras ¹	91,72 (2,88)	107,95 (2,54)
Nível de escolaridade, n (%)		
Ensino superior	1948,90 (60,45)	2537 (59,07)
Fundamental incompleto	117,03 (3,63)	186,83 (4,35)
Fundamental completo	170,87 (5,30)	240,09 (5,59)
Ensino médio	986,86 (30,61)	1331,02 (30,99)
Tabagismo, n (%)		
Nunca fumou	1930,85 (59,89)	2539,20 (59,12)
Ex-tabagista	868,86 (26,95)	1224,93 (28,52)

Tabagista	423,95 (13,15)	530,86 (12,36)
Atividade física ² , n (%)		
Baixa	2379,1 (74)	3192,11 (74,53)
Moderada	578,05 (17,98)	767,94 (17,93)
Alta	257,84 (8,02)	322,93 (7,54)
Consumo de álcool ³ , sim, n (%)	220,84 (6,85)	349,10 (8,13)
IMC (kg/m ²), mediana [IQ]	25,24 [22,98 - 27,94]	25,73 [23,30 - 28,67]
Pressão arterial, mediana [IQ]	114,25 [106,00 - 123,00]	117,50 [108,00 - 128,00]
Diabetes mellitus ⁴ (não), n (%)	2941,04 (91,28)	3806,12 (93,77)
Hemoglobina (g/dL), mediana [IQ]	14,00 [13,20 - 15,00]	14,10 [13,20 - 15,10]
VCM (fL), mediana [IQ]	88,40 [85,80 - 91,00]	88,50 [85,80 - 91,10]
Colesterol total (mg/dL), mediana [IQ]	209,00 [184,00 - 236,00]	210,00 [185,00 - 237,00]
HDL colesterol (mg/dL), mediana [IQ]	55,00 [47,00 - 66,00]	55,00 [47,00 - 65,00]
PCR (mg/dL), mediana [IQ]	1,24 [0,63 - 2,67]	1,35 [0,68 - 2,97]
eTFG ⁵ > 60 mL/min, n (%)	3094,08 (96)	4038,93 (94,06%)

¹Indígena, oriental e indivíduos que não declararam raça/cor; ²Atividade física, segundo Questionário Internacional de Atividade Física (IPAQ); ³Bebedor excessivo (homens ≥ 210 g de álcool /semana; mulheres ≥ 140 g de álcool /semana); ⁴Diabetes mellitus: definido de acordo com os critérios da *American Diabetes Association* (ADA) ou por auto relato de diagnóstico prévio de DM e/ou uso de insulina ou hipoglicemiantes orais; ⁵Hipertensão Arterial Sistêmica: definida como qualquer um dos seguintes critérios: auto relato de diagnóstico prévio de HA, ou uso de agentes anti-hipertensivos, ou pressão arterial ≥ 140 × 90 mmHg de três medidas;

⁶Estimativa da Taxa de Filtração Glomerular pela equação da *Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration* (CKD - EPI).

HA, Hipertensão Arterial Sistêmica; DM, diabetes mellitus; RDW, do inglês *red cell distribution width*; IMC, Índice de massa corporal; VCM, volume corpuscular médio; *HDL*, do inglês *High Density Lipoproteins*; PCR, proteína C-reativa; eTFG, estimativa da Taxa de Filtração Glomerular.

O modelo de Cox mostrou que não há evidência estatística da associação entre o RDW e a incidência de HAS e DM, após quatro anos de seguimento, mesmo após os ajustes das variáveis de confusão (Tabelas 6 e 7, respectivamente).

Tabela 6. Incidência de Hipertensão Arterial Sistêmica em relação ao RDW ajustado por diferentes variáveis.

RDW	Incidência de HAS		
	e ^β	Valor de p	IC 95%
Modelos			
1 ¹	1,133	0,015	1,024 - 1,254
2 ²	1,143	0,012	1,028 - 1,271
3 ³	1,073	0,225	0,957 - 1,204
4 ⁴	1,077	0,192	0,963 - 1,205

¹Modelo 1: RDW; ²Modelo 2: modelo 1 + sexo, idade, raça/cor da pele, escolaridade, ³Modelo 3: modelo 2 + DM, hemoglobina, VCM, colesterol total, HDL, PCR e eTFG; ⁴Modelo 4: modelo 3 + tabagismo, atividade física, consumo de álcool e IMC.

RDW, do inglês *red cell distribution width*; HA, Hipertensão Arterial Sistêmica; VCM, volume corpuscular médio; HDL, do inglês *high-density lipoprotein*; PCR, proteína C-reativa; eTFG, estimativa da taxa de filtração glomerular; IMC, índice de massa corporal; Regressão de Cox; Valores significativos se $p \leq 0,05$.

Tabela 7. Incidência de diabetes mellitus em relação ao RDW ajustado por diferentes variáveis.

RDW	Incidência de DM		
	e ^β	Valor de p	IC95%
Modelos			
1 ¹	1,080	0,322	0,927 - 1,258
2 ²	1,007	0,935	0,848 - 1,195
3 ³	1,005	0,948	0,847 - 1,193
4 ⁴	0,999	0,991	0,841 - 1,186

¹Modelo 1: RDW; ²Modelo 2: modelo 1 + sexo, idade, raça/cor da pele, escolaridade, ³Modelo 3: modelo 2 + hemoglobina, VCM, colesterol total, HDL, PCR e eTFG, Modelo 4: modelo 3 + atividade física e IMC.

RDW, do inglês *red cell distribution width*; DM, diabetes mellitus; VCM, volume corpuscular médio; HDL, do inglês, *high-density lipoprotein*; PCR, proteína C-reativa; eTFG, estimativa da taxa de filtração glomerular; IMC, índice de massa corporal; Regressão de Cox; Valores significativos se $p \leq 0,05$.

6 DISCUSSÃO

Este é o primeiro estudo a investigar em uma população brasileira a associação entre o aumento do RDW: (A) risco cardiovascular estimado por ERF usando tanto abordagens transversais quanto longitudinais (B) incidência de HAS e (C) incidência de DM. O aumento do RDW permaneceu associado ao ERF mesmo após os ajustes das variáveis de confusão, tanto no desenho transversal, quanto longitudinal, entretanto, não conseguiu prever uma piora do risco cardiovascular na trajetória longitudinal desses indivíduos ao longo de quatro anos. Nós também não encontramos evidências significativas da associação entre RDW e a incidência de HAS e DM, após quatro anos de seguimento, mesmo após os ajustes das variáveis de confusão. Poucos estudos demonstraram a associação entre RDW e fatores de risco para doença cardiovascular, embora vários estudos tenham demonstrado que o RDW está independentemente associado à morbidade e mortalidade na doença cardiovascular.

Neste estudo, o risco cardiovascular dos participantes, estimado pelo ERF, presentes no quarto quartil do RDW foi, em média, 30% maior em comparação àqueles presentes no primeiro quartil do RDW. Utilizando os dados da segunda visita, após 4 anos em média de acompanhamento, essa correlação foi semelhante: os participantes presentes no quarto quartil do RDW tinham um risco, em média, 29% maior de desenvolver um evento CV maior em 10 anos, do que os participantes com RDW no primeiro quartil. Assim, um indivíduo que apresente um risco de 10% de desenvolver um evento CV maior, caso tenha $RDW \geq 13,5\%$, teria seu risco aumentado para 12,9%, o que pode influenciar na tomada de decisão clínica. Shah et al. (2017), demonstraram que valores de RDW superiores a 14,5% foram associados com morte por doença coronária (Shah *et al.*, 2017), enquanto que Sharma e Agrawal (2015) relataram que um $RDW > 14\%$ foi associado com PCR elevada, infarto do miocárdio sem elevação ST, e angina instável (Sharma e Agrawal, 2015).

A análise incluindo o termo de interação entre o tempo e as variáveis RDW, mostrou que o RDW não foi capaz de prever mudanças significativas no risco de DCV ao longo de quatro anos de acompanhamento, indicando que a inclinação da associação não mudou ao longo do tempo. Um estudo com seguimento de 14 anos, envolvendo 7005 indivíduos saudáveis, classificados no início do estudo, de acordo com o ERF para DAC, descobriu que a adição de RDW ao ERF ajudou a reclassificar categoria de risco intermediário para categoria de alto risco de morte para DAC. Os autores concluíram que o RDW melhorou a acurácia do ERF na predição de mortalidade cardiovascular (Shah *et al.*, 2017). As diferenças nos resultados dos dois estudos podem se dever ao fato de que o tempo de seguimento foi maior do que no presente estudo, 14 anos vs. 4 anos, além do desfecho final, ser mortalidade e não a mudança no ERF. O acompanhamento de quatro anos pode ter sido insuficiente para demonstrar a influência do tempo na associação entre o RDW e o ERF.

A associação independente entre RDW e DCV foi demonstrada por outros autores em estudos envolvendo diversos grupos populacionais. Uma revisão sistemática com meta-análise avaliou 80.216 participantes em 22 estudos de diferentes regiões e concluiu que altos valores de RDW estão associados com o aumento do risco de mortalidade e eventos cardiovasculares em pacientes com DAC (Su *et al.*, 2014). Outra revisão sistemática com meta-análise envolveu 17 estudos com 18.288 participantes com IC

aguda ou crônica de diversas regiões e concluiu que pacientes com IC e com altos valores de RDW, possuem um pior prognóstico quando comparados com os pacientes com baixos valores de RDW (Huang *et al.*, 2014). Além disso, diferentes estudos de grandes coortes, acompanhadas por um período de cinco a 15 anos, demonstraram que valores elevados de RDW estão associados com risco aumentado de IAM e morte por DAC em adultos, independente de outros fatores de risco (Veeranna *et al.*, 2013; Skjelbakken *et al.*, 2014), assim como, em idosos sem doenças associadas à idade. (Patel *et al.*, 2010).

Os mecanismos fisiopatológicos envolvidos na associação entre o RDW e o risco de DCV não foram totalmente determinados, entretanto, alguns sugerem que a anisocitose possa estar associada ao estado inflamatório (Ridker *et al.*, 2001; Sesso *et al.*, 2003; Zalawadiya *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2015; Mozos, 2015). Em nosso estudo, indivíduos com os maiores valores de RDW (Q4) tiveram também maiores valores de PCR e menores valores de VCM, quando comparado aos demais quartis de RDW (Tabela 2). Diante dos resultados, acreditamos que os indivíduos da coorte ELSA-Brasil, possam ter alterações nos valores do RDW, em decorrência da exposição às doenças crônicas e inflamação, com consequente perturbação da síntese de hemoglobina e afluxo intermitente de ferro.

No presente estudo a PCR, biomarcador sistêmico da inflamação, foi incluída entre as variáveis de ajuste dos modelos para investigar a associação entre RDW e risco de DCV. No modelo sem PCR, o RDW permaneceu independentemente correlacionado com o ERF ($e^{\beta} = 1,29$; valor de ≤ 0.001) após quatro anos de acompanhamento. Esse resultado mostra que, embora a inflamação tenha sido implicada na anisocitose e possa impactar diretamente o risco cardiovascular, em nosso estudo não afetou a associação entre RDW e ERF após quatro anos de acompanhamento.

O presente estudo demonstrou que não há evidência estatística de associação entre o RDW e a incidência de DM, após o seguimento de quatro anos. Os autores que avaliaram associação do RDW e a HbA1c em adultos sem DM, encontraram uma associação positiva entre RDW e a HbA1c, independente dos níveis de glicemia em jejum (Veeranna *et al.*, 2012). Contudo, Engstrom et al (2014) avaliaram a associação do RDW e HbA1 com a incidência de DM e demonstraram que altos valores de RDW

atuam como fator de proteção para o início do DM, mesmo após o ajuste de diversos fatores de confusão. Eles defendem a hipótese de que aumento da glicose em jejum e hiperglicemia pós-prandial pode ser suficiente para alterar as propriedades mecânicas dos eritrócitos, reduzir a sobrevivência e criar uma população mais homogênea de células (Engstrom *et al.*, 2014). Diante dos resultados acreditamos que a relação entre o RDW e o DM ainda necessita ser melhor elucidada, já que diferentes trabalhos mostram resultados conflitantes.

Na análise da associação entre o RDW e a incidência de HAS, não foram encontradas evidências estatísticas significativas. Diferentes resultados são descritos na literatura em relação a essa associação. Um estudo envolvendo 170 indivíduos avaliou a associação do RDW à pressão arterial, considerando os valores durante o sono e em vigília em pacientes hipertensos e normotensos e concluiu que hipertensos tem maiores valores de RDW do que os normotensos e que os níveis de RDW foram mais altos nos indivíduos com descenso noturno alterado do que naqueles com descenso noturno sem alterações (Buyukkaya *et al.*, 2016). Por outro lado, um estudo contendo 9808 participantes avaliou a associação de diferentes parâmetros hematológicos e bioquímicos em indivíduos hipertensos e não hipertensos, em relação ao RDW os maiores valores estavam associados ao grupo normotensos, ao invés de hipertensos (Emamian *et al.*, 2017). Essas diferenças podem decorrer de vários fatores entre eles, tempo de seguimento dos estudos, diferentes metodologias de medidas do RDW e populações estudadas com diferentes características poligênicas na regulação da HAS e do DM2 (Rudnicki e Mayer, 2009; Santulli *et al.*, 2012; Santulli *et al.*, 2013; Patel *et al.*, 2014).

