BEATRIZ DA CUNHA LOPES ROCHA

Aterosclerose subclínica medida pelo escore de cálcio coronariano e avaliação da HDL em pacientes com doença de Crohn

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

Programa de Ciências em Gastroenterologia

Orientador: Prof. Dr. Flair José Carrilho

São Paulo

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Rocha, Beatriz da Cunha Lopes
Aterosclerose subclínica medida pelo escore de cálcio coronariano e avaliação da HDL em pacientes com doença de Crohn / Beatriz da Cunha Lopes Rocha. -- São Paulo, 2019.
Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Ciências em Gastroenterologia.
Orientador: Flair José Carrilho.

Descritores: 1.Doença de Crohn 2.Inflamação 3.Aterosclerose 4.Lipoproteínas HDL 5.Proteômica

USP/FM/DBD-315/19

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Aos pacientes

Que me motivaram,
transformaram-me com seus exemplos e fizeram todo esse caminho fazer sentido.

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. André Zonetti de Arruda Leite, pelo companheirismo e participação ativa em cada etapa deste estudo. Sua ajuda esteve presente desde a elaboração da ideia até a coleta de sangue. Grandes mestres são aqueles que nos dão os melhores exemplos. E você foi um deles. Receba minha sincera gratidão.

Ao Prof. Dr. Flair José Carrilho, por ter me acolhido como sua aluna de pós-graduação e por ter me proporcionado toda a estrutura para a concretização desse estudo com o alicerce do Departamento de Gastroenterologia da Universidade de São Paulo (USP).

Ao Marcelo, meu amado esposo, por ter sido um guerreiro comigo em todas as manhãs dos sábados no Incor e por ter me abastecido de força, otimismo e coragem nos momentos mais difíceis.

Ao meu querido irmão Bernardo, pela grande inspiração do tema desse estudo. Conseguimos unir a sua querida Cardiologia com a minha querida Gastroenterologia!

Aos meus amados pais, por serem meus maiores incentivadores e exemplos, sempre.

À querida amiga Adriana Ribas, pelos sábios conselhos e por me mostrar que tudo era possível pelo caminho que trilhou antes de mim.

Às equipes do Laboratório de Lípides da FMUSP (Marisa Passarelli, Raphael, Monique e Fabiana) e do Instituto de Química da USP (Graziella Ronsein e Amanda) pela parceria, dedicação e confiança.

Ao grupo do Incor, em especial ao Dr. Cesar Higa Nomura, à dedicada técnica de enfermagem Samara, aos biomédicos e à equipe de pesquisa, pelo apoio incondicional com toda a estrutura desse serviço de excelência.

A todos que me ajudaram, incansavelmente, no processo da coleta de sangue, em especial aos estimados do grupo da Imunologia (Rosana, Serafim e Maurício) e à Alcione, exemplar técnica de enfermagem do Centro Diagnóstico em Gastroenterologia.

Aos queridos do LIM-7, por cuidarem tão bem de minhas amostras.

Ao Dr. Eduardo Cançado, por prontamente autorizar a utilização da centrífuga de seu laboratório aos sábados.

Ao grupo do ambulatório de doença inflamatória intestinal da coloproctologia da FMUSP pela parceria.

Aos estimados do ambulatório de intestino da gastroenterologia clínica da FMUSP, em especial ao Dr. Aytan Sipahi, ao Dr. Adérson Damião, a Matheus Azevedo e a Alexandre Carlos, por me ensinarem tanto sobre doença inflamatória intestinal.

Minha eterna gratidão a todos.

NORMALIZAÇÃO ADOTADA

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

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

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

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

SUMÁRIO

Lista de siglas
Lista de símbolos
Lista de figuras
Lista de tabelas
Resumo
Abstract
1 INTRODUÇÃO.....22
1.1 A aterosclerose e a inflamação.....22
1.2 As doenças inflamatórias sistêmicas e a aterosclerose.....23
1.3 A doença de Crohn e a aterosclerose.....23
1.4 O escore de cálcio coronariano como preditor de risco cardiovascular 25
1.5 A HDL e a inflamação.....26
1.5.1 A HDL e o efluxo de colesterol de macrófagos.....28
1.5.2 A proteômica da HDL.....28
1.6 O racional do estudo.....30
2 OBJETIVOS.....32
2.1 Objetivo principal.....32
2.2 Objetivo secundário.....32
3 MÉTODOS 34
3.1 Desenho do estudo.....34
3.2 Casuística.....34
3.2.1 Seleção.....34
3.2.2 Critérios de inclusão.....34
3.2.3 Critérios de exclusão.....35
3.2.4 Cálculo amostral.....36
3.2.5 Amostragem.....36
3.3 Avaliação clínica e laboratorial geral.....37
3.4 Avaliação de parâmetros cardiovasculares.....38

3.4.1 Escore de risco de Framingham.....38
3.4.2 Escore de cálcio coronariano.....38
3.4.3 Gordura visceral e subcutânea 39
3.4.4 Avaliação da HDL.....40
3.4.4.1 Estudo funcional da HDL.....41
3.4.4.1.1 Obtenção e armazenamento do plasma.....41
3.4.4.1.2 Obtenção e armazenamento da HDL.....41
3.4.4.1.3 Acetilação de LDL.....42
3.4.4.1.4 Obtenção e cultivo dos macrófagos derivados de células da medula óssea (camundongos C57BL-6 selvagens)..... 42
3.4.4.1.5 Efluxo de ^{14}C-colesterol mediado por HDL.....43
3.4.4.2 Estudo da proteômica da HDL.....45
3.4.4.2.1 Digestão proteolítica.....45
3.4.4.2.2 Análise qualitativa do proteoma da HDL (Shotgun ou análise dependente de dados, do inglês, DDA).....46
3.4.4.2.3 Seleção de proteínas contidas nas amostras de HDL.....47
3.4.4.2.4 Cromatografia líquida para proteômica quantitativa.....47
3.4.4.2.5 Análise quantitativa do proteoma por monitoramento de reações em paralelo (do inglês, Parallel reaction monitoring, PRM).....47
3.4.4.2.6 Processamento de dados.....48
3.5 Aspectos éticos.....48
3.6 Análise estatística.....49
4 RESULTADOS.....51
4.1 Caracterização da amostra.....51
4.2 Dados demográficos.....52
4.2.1 Características demográficas gerais.....52
4.2.2 Características gerais dos pacientes com doença de Crohn.....54
4.3 Avaliação do escore de cálcio coronariano.....57
4.4 Avaliação da HDL.....62
4.4.1 Estudo funcional da HDL.....63
4.4.1.1 Relação do efluxo de colesterol de macrófagos com o escore de cálcio coronariano.....63
4.4.1.2 Parâmetros inflamatórios da doença de Crohn e o efluxo de colesterol..64

4.4.2 Estudo da proteômica da HDL.....67
4.5 Análise integrada dos dados.....70
5 DISCUSSÃO.....73
5.1 Aterosclerose subclínica medida pelo EC coronariano.....73
5.2 Perfil lipídico quantitativo.....76
5.3 Funcionalidade da HDL.....77
5.3.1 Efluxo e atividade inflamatória.....78
5.3.2 Efluxo e escore de cálcio coronariano.....79
5.4 Proteômica da HDL.....79
5.5 Limitações do estudo.....81
6 CONCLUSÕES.....84
7 ANEXOS.....85
7.1 Anexo A – Convite aos funcionários e servidores do HCFMUSP (grupo controle).....86
7.2 Anexo B – Critérios de elegibilidade (modelo de formulário do *RedCap*) 87
7.3 Anexo C – Parecer consubstanciado do comitê de ética em pesquisa..90
7.4 Anexo D – Termo de consentimento livre e esclarecido.....93
7.5 Anexo E – Valores de efluxo de ^{14}C-colesterol mediado por HDL.....98
7.6 Anexo F – Proteínas determinadas pelo método *Shotgun*.....99
7.7 Anexo G – Proteínas e peptídeos determinados pelo método PRM.....101
8 REFERÊNCIAS……...……..105
APÊNDICE