Este estudo tem algumas limitações. Potenciais fatores de confusão, como ferritina, vitamina B12 e níveis séricos de folato não foram medidos e, portanto, não incluídos na análise. A natureza multicêntrica do estudo ELSA-Brasil e a estabilidade limitada das amostras de sangue total utilizadas para a medida do RDW exigiram que os hemogramas fossem realizados em diferentes laboratórios em cada centro de investigação do ELSA-Brasil. As diferentes metodologias empregadas poderiam interferir nos valores e, assim, somente foram incluídos os participantes de Minas Gerais e do Rio Grande do Sul que utilizaram analisadores hematológicos com mesma metodologia, marca e modelo. Considerando que as condições clínicas incluídas no estudo são de caráter crônico, o tempo de seguimento longitudinal de quatro anos, em

média, pode não ter sido suficiente para evidenciar as associações do RDW com essas condições. Apesar dessas limitações, este é o primeiro estudo brasileiro a investigar a associação entre RDW e risco cardiovascular estimado por ERF, a incidência de HAS e de DM.

7 CONCLUSÃO

Nesta coorte de brasileiros adultos, o RDW foi independentemente associado ao aumento do risco de DCV, medido pelo ERF tanto na linha de base do estudo, quanto após quatro anos de acompanhamento, mas não foi capaz de prever mudança no ERF longitudinalmente. Na população estudada, não houve evidência estatística de que maiores valores de RDW foram associados com a incidência de HAS ou de DM, no intervalo médio de quatro anos. Considerando o caráter crônico das condições clínicas investigadas, o seguimento dessa coorte poderá evidenciar o papel do RDW como biomarcador preditivo de DCV, DM e HAS, além de reforçar o caráter multifatorial das doenças cardiovasculares e de possíveis mecanismos fisiopatológicos subjacentes às associações encontradas. O esforço envolvido na investigação do RDW se justifica já que este apresenta várias vantagens sobre os biomarcadores convencionais, incluindo baixa variação biológica intraindividual, baixo custo, facilidade de interpretação e ampla disponibilidade.

8 REFERÊNCIAS

ABESO. **Diretrizes brasileiras de obesidade 2009/2010 - Abeso- Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade e da Síndrome Metabólica.** Itapevi, SP: AC Farmacêutic, 2009.

ADAMSSON ERYD, S.; BORNE, Y.; MELANDER, O.; PERSSON, M.; SMITH, J. G.; HEDBLAD, B. et al. Red blood cell distribution width is associated with incidence of atrial fibrillation. **J Intern Med**, v. 275, n. 1, p. 84-92, Jan 2014.

AIRES, M. **Fisiologia.** Rio de Janeiro: 1999.

AQUINO, E. M.; BARRETO, S. M.; BENSENOR, I. M.; CARVALHO, M. S.; CHOR, D.; DUNCAN, B. B. et al. Brazilian Longitudinal Study of Adult Health (ELSA-Brasil): objectives and design. **Am J Epidemiol**, v. 175, n. 4, p. 315-24, Feb 15 2012.

AQUINO, E. M. L.; ARAUJO, M. J.; ALMEIDA, M. D. C. C.; CONCEIÇÃO, P.; ANDRADE, C. R. D.; CADE, N. V. et al. Recrutamento de participantes no Estudo Longitudinal de Saúde do Adulto. **Revista de Saúde Pública**, v. 47, p. 10-18, 2013.

BEAGLEHOLE, R.; BONITA, R. Global public health: a scorecard. **Lancet**, v. 372, n. 9654, p. 1988-96, Dec 6 2008.

BERGER, J. S.; JORDAN, C. O.; LLOYD-JONES, D.; BLUMENTHAL, R. S. Screening for cardiovascular risk in asymptomatic patients. **J Am Coll Cardiol**, v. 55, n. 12, p. 1169-77, Mar 23 2010.

BLACKBURN, H.; KEYS, A.; SIMONSON, E.; RAUTAHARJU, P.; PUNSAR, S. The electrocardiogram in population studies. A classification system. **Circulation**, v. 21, p. 1160-75, Jun 1960.

BLOOD PRESSURE LOWERING TREATMENT TRIALISTS' COLLABORATION. Blood pressure-lowering treatment based on cardiovascular risk: a meta-analysis of individual patient data. **Lancet**, v. 384, n. 9943, p. 591-598, Aug 16 2014.

BONETTI, P. O.; LERMAN, L. O.; LERMAN, A. Endothelial dysfunction: a marker of atherosclerotic risk. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 23, n. 2, p. 168-75, Feb 1 2003.

BUTLER, D. UN targets top killers. **Nature**, v. 477, n. 7364, p. 260-1, Sep 15 2011.

BUTTARELLO, M.; PLEBANI, M. Automated blood cell counts: state of the art. **Am J Clin Pathol**, v. 130, n. 1, p. 104-16, Jul 2008.

BUYUKKAYA, E.; ERAYMAN, A.; KARAKAS, E.; BUGRA NACAR, A.; KURT, M.; BUYUKKAYA, S. et al. Relation of red cell distribution width with dipper and non-dipper hypertension. **Med Glas (Zenica)**, v. 13, n. 2, p. 75-81, Aug 01 2016.

CAMPANA, E. M. G.; BRANDAO, A. A.; POZZAN, R.; MAGALHAES, M. E. C.; FONSECA, F. L.; PIZZI, O. L. et al. Pressão Arterial na Adolescência, Adipocinas e Inflamação no Adulto Jovem. Estudo do Rio de Janeiro. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 102, p. 60-69, 2014.

CAPORAL, F. A.; COMAR, S. R. Evaluation of RDW-CV, RDW-SD, and MATH-1SD for the detection of erythrocyte anisocytosis observed by optical microscopy. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 49, p. 324-331, 2013.

CESARINO, C. B.; BORGES, P. P.; RIBEIRO, R. D. C. H. M.; RIBEIRO, D. F.; KUSUMOTA, L. Avaliação do risco cardiovascular de pacientes renais crônicos segundo critérios de Framingham. **Acta Paulista de Enfermagem**, v. 26, p. 101-107, 2013.

CESARINO, C. B.; CIPULLO, J. P.; MARTIN, J. F. V.; CIORLIA, L. A.; GODOY, M. R. P. D.; CORDEIRO, J. A. et al. Prevalência e fatores sociodemográficos em hipertensos de São José do Rio Preto - SP. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 91, p. 31-35, 2008.

CHEN, P. C.; SUNG, F. C.; CHIEN, K. L.; HSU, H. C.; SU, T. C.; LEE, Y. T. Red blood cell distribution width and risk of cardiovascular events and mortality in a community cohort in Taiwan. **Am J Epidemiol**, v. 171, n. 2, p. 214-20, Jan 15 2010.

CHOR, D.; PINHO RIBEIRO, A. L.; SÁ CARVALHO, M.; DUNCAN, B. B.; ANDRADE LOTUFO, P.; ARAÚJO NOBRE, A. et al. Prevalence, Awareness, Treatment and Influence of Socioeconomic

Variables on Control of High Blood Pressure: Results of the ELSA-Brasil Study. **PLoS ONE**, v. 10, n. 6, p. e0127382,

2015.

CLSI. **Procedures for the Collection of Diagnostic Blood Specimens by Venipuncture. Document H3-A6.** Wayne (PA): CLSI, 2007.

COELHO, C. G.; GIATTI, L.; MOLINA, M. D.; NUNES, M. A.; BARRETO, S. M. Body Image and Nutritional Status Are Associated with Physical Activity in Men and Women: The ELSA-Brasil Study. **Int J Environ Res Public Health**, v. 12, n. 6, p. 6179-96, May 29 2015.

CONEN, D.; GLYNN, R. J.; RIDKER, P. M.; BURING, J. E.; ALBERT, M. A. Socioeconomic status, blood pressure progression, and incident hypertension in a prospective cohort of female health professionals. **Eur Heart J**, v. 30, n. 11, p. 1378-84, Jun 2009.

CONROY, R. M.; PYORALA, K.; FITZGERALD, A. P.; SANS, S.; MENOTTI, A.; DE BACKER, G. et al. Estimation of ten-year risk of fatal cardiovascular disease in Europe: the SCORE project. **Eur Heart J**, v. 24, n. 11, p. 987-1003, Jun 2003.

CRAIG, C. L.; MARSHALL, A. L.; SJOSTROM, M.; BAUMAN, A. E.; BOOTH, M. L.; AINSWORTH, B. E. et al. International physical activity questionnaire: 12-country reliability and validity. **Med Sci Sports Exerc**, v. 35, n. 8, p. 1381-95, Aug 2003.

CRAWFORD, J. H.; CHACKO, B. K.; KEVIL, C. G.; PATEL, R. P. The red blood cell and vascular function in health and disease. **Antioxid Redox Signal**, v. 6, n. 6, p. 992-9, Dec 2004.

D'AGOSTINO, R. B., SR.; VASAN, R. S.; PENCINA, M. J.; WOLF, P. A.; COBAIN, M.; MASSARO, J. M. et al. General cardiovascular risk profile for use in primary care: the Framingham Heart Study. **Circulation**, v. 117, n. 6, p. 743-53, Feb 12 2008.

DADA, O. A.; UCHE, E.; AKINBAMI, A.; ODESANYA, M.; JOHN-OLABODE, S.; ADEDIRAN, A. et al. The relationship between red blood cell distribution width and blood pressure in patients with type 2 diabetes mellitus in Lagos, Nigeria. **J Blood Med**, v. 5, p. 185-9, 2014.

DANESE, E.; LIPPI, G.; MONTAGNANA, M. Red blood cell distribution width and cardiovascular diseases. **J Thorac Dis**, v. 7, n. 10, p. E402-11, Oct 2015.

DAWBERT, T. R.; MOORE, F. E.; MANN, G. V. Coronary heart disease in the Framingham study. **Am J Public Health Nations Health**, v. 47, n. 4 Pt 2, p. 4-24, Apr 1957.

DIRETRIZES SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. **Diretrizes Sociedade Brasileira de Diabetes 2017-2018**. São Paulo: Clannad 2017. ISBN 978-85-93746-02-4.

EHRET, G. B.; MUNROE, P. B.; RICE, K. M.; BOCHUD, M.; JOHNSON, A. D.; CHASMAN, D. I. et al. Genetic variants in novel pathways influence blood pressure and cardiovascular disease risk. **Nature**, v. 478, n. 7367, p. 103-9, Sep 11 2011.

EMAMIAN, M.; HASANIAN, S. M.; TAYEFI, M.; BIJARI, M.; MOVAHEDIAN FAR, F.; SHAFIEE, M. et al. Association of hematocrit with blood pressure and hypertension. **J Clin Lab Anal**, v. 31, n. 6, Nov 2017.

ENGSTROM, G.; SMITH, J. G.; PERSSON, M.; NILSSON, P. M.; MELANDER, O.; HEDBLAD, B. Red cell distribution width, haemoglobin A1c and incidence of diabetes mellitus. **J Intern Med**, v. 276, n. 2, p. 174-83, 2014.

EXPERT PANEL ON DETECTION EVALUATION AND TREATMENT OF HIGH BLOOD CHOLESTEROL IN ADULTS. Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III). **Jama**, v. 285, n. 19, p. 2486-97, May 16 2001.

FALUDI, A. A.; IZAR, M. C. O.; SARAIVA, J. F. K.; CHACRA, A. P. M.; BIANCO, H. T.; AFIUNE, A. N. et al. **Arq Bras Cardiol**, v. 109, n. 2 Supl 1, p. 1-76, Jul 2017.

FEDALI, L. G.; VIDIGAL, P. G.; LEITE, C. M.; CASTILHOS, C. D.; PIMENTEL, R. A.; MANIERO, V. C. et al. Logística de coleta e transporte de material biológico e organização do laboratório central no ELSA-Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 47, p. 63-71, 2013.

FEDELI, L. G.; VIDIGAL, P. G.; LEITE, C. M.; CASTILHOS, C. D.; PIMENTEL, R. A.; MANIERO, V. C. et al. Logistics of collection and transportation of biological samples and the organization of the central laboratory in the ELSA-Brasil. **Rev Saude Publica**, v. 47, 2013.

FELKER, G. M.; ALLEN, L. A.; POCOOCK, S. J.; SHAW, L. K.; MCMURRAY, J. J.; PFEFFER, M. A. et al. Red cell distribution width as a novel prognostic marker in heart failure: data from the CHARM Program and the Duke Databank. **J Am Coll Cardiol**, v. 50, n. 1, p. 40-7, Jul 3 2007.

FOROUZANFAR, M.; AFSHIN, A.; ALEXANDER, L.; ANDERSON, H.; BHUTTA, Z.; BIRYUKOV, S. et al. Global, regional, and national comparative risk assessment of 79 behavioural, environmental and occupational, and metabolic risks or clusters of risks, 1990-2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. **Lancet**, v. 388, n. 10053, p. 1659-1724, Oct 8 2016.

FOROUZANFAR, M. H.; LIU, P.; ROTH, G. A.; NG, M.; BIRYUKOV, S.; MARCZAK, L. et al. Global Burden of Hypertension and Systolic Blood Pressure of at Least 110 to 115 mm Hg, 1990-2015. **Jama**, v. 317, n. 2, p. 165-182, Jan 10 2017.

GANG, L.; LIFANG, W. Association of the Elevated Red Blood Cell Distribution Width with the Risk of Developing Diabetes Mellitus. **Intern Med**, v. 55, n. 15, p. 1959-65, 2016.

GEORGE, L. B.; MATTHEW, S. **Hypertension: A Companion to Braunwald's Heart Disease** Elsevier, 2018.

GRUNDY, S. M.; PASTERNAK, R.; GREENLAND, P.; SMITH, S., JR.; 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**, v. 100, n. 13, p. 1481-92, Sep 28 1999.

HANSSON, G. K. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. **N Engl J Med**, v. 352, n. 16, p. 1685-95, Apr 21 2005.

HU, Z. D.; CHEN, Y.; ZHANG, L.; SUN, Y.; HUANG, Y. L.; WANG, Q. Q. et al. Red blood cell distribution width is a potential index to assess the disease activity of systemic lupus erythematosus. **Clin Chim Acta**, v. 425, p. 202-5, Oct 21 2013.

HUANG, Y. L.; HU, Z. D.; LIU, S. J.; SUN, Y.; QIN, Q.; QIN, B. D. et al. Prognostic value of red blood cell distribution width for patients with heart failure: a systematic review and meta-analysis of cohort studies. **PLoS One**, v. 9, n. 8, p. e104861, 2014.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. **International Diabetes Federation. IDF Atlas**. Brussels, Belgium: : 2017.

JACKSON, S. R.; CARTER, J. M. Platelet volume: laboratory measurement and clinical application. **Blood Rev**, v. 7, n. 2, p. 104-13, Jun 1993.

KANNEL, W. B.; DAWBER, T. R.; COHEN, M. E.; MCNAMARA, P. M. VASCULAR DISEASE OF THE BRAIN--EPIDEMIOLOGIC ASPECTS: THE FARMINGHAM STUDY. **Am J Public Health Nations Health**, v. 55, p. 1355-66, Sep 1965.

KAYA, A.; ISIK, T.; KAYA, Y.; ENGINYURT, O.; GUNAYDIN, Z. Y.; ISCANLI, M. D. et al. Relationship between red cell distribution width and stroke in patients with stable chronic heart failure: a propensity score matching analysis. **Clin Appl Thromb Hemost**, v. 21, n. 2, p. 160-5, Mar 2015.

KHARROUBI, A. T.; DARWISH, H. M. Diabetes mellitus: The epidemic of the century. **World J Diabetes**, v. 6, n. 6, p. 850-67, Jun 25 2015.

LEVEY, A. S.; STEVENS, L. A.; SCHMID, C. H.; ZHANG, Y. L.; CASTRO, A. F., 3RD; FELDMAN, H. I. et al. A new equation to estimate glomerular filtration rate. **Ann Intern Med**, v. 150, n. 9, p. 604-12, May 05 2009.

LEWINGTON, S.; CLARKE, R.; QIZILBASH, N.; PETO, R.; COLLINS, R. Age-specific relevance of usual blood pressure to vascular mortality: a meta-analysis of individual data for one million adults in 61 prospective studies. **Lancet**, v. 360, n. 9349, p. 1903-13, Dec 14 2002.

LI, W.; LI, X.; WANG, M.; GE, X.; LI, F.; HUANG, B. et al. Association between red cell distribution width and the risk of heart events in patients with coronary artery disease. **Exp Ther Med**, v. 9, n. 4, p. 1508-1514, Apr 2015.

LIBBY, P.; THEROUX, P. Pathophysiology of coronary artery disease. **Circulation**, v. 111, n. 25, p. 3481-8, Jun 28 2005.

LIPPI, G.; CERVELLIN, G.; SANCHIS-GOMAR, F. Red blood cell distribution width and cardiovascular disorders. Does it really matter which comes first, the chicken or the egg? **Int J Cardiol**, v. 206, p. 129-30, Mar 1 2016.

LIPPI, G.; MATTIUZZI, C. The biomarker paradigm: between diagnostic efficiency and clinical efficacy. **Pol Arch Med Wewn**, v. 125, n. 4, p. 282-8, 2015.

LIPPI, G.; PAVESI, F.; BARDI, M.; PIPITONE, S. Lack of harmonization of red blood cell distribution width (RDW). Evaluation of four hematological analyzers. **Clin Biochem**, v. 47, n. 12, p. 1100-3, Aug 2014.

LIPPI, G.; PLEBANI, M. Red blood cell distribution width (RDW) and human pathology. One size fits all. **Clin Chem Lab Med**, v. 52, n. 9, p. 1247-9, Sep 2014.

LOTUFO, P. A. Construção do Estudo Longitudinal de Saúde do Adulto (ELSA-Brasil). **Revista de Saúde Pública**, v. 47, p. 3-9, 2013.

MAHMOOD, S. S.; LEVY, D.; VASAN, R. S.; WANG, T. J. The Framingham Heart Study and the epidemiology of cardiovascular disease: a historical perspective. **Lancet**, v. 383, n. 9921, p. 999-1008, Mar 15 2014.

MAKHOUL, B. F.; KHOURIEH, A.; KAPLAN, M.; BAHOUTH, F.; ARONSON, D.; AZZAM, Z. S. Relation between changes in red cell distribution width and clinical outcomes in acute decompensated heart failure. **Int J Cardiol**, v. 167, n. 4, p. 1412-6, Aug 20 2013.

MALACHIAS, M.; PÓVOA, R.; NOGUEIRA, A.; SOUZA, D.; COSTA, L.; MAGALHÃES, M. 7th Brazilian Guideline of Arterial Hypertension: Chapter 3 - Clinical and Complementary Assessment. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 107, p. 14-17, 2016.

MALUF, C. B. **Associação dos índices de volume plaquetário com perfil de risco cardiovascular e fatores de risco para doença aterosclerótica em participantes do Estudo Longitudinal de**

Saúde do Adulto (ELSA) – Brasil do Estado de Minas Gerais. 2015. 70p (doutorado).
Propedêutica Complementar, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

MIKAEL, L. R.; PAIVA, A. M. G.; GOMES, M. M.; SOUSA, A. L. L.; JARDIM, P.; VITORINO, P. V. O.
et al. Vascular Aging and Arterial Stiffness. **Arq Bras Cardiol**, v. 109, n. 3, p. 253-258, Sep 2017.

MILLS, K. T.; BUNDY, J. D.; KELLY, T. N.; REED, J. E.; KEARNEY, P. M.; REYNOLDS, K. et al. Global
Disparities of Hypertension Prevalence and Control: A Systematic Analysis of Population-Based
Studies From 90 Countries. **Circulation**, v. 134, n. 6, p. 441-50, Aug 9 2016.

MINETTI, M.; AGATI, L.; MALORNI, W. The microenvironment can shift erythrocytes from a
friendly to a harmful behavior: pathogenetic implications for vascular diseases. **Cardiovasc
Res**, v. 75, n. 1, p. 21-8, Jul 01 2007.

MINETTI, M.; MALORNI, W. Redox control of red blood cell biology: the red blood cell as a
target and source of prooxidant species. **Antioxid Redox Signal**, v. 8, n. 7-8, p. 1165-9, Jul-Aug
2006.

MONTAGNANA, M.; CERVELLIN, G.; MESCHI, T.; LIPPI, G. The role of red blood cell distribution
width in cardiovascular and thrombotic disorders. **Clin Chem Lab Med**, v. 50, n. 4, p. 635-41,
Apr 2012.

MOZOS, I. Mechanisms linking red blood cell disorders and cardiovascular diseases. **Biomed
Res Int**, v. 2015, p. 682054, 2015.

NASCIMENTO, M. L. **Por que na relação entre a concentração de hemoglobina globular média
e a contagem de hemácias a avaliação doRDW-SD é importante?** . 2003.

OPARIL, S.; ACELAJADO, M. C.; BAKRIS, G. L.; BERLOWITZ, D. R.; CÍFKOVÁ, R.; DOMINICZAK, A.
F. et al. Hypertension. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 4, p. 18014, 03/22/online 2018.

PATEL, H. H.; PATEL, H. R.; HIGGINS, J. M. Modulation of red blood cell population dynamics is
a fundamental homeostatic response to disease. **Am J Hematol**, v. 90, n. 5, p. 422-8, May
2015.

PATEL, K. V.; FERRUCCI, L.; ERSHLER, W. B.; LONGO, D. L.; GURALNIK, J. M. Red blood cell distribution width and the risk of death in middle-aged and older adults. **Arch Intern Med**, v. 169, n. 5, p. 515-23, Mar 9 2009.

PATEL, K. V.; SEMBA, R. D.; FERRUCCI, L.; NEWMAN, A. B.; FRIED, L. P.; WALLACE, R. B. et al. Red Cell Distribution Width and Mortality in Older Adults: A Meta-analysis. **The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences**, v. 65A, n. 3, p. 258-265, 2010.

PATEL, S. K.; VELKOSKA, E.; FREEMAN, M.; WAI, B.; LANCEFIELD, T. F.; BURRELL, L. M. From gene to protein-experimental and clinical studies of ACE2 in blood pressure control and arterial hypertension. **Front Physiol**, v. 5, p. 227, 2014.

PEREIRA, A. C.; BENSENOR, I. M.; FEDELI, L. M.; CASTILHOS, C.; VIDIGAL, P. G.; MANIERO, V. et al. Delineamento e implementação do biobanco do ELSA-Brasil: estudo prospectivo na população brasileira. **Revista de Saúde Pública**, v. 47, p. 72-78, 2013.

PIERRE, R. V. Red cell morphology and the peripheral blood film. **Clin Lab Med**, v. 22, n. 1, p. 25-61, v-vi, Mar 2002.

POULTER, N. R.; PRABHAKARAN, D.; CAULFIELD, M. Hypertension. **Lancet**, v. 386, n. 9995, p. 801-12, Aug 22 2015.

R CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing**. Vienna, Austria: COMPUTING, R. F. F. S. 2017.

_____. **R: A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria 2018.

RIDKER, P. M.; PAYNTER, N. P.; RIFAI, N.; GAZIANO, J. M.; COOK, N. R. C-reactive protein and parental history improve global cardiovascular risk prediction: the Reynolds Risk Score for men. **Circulation**, v. 118, n. 22, p. 2243-51, 4p following 2251, Nov 25 2008.

RIDKER, P. M.; RIFAI, N.; CLEARFIELD, M.; DOWNS, J. R.; WEIS, S. E.; MILES, J. S. et al. Measurement of C-reactive protein for the targeting of statin therapy in the primary prevention of acute coronary events. **N Engl J Med**, v. 344, n. 26, p. 1959-65, Jun 28 2001.

ROSÁRIO, T. M. D.; SCALA, L. C. N.; FRANÇA, G. V. A. D.; PEREIRA, M. R. G.; JARDIM, P. C. B. V. Prevalência, controle e tratamento da hipertensão arterial sistêmica em Nobres - MT. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 93, p. 672-678, 2009.

ROSS, R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. **N Engl J Med**, v. 340, n. 2, p. 115-26, Jan 14 1999.

ROWAN, R. M.; FRASER, C.; GRAY, J. H.; MCDONALD, G. A. The Coulter Counter Model S Plus--the shape of things to come. **Clin Lab Haematol**, v. 1, n. 1, p. 29-40, 1979.

RUDNICKI, M.; MAYER, G. Significance of genetic polymorphisms of the renin-angiotensin-aldosterone system in cardiovascular and renal disease. **Pharmacogenomics**, v. 10, n. 3, p. 463-76, Mar 2009.

SAHLI, C. A.; BIBI, A.; OUALI, F.; FREDJ, S. H.; DAKHLAOUI, B.; OTHMANI, R. et al. Red cell indices: differentiation between beta-thalassemia trait and iron deficiency anemia and application to sickle-cell disease and sickle-cell thalassemia. **Clin Chem Lab Med**, v. 51, n. 11, p. 2115-24, Nov 2013.

SALVAGNO, G. L.; SANCHIS-GOMAR, F.; PICANZA, A.; LIPPI, G. Red blood cell distribution width: A simple parameter with multiple clinical applications. **Crit Rev Clin Lab Sci**, v. 52, n. 2, p. 86-105, 2015.

SANTULLI, G.; CIPOLLETTA, E.; SORRIENTO, D.; DEL GIUDICE, C.; ANASTASIO, A.; MONACO, S. et al. CaMK4 Gene Deletion Induces Hypertension. **J Am Heart Assoc**, v. 1, n. 4, p. e001081, Aug 2012.

SANTULLI, G.; TRIMARCO, B.; IACCARINO, G. G-protein-coupled receptor kinase 2 and hypertension: molecular insights and pathophysiological mechanisms. **High Blood Press Cardiovasc Prev**, v. 20, n. 1, p. 5-12, Mar 2013.

SCHERR, C.; RIBEIRO, J. P. Gênero, idade, nível social e fatores de risco cardiovascular: considerações sobre a realidade brasileira. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 93, p. e54-e56, 2009.