LISTA DE SIGLAS

ABCA1	*ATP-binding cassette transporter A1*
APO	Apolipoproteína
AR	Artrite reumatoide
AVE	Acidente vascular encefálico
BCA	Ácido bicinconínico
CDAI	*Crohn's Disease Activity Index*
CD40L	Ligante de CD40
CETP	*Cholesteryl ester transfer protein*
CO_2	Dióxido de carbono
CV	Cardiovascular
DAC	Doença arterial coronariana
DC	Doença de Crohn
DCV	Doença cardiovascular
DII	Doença inflamatória intestinal
DMEM	Meio essencial mínimo de Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
DRC	Doença renal crônica
EC	Escore de cálcio
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ERF	Escore de risco de Framingham
FAFA	Albumina isenta de ácidos graxos
FIBA	Fibrinogênio
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
GS	Gordura subcutânea
GV	Gordura visceral
HBI	*Harvey Bradshaw Index*
HCFMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HDL	Lipoproteína de alta densidade

H_2O	Água
IL-6	Interleucina-6
IMC	Índice de massa corporal
LCAT	Fosfatidilcolina-esterol aciltransferase
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LDL-ox	LDL oxidada
LES	Lúpus eritematoso sistêmico
LPS	Lipopolissacarídeos
MS	*Mass spectrometry*
NaOH	Hidróxido de sódio
OR	*Odds ratio*
PAF-AH	Fator ativador de plaquetas acetil-hidrolase
PBS	Tampão fosfato-salino
PCR	Proteína C reativa
PLTP	*Phospholipid transfer protein*
PMFS	Fluoreto de fenil metila sulfonila
PON	Paraoxonase
RET4	Proteína ligadora de retinol 4
SAA	Substância sérica amiloide A
TC	Tomografia computadorizada
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TG	Triglicerídeos
TGI	Trato gastrointestinal superior
TNF	Fator de necrose tumoral

LISTA DE SÍMBOLOS

dL	decilitro
g	grama
h	hora
kg	quilograma
L	litro
µCi	micro Curie
µg	micrograma
µL	microlitro
µm	micrômetro
µM	micromol
M	mol
m^2	metros quadrados
mg	miligrama
min	minuto
mL	mililitro
mM	milimol
mm	milímetro
mm^2	milímetros quadrados
mm^3	milímetros cúbicos
mmHg	milímetro de mercúrio
ms	milissegundo
mSv	miliSievert
m/z	massa/carga
N	normalidade
Ng	nanograma
nL	nanolitro
nm	nanômetro
pg	picograma
rpm	rotação por minuto

s	segundo
UH	unidade Hounsfield
<	menor
>	maior
≤	menor ou igual
≥	maior ou igual
+	mais
-	menos
±	mais ou menos
%	por cento
ºC	grau Celsius
Δ	variação

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Mecanismos pelos quais a doença de Crohn pode aumentar a aterogênese e a propagação da placa aterosclerótica.....25

Figura 2 – Funções antiaterogênicas e protetoras da HDL.....27

Figura 3 – Comparação entre HDL anti-inflamatório e protetor (a) e HDL pró-inflamatório (b)..... 29

Figura 4 – Calcificação coronariana pela TC.....39

Figura 5 – Representação tomográfica das gorduras visceral e subcutânea....40

Figura 6 – Representação esquemática do gradiente descontínuo de densidade para isolamento da HDL total (3,6 mL: HDL_2 + HDL_3).....42

Figura 7 – Efluxo de colesterol celular mediado por HDL.....45

Figura 8 – Colesterol total e ressecção intestinal prévia.....56

Figura 9 – LDL e ressecção intestinal prévia.....57

Figura 10 – Prevalência de EC > 0 e EC = 0 entre os grupos Crohn e controle...58

Figura 11 – Prevalência de EC > 0 e EC = 0 de acordo com a faixa etária.....59

Figura 12 – Efluxo de ^{14}C-colesterol mediado por HDL nos pacientes com doença de Crohn e controles.....63

Figura 13 – Efluxo de ^{14}C-colesterol mediado por HDL nos participantes com EC = 0 *vs*. EC > 0.....64

Figura 14 – Efluxo de ^{14}C-colesterol mediado por HDL nos pacientes com doença de Crohn em remissão clínica (CDAI < 150) e em atividade clínica (CDAI ≥ 150).....65

Figura 15 – Correlação entre efluxo de ^{14}C-colesterol mediado por HDL e o CDAI..... 66

Figura 16 – Correlação entre efluxo de ^{14}C-colesterol mediado por HDL e o Harvey Bradshaw.....66

Figura 17 – Análise por PRM das proteínas da HDL nos pacientes com DC e controles..... 68

Figura 18 – Proteínas da HDL que apresentaram valores diferentes entre pacientes com doença de Crohn *vs*. controles.....69

Figura 19 – Níveis de APOA1 na HDL dos controles *vs*. Crohn com PCR < 5 *vs*. Crohn com PCR ≥ 5.....70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Características demográficas gerais dos pacientes com doença de Crohn e controles.....53

Tabela 2 – Características relacionadas à doença de Crohn.....55

Tabela 3 – Prevalência e extensão da calcificação coronariana nos pacientes com DC e controles.....58

Tabela 4 – Características demográficas gerais de acordo com a presença ou ausência de calcificação coronariana.....60

Tabela 5 – Características relacionadas à doença de Crohn de acordo com a presença ou ausência de calcificação coronariana.....61

Tabela 6 – Características demográficas gerais do subgrupo que realizou a avaliação da HDL.....62

Tabela 7 – Modelo de regressão logística tendo como variável resposta EC > 0.....71

RESUMO

Rocha BCL. *Aterosclerose subclínica medida pelo escore de cálcio coronariano e avaliação da HDL em pacientes com doença de Crohn* [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2019.

INTRODUÇÃO: Diversas doenças inflamatórias crônicas estão relacionadas com maior incidência de eventos cardiovasculares, uma vez que a inflamação desempenha importante papel na aterosclerose. Contudo, apesar da doença de Crohn ser uma enfermidade inflamatória crônica, existem dados ainda conflitantes a respeito do aumento do risco cardiovascular nesses pacientes. Um dos mecanismos pelo qual a inflamação sistêmica contribui para a aterogênese consiste na redução da capacidade antiaterogênica da HDL por meio de alterações, tanto sob ponto de vista funcional quanto estrutural desta lipoproteína. Os objetivos deste estudo consistiram em avaliar a aterosclerose subclínica por meio do escore de cálcio coronariano e analisar aspectos estruturais e funcionais da HDL em pacientes com doença de Crohn. **MÉTODOS:** Foram investigados 150 pacientes com doença de Crohn (diagnóstico há mais de cinco anos) e 75 controles sem doenças cardiovasculares conhecidas ou fatores de risco tradicionais para aterosclerose. Todos os participantes foram submetidos à tomografia computadorizada para quantificação da calcificação coronariana por meio do escore de cálcio (Agatston). O escore de cálcio foi considerado uma variável qualitativa (= 0 e > 0). O estudo da HDL foi realizado em um subgrupo de 32 pacientes e 32 controles. A análise funcional da HDL ocorreu por meio da medida do efluxo de colesterol de macrófagos. A avaliação estrutural da HDL se deu por meio do estudo da proteômica com utilização da técnica de *Shotgun* para identificação das proteínas e posterior quantificação pelo método PRM (*Parallel reaction monitoring*). **RESULTADOS:** Os pacientes com doença de Crohn apresentaram a mesma prevalência de escore de cálcio > 0 que os controles (7,3% *vs*. 6,7%, p=1,000). A gordura visceral e o efluxo de colesterol de macrófagos foram identificados como preditores de calcificação coronariana. O efluxo não diferiu entre os pacientes e os controles (p=0,391), mas, nos indivíduos com doença de Crohn, houve significativa correlação entre o efluxo e os escores de atividade clínica da doença (CDAI e Harvey Bradshaw). Com relação à proteômica da HDL, os pacientes apresentaram depleção de seis importantes proteínas ateroprotetoras (PON1, APOA1, APOA2, APOM, APOD e APOF) e níveis aumentados de fibrinogênio e proteína ligadora de retinol 4. **CONCLUSÕES:** Pacientes com doença de Crohn sem fatores de risco cardiovasculares tradicionais não apresentam maior prevalência de calcificação coronariana. No entanto, exibem alterações na constituição proteica da HDL que não afetam o efluxo de colesterol, mas apontam para uma molécula menos protetora e com potencial de impactar o desenvolvimento de doenças cardiovasculares em longo prazo.

Descritores: Doença de Crohn; Inflamação; Aterosclerose; Lipoproteínas HDL; Proteômica

ABSTRACT

Rocha BCL. *Subclinical atherosclerosis assessed by coronary artery calcium score and HDL evaluation in Crohn's disease patients* [Thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2019.

INTRODUCTION: Several chronic inflammatory diseases are associated with a higher incidence of cardiovascular events, as inflammation plays an important role in atherosclerosis. Although Crohn's disease is associated with chronic systemic inflammation there is still conflicting data regarding increased cardiovascular risk in this population. Systemic inflammation contributes to atherogenesis by altering both the function and composition of HDL that influence its antiatherogenic properties. The aims of this study were to evaluate subclinical atherosclerosis through coronary artery calcium score and to analyze structural and functional aspects of HDL in patients with Crohn's disease. **METHODS:** One hundred and fifty patients with Crohn's disease (diagnosed for more than 5 years) and 75 controls without known cardiovascular diseases or any traditional risk factors for atherosclerosis were enrolled in the study. All participants were submitted to a computed tomography to quantify coronary artery calcification by calcium score (Agatston). The coronary calcium score was considered a qualitative variable (= 0 and > 0). HDL assay was performed in a subgroup of 32 patients and 32 controls. Functional analysis of HDL was done by measuring the cholesterol efflux of macrophages. The structural evaluation of HDL was assessed through proteomics analysis using the Shotgun technique to identify the proteins and subsequent quantification by PRM (Parallel reaction monitoring) method. **RESULTS:** Crohn's disease patients had the same prevalence of calcium score > 0 as controls (7.3% vs. 6.7%, p = 1.000). Visceral fat and macrophage cholesterol efflux were identified as predictors of coronary calcification. Cholesterol efflux did not differ between patients and controls (p = 0.391) but in Crohn's disease there was a significant inverse correlation with clinical activity scores (CDAI and Harvey Bradshaw). Regarding HDL proteomics, patients exhibited a reduction of six important atheroprotective proteins (PON1, APOA1, APOA2, APOM, APOD and APOF) and increased levels of fibrinogen and retinol binding protein 4. **CONCLUSIONS:** Patients with Crohn's disease without traditional cardiovascular risk factors do not have a higher prevalence of coronary artery calcification. However, even without a clear effect in the cholesterol efflux, changes detected in HDL protein cargo point to a less protective molecule that may have an impact in the development of cardiovascular diseases in long-term.

Descriptors: Crohn disease; Inflammation; Atherosclerosis; Lipoproteins, HDL; Proteomics

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 A aterosclerose e a inflamação

A aterosclerose, ao longo das últimas três décadas, passou a ser compreendida como uma doença inflamatória crônica, uma vez que avanços substanciais nas ciências básicas e experimentais ressaltaram o papel central da inflamação desde a aterogênese até a propagação e ruptura da placa [1].

O processo de aterogênese inicia-se pela agressão ao endotélio vascular que, por sua vez, aumenta a expressão de moléculas de adesão de leucócitos e incrementa a permeabilidade da íntima às lipoproteínas plasmáticas. As moléculas de adesão são responsáveis pela atração de monócitos e linfócitos para a intimidade da parede arterial. Os monócitos se diferenciam em macrófagos que, por sua vez, captam LDL já oxidada (LDL-ox) e se tornam as células espumosas. Os linfócitos T, ao entrarem na íntima, secretam citocinas que, subsequentemente, amplificam a resposta inflamatória e promovem a migração e proliferação de células musculares lisas da íntima. Posteriormente, mediadores inflamatórios podem enfraquecer a capa fibrosa protetora do ateroma e ocasionar a ruptura da placa [1,2].

Níveis elevados de diversos mediadores inflamatórios provaram ter valor preditivo para o desenvolvimento de eventos cardiovasculares (CV) futuros. Vários estudos epidemiológicos prospectivos demonstraram aumento do risco CV em associação com níveis basais aumentados de citocinas, tais como interleucina-6 (IL-6) e fator de necrose tumoral (TNF) [3–5], moléculas de adesão celular [6] e reagentes de fase aguda, como proteína C reativa (PCR), fibrinogênio e substância sérica amiloide A (SAA) [7–9]. A PCR pode afetar a progressão da doença vascular por meio de vários mecanismos diretos, tais como a capacidade de se ligar e ativar o complemento, induzir a expressão de várias moléculas de adesão celular, mediar a captação de LDL pelos macrófagos endoteliais e induzir o recrutamento de monócitos na parede arterial [10–12].

1.2 As doenças inflamatórias sistêmicas e a aterosclerose

Ao se entender o papel fundamental da inflamação na aterosclerose, foi possível compreender que a inflamação crônica presente em algumas doenças sistêmicas atua de forma independente e em sinergia com fatores de risco tradicionais na patogênese da aterosclerose [13].

Inúmeras doenças inflamatórias crônicas imunomediadas, como artrite reumatoide (AR), lúpus eritematoso sistêmico (LES), psoríase, esclerose sistêmica e espondilite anquilosante, sabidamente, estão relacionadas com maior incidência de doenças cardiovasculares (DCV), como doença arterial coronariana (DAC) e acidente vascular encefálico (AVE) [14]. Pacientes com AR têm um risco aumentado em 48% de DCV quando se compara com a população geral [15] e as DCV são uma das principais causas de morte entre pacientes com LES [16,17].

O impacto das doenças inflamatórias crônicas na incidência de eventos CV se tornou tão relevante que a última diretriz americana de prevenção primária de DCV publicada em 2019 destaca que as condições inflamatórias crônicas, como LES, AR e psoríase, devem ser consideradas fatores agravantes de risco para aqueles pacientes classificados como de risco intermediário, podendo pautar decisões quanto a intervenções preventivas (estatinas, por exemplo) [18].

1.3 A doença de Crohn e a aterosclerose

A doença de Crohn (DC) é uma enfermidade imunomediada marcada por inflamação crônica e transmural do trato gastrointestinal e pode acometer da boca até o ânus. É uma doença que cursa com períodos de surto e remissão e tem caráter progressivo se não tratada corretamente, podendo evoluir com complicações, como estenoses, fístulas e abscessos [19].

Assim como outras doenças crônicas imunomediadas, a DC também está associada a uma maior incidência de eventos CV (DAC, AVE, doença arterial periférica e isquemia mesentérica), independentemente da presença dos fatores de risco clássicos para aterosclerose [20–34]. Diversas coortes retrospectivas

realizadas por meio de grandes bases de dados populacionais, com envolvimento de até cerca de 150.000 pacientes com DC, evidenciam risco de doença isquêmica do miocárdio aumentado em até 31% em relação à população geral [20,22,26,27,34]. Quando se avaliam pacientes com atividade inflamatória persistente, o risco de infarto agudo do miocárdio pode chegar a ser duas vezes maior do que na população sem a doença [34].

Com relação à aterosclerose subclínica, alguns autores estudaram a espessura íntima-média de carótida, um reconhecido preditor de risco CV, e demonstraram que pacientes com DC apresentam valores significativamente maiores que indivíduos controles [35–39]. Medidas de rigidez arterial, como a velocidade de onda de pulso carótida-femoral, outro marcador de risco CV, também foram estudadas e pacientes com DC apresentaram valores significativamente maiores que controles sem a doença [35,40–42].

Os mecanismos pelos quais a DC pode contribuir em todas as fases da aterosclerose são inúmeros [43]: redução dos níveis séricos de HDL com presença de maior proporção de HDL disfuncional e de menor atividade antiaterogênica [44,45], elevação de PCR, IL-6 e TNF-alfa [46], disfunção endotelial [47,48], maior translocação de lipopolissacarídeos (LPS) e endotoxinas para a circulação sistêmica [49], hiper-homocisteinemia [50], hipercoagulabilidade [51], além de maior expressão da via CD40/CD40L [52] (figura 1).