SCHMIDT, H. H.; HOFMANN, F.; STASCH, J. P. Handbook of Experimental Pharmacology 191. cGMP: generators, effectors and therapeutic implications. Preface. **Handb Exp Pharmacol**, n. 191, p. v-vi, 2009.

SCHMIDT, M. I.; DUNCAN, B. B.; MILL, J. G.; LOTUFO, P. A.; CHOR, D.; BARRETO, S. M. et al. Cohort Profile: Longitudinal Study of Adult Health (ELSA-Brasil). **Int J Epidemiol**, v. 44, n. 1, p. 68-75, Feb 2015.

SERRANO JR., C. V.; TIMERMAN, A.; STEFANINI, E. **Tratado de cardiologia SOCESP**. São paulo: Manole, 2009.

SESSO, H. D.; BURING, J. E.; RIFAI, N.; BLAKE, G. J.; GAZIANO, J. M.; RIDKER, P. M. C-reactive protein and the risk of developing hypertension. **Jama**, v. 290, n. 22, p. 2945-51, Dec 10 2003.

SHAH, N.; PAHUJA, M.; PANT, S.; HANDA, A.; AGARWAL, V.; PATEL, N. et al. Red cell distribution width and risk of cardiovascular mortality: Insights from National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES)-III. **Int J Cardiol**, v. 232, p. 105-110, Apr 1 2017.

SHAO, Q.; LI, L.; LI, G.; LIU, T. Prognostic value of red blood cell distribution width in heart failure patients: a meta-analysis. **Int J Cardiol**, v. 179, p. 495-9, Jan 20 2015.

SHARMA, R.; AGRAWAL, V. V. The Relationship Between Red Blood Cell Distribution Width (RDW CV) And C Reactive Protein (CRP) With The Clinical Outcomes In Non-St Elevation Myocardial Infarction And Unstable Angina Pectoris: A 6 Months Follow Up Study. **2015**, v. 2, p. 5, 2015-05-12 2015.

SIMÃO, A. F.; PRÉCOMA, D. B.; ANDRADE, J. P. D.; CORREA FILHO, H.; SARAIVA, J. F. K.; OLIVEIRA, G. M. M. D. I Diretriz de Prevenção Cardiovascular da Sociedade Brasileira de Cardiologia - Resumo Executivo. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 102, p. 420-431, 2014.

SKJELBAKKEN, T.; LAPPEGARD, J.; ELLINGSEN, T. S.; BARRETT-CONNOR, E.; BROX, J.; LOCHEN, M. L. et al. Red cell distribution width is associated with incident myocardial infarction in a general population: the Tromso Study. **J Am Heart Assoc**, v. 3, n. 4, Aug 18 2014.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE PATOLOGIA CLÍNICA/MEDICINA LABORATORIAL. **Recomendações da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial para coleta de sangue venoso**. Barueri, São paulo: Manole, 2005. ISBN ISBN 978-85-98416-94-6.

STAMLER, J. S., R. NEATON, J. D. Blood pressure, systolic and diastolic, and cardiovascular risks. US population data. **Arch Intern Med**, v. 153, n. 5, p. 598-615, Mar 8 1993.

Standards of medical care in diabetes. **Diabetes Care**, v. 37 Suppl 1, p. S14-80, Jan 2014.

STEPAN, J.; BARODKA, V.; BERKOWITZ, D. E.; NYHAN, D. Vascular stiffness and increased pulse pressure in the aging cardiovascular system. **Cardiol Res Pract**, v. 2011, p. 263585, 2011.

SU, C.; LIAO, L. Z.; SONG, Y.; XU, Z. W.; MEI, W. Y. The role of red blood cell distribution width in mortality and cardiovascular risk among patients with coronary artery diseases: a systematic review and meta-analysis. **J Thorac Dis**, v. 6, n. 10, p. 1429-40, Oct 2014.

TANINDI, A.; TOPAL, F. E.; TOPAL, F.; CELIK, B. Red cell distribution width in patients with prehypertension and hypertension. **Blood Press**, v. 21, n. 3, p. 177-81, Jun 2012.

TONELLI, M.; SACKS, F.; ARNOLD, M.; MOYE, L.; DAVIS, B.; PFEFFER, M. Relation Between Red Blood Cell Distribution Width and Cardiovascular Event Rate in People With Coronary Disease. **Circulation**, v. 117, n. 2, p. 163-168, Jan 15 2008.

VAN DEN BOSSCHE, J.; DEVREESE, K.; MALFAIT, R.; VAN DE VYVERE, M.; WAUTERS, A.; NEEIS, H. et al. Reference intervals for a complete blood count determined on different automated haematology analysers: Abx Pentra 120 Retic, Coulter Gen-S, Sysmex SE 9500, Abbott Cell Dyn 4000 and Bayer Advia 120. **Clin Chem Lab Med**, v. 40, n. 1, p. 69-73, Jan 2002.

VEERANNA, V.; ZALAWADIYA, S. K.; PANAICH, S.; PATEL, K. V.; AFONSO, L. Comparative analysis of red cell distribution width and high sensitivity C-reactive protein for coronary heart disease

mortality prediction in multi-ethnic population: findings from the 1999-2004 NHANES. **Int J Cardiol**, v. 168, n. 6, p. 5156-61, Oct 15 2013.

VEERANNA, V.; ZALAWADIYA, S. K.; PANAICH, S. S.; RAMESH, K.; AFONSO, L. The association of red cell distribution width with glycated hemoglobin among healthy adults without diabetes mellitus. **Cardiology**, v. 122, n. 2, p. 129-32, 2012.

VERBEK, G. M., G. . **Linear Mixed Models for Longitudinal Data**. new York: Springer-Verlag, 2000.

VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 95, p. I-III, 2010.

VISWANATH, D.; HEGDE, R.; MURTHY, V.; NAGASHREE, S.; SHAH, R. Red cell distribution width in the diagnosis of iron deficiency anemia. **Indian J Pediatr**, v. 68, n. 12, p. 1117-9, Dec 2001.

VOS, T.; ALLEN, C.; ARORA, M.; BARBER, R.; BHUTTA, Z.; BROWN, A. et al. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 310 diseases and injuries, 1990-2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. **Lancet**, v. 388, n. 10053, p. 1545-1602, Oct 8 2016.

WALTERS, J. G. G., P. F. . **RDW-SD and RDW-CV: their relationship to RBC distribution curves and anisocytosis**. . Sysmex J Int,, 1993.

WEUVE, J.; MENDES DE LEON, C. F.; BENNETT, D. A.; DONG, X.; EVANS, D. A. The red cell distribution width and anemia in association with prevalent dementia. **Alzheimer Dis Assoc Disord**, v. 28, n. 2, p. 99-105, Apr-Jun 2014.

WILSON, P. W.; D'AGOSTINO, R. B.; LEVY, D.; BELANGER, A. M.; SILBERSHATZ, H.; KANNEL, W. B. Prediction of coronary heart disease using risk factor categories. **Circulation**, v. 97, n. 18, p. 1837-47, May 12 1998.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **World health statistics 2015**. Geneva: WHO: WHO Library Cataloguing-in-Publication Data, 2015.

XANTHOPOULOS, A.; GIAMOZIS, G.; MELIDONIS, A.; KITAI, T.; PARASKEVOPOULOU, E.; PARASKEVOPOULOU, P. et al. Red blood cell distribution width as a prognostic marker in patients with heart failure and diabetes mellitus. **Cardiovasc Diabetol**, v. 16, n. 1, p. 81, Jul 6 2017.

XAVIER, H. T.; IZAR, M. C.; FARIA NETO, J. R.; ASSAD, M. H.; ROCHA, V. Z.; SPOSITO, A. C. et al. V Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 101, p. 1-20, 2013.

YELINOVA, V.; GLAZACHEV, Y.; KHRAMTSOV, V.; KUDRYASHOVA, L.; RYKOVA, V.; SALGANIK, R. Studies of human and rat blood under oxidative stress: changes in plasma thiol level, antioxidant enzyme activity, protein carbonyl content, and fluidity of erythrocyte membrane. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 221, n. 2, p. 300-3, Apr 16 1996.

YOON, H. E.; KIM, S. J.; HWANG, H. S.; CHUNG, S.; YANG, C. W.; SHIN, S. J. Progressive rise in red blood cell distribution width predicts mortality and cardiovascular events in end-stage renal disease patients. **PLoS One**, v. 10, n. 5, p. e0126272, 2015.

ZALAWADIYA, S. K.; VEERANNA, V.; PANAICH, S. S.; AFONSO, L. Red cell distribution width and risk of peripheral artery disease: analysis of National Health and Nutrition Examination Survey 1999-2004. **Vasc Med**, v. 17, n. 3, p. 155-63, Jun 2012.

APÊNDICES

Apêndice 1 – O Estudo Longitudinal de Saúde do Adulto (ELSA- Brasil)

O ELSA - Brasil é um estudo de coorte, prospectivo, composto de 15.105 voluntários. O planejamento desse projeto teve início no ano de 2004 e sua criação surgiu devido à necessidade de se desenvolver estudos multi-institucionais e multidisciplinares que abrangessem a complexidade dos mecanismos de saúde-doença crônica em um contexto social de grande divergência socioeconômica e cultural como no Brasil (Lotufo, 2013).

O estudo tem como principal objetivo avaliar a incidência e os fatores de risco das DCNT, principalmente as DCV e o DM. Além disso, o ELSA-Brasil pretende analisar as possíveis associações entre as DCV e o DM com os fatores: biológicos, comportamentais, ambientais, ocupacionais e sociais. Além de qualificar os profissionais e aprimorar as pesquisas epidemiológicas (Lotufo, 2013).

O projeto é realizado em instituições de ensino superior e pesquisa de seis estados e três regiões do Brasil: região nordeste: Universidade Federal da Bahia (UFBA); região sudeste: Fundação Osvaldo Cruz (FIOCRUZ- Rio de Janeiro), Universidade de São Paulo (USP), Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e Centro Federal de Educação Tecnológico-MG, Universidade Federal do Espírito Santo (UFES) e, região sul, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) (Lotufo, 2013).

A sua linha de base foi composta de homens e mulheres de 35 a 74 anos, totalizando 15.105 servidores públicos das instituições de ensino participantes do estudo. Os critérios de exclusão utilizados no ELSA- Brasil foram: indivíduos com intenção de sair da instituição, grávidas ou aquelas que estiveram há menos de quatro meses, pessoas com grave comprometimento cognitivo ou de comunicação, se aposentado e se residisse fora da região metropolitana correspondente aos centros de estudo. Os voluntários foram submetidos a entrevistas, avaliações clínicas e exames laboratoriais, todas as etapas respeitaram os protocolos padronizados e seguidos nos Centros de Investigação ELSA-Brasil, de forma a manter a uniformidade dos padrões dos procedimentos efetuados.

A realização dos procedimentos e exames foi executada por membros da equipe treinados e certificados pelo projeto. As entrevistas continham informações referentes às

características sociodemográficas, história médica pregressa, história ocupacional, história familiar de doenças, história reprodutiva, acesso ao sistema de saúde, fatores psicossociais, história de peso e da imagem corporal, consumo de alimentos, tabagismo, consumo de álcool, atividade física, medicação, função cognitiva e saúde mental. Durante as entrevistas, avaliações clínicas e exames laboratoriais foram coletado suma importante quantidade de informações, originando um banco de dados com aproximadamente duas mil variáveis por voluntário. Todo material biológico coletado foi armazenado para análises futuras em freezer a -80°C (Aquino *et al.*, 2013). Uma descrição detalhada desse estudo de coorte pode ser encontrada em outras publicações (Aquino *et al.*, 2012; Fedeli, Ligia G *et al.*, 2013; Pereira *et al.*, 2013; Schmidt *et al.*, 2015)

O ELSA-Brasil foi aprovado pelos Comitês de Ética em Pesquisa com Seres Humanos de cada instituição envolvida e pelo Conselho Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) de acordo com o parecer número 186/06. Todos os voluntários assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

Apêndice 2 – Red cell distribution width is associated with cardiovascular risk in the Brazilian Longitudinal Study of Adult Health: a four-year follow-up

Natane Moreira de Carvalho^a; Chams Bicalho Maluf^a; Douglas Roberto Mesquita Azevedo^b; Rodrigo Citton Padilha dos Reis^c; Cristina Dickie de Castilhos^d; Sandhi Maria Barreto^e; Pedro Guatimosim Vidigal^a

^aDepartment of Clinical Pathology, School of Medicine, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Av. Prof. Alfredo Balena, 190. Belo Horizonte - MG - Brasil - Cep 30130-100

^bDepartment of Statistics, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Av. Prof. Alfredo Balena, 190. Belo Horizonte - MG - Brasil - Cep 30130-100

^cDepartment of Statistics, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Av. Bento Gonçalves, 9500. Porto Alegre – RS - Cep 91501-970

^dDepartment of Public Health, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). R. São Manoel, 963. Porto Alegre – RS – Cep 90620-110

^eDepartment of Public Health, School of Medicine, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Av. Prof. Alfredo Balena, 190. Belo Horizonte - MG - Brasil - Cep 30130-100

ABSTRACT

Background: Red cell distribution width (RDW) is a measure of erythrocyte size variability. Recent studies have shown that RDW is a predictive, and prognostic marker of mortality and cardiovascular (CVD) events in the general population and in CVD patients. This study aimed to investigate the association between RDW and CVD risk in a large sample of adults.

Methods: A subsample of CVD free participants who attended the baseline (2008–2010) and the second visit (2012–2014) of the ELSA–Brasil cohort was included

(n=4427). In the cross-sectional approach, multiple regression analysis was used to investigate the association between RDW and the Framingham Risk Score (FRS). A mixed regression for longitudinal analysis was used to evaluate whether baseline RDW predicted changes in CVD risk after about four-year follow up.

Results: Cross-sectional analysis showed that RDW was independently associated with FRS, participants in the fourth-quartile of RDW distribution had a 28% higher FRS than those in the first-quartile RDW ($p < 0.001$). On longitudinal analysis, RDW remained associated with increased FRS, but did not predict changes in the FRS at four-year follow-up. Participants in the fourth-quartile of RDW distribution had a 26% higher FRS than those in the first-quartile RDW ($p < 0.001$).

Conclusions: In this large cohort of adult Brazilians, RDW was independently associated with increased CVD risk, as measured by the FRS, both at baseline and after four-year follow-up. However, RDW did not predict change in CVD risk in this short-term follow up.

Keywords: erythrocyte indices, cardiovascular diseases, risk.

INTRODUCTION

Red cell distribution width (RDW), a quantitative measure of erythrocyte size variability, reflects differences in erythrocyte size within a sample, or the degree of anisocytosis. RDW is a cost-efficient measure that is easy to be obtained as most hematology analyzers provide RDW values as part of a complete blood count test. RDW is routinely used in differential diagnosis of anemic conditions such as thalassemia, megaloblastic anemia, chronic disease-related anemia, and iron deficiency anemia [1].

Recent studies indicate that RDW is a predictor of morbidity and mortality in several conditions, including cancer, autoimmune, respiratory and infectious diseases, end-stage renal disease, diabetes and hepatic diseases among others [2-7]; Moreover, the degree of anisocytosis is thought to be a risk factor for increased mortality and morbidity in the general population, especially in patients suffering from cardiovascular diseases (CVD) [2, 8-10]. In this particular group, increased RDW is believed to be associated with a poor prognosis in the presence of heart failure [5, 11].

According to the World Health Organization (WHO), 17.5 million people die each year from CVD, representing an estimated 31% of all deaths globally. Over 75% of CVD deaths occur in low- and middle-income countries [12]. Thus, CVD prevention is of paramount importance and its effectiveness depends upon the identification of asymptomatic individuals with increased risk of cardiovascular events. The Framingham Risk Score (FRS) is a widely used algorithm that estimates the risk of atherosclerotic disease based on the combination of the following variables: age, diabetes, smoking, hypertension, dyslipidemia, and obesity. The FRS final score estimate the individual 10-year probability of CVD development in patients without a previous diagnosis of CVD [13].

The association between RDW and CVD is fairly instigating. The physiological mechanisms underlying RDW elevation have not been fully elucidated and their investigation has received increasing attention in CVD research. Independent correlations between RDW and clinical conditions, lifestyle behaviors, and biomarkers have been demonstrated in different studies, suggesting that RDW elevation may be related to inflammatory status, oxidative stress, and endothelial dysfunction [14-16]. This study aims to evaluate the association between RDW and FRS in participants of

the Brazilian Longitudinal Study of Adult Health (ELSA–Brasil) using cross-sectional and longitudinal approaches.

METHODS

Study population

ELSA–Brasil is a prospective multicenter cohort study developed in partnership with the Ministry of Health and the Ministry of Science and Technology, and designed to investigate the incidence and risk factors of chronic diseases, particularly CVD and diabetes mellitus (DM), in Brazilian adults [17, 18].

The ELSA–Brasil sample consists of 15105 male and female civil servants aged 35–74 years at baseline assessment (2008–2010) from research centers and higher education institutions in six states from three regions of Brazil. All participants underwent standardized interviews, physical examination, and laboratory testing. A second round of interviews, physical examination, and laboratory testing was conducted between 2012–2014. A third follow-up visit is under way (2016–2018). Detailed information about the ELSA–Brasil design and cohort profile can be found elsewhere [17, 18].

ELSA–Brasil was approved by the Human Research Ethics Committees at the participating institutions and by the National Research Ethics Commission (CONEP). The study protocol conforms to the ethical guidelines of the 1975 Declaration of Helsinki. All participants provided written consent including permission for the storage of biological samples for future studies.

Participants

The sample in this study is a subpopulation of the ELSA–Brasil cohort comprising 5176 volunteers from the Federal University of Minas Gerais (UFMG), Federal Center for Technological Education of Minas Gerais (CEFET-MG), and Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS). These centers were selected due to the availability of automated counters of the same brand and model, i.e., the use of the same RDW measurement methods. Of the 5176 eligible participants, 749 were excluded and the remaining 4427 enrolled participants were stratified for cardiovascular risk by the FRS (Fig. 1). The following variables were considered for risk assessment: age, gender, systolic blood pressure, total cholesterol, high-density lipoprotein (HDL) cholesterol, smoking, diabetes, and use of antihypertensive drugs [13].

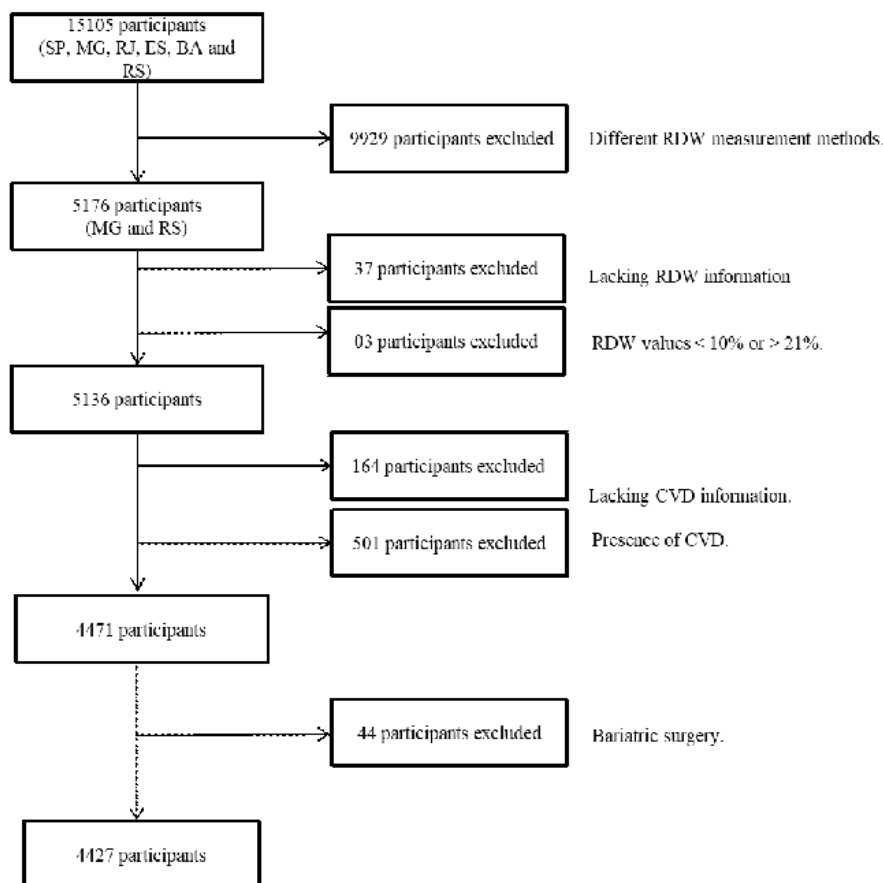


Figure 1. Enrollment flowchart for the study population. SP: São Paulo, MG: Minas Gerais, RJ: Rio de Janeiro, ES: Espírito Santo, BA: Bahia, and RS: Rio Grande do Sul. RDW: red cell distribution width. CVD: cardiovascular disease.

Sociodemographic, clinical and lifestyle variables

Sociodemographic variables including age, gender, skin color/race (White, Black, Brown, Indigenous and Asian descent), level of education, and cigarette and alcohol consumption were self-reported, excessive drinker (men ≥ 210 g alcohol/week; women ≥ 140 g alcohol/week). Additional variables of interest included level of physical activity, based on the International Physical Activity Questionnaire (IPAQ) [19]; body mass index (BMI, kg/m²) [20]; and estimated glomerular filtration rate (eGFR) defined by the Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration (CKD – EPI) equation [21]. DM was defined according to the American Diabetes Association (ADA) criteria

or by self-report of previous diagnosis of DM and/or use of insulin or oral hypoglycemic agents. Impaired glucose tolerance (IGT) was defined as glucose levels > 140 mg/dL and < 200 mg/dL 2 h after overload with 75 g of anhydrous glucose according to ADA criteria. Hypertension was defined by self-report of medical diagnosis of hypertension, or use of antihypertensive agents, or blood pressure equal to or above 140 × 90 mmHg from three different measurements [18]. CVD was defined as reported surgical heart revascularization and/or medical diagnosis of acute myocardial infarction, and/or thrombosis or embolism, and/or atrial fibrillation, and/or peripheral arterial disease, and/or stroke, and/or heart failure, and/or electrocardiography abnormalities consistent with myocardial infarction according to the Minnesota code [22].

Blood samples

Venous blood samples were collected in the morning after a 12- to 14-h fasting period in compliance with the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) – Procedures for the Collection of Diagnostic Blood Specimens by Venipuncture: Approved Standard [23]. Participants were asked to stop taking multivitamins and vitamin C 24 h prior to blood collection and to restrain from physical activity during the fasting period. Venipuncture was performed using a butterfly needle for multiple vacuum collections and tourniquet application for a maximum of 1 min. Sample tubes containing ethylenediaminetetraacetic acid tripotassium salt (EDTA) were identified with bar codes and kept at room temperature until complete blood count (CBC) tests were performed. CBCs were conducted at local UFMG and UFRGS teaching hospital laboratories.

Plasma/serum samples for biochemical analysis were stored at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ and sent to the ELSA–Brasil central laboratory at the University of São Paulo Teaching Hospital [24].

Red cell distribution width (RDW)

RDW was measured on SYSMEX XE 2100 D automated blood analyzers (Sysmex, Kobe, Japan). This system uses electrical impedance for erythrocyte count, size and volume determination and generates a histogram of the coefficient of variation for red cell distribution width (RDW-CV) that is mathematically derived from mean corpuscular volume (MCV). The RDW-CV is expressed in percentage and calculated with the following formula: $\text{RDW-CV (\%)} = \frac{\text{one standard deviation (fL)}}{\text{MCV (fL)}} \times 100$, where one standard deviation (SD) corresponds to the ratio of 1 SD to MCV obtained at 68.2% above the base frequency of erythrocyte volume distribution histograms. Values are expressed as percentages and reference intervals may vary from 10.7–12.9% to 13.8–15.3% (lower and upper ranges, respectively) depending on the analyzer used [25-27].

Biochemical analyses

An Advia 1200 automated biochemistry analyzer (Siemens, Deerfield, IL, USA) was used to determine fasting and overload glucose levels, HDL cholesterol, low-density lipoprotein (LDL) cholesterol, total cholesterol, and triglycerides. C-reactive protein (CRP) was measured using nephelometry on a BN II nephelometer (Siemens, Vienna, Austria). Glycated hemoglobin (HbA1c) was measured using a high-performance liquid chromatography (HPLC) assay on a Variant™ II system (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

Statistical analysis

Variable distributions are reported as medians and interquartile ranges (continuous variables) or absolute values and frequencies (categorical variables). Baseline characteristics were compared across these quartiles using the chi-square test for categorical variables and the analysis of variance (ANOVA) test for continuous variables. The Kolmogorov-Smirnov test was used to assess the normality of continuous variables.

In both cross-sectional and longitudinal analyses, the relationship of RDW and FRS was analyzed using FRS as continuous variable, and RDW as a categorical variables grouped into quartiles: Q1= 11.1–12.69%; Q2= 12.7–12.99%; Q3= 13.0–13.49%; and Q4= 13.5–20.5%. FRS (response variable) was log-transformed to normalize its distribution.

Simple linear regression was used to assess the association between the FRS and the clinical, socio-demographic, lifestyle, and laboratory variables. From this analysis, we identified confounding factors and the adjustment models for the multivariate regression. The variables with potential confounding effect were those that correlated with the RDW with $p < 0.1$ and those that were not part of the FRS to avoid over adjustment. The final model retained all variables which remained associated with the FRS at the level of $p < 0.05$.

The independent association between RDW (explanatory variable) and FRS at baseline was investigated using multiple regression analysis. Having the FRS as the response variable, the following regression models were run: Model 1: RDW; Model 2: Model 1 + skin color/race, level of education, BMI, CRP, and alcohol consumption.