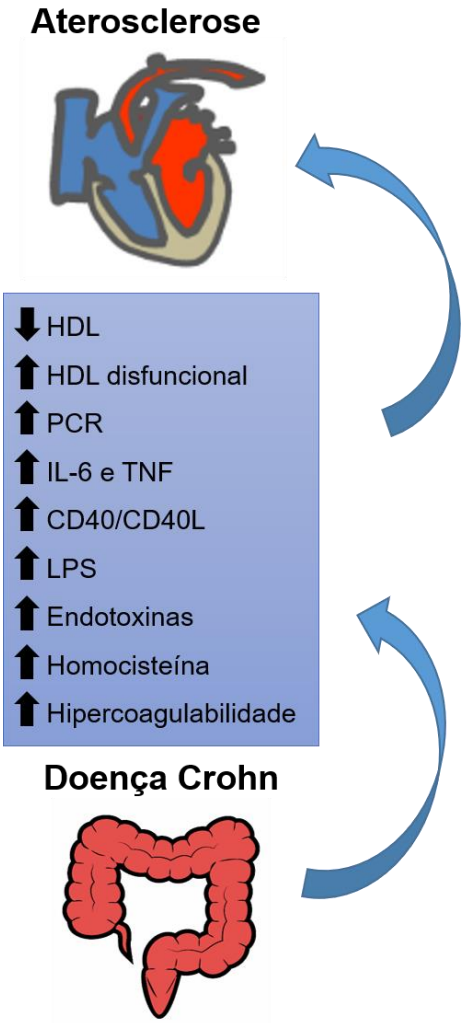


Figura 1 – Mecanismos pelos quais a doença de Crohn pode aumentar a aterogênese e a propagação da placa aterosclerótica. Adaptado a partir de Schicho *et al*. [43]

1.4 O escore de cálcio coronariano como preditor de risco cardiovascular

A calcificação na parede dos vasos é um fenômeno específico do processo de aterosclerose e a quantidade de calcificação coronariana tem relação com a carga de placa aterosclerótica total do indivíduo [53,54]. Com isso, o escore de cálcio (EC) coronariano traduz a carga de aterosclerose presente no indivíduo e se mostrou forte preditor de DAC em todos os principais grupos étnicos no grande estudo MESA (Estudo Multiétnico em Aterosclerose) [55].

A prevenção primária de eventos CV depende da correta estratificação de risco CV e, além do EC, diversos são os marcadores de risco disponíveis na

prática clínica: Escore de Risco de Framingham (ERF), Escore de Risco Global, PCR ultrassensível, índice tornozelo braquial, espessura íntima-média de carótida, entre outros [56]. A medida do EC coronariano tem se mostrado de extrema importância, uma vez que os estudos demonstram de forma consistente que, dentre os novos marcadores de risco, o EC apresenta a maior acurácia em predizer eventos coronarianos [57]. Ainda, as doenças inflamatórias, dentre elas a doença inflamatória intestinal (DII), propiciam um aumento no risco CV de forma independente, mesmo na ausência de fatores de risco habituais. Devido a isso, muitos desses pacientes não são adequadamente estratificados pelos escores de risco tradicionais, como o Framingham, por serem, muitas vezes, jovens e não possuírem fatores de risco CV clássicos. Desta forma, nesses pacientes inflamados crônicos, a aferição do EC se torna uma boa ferramenta de avaliação de risco de DCV [58].

O EC tem como principal indicação a estratificação de risco CV em pacientes assintomáticos e de risco intermediário. Segundo as atuais diretrizes brasileira e americana de prevenção de aterosclerose, o EC alterado é considerado um fator agravante que, quando superior a 100, reclassifica o indivíduo para um risco CV mais alto [18,56].

Pacientes com AR [59–62], LES [61,63–65] e psoríase [66–69] apresentam maior prevalência de EC alterado com relação a controles e sabe-se, ainda, que a gravidade [67] e a duração da doença inflamatória [62,70] podem influenciar a presença e a extensão da calcificação coronariana. No entanto, até o momento, não foram realizados estudos de avaliação do EC coronariano em pacientes com DC.

1.5 A HDL e a inflamação

A HDL é uma lipoproteína que confere proteção contra a aterosclerose por diversos mecanismos e, consequentemente, alterações quantitativas e qualitativas desta lipoproteína estão presentes em algumas condições associadas a um risco aumentado de DCV [71].

Esta lipoproteína de alta densidade e seu principal constituinte proteico, a

apolipoproteína A-1 (APOA1), possuem diversas funções antiaterosclerótica[72,73]. A propriedade funcional mais conhecida da HDL é a capacidade de transportar o colesterol de macrófagos de volta ao fígado [74]. Ao aumentar a síntese endotelial de óxido nítrico, um potente vasodilatador, a HDL também melhora a disfunção endotelial [75]. Além disso, esta lipoproteína atua de forma anti-inflamatória ao diminuir a expressão de moléculas de adesão nas células endoteliais e inibir diretamente a ativação de monócitos [76,77]. Ainda, ao reduzir a ativação plaquetária, apresenta propriedades antitrombóticas [78]. Por fim, a HDL também é capaz de inibir a oxidação da LDL *in vitro* [79] e, além disso, reduzir apoptose endotelial [80] (figura 2).

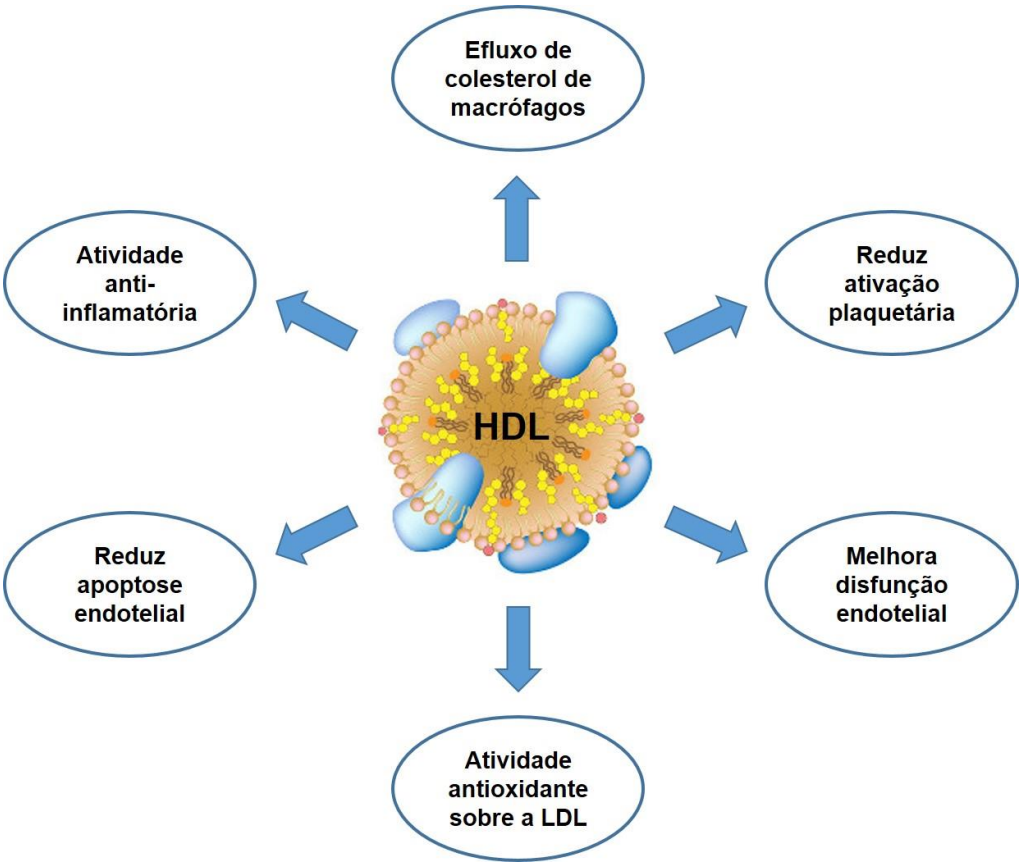


Figura 2 – Funções antiaterogênicas e protetoras da HDL

Contudo, a inflamação sistêmica é capaz de afetar o caráter antiaterogênico da HDL e, ainda, permitir que a HDL se torne um mediador pró-

aterogênico e pró-inflamatório [71,81,82]. A perda da capacidade de efluxo de colesterol e a redução de proteínas anti-inflamatórias e antioxidantes, em conjunto com o ganho de proteínas pró-inflamatórias, são fatores contribuintes fundamentais na geração da HDL disfuncional [74].

1.5.1 A HDL e o efluxo de colesterol de macrófagos

O efluxo de colesterol de macrófagos é descrito como a atividade ateroprotetora clinicamente mais relevante da HDL e é considerado o primeiro e principal passo no transporte reverso do colesterol das células periféricas para o fígado [79,83].

Primeiramente, as partículas de HDL removem o colesterol dos macrófagos e células espumosas da parede arterial. Esta remoção ocorre por meio da interação da HDL com receptores específicos na superfície celular. O efluxo de colesterol específico, rápido, ativo e unidirecional é mediado pelos transportadores ABCA1 (*ATP-binding cassette transporter A1*) e ABCG1 (*ATP-binding cassette transporter G1*), enquanto o receptor SR-B1 (*Scavenger receptor B1*) assegura grande parte da transferência inespecífica, lenta e bidirecional do colesterol [83,84]. Ainda, existe a difusão passiva de colesterol para a HDL, independente de receptor [85]. Após a remoção do colesterol dos macrófagos, a HDL carreia o colesterol até o fígado e a excreção pela bile é o passo final da via do transporte reverso do colesterol [86].