Independent association between RDW and changes in the trajectory of FRS after four-year follow up was investigated using linear mixed models. In these models, the response variable (FRS) was assessed on the baseline visit and at the second visit, whereas explanatory variables were only measured at the baseline visit. Change in FRS with time was assessed by entering an interaction term between RDW and time between visits in the final model, considering the significance level of $p < 0.05$. The following variables were entered in each model: Model 1: RDW; Model 2: model 1 + skin color/race, level of education, BMI, CRP, alcohol consumption and interactions (hemoglobin and time and BMI and time). Linear mixed models easily accommodate unbalanced, unequally spaced observations, and consequently are ideal tools for analyzing longitudinal data [28]. In mixed models, the interaction term between a fixed effect covariate and time evaluates whether this covariate is a predictor of the longitudinal changes in the response variable (FRS). Thus, the interaction terms between time and all of the aforementioned fixed effect variables were evaluated, but only the statistically significant ($p < 0.05$) ones were retained in the final model. In all models, we included the intercept as a random term, which allows each participant's baseline value to vary from the population average, but kept the slope fixed and equal to β_1 .

Model assumptions were investigated following model adjustments. Statistical analyses were performed using R statistical software package version 3.4.2 [29].

RESULTS

Descriptive analysis

The sociodemographic, lifestyle, clinical, and laboratory characteristics of participants stratified by baseline RDW quartiles are shown in Table 1. Median age was 51 years and most participants were women (54.5%), self-declared white (24.4%), had completed higher education (56.5%), and had never smoked (57.7%). Significant differences were observed among the RDW quartiles. There was a gradual increase in the proportion of patients with comorbidities such as DM and hypertension. In addition, among individuals in the 4^o quartile of RDW there were significantly higher frequency of participants who engaged in low-intensity physical activity, smokers, and those with higher total cholesterol and LDL-cholesterol levels (Table 1). Median RDW was 13.0% (interquartile range: 12.7–13.5%; Table 1).

Table 1. Summary of participant characteristics.

Characteristic	RDW quartiles (%)				p-value
	Q1 11.1–12.69 N= 1344	Q2 12.7–12.99 N= 887	Q3 13.0–13.49 N= 1181	Q4 13.5–20.5 N= 1015	
Gender, women	50.2%	52.5%	53.0%	62.0%	<0.001
Age	51.0 [44.0-58.0]	51.0 [45.0-59.0]	52.0 [46.0-58.0]	52.0 [46.0-59.5]	<0.001
Self-rated race/skin color					<0.001
Black	63.8%	62.8%	60.0%	47.7%	
Brown	3.94%	4.40%	3.13%	2.86%	
White	23.1%	23.4%	23.4%	28.3%	
Other ¹	9.08%	9.36%	13.5%	21.2%	
Level of education					0.002
University degree	59.6%	58.9%	58.1%	51.5%	
Incomplete elementary school	3.57%	5.07%	5.17%	6.21%	
Complete elementary school	5.58%	6.76%	6.35%	6.31%	
Complete high school	31.2%	29.3%	30.4%	36.0%	
Smoking status					<0.001

Never smoked	60.1%	57.3%	58.2%	54.3%	
Former smoker	60.1%	57.3%	58.2%	54.3%	
Current smoker	11.1%	10.1%	12.8%	17.0%	
Physical activity ²					0.507
Low	74.3%	73.7%	74.9%	76.3%	
Moderate	18.0%	19.1%	17.4%	17.9%	
High	7.67%	7.22%	7.79%	5.74%	
Alcohol consumption ³ , yes	9.23%	8.23%	8.73%	7.88%	0.675
BMI (kg/m ²)	25.4 [23.1-28.1]	25.9 [23.4-29.0]	26.2 [23.6-29.3]	27.0 [24.1-30.5]	<0.001
Diabetes mellitus ⁴	14.0%	15.3%	14.9%	19.3%	0.003
Hypertension ⁵	10.5%	10.5%	10.8%	13.6%	0.067
Hemoglobin (g/dL)	14.4 [13.5-15.4]	14.2 [13.4-15.2]	14.2 [13.3-15.2]	13.7 [12.7-14.7]	<0.001
MCV (fL)	89.3 [86.9-91.8]	88.6 [86.3-90.7]	88.1 [85.5-90.8]	86.6 [82.8-89.6]	<0.001
Total cholesterol (mg/dL)	206 [184-232]	210 [183-241]	212 [187-239]	213 [186-240]	0.018
HDL cholesterol (mg/dL)	53.0 [45.0-63.0]	53.5 [45.0-64.0]	55.0 [46.0-65.0]	56.0 [47.0-66.5]	<0.001
CRP (mg/dL)	1.16 [0.60-2.46]	1.31 [0.70-2.66]	1.47 [0.74-3.19]	2.06 [0.91-4.42]	<0.001
eGFR ⁶ > 60 mL/min	96.6%	95.7%	95.5%	95.7%	0.523

Continuous variables presented as median and interquartile ranges [IQ]. Categorical variables: frequencies (%).

¹Indigenous, Asian, and individuals who did not declare skin color/race; ²Physical activity based on the International Physical Activity Questionnaire (IPAQ); ³Excessive drinker (men \geq 210 g alcohol/week; women \geq 140 g alcohol/week); ⁴Diabetes mellitus: defined according to American Diabetes Association (ADA) criteria or by self-report of previous diagnosis of DM and/or use of insulin or oral hypoglycemic agents; ⁵Hypertension: defined as any of the following: self-report of previous diagnosis of hypertension, or use of antihypertensive agents, or blood pressure \geq 140 \times 90 mmHg from three measurements; ⁶Estimated glomerular filtration rate defined by the Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration (CKD - EPI) equation.

BMI, body mass index; MCV, mean corpuscular volume; HDL, high-density lipoprotein; CRP, c-reactive protein; eGFR, estimated glomerular filtration rate.

Cross-sectional analysis

Multiple regression models revealed an independent association between RDW and FRS even after adjusting for confounders, with an upward gradient, as the FRS increases with increasing RDW quartile, although only the 4th quartile remained statistically significant in the fully adjusted model (model 2). In total, model 2 explained about 30% of the variability in the FRS in the study sample (Table 2).

Table 2. Multiple regression models for the association between RDW and cardiovascular risk by FRS quartile adjusted for different variables.

Model	FRS				R ² Aj
	Q1 11.1–12.69 N= 1343	Q2 12.7–12.99 N= 887	Q3 13.0–13.49 N= 1181	Q4 13.5–20.5 N= 1015	
	e ^β ; p-value [95% CI]	e ^β ; p-value [95% CI]	e ^β ; p-value [95% CI]	e ^β ; p-value [95% CI]	
1 ¹	Reference	1.053; 0.202 [0.972–1.141]	1.084; 0.032 [1.007–1.167]	1.167; ≤ 0.001 [1.076–1.256]	0.0034
2 ²	Reference	1.06; 0.09 [0.99–1.134]	1.079; 0.171 [1.013–1.149]	1.28; ≤ 0.001 [1.197–1.37]	0.2979

Regression coefficients (β) were log-transformed.

¹Model 1: crude model adjusted for RDW; ²Model 2: model 1 + hemoglobin, race, level of education, BMI, CRP, physical activity, and alcohol consumption.

RDW, red cell distribution width; FRS, Framingham Risk Score; e^β, exponential of beta coefficient; BMI, body mass index; CRP, C-reactive protein. Multiple linear regression significant at $p \leq 0.05$.

Longitudinal analysis

Linear mixed regression models also confirmed the findings of the cross-sectional analysis, showing significant associations between RDW and FRS after adjusting for confounding variables, both at baseline and at the second visit. The interaction term between the RDW and the covariable time was not statistically significant, indicating that the slope of the association did not change over time. Thus, although model two accounts for about 26% of the ERF variability, RDW was not able to predict a

worsening in the cardiovascular risk in the longitudinal trajectory of these individuals over four years (Table 3).

Table 3. Mixed regression models for the association between RDW and cardiovascular risk by FRS quartile adjusted for different variables.

	FRS			
	Q1 11.1–12.69 N= 1343	Q2 12.7–12.99 N= 887	Q3 13.0–13.49 N= 1181	Q4 13.5–20.5 N= 1015
Model	e^{β} ; p-value [95% CI]	e^{β} ; p-value [95% CI]	e^{β} ; p-value [95% CI]	e^{β} ; p-value [95% CI]
1 ¹	Reference	1.046; 0.249 [0.968–1.129]	1.08; 0.033 [1.006–1.159]	1.148; \leq 0.001 [1.066–1.236]
2 ²	Reference	1.052; 0.121 [0.986–1.122]	1.075; 0.161 [1.013–1.141]	1.264; \leq 0.001 [1.186–1.348]
2 ²	interaction terms time	(p-value) 0.399	(p-value) 0.488	(p-value) 0.109

Regression coefficients (β) were log-transformed.

¹Model 1: crude model adjusted for follow-up time and RDW; ²Model 2: model one + hemoglobin, race, level of education, BMI, CRP, physical activity, alcohol consumption, and hemoglobin \times time and BMI \times time interactions.

RDW, red cell distribution width; FRS, Framingham Risk Score; e^{β} , exponential of beta coefficient; MCV, mean corpuscular volume; TSH, thyroid-stimulating hormone; ALT, alanine aminotransferase; BMI, body mass index; CRP, C-reactive protein Mixed linear regression significant at $p \leq 0.05$.

DISCUSSION

Few studies have explored the association between high RDW and cardiovascular risk, even though RDW has been demonstrated to be independently associated with increasing cardiovascular morbidity and mortality. This is the first study to investigate the independent association between increased RDW and cardiovascular risk estimated by FRS in middle income country population using both cross-sectional and longitudinal approaches.

In this study, the cardiovascular risk of participants in the fourth-quartile RDW was on average 26% higher compared to those in the first-quartile RDW, both at baseline and after four-year follow-up, replicating the result observed in cross-sectional analysis. For instance, a RDW $\geq 13.5\%$ would increase the 10-year CVD risk from 10% to 12.6%, which may considerably influence clinical decision making. Shah et al. (2017) [30] found that RDW values greater than 14.5% were associated with coronary disease, whereas Sharma and Agrawal (2015) [31] reported that an RDW $> 14\%$ was associated with elevated CRP, non-ST elevation myocardial infarction, and unstable angina. In our study, we observed an RDW $\geq 13.5\%$ (Q4) to be associated with a higher CVD risk as measured by the 10-year FRS.

In our study, the interaction term between RDW and CVD risk showed that RDW did not predict significant change in CVD risk over the four-year follow-up period. A 14-year follow up study of 7005 healthy subjects classified at baseline, according to the FRS for coronary heart disease (CHD), found that the addition of RDW to the CHD-FRS helped to reclassify intermediate-risk category to high-risk category of death from CHD. The authors concluded that RDW improved the accuracy of FRS in predicting cardiovascular mortality [30]. It is important to highlight that the length of follow-up was much longer than in our study, besides the end point being mortality and not change in FRS. The four-year follow-up in the present study might be insufficient to capture the influence of RDW on the FRS trend over time.

The independent association between RDW and CVD has been demonstrated in different studies and population groups. A systematic review and meta-analysis of 80216 participants and 22 studies from different countries showed that high RDW values are associated with increased risks of mortality and cardiovascular events in patients with CHD [32]. Another systematic review and meta-analysis of 17 studies

enrolling 18288 participants from different countries demonstrated that individuals with acute or chronic heart failure and increased RDW have a poorer prognosis compared to those with low RDW values [5]. Moreover, diverse studies with large cohorts and 5- to 15-year follow-up showed that RDW is associated with increased risk of myocardial infarction and death from CHD in adults independent of other risk factors [33, 34] and in elderly individuals not suffering from age-related diseases [35]. Thus, RDW has been demonstrated to be associated with CVD in several studies.

The underlying pathophysiological mechanisms linking RDW to CVD risk have not been fully determined, even though increased RDW has been associated with an inflammatory status [36, 37]. To reduce the risk of confounding, we adjusted the models for several variables that may potentially affect the risk of cardiovascular events. We also adjusted the analysis for CRP, a biomarker of systemic low grade inflammation, a potential mediator in the association between RDW and CVD risk. In the model without CRP (data not shown), both cross-sectional and longitudinal analyses, RDW remained independently correlated with FRS. This result shows that even though inflammation has been implicated in anisocytosis and may directly impact cardiovascular risk, in our study it did not affect the association between RDW and FRS.

This study has some limitations. Potential confounding factors such as ferritin, vitamin B12, and folate serum levels were not measured and thus not included in the analysis. The multicenter nature of the ELSA–Brasil study and the limited stability of whole blood samples required that blood tests be performed in different laboratories in each ELSA–Brasil investigation centers. However, we found no statistical difference in the median RDW and interquartile ranges between participants from UFMG (13.1%, 12.7–

13.6%) and UFRGS (13.0%, 12.7–13.5%) research centers ($p = 0.18$). Moreover, differences in cell counting instruments and RDW determination between laboratories precluded the inclusion of the entire ELSA–Brasil cohort in this study.