Sabidamente, processos inflamatórios podem tornar a HDL disfuncional e comprometer o efluxo de colesterol de macrófagos, com consequente prejuízo no transporte reverso de colesterol [87,88].

1.5.2 A proteômica da HDL

A proteômica consiste na análise global do proteoma, que corresponde ao conjunto de proteínas expressas em uma amostra biológica (organismo,

tecido, fluido biológico ou célula) [89]. A proteômica da HDL, portanto, consiste na avaliação da composição proteica desta lipoproteína.

As proteínas que compõem a HDL são fundamentais para a manutenção da sua atividade protetora e alterações nessas proteínas podem prejudicar suas propriedades antiaterosclerótícas. Sabidamente, o proteoma da HDL está alterado em pacientes com DCV e sugere-se, ainda, que seja um marcador e, talvez, mediador de DCV em seres humanos [90,91].

Durante o processo inflamatório, várias alterações ocorrem na composição proteica na HDL e a mesma, além de perder suas funções protetora e anti-inflamatória, pode adquirir propriedades pró-inflamatórias [92]. Diversos são os mecanismos envolvidos nessa transformação: oxidação de lipídios e lipoproteínas nas partículas de HDL (por aumento de atividade de peroxidases que ocorre durante o processo inflamatório) [93,94], diminuição da síntese das proteínas que povoam as partículas de HDL (por exemplo, APOA1) e substituição de proteínas transportadoras de colesterol e enzimas antioxidantes (PON, LCAT, CETP, PLTP) por SAA e ceruloplasmina pró-oxidantes [92,95]. Na figura 3 é possível observar uma representação esquemática das mudanças que ocorrem na composição proteica da HDL em um ambiente inflamatório.

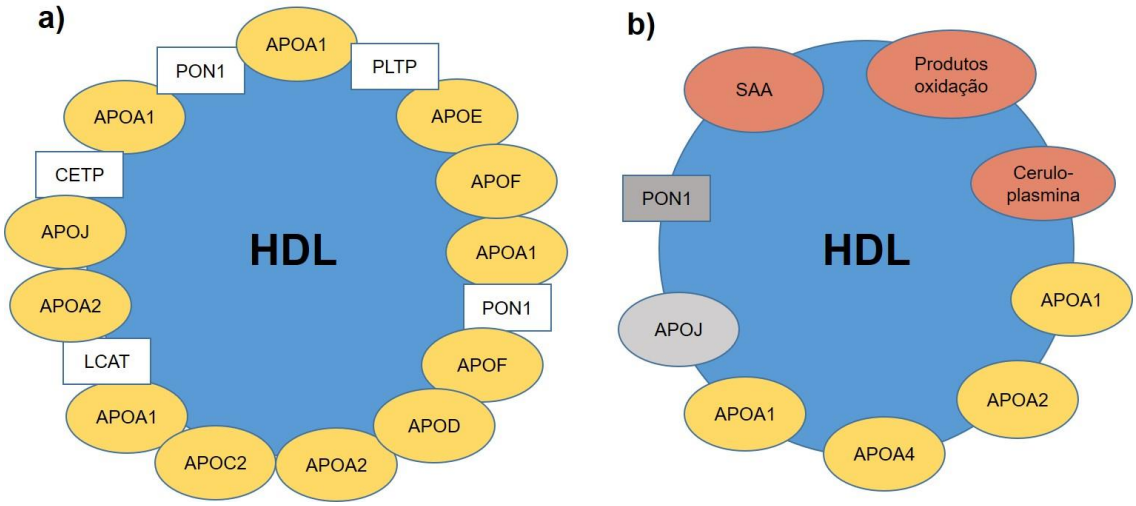


Figura 3 – Comparação entre HDL anti-inflamatório e protetor (a) e HDL pró-inflamatório (b). Adaptado de Hahn *et al*. [92]

Até o momento, não existem estudos de proteômica de HDL em pacientes com DC, mas níveis de APOA1 já se mostraram reduzidos e de SAA, aumentados no soro desses indivíduos [44,45,96]. Contudo, a composição proteica da HDL já foi avaliada em pacientes com outras doenças inflamatórias, como psoríase, AR e LES, com evidência de alterações significativas, principalmente com redução de APOA1 e PON e aumento de proteínas relacionadas a resposta de fase aguda [97–99].

1.6 O racional do estudo

O presente estudo foi motivado pela demonstrada relevância das DCV no contexto das doenças inflamatórias crônicas. No que se refere à DC, as pesquisas envolvendo DCV vêm ganhando importância nos últimos anos e o EC coronariano, o marcador de maior acurácia em predizer mortalidade e eventos CV disponível atualmente [57], ainda não foi analisado nesses indivíduos.

Ademais, a avaliação qualitativa da HDL tem se tornado cada vez mais relevante em detrimento da sua simples quantificação como preditor de risco CV e, até o momento, apenas dois estudos a examinaram do ponto de vista funcional na DC [44,45], sendo que a proteômica da HDL ainda não foi realizada no contexto de DII.

Sendo assim, este estudo foi conduzido a partir da hipótese de que, com a inflamação sistêmica, os pacientes com DC apresentariam maior prevalência de aterosclerose subclínica medida pelo EC coronariano, além de alteração da HDL do ponto de vista funcional e estrutural.

As DCV têm grande impacto em qualidade de vida, mortalidade e custo global para o sistema de saúde. Os resultados deste trabalho podem gerar mudanças na prática clínica, com foco em prevenção primária de eventos CV nos pacientes com DC.

2 OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo principal

Avaliar a aterosclerose subclínica por meio do EC coronariano em pacientes com DC.

2.2 Objetivo secundário

Avaliar a HDL do ponto de vista estrutural e funcional em pacientes com DC.

3 MÉTODOS

3 MÉTODOS

3.1 Desenho do estudo

Estudo observacional, analítico e transversal em pacientes com DC e controles.

3.2 Casuística

3.2.1 Seleção

Foram incluídos pacientes com DC confirmada, provenientes dos ambulatórios de gastroenterologia clínica e coloproctologia da Divisão de Gastroenterologia e Hepatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP). O diagnóstico de DC foi firmado por meio de critérios clínicos, endoscópicos e radiológicos [19]. Esses pacientes foram pareados de acordo com idade e sexo com controles voluntários sem a doença, provenientes do grupo de funcionários e servidores do HCFMUSP.

3.2.2 Critérios de inclusão

a) Assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).
b) Diagnóstico de DC há pelo menos cinco anos, independente de localização, complicações, cirurgias prévias e atividade clínica ou endoscópica da doença.
c) Idade: ≥ 35 e ≤ 55 anos.

3.2.3 Critérios de exclusão

a) História pessoal atual ou prévia de DAC (dor anginosa típica, síndrome coronariana aguda, revascularização miocárdica, angioplastia percutânea, teste não invasivo com evidência de isquemia ou evidência de DAC por exames de imagem), doença arterial obstrutiva periférica, doença cerebrovascular ou doença carotídea obstrutiva documentada.
b) História familiar de DAC prematura (parente de primeiro grau do sexo masculino < 55 anos ou do sexo feminino < 65 anos de idade).
c) Diabetes *mellitus* tipo 1 e tipo 2 (em uso de insulina, hipoglicemiantes orais ou com diagnóstico segundo os critérios da *American Diabetes Association*: hemoglobina glicada ≥ 6,5 % em duas dosagens ou glicemia de jejum ≥ 126 mg/dL em duas dosagens ou teste oral de tolerância à glicose com glicemia de 2 h ≥ 200 mg/dL em duas dosagens ou uma única glicemia aleatória ≥ 200 mg/dL em paciente com sintomas clássicos de hiperglicemia) [100].
d) Hipertensão arterial sistêmica (em uso de anti-hipertensivos ou com diagnóstico segundo os critérios da VII Diretriz Brasileira de Hipertensão: pressão arterial ≥ 140/90 mmHg aferida em consultório, dentro das regras corretas de aferição) [101].
e) Dislipidemia (em uso de hipolipemiantes ou LDL ≥ 160 mg/dL ou TG ≥ 200 mg/dL. O valor de TG considerado alterado é ≥ 150 mg/dL, mas no nosso estudo consideramos como critério de exclusão TG ≥ 200 mg/dL, pois é a partir deste nível que se deve considerar o início do tratamento medicamentoso [56]). HDL baixo não foi considerado critério de exclusão, pois o mesmo foi analisado qualitativamente.
f) Doença renal crônica (DRC) com *clearance* de creatinina < 60 mL/min/1,73 m^2 [102] ou em terapia renal substitutiva.
g) Índice de massa corporal (IMC) ≥ 30 kg/m^2.
h) Tabagismo ativo ou prévio, em qualquer carga tabágica. Aqueles que cessaram o uso há mais de dez anos puderam ser incluídos no estudo.

i) Doenças do tecido conjuntivo (AR, LES, psoríase, esclerose sistêmica, espondilite anquilosante e doença mista do tecido conjuntivo).
j) Gravidez.
k) Dependência atual de prednisona, definida pelo uso de dose maior ou igual a 7,5 mg/dia ou dose equivalente de outro corticosteroide por mais de três meses [103].

3.2.4 Cálculo amostral

Por não haver estudos publicados até o momento com EC coronariano em DC, o cálculo amostral foi baseado em pesquisas que compararam os valores de EC alterado em pacientes com doenças reumatológicas (LES, AR e psoríase) e controles [60,65,68]. O tamanho amostral foi calculado em 73 participantes por grupo (DC e controles), considerando uma diferença na frequência de EC alterado de 22% entre os grupos, probabilidade de erro alfa de 0,05 e poder de 0,90. O cálculo foi baseado na comparação de proporções entre dois grupos independentes.

A avaliação da HDL foi realizada em um subgrupo de pacientes e controles e o tamanho amostral foi definido como 32 pacientes e 32 controles baseado no único trabalho realizado até o momento para avaliação do efluxo de colesterol em pacientes com DII [45].

3.2.5 Amostragem

A população foi definida de acordo com os critérios de inclusão e exclusão expostos anteriormente, sendo os indivíduos do grupo DC selecionados sucessivamente nas consultas ambulatoriais de rotina e os indivíduos do grupo controle selecionados ao se voluntariarem. A divulgação do estudo para os controles voluntários foi realizada por meio de avisos anexados em diversos setores do hospital, assim como nos periódicos institucionais enviados por *e-mail* aos funcionários (anexo A).

Todos os indivíduos participantes realizaram a TC cardíaca para aferição do EC e, no mesmo dia, foi coletada uma amostra de sangue para avaliação laboratorial geral, sendo armazenada uma quantia para a análise da HDL.

Posteriormente, foi selecionado o subgrupo de pacientes e controles para a avaliação funcional e estrutural da HDL em laboratório. Os grupos foram pareados por sexo e idade, todos os indivíduos com EC alterado foram incluídos e o grupo com DC foi selecionado de forma que metade dos pacientes apresentava PCR < 5,0 mg/L e a outra metade, PCR > 5,0 mg/L. Cabe ressaltar que foram priorizados os pacientes e controles com menor tempo de congelamento das amostras.

3.3 Avaliação clínica e laboratorial geral

A coleta de dados foi realizada de forma sistematizada e informatizada com auxílio do programa RedCap (*Research Electronic Data Capture*) [104].

Todos os participantes foram questionados quanto à idade, etnia e todos os critérios de inclusão e exclusão. Foram aferidos peso, altura e pressão arterial, conforme preconizado pela Diretriz Brasileira de Hipertensão mais recente (anexo B) [101].

Alíquota de 50 ml de sangue foi coletada de todos os participantes, após jejum de 12 h, para a análise da HDL e para a realização dos seguintes exames laboratoriais: creatinina, glicemia de jejum, hemoglobina glicada, colesterol total e frações, PCR, hemograma completo, ácido fólico, vitamina B12, albumina e betaHCG para pacientes do sexo feminino em idade fértil.

Os seguintes dados clínicos relacionados à DC foram questionados e revistos em prontuário: tempo de doença, localização, complicações atuais e prévias (fístulas, abscessos, estenoses, perfuração intestinal), manifestações extraintestinais, cirurgias relacionadas à doença e tratamento medicamentoso atual e prévio.

Escores de atividade clínica e gravidade da DC foram calculados:

a) *Crohn's Disease Activity Index* (CDAI) [105].
b) *Harvey Bradshaw Index* (HBI) [106].

c) Escore de gravidade global [107].

3.4 Avaliação de parâmetros cardiovasculares

3.4.1 Escore de risco de Framingham

O ERF para estimativa do risco em dez anos de desenvolvimento de DCV (acidente vascular encefálico, DAC, insuficiência cardíaca e doença arterial obstrutiva periférica) foi calculado para todos os indivíduos. Este é um escore de risco tradicional validado e amplamente utilizado na prática clínica. Para o seu cálculo são considerados idade, sexo, tabagismo, diabetes, pressão arterial sistólica, colesterol total e HDL [108]. Segundo a V Diretriz Brasileira de Dislipidemia e Prevenção de Aterosclerose [56], os riscos são classificados da seguinte forma para aqueles sem doença aterosclerótica estabelecida:

a) Baixo risco: probabilidade < 5 %.
b) Risco intermediário: os homens com risco calculado ≥ 5 % e ≤ 20 % e as mulheres com risco calculado ≥ 5 % e ≤ 10 %.
c) Alto risco: probabilidade > 20 % para homens e > 10 % para mulheres.

3.4.2 Escore de cálcio coronariano

Todos os participantes realizaram TC cardíaca em aparelho de 320 fileiras de detectores (*Aquilion One scanner*, Toshiba Medical Systems®, Tochigi-ken, Japão) no Instituto do Coração (Incor, HCFMUSP) para aferição do EC coronariano (técnica utilizada: 120 kV e 300 mA). No protocolo do exame não se faz necessária a administração de contraste iodado e não é preciso um controle rigoroso de frequência cardíaca. Os indivíduos foram posicionados em decúbito dorsal e foram adquiridas imagens axiais do coração com 3 mm de espessura, sendo a aquisição sincronizada com o eletrocardiograma [109].

A calcificação coronariana pela TC foi definida como uma lesão com atenuação acima de 130 UH em uma área igual ou maior a três *pixels* adjacentes

(≥ 1 mm^3) (figura 4). O método utilizado para a quantificação do cálcio coronariano foi o escore de Agatston, que consiste no produto da área total de cálcio por um fator derivado da densidade máxima medida [110].

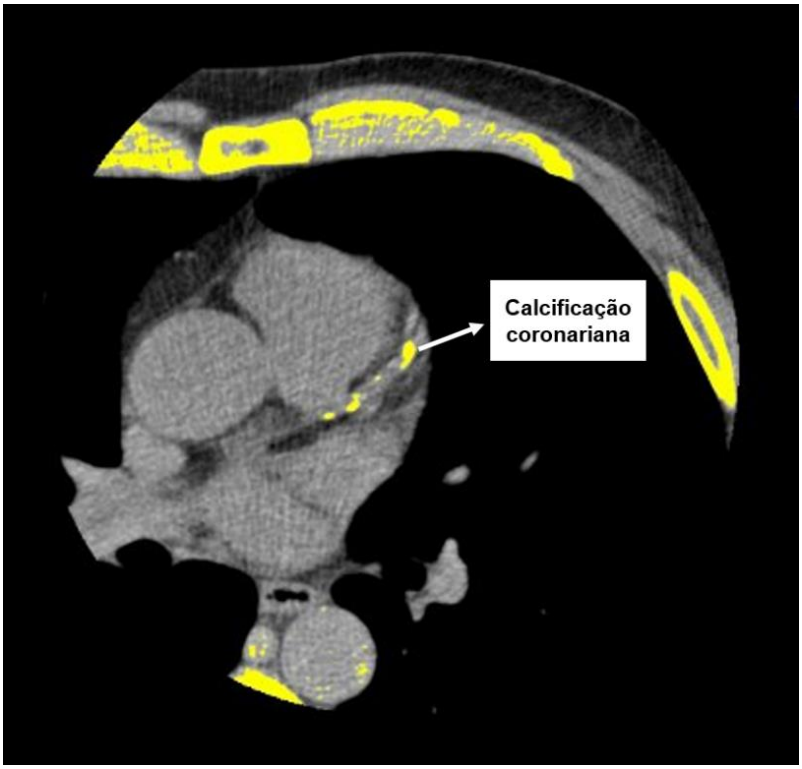


Figura 4 – Calcificação coronariana pela TC
Legenda: A seta aponta lesão considerada no cálculo do EC coronariano, pois apresenta atenuação acima de 130 UH em uma área ≥ 1 mm^2

3.4.3 Gordura visceral e subcutânea

A aferição das áreas (cm^2) de gordura visceral (GV) e subcutânea (GS) foi realizada em 171 participantes, sendo 115 do grupo Crohn e 56 do grupo controle. O aparelho de tomografia utilizado foi o mesmo do EC e a aquisição das imagens realizada no mesmo momento (técnica utilizada: 120 kV e mA modulado).