In this large cohort of adult Brazilians, RDW was independently associated with increased CVD risk as measured by the FRS both at baseline and after four-year follow-up, but did not predict change in the FRS with time. Because anisocytosis appears directly involved in the pathophysiology of CVD, the prognostic value of RDW should be considered in the preventive management of CVD. Being a hematological index, RDW has several advantages over conventional CVD diagnostic and prognostic biomarkers, including low intra-individual biological variation, low cost, ease of interpretation, and wide availability, all of which argue in favor of its use in clinical practice. The increase in the follow up duration of ELSA-Brasil cohort will allow to clarify if RDW predict worsening of CVD risk and help to improve the predictive accuracy of current guidelines for CVD risk stratification. Additionally, further studies are needed to investigate the physiological mechanisms underlying the associations described in this study.

DECLARATION OF CONFLICTING INTERESTS

The Authors declare that there is no conflict of interest.

REFERENCES

- [1] Bessman JD, Gilmer PR, Jr., Gardner FH. Improved classification of anemias by MCV and RDW. *American journal of clinical pathology*. 1983;80:322-6.
- [2] Patel KV, Ferrucci L, Ershler WB, Longo DL, Guralnik JM. Red blood cell distribution width and the risk of death in middle-aged and older adults. *Archives of internal medicine*. 2009;169:515-23.

- [3] Hu ZD, Chen Y, Zhang L, Sun Y, Huang YL, Wang QQ, et al. Red blood cell distribution width is a potential index to assess the disease activity of systemic lupus erythematosus. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. 2013;425:202-5.
- [4] Engstrom G, Smith JG, Persson M, Nilsson PM, Melander O, Hedblad B. Red cell distribution width, haemoglobin A1c and incidence of diabetes mellitus. *J Intern Med*. 2014;276:174-83.
- [5] Huang YL, Hu ZD, Liu SJ, Sun Y, Qin Q, Qin BD, et al. Prognostic value of red blood cell distribution width for patients with heart failure: a systematic review and meta-analysis of cohort studies. *PloS one*. 2014;9:e104861.
- [6] Weuve J, Mendes de Leon CF, Bennett DA, Dong X, Evans DA. The red cell distribution width and anemia in association with prevalent dementia. *Alzheimer disease and associated disorders*. 2014;28:99-105.
- [7] Yoon HE, Kim SJ, Hwang HS, Chung S, Yang CW, Shin SJ. Progressive rise in red blood cell distribution width predicts mortality and cardiovascular events in end-stage renal disease patients. *PloS one*. 2015;10:e0126272.
- [8] Perlstein TS, Weuve J, Pfeffer MA, Beckman JA. Red blood cell distribution width and mortality risk in a community-based prospective cohort. *Archives of internal medicine*. 2009;169:588-94.
- [9] Chen PC, Sung FC, Chien KL, Hsu HC, Su TC, Lee YT. Red blood cell distribution width and risk of cardiovascular events and mortality in a community cohort in Taiwan. *American journal of epidemiology*. 2010;171:214-20.
- [10] Danese E, Lippi G, Montagnana M. Red blood cell distribution width and cardiovascular diseases. *Journal of thoracic disease*. 2015;7:E402-11.
- [11] Shao Q, Li L, Li G, Liu T. Prognostic value of red blood cell distribution width in heart failure patients: a meta-analysis. *International journal of cardiology*. 2015;179:495-9.
- [12] World Health Organization. *World health statistics 2015*. Geneva: WHO: WHO Library Cataloguing-in-Publication Data; 2015.
- [13] D'Agostino RB, Sr., Vasan RS, Pencina MJ, Wolf PA, Cobain M, Massaro JM, et al. General cardiovascular risk profile for use in primary care: the Framingham Heart Study. *Circulation*. 2008;117:743-53.
- [14] Zalawadiya SK, Veeranna V, Panaich SS, Afonso L. Red cell distribution width and risk of peripheral artery disease: analysis of National Health and Nutrition Examination Survey 1999-2004. *Vascular medicine (London, England)*. 2012;17:155-63.
- [15] Li W, Li X, Wang M, Ge X, Li F, Huang B, et al. Association between red cell distribution width and the risk of heart events in patients with coronary artery disease. *Experimental and therapeutic medicine*. 2015;9:1508-14.

- [16] Mozos I. Mechanisms linking red blood cell disorders and cardiovascular diseases. *BioMed research international*. 2015;2015:682054.
- [17] Aquino EM, Barreto SM, Bensenor IM, Carvalho MS, Chor D, Duncan BB, et al. Brazilian Longitudinal Study of Adult Health (ELSA-Brasil): objectives and design. *American journal of epidemiology*. 2012;175:315-24.
- [18] Schmidt MI, Duncan BB, Mill JG, Lotufo PA, Chor D, Barreto SM, et al. Cohort Profile: Longitudinal Study of Adult Health (ELSA-Brasil). *International journal of epidemiology*. 2015;44:68-75.
- [19] Craig CL, Marshall AL, Sjoström M, Bauman AE, Booth ML, Ainsworth BE, et al. International physical activity questionnaire: 12-country reliability and validity. *Medicine and science in sports and exercise*. 2003;35:1381-95.
- [20] World Health Organization. Defining the problem of overweight and obesity. In: World Health Organization. *Obesity: preventing and managing the global epidemic: report of a Who Consultation*. Geneva2000. p. p. 241-3. .
- [21] Levey AS, Stevens LA, Schmid CH, Zhang YL, Castro AF, 3rd, Feldman HI, et al. A new equation to estimate glomerular filtration rate. *Annals of internal medicine*. 2009;150:604-12.
- [22] Blackburn H, Keys A, Simonson E, Rautaharju P, Punsar S. The electrocardiogram in population studies. A classification system. *Circulation*. 1960;21:1160-75.
- [23] CLSI. *Procedures for the Collection of Diagnostic Blood Specimens by Venipuncture*. Document H3-A6. Wayne (PA): CLSI; 2007.
- [24] Fedeli LG, Vidigal PG, Leite CM, Castilhos CD, Pimentel RA, Maniero VC, et al. Logística de coleta e transporte de material biológico e organização do laboratório central no ELSA-Brasil. *Revista de Saúde Pública*. 2013;47:63-71.
- [25] Van den Bossche J, Devreese K, Malfait R, Van de Vyvere M, Wauters A, Neelis H, et al. Reference intervals for a complete blood count determined on different automated haematology analysers: Abx Pentra 120 Retic, Coulter Gen-S, Sysmex SE 9500, Abbott Cell Dyn 4000 and Bayer Advia 120. *Clinical chemistry and laboratory medicine*. 2002;40:69-73.
- [26] Buttarello M, Plebani M. Automated blood cell counts: state of the art. *American journal of clinical pathology*. 2008;130:104-16.
- [27] Caporal FA, Comar SR. Evaluation of RDW-CV, RDW-SD, and MATH-1SD for the detection of erythrocyte anisocytosis observed by optical microscopy. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*. 2013;49:324-31.
- [28] Verbeke GM, G. . *Linear Mixed Models for Longitudinal Data*. new York: Springer-Verlag; 2000.
- [29] R Core Team. *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria2018.

- [30] Shah N, Pahuja M, Pant S, Handa A, Agarwal V, Patel N, et al. Red cell distribution width and risk of cardiovascular mortality: Insights from National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES)-III. *International journal of cardiology*. 2017;232:105-10.
- [31] Sharma R, Agrawal VV. The Relationship Between Red Blood Cell Distribution Width (RDW CV) And C Reactive Protein (CRP) With The Clinical Outcomes In Non-St Elevation Myocardial Infarction And Unstable Angina Pectoris: A 6 Months Follow Up Study. 2015. 2015;2:5.
- [32] Su C, Liao LZ, Song Y, Xu ZW, Mei WY. The role of red blood cell distribution width in mortality and cardiovascular risk among patients with coronary artery diseases: a systematic review and meta-analysis. *Journal of thoracic disease*. 2014;6:1429-40.
- [33] Veeranna V, Zalawadiya SK, Panaich S, Patel KV, Afonso L. Comparative analysis of red cell distribution width and high sensitivity C-reactive protein for coronary heart disease mortality prediction in multi-ethnic population: findings from the 1999-2004 NHANES. *International journal of cardiology*. 2013;168:5156-61.
- [34] Skjelbakken T, Lappegard J, Ellingsen TS, Barrett-Connor E, Brox J, Lochen ML, et al. Red cell distribution width is associated with incident myocardial infarction in a general population: the Tromso Study. *Journal of the American Heart Association*. 2014;3.
- [35] Patel KV, Semba RD, Ferrucci L, Newman AB, Fried LP, Wallace RB, et al. Red Cell Distribution Width and Mortality in Older Adults: A Meta-analysis. *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*. 2010;65A:258-65.
- [36] Ridker PM, Rifai N, Clearfield M, Downs JR, Weis SE, Miles JS, et al. Measurement of C-reactive protein for the targeting of statin therapy in the primary prevention of acute coronary events. *The New England journal of medicine*. 2001;344:1959-65.
- [37] Sesso HD, Buring JE, Rifai N, Blake GJ, Gaziano JM, Ridker PM. C-reactive protein and the risk of developing hypertension. *Jama*. 2003;290:2945-51.

Apêndice 3 – Comprovante de submissão artigo



Natane Moreira de Carvalho <natanecarvalho@gmail.com>

Submission Confirmation for Red cell distribution width is associated with cardiovascular risk in the Brazilian Longitudinal Study of Adult Health: a four-year follow-up

EJPC <em@editorialmanager.com>

4 de janeiro de 2019 13:52

Responder a: EJPC <ejpceditorialoffice@sagepub.com>

Para: Natane Moreira de Carvalho <natanecarvalho@gmail.com>

Dear Dr de Carvalho,

Your submission entitled "Red cell distribution width is associated with cardiovascular risk in the Brazilian Longitudinal Study of Adult Health: a four-year follow-up" has been received by journal European Journal of Preventive Cardiology

You will be able to check on the progress of your paper by logging on to Editorial Manager as an author. The URL is <https://ejpc.editorialmanager.com/>.

Your manuscript will be given a reference number once an Editor has been assigned.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Editorial Office Staff
European Journal of Preventive Cardiology

In compliance with data protection regulations, please contact the publication office if you would like to have your personal information removed from the database.

ANEXOS

Anexo 1 – Folha de Aprovação



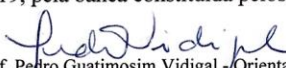
FOLHA DE APROVAÇÃO

RDW E O RISCO DE DOENÇA CARDIOVASCULAR EM PARTICIPANTES DO ESTUDO LONGITUDINAL DE SAÚDE DO ADULTO (ELSA-BRASIL)

NATANE MOREIRA DE CARVALHO

Tese submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em PATOLOGIA, como requisito para obtenção do grau de Doutor em PATOLOGIA, área de concentração PATOLOGIA INVESTIGATIVA.

Aprovada em 29 de abril de 2019, pela banca constituída pelos membros:

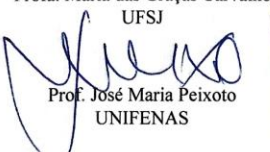

 Prof. Pedro Guatimosim Vidigal - Orientador
 UFMG


 Prof. Chams Bicalho Maluf - Coorientadora
 UFMG


 Prof. Andrea Maria Camargos Rocha
 UFMG


 Prof. Luciana de Godvêa Viana
 UFMG


 Prof. Maria das Graças Carvalho
 UFSJ


 Prof. José Maria Peixoto
 UNIFENAS

Belo Horizonte, 29 de abril de 2019.

Anexo 2 – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG

Universidade Federal de Minas Gerais
Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG - COEP

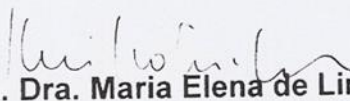
Parecer nº. ETIC 186/06

Interesse: Prof. (a) Sandhi Maria Barreto
Depto. De Medicina Preventiva e Social
Faculdade de Medicina -UFMG

DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP, aprovou no dia 28 de junho de 2006 o projeto de pesquisa intitulado **“ELSA - Estudo longitudinal da saúde do adulto.”** bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido do referido projeto.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.

pi 
Profa. Dra. Maria Elena de Lima Perez Garcia
Presidente do COEP/UFMG

Fls. nº 109
Rubrica f

MINISTÉRIO DA SAÚDE
Conselho Nacional de Saúde
Comissão Nacional de Ética em Pesquisa

CARTA Nº 976 CONEP/CNS/MS

Brasília, 04 de agosto de 2006.