As medidas de gordura foram aferidas da seguinte forma: a partir de imagem axial do abdome ao nível da cicatriz umbilical, foi traçada uma região de interesse circunferencial com referência na face interna da musculatura da

parede abdominal, que delimitou a cavidade abdominal (conteúdo no interior dessa região de interesse) e a parede abdominal (conteúdo entre a pele e a referida região de interesse); foi definido como GV o tecido com atenuação entre -150 UH e -50 UH no interior da cavidade abdominal e, como GS, o tecido adiposo com essa mesma atenuação na parede abdominal (figura 5). Em seguida, foi calculada a relação GV/GS (%).

A avaliação do EC e da GV/GS foi realizada por um único imaginologista experiente, em *workstation* dedicada (*Aquarius Intuition Edition*, versão 4.4.12, TeraRecon Inc.®, Foster City, Estados Unidos).

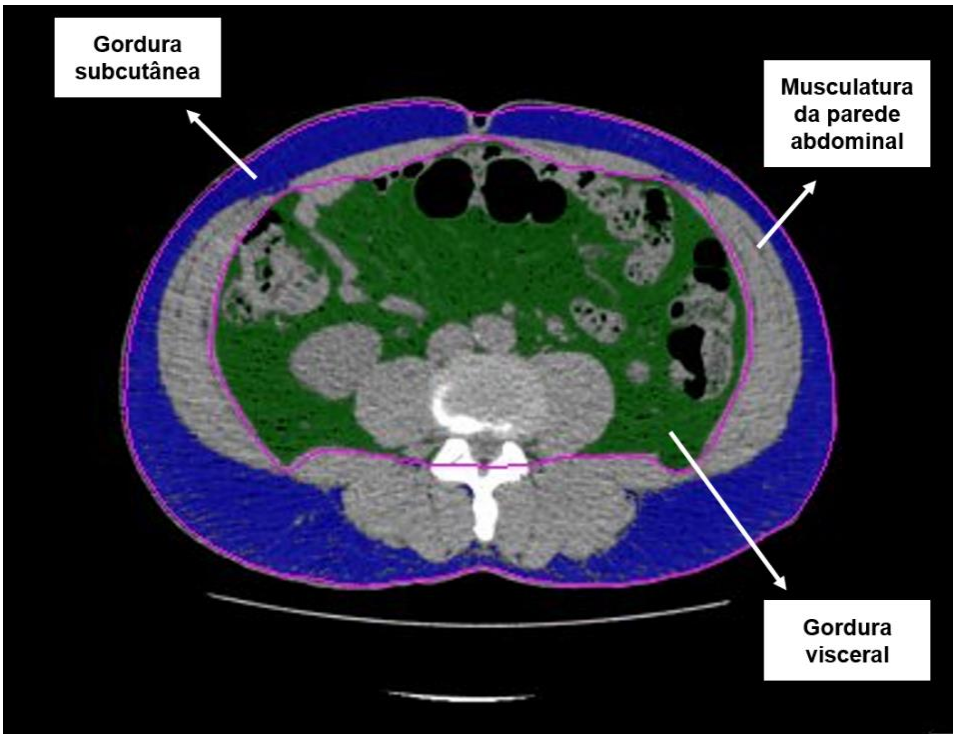


Figura 5 – Representação tomográfica das gorduras visceral e subcutânea.
Legenda: A GV está representada em verde (tecido com atenuação entre -150 UH e -50 UH no interior da cavidade abdominal) e a GS corresponde à área azul (tecido adiposo com essa mesma atenuação na parede abdominal)

3.4.4 Avaliação da HDL

A HDL foi avaliada do ponto de vista funcional e estrutural. A avaliação funcional foi realizada por meio da medida do efluxo de colesterol de macrófagos e a análise estrutural, por meio da proteômica.

3.4.4.1 Estudo funcional da HDL

3.4.4.1.1 Obtenção e armazenamento do plasma

Sangue venoso dos indivíduos, em jejum de 12 h, foi coletado em tubos contendo EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) 10 % e, imediatamente, centrifugado a 3.000 rpm, por 25 min e a 4 ºC. O plasma foi separado e imediatamente congelado a - 80 ºC até a realização dos experimentos.

3.4.4.1.2 Obtenção e armazenamento da HDL

O plasma foi descongelado e ultracentrifugado a 40.000 rpm, por 24 h, e a 4 ºC para o isolamento da HDL total por meio da técnica de gradiente descontínuo de densidade [111] (figura 6). As concentrações finais de proteínas em cada amostra foram determinadas pelo método de BCA (ácido bicinconínico, Pierce®) [112]. VLDL, IDL e LDL foram descartadas. Sacarose a 5 % foi adicionada às amostras e as mesmas foram novamente congeladas a - 80 ºC até a realização dos experimentos.

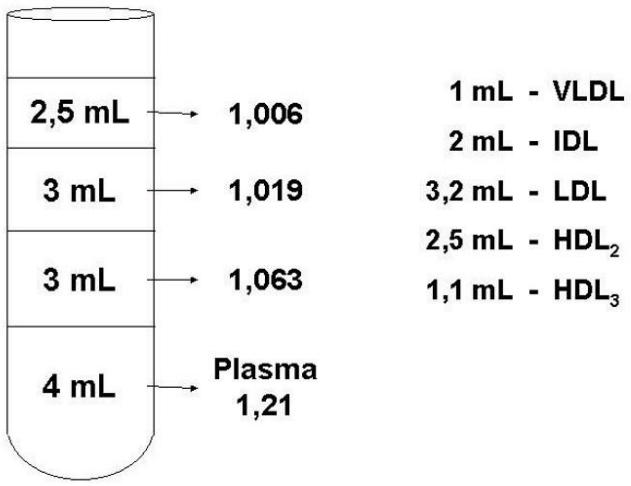


Figura 6 – Representação esquemática do gradiente descontínuo de densidade para isolamento da HDL total (3,6 mL: HDL_2 + HDL_3)

3.4.4.1.3 Acetilação de LDL

LDL isolada de doadores saudáveis foi acetilada, segundo protocolo descrito por Basu *et al*. em 1976 [113]. Para cada 16 mg de proteína de LDL, foi adicionado 1 mL de solução saturada de acetato de sódio e 1 mL de cloreto de sódio (NaCl 0,15 M), sob constante agitação e banho de gelo. Anidrido acético em pequenas e múltiplas quantidades foi adicionado por um período de 1 h, seguido de 30 min de agitação em banho de gelo. O volume de anidrido acético utilizado foi de 1,5 vez a massa de proteína de LDL. A seguir, a LDL acetilada foi dialisada contra tampão fosfato-salino (PBS) com EDTA (pH = 7,4), por 24 h a 4 ºC e esterilizada em filtro 0,22 µm. A concentração final de proteína da amostra foi determinada por espectrofotometria, usando reagentes comerciais (*BCA protein assay*, Pierce®) e albumina como padrão.

3.4.4.1.4 Obtenção e cultivo dos macrófagos derivados de células da medula óssea (camundongos C57BL-6 selvagens)

Camundongos da linhagem C57BL-6 do tipo selvagem (WT), com sete semanas de idade, foram obtidos do Departamento Técnico de Apoio ao Ensino e Pesquisa e mantidos em biotério convencional com ciclo claro-escuro (12 h/12 h) e temperatura entre 22 °C ± 2 °C, com livre acesso à água e ração convencional (*ad libitum*).

Os animais foram submetidos à eutanásia por meio de injeção intraperitoneal de sobredose da mistura anestésica (três vezes a dose recomendada para anestesia) composta por cloridrato de cetamina (Ketalar® - 50 mg/kg de peso corporal) e cloridrato de xilazina (Rompum® - 10 mg/kg de peso corporal).

Após eutanásia dos animais, ambos os membros posteriores foram dissecados com auxílio de pinça e tesoura cirúrgicas para acesso cirúrgico ao fêmur e à tíbia. Em seguida, foi realizada a osteotomia proximal e distal do fêmur e da tíbia. Com auxílio de agulha (diâmetro: 0,45 mm; comprimento: 13 mm) e seringa, foram injetados na medula de cada osso 5 mL de meio de condicionamento (400 mL de DMEM com baixa glicose + 4 mL de penicilina/estreptomicina + 50 mL de soro fetal bovino inativado + 50 mL de meio condicionado de células L929 - 25 mL de meio da primeira semana com 25 mL de meio da segunda semana) para coletar as células da medula óssea.

Meio de condicionamento contendo as células isoladas da medula óssea foi suavemente aspirado e expelido por cinco vezes, utilizando seringa de 20 mL e agulha tamanho 18,5 (diâmetro: 1,2 mm; comprimento: 40 mm), para separar os agregados de células. Em seguida, foram centrifugadas durante 6 min e 1.000 rpm em temperatura ambiente. O *pellet* celular foi, então, ressuspendido em meio de condicionamento e as células distribuídas em placa de cultura e incubadas durante cinco dias a 37 °C sob 5 % (v/v) de CO_2, para promover a diferenciação dos monócitos em macrófagos. No quinto dia, o meio condicionado foi trocado para um novo meio de condicionamento por 24 h. Após esse período, os macrófagos foram tratados de acordo com a metodologia descrita abaixo.

3.4.4.1.5 Efluxo de ^{14}C-colesterol mediado por HDL

Macrófagos foram incubados em placas de cultura com 96 cavidades (0,2 x 10^6 células por cavidade). As células foram mantidas em estufa a 37 °C com atmosfera de CO_2 a 5 %. Os macrófagos foram lavados uma vez com PBS/FAFA e incubados com DMEM/FAFA, acrescidos de LDL acetilada (50 µg de proteína de LDL/mL de meio) e ^{14}C-colesterol (0,3 µCi/mL de meio) por 48 h.

Após esse período, esses macrófagos foram incubados por mais seis horas na presença dos compostos anteriormente descritos e 50 µg de HDL total de cada participante do estudo. O meio de cultura foi recolhido para tubos de vidro, centrifugado a 1.500 rpm durante dez minutos a 4 °C para a remoção de debris celulares e transferido para frascos de cintilação. Em seguida, foi adicionada solução contadora (Perkin Elmer®, Turko, Finlândia). As cavidades das placas foram lavadas com solução fisiológica gelada (4 °C). A quantidade de radioatividade presente no meio, ao final do período de incubação, indicou o efluxo basal de colesterol e o mediado pela HDL total dos participantes (figura 7).

Os lípides celulares foram extraídos com solução de hexana:isopropanol (3:2) (Merck®, Darmastadt, Alemanha) e a radioatividade determinada após evaporação do solvente. As células foram incubadas com 250 µL de NaOH 0,2 N, durante três horas, em temperatura ambiente, para lise celular e determinação da concentração de proteína, pelo método de Lowry [114].

Os valores obtidos em incubações na presença da HDL total foram subtraídos daqueles obtidos apenas com o meio, de maneira a refletir o efluxo mediado somente por HDL.

A porcentagem de efluxo foi calculada como:

$$\frac{^{14}\text{C-colesterol no meio}}{^{14}\text{C-colesterol no meio} + ^{14}\text{C-colesterol na célula}} \times 100$$

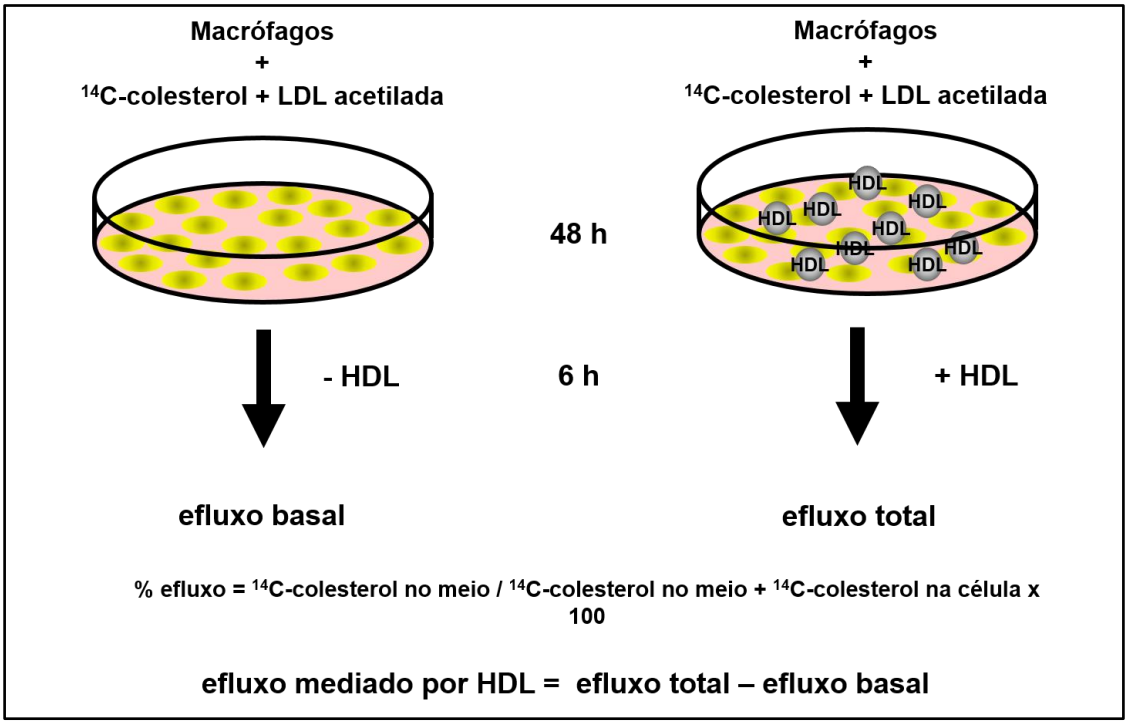


Imagem gentilmente cedida por Marisa Passarelli

Figura 7 – Efluxo de colesterol celular mediado por HDL

3.4.4.2 Estudo da proteômica da HDL

3.4.4.2.1 Digestão proteolítica

Após quantificação das proteínas pela técnica de Bradford [115], 10 µg de proteína de HDL foi solubilizada com 50 µL de deoxicolato 0,4 % em bicarbonato de amônio 100 mM, reduzida com 5 µL de ditiotreitol 0,1 M, alquilada com 3 µL de iodoacetamida 0,5 M e digerida com 2,5 µL de tripsina (1 tripsina:40 proteína, Promega®, Madison, Estados Unidos), durante quatro horas a 37 °C. Uma segunda alíquota de tripsina (1 tripsina:40 proteína) foi adicionada e incubada durante a noite a 37 °C. Após a hidrólise ácida do deoxicolato com ácido trifluoroacético 2 % (0,5 %), as amostras passaram pelo processo de limpeza nas colunas Oasis PRIME HLB SPE (Waters), foram secas e armazenadas a -20 °C até a análise por espectrometria de massas.

3.4.4.2.2 Análise qualitativa do proteoma da HDL (Shotgun ou análise dependente de dados, do inglês, DDA)

Um equipamento *Easy-nLC* 1200 (*Thermo Scientific*®, Bremen, Alemanha) foi utilizado para a separação dos peptídeos com um gradiente linear de solvente A (0,1 % de ácido fórmico) e solvente B (0,1 % de ácido fórmico em 80 % de acetonitrila). A HDL digerida (50 ng) foi concentrada na pré-coluna tipo *trap* (*nanoViper* C18, 3 µm, 75 µm x 2 cm, *Thermo Scientific*®) fixando-se a pressão em 980 bar e passando-se 12 µl de solvente A. Após este período, os peptídeos aprisionados na coluna *trap* foram eluídos para uma coluna C18 (*nanoViper* C18, 2 m, 75 m x 15 cm, *Thermo Scientific*®). A eluição ocorreu a 300 nL/min, utilizando um gradiente linear de 5 % a 28 % de B durante 25 min e 28 % a 40 % de B durante 5 min. Finalmente, a coluna foi lavada durante 2 min com 95 % de B, e o sistema foi reequilibrado com o mesmo gradiente durante 10 min. Os dados foram obtidos por meio de uma fonte *nanospray* integrada (*Thermo Scientific*®) a um espectrômetro de massas *Orbitrap Fusion Lumos* (*Thermo Scientific*®) utilizando a opção de um MS1 (espectro de massas de íons precursores) seguido por MS2 (espectros de massas de íons produtos) dependentes de dados num ciclo de 3 s. Íons precursores selecionados para MS2 foram excluídos para varreduras subsequentes de MS2 por 20 s. A