Senhora Coordenadora,

Tendo a CONEP recebido desse CEP o projeto de pesquisa "*Estudo Longitudinal de Saúde do Adulto – ELSA*" Registro CEP-HU/USP 659/06 - CAAE 0016.1.198.000-06, Registro Sipar MS: nº 25000.083729/2006-38, Registro CONEP nº 13065, verifica-se que:

Trata-se de protocolo a ser desenvolvido por consórcio vencedor da Chamada Pública DECIT/MS/FINEP/CNPq que foi constituído por sete instituições de ensino superior e pesquisa de seis estados, das regiões Nordeste (Universidade Federal da Bahia), Sudeste (FIOCRUZ/RJ, USP, UERJ, UFMG e UFES) e Sul (UFRS). Será um estudo de coorte de 15 mil funcionários de instituições públicas com idade igual ou superior a 35 anos. A coorte será acompanhada anualmente para verificação do estado geral e, a cada três anos, será chamada para avaliações mais detalhadas que incluem exames clínicos. Os sujeitos de pesquisa serão entrevistados por pessoas treinadas e certificadas e os exames serão realizados por profissionais de saúde. O estudo tem como objetivos principais: estimar a incidência do diabetes e das doenças cardiovasculares e estudar sua história natural; investigar associações entre fatores biológicos, comportamentais, ambientais, ocupacionais, psicológicos e sociais relacionados a essas doenças e complicações decorrentes, buscando compor modelo causal que contemple suas inter-relações; descrever a evolução temporal desses fatores e os determinantes dessa evolução; identificar modificadores de efeito das associações observadas; identificar diferenciais nos padrões de risco entre os centros participantes que possam expressar variações regionais relacionadas a essas doenças no país. Dentre os objetivos secundários consta "*estocar material biológico, para estudos futuros com diversos tipos de marcadores relacionados à inflamação, coagulação, disfunção endotelial, resistência à insulina, obesidade central, estresse e fatores de risco tradicionais, bem como prover a extração de DNA para exames genéticos futuros*". De acordo com informação da pág. 11 do protocolo, item "coleta de sangue", as amostras de sangue serão estocadas para

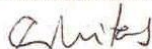
Fls. nº 110
 Rubrica f

Cont. Carta CONEP nº 976/2006

exames adicionais e formação de banco de DNA. Haverá um laboratório central que fará as "determinações básicas do estudo em amostras encaminhadas pelos centros de investigação", as "determinações simples" serão feitas nos próprios laboratórios. O banco de material biológico está em fase de planejamento com local e coordenador a serem definidos.

Diante do exposto, embora nos objetivos do estudo verifica-se que haverá também pesquisa genética, pelas informações do protocolo tal pesquisa não será realizada no momento, não estando descrito ainda (nem no protocolo, nem no Termo de Consentimento Livre e Esclarecido-TCLE) os procedimentos para tal. Portanto, nesse primeiro momento do estudo não se trata de projeto da área temática especial "genética humana" (Grupo I), conforme registrado na folha de rosto, mas sim, do grupo III. Nesse caso, a aprovação ética é delegada ao Comitê de Ética em Pesquisa da instituição, devendo ser seguido o procedimento para projetos do grupo III, conforme o fluxograma disponível no site : <http://conselho.saude.gov.br> e no Manual Operacional para CEP. Não cabe, portanto, a referência a CONEP no 3º parágrafo da pág. 1 e no 6º parágrafo da pág.2 do TCLE. Evidenciamos, entretanto, que o armazenamento e utilização de materiais biológicos humanos no âmbito de projetos de pesquisa está regulamentado pela Resolução CNS 347/2005 e que o projeto em questão deve incluir as determinações dessa resolução. Quando for elaborado o protocolo para os estudos genéticos, deverá também ser cumprida a Resolução CNS 340/04 incluindo obtenção de TCLE específico. Em se tratando de pesquisa com funcionários de instituições públicas, cabe ressaltar o disposto no item IV.3 "b" da Res. 196/96.

Atenciosamente,



CORINA BONTEMPO DUCA DE FREITAS
 Secretária Executiva da
 COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA

À Sua Senhoria

Sr(a) Maria Teresa Zulini da Costa
 Coordenadora Comitê de Ética em Pesquisas
 Hospital Universitário da Universidade de São Paulo - HU/USP
 Av. Profº Lineu Prestes, 2565
 Cidade Universitária São Paulo
 Cep:05.508-900

C/ cópia para os CEPs: UFBA, FIOCRUZ/RJ, UERJ, UFMG, UFES e UFRS

Anexo 3 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido



ESTUDO LONGITUDINAL DE SAÚDE DO ADULTO – Elsa Brasil

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

Apresentação do estudo:

O Estudo Longitudinal de Saúde do Adulto – Elsa Brasil – é uma pesquisa sobre doenças crônicas que acometem a população adulta, principalmente as doenças cardiovasculares e o diabetes. É um estudo pioneiro no Brasil por ser realizado em várias cidades e por acompanhar as pessoas estudadas por um longo período de tempo. Graças a pesquisas semelhantes desenvolvidas em outros países, hoje se sabe, por exemplo, da importância de cuidados à pressão arterial e à dieta para a prevenção dessas doenças,

Objetivos do estudo:

O Elsa Brasil investigará fatores que podem levar ao desenvolvimento dessas doenças, ou ao seu agravamento, visando sugerir medidas mais eficazes de prevenção ou tratamento. Os fatores investigados incluem aspectos relacionados aos hábitos de vida, família, trabalho, lazer e saúde em geral, inclusive fatores genéticos,

Instituições envolvidas no estudo:

O Elsa Brasil envolverá 15,000 funcionários de instituições públicas de ensino e pesquisa localizadas em seis estados brasileiros (BA, ES, MG, RJ, RS e SP)¹. É coordenado por representantes de cada Centro de Investigação, do Ministério da Saúde e do Ministério da Ciência e Tecnologia, tendo sido aprovado pelos Comitês de Ética em Pesquisa dos seis centros. Em Salvador, o estudo está sob a responsabilidade da Universidade Federal da Bahia, sob a coordenação do Instituto de Saúde Coletiva,

Participação no estudo:

O/A Sr./a é convidado/a a participar do Elsa Brasil, que envolve o acompanhamento dos participantes por pelo menos sete anos, com a realização de entrevistas, de exames e medidas que ocorrerão em várias etapas,

Inicialmente, o/a Sr./a fará a primeira parte da entrevista preferencialmente em sua unidade de trabalho e será agendado/a para comparecer ao Centro de Investigação Elsa (CI-BA), situado na Av. Araújo Pinho nº 513, Canela, em três momentos: o primeiro com duração de cerca de quatro horas pela manhã, e os outros dois à tarde, com duração prevista em uma hora cada. No CI-BA, o/a Sr./a, fará a segunda parte da entrevista, realizará algumas medidas (peso, altura, circunferência de cintura, quadril e pescoço e pressão arterial), exame de urina de 12 horas noturnas, ultrassom do abdome e carótidas, ecocardiograma, eletrocardiograma, fotografia do fundo de olho e exames especializados de fisiologia cardiovascular (Variabilidade da Frequência Cardíaca e Velocidade da Onda do Pulso), Realizará também exames de

¹ Fundação Osvaldo Cruz (Fiocruz), Universidade de São Paulo (USP), Universidade Federal da Bahia (UFBA), Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Universidade Federal do Espírito Santo (UFES) e Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

sangue², para os quais, serão feitas duas coletas: a primeira quando chegar, em jejum de 12 horas, e a segunda, após duas horas da ingestão de uma bebida doce padrão (exceto os diabéticos que receberão um lanche específico em substituição), O total de sangue coletado será aproximadamente de 65 ml, e não traz inconveniências para adultos, Apenas um leve desconforto pode ocorrer associado à picada da agulha, Algumas vezes pode haver sensação momentânea de tontura ou pequena reação local, mas esses efeitos são passageiros e não oferecem riscos, A maioria desses exames já faz parte da rotina médica e nenhum deles emite radiação,

Caso necessário, será solicitada sua liberação para participar da pesquisa em horário de trabalho,

A coleta de sangue segue rotinas padronizadas e será realizada, assim como os demais procedimentos, por pessoal capacitado e treinado para este fim, supervisionados por profissional qualificado que poderá orientá-lo no caso de dúvida, ou alguma outra eventualidade,

Após esta primeira etapa do estudo, o/a Sr/a, será periodicamente contatado/a por telefone, correspondência ou e-mail para acompanhar as modificações no seu estado de saúde e para obtenção de informações adicionais, Estão previstas novas visitas ao CI-BA a cada três anos, Por isso, é muito importante informar seu novo endereço e telefone em caso de mudança,

Para poder monitorar melhor sua situação de saúde, é essencial obter detalhes clínicos em registros de saúde, Assim, necessitamos obter informações da UFBA e de outras instituições do sistema de saúde, a respeito da ocorrência de hospitalizações, licenças médicas, eventos de saúde, aposentadoria, ou afastamento de qualquer natureza, Para isso é imprescindível que nos autorize por escrito o acesso às mesmas ao final deste documento, Infelizmente, sem essa autorização, não será possível sua participação no estudo pois dela depende a confirmação de eventos clínicos,

Armazenamento de material biológico:

Serão armazenadas amostras de sangue, urina e ácido desoxirribonucleico (DNA) por um período de cinco anos, sem identificação nominal, de forma segura e em locais especialmente preparados para a conservação das mesmas, Assim como em outras pesquisas no país e no mundo, essas amostras são fundamentais para futuras análises que possam ampliar o conhecimento sobre as doenças em estudo, contribuindo para o avanço da ciência,

Análises adicionais, de caráter genético ou não, que não foram incluídas nos objetivos definidos no protocolo original da pesquisa, somente serão realizadas mediante a apresentação de projetos de pesquisa específicos, aprovados pelo

²Hemograma completo, exames diagnósticos para diabetes (glicose e insulina em jejum e pós-ingestão e teste de tolerância à glicose), creatinina, dosagem de lipídios, hormônios associados ao diabetes ou à doença cardiovascular e provas de atividade inflamatória.

Comitê Diretivo e pelos Comitês de Ética em Pesquisa de cada uma das instituições envolvidas, incluindo a assinatura de novos Termos de Consentimento Livre e Esclarecido,

Seus direitos como participante:

Sua participação é inteiramente voluntária, sendo fundamental que ocorra em todas as etapas do estudo, Entretanto, se quiser, poderá deixar de responder a qualquer pergunta durante a entrevista, recusar-se a fazer qualquer exame, solicitar a substituição do/a entrevistador/a, ou deixar de participar da pesquisa a qualquer momento,

Não será feito qualquer pagamento pela sua participação e todos os procedimentos realizados serão inteiramente gratuitos, Os participantes poderão ter acesso aos resultados das análises realizadas no estudo por meio de publicações científicas e do *website* oficial da pesquisa (www.elsa.org.br),

Os exames e medidas realizados no estudo não têm por objetivo fazer o diagnóstico médico de qualquer doença, Entretanto, como eles podem contribuir para o/a Sr/a, conhecer melhor sua saúde, os resultados destes exames e medidas lhe serão entregues e o/a Sr/a, será orientado a procurar as unidades da rede SUS ou outro serviço de saúde de sua preferência, quando eles indicarem alguma alteração em relação aos padrões considerados normais, Se durante a sua permanência no CI-BA forem identificados problemas que requeiram atenção de urgência/emergência, o/a Sr/a, será atendido/a no Hospital Universitário Professor Edgard Santos,

Todas as informações obtidas do/a Sr/a, serão confidenciais, identificadas por um número e sem menção ao seu nome, Elas serão utilizadas exclusivamente para fins de análise científica e serão guardadas com segurança - somente terão acesso a elas os pesquisadores envolvidos no projeto, Com a finalidade exclusiva de controle de qualidade, sua entrevista será gravada e poderá ser revista pela supervisão do projeto, A gravação será destruída posteriormente, Como nos demais aspectos do projeto, serão adotados procedimentos para garantir a confidencialidade das informações gravadas, Em nenhuma hipótese será permitido o acesso a informações individualizadas a qualquer pessoa, incluindo empregadores, superiores hierárquicos e seguradoras,

Uma cópia deste Termo de Consentimento lhe será entregue, Se houver perguntas ou necessidade de mais informações sobre o estudo, ou qualquer intercorrência, o/a Sr/a, pode procurar a Professora Estela Maria Leão de Aquino, Instituto de Saúde Coletiva, Rua Araújo Pinho, 513, Campus do Canela, telefone (71) 3283-7490 coordenadora do projeto no CI-BA,

O Comitê de Ética e Pesquisa do Instituto de Saúde Coletiva pode ser contatado pelo seguinte telefone: (71) 3283-7418,

Sua assinatura abaixo significa que o/a Sr/a, leu e compreendeu todas as informações e concorda em participar da pesquisa Elsa Brasil,

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Nome do/a participante:

Documento de Identidade:

Data de nascimento:

Endereço:

Telefones para contato:

Declaro que compreendi as informações apresentadas neste documento e dei meu consentimento para participação no estudo,

Autorizo os pesquisadores do Estudo Longitudinal de Saúde do Adulto – Elsa Brasil, a obter informações sobre a ocorrência de hospitalizações, licenças médicas, eventos de saúde, aposentadoria, ou afastamento de qualquer natureza em registros de saúde junto ao Serviço Médico Universitário Rubem Brasil Soares e a outras instituições de saúde públicas ou privadas, conforme indicar a situação específica,

No caso de hospitalização, autorizo, adicionalmente, que o/a representante do ELSA, devidamente credenciado/a, copie dados constantes na papeleta de internação, bem como resultados de exames realizados durante minha internação,

As informações obtidas somente poderão ser utilizadas para fins estatísticos e deverão ser mantidas sob proteção, codificadas e sem minha identificação nominal,

Assinatura _____

Declaro concordar que amostras de sangue sejam armazenadas para análises futuras sobre as doenças crônicas em estudo,

Sim **Não**

Assinatura _____

Local _____ Data ____/____/____

Nome do/a entrevistador/a:

Código do/a entrevistador/a no CI-BA,.....

Assinatura: _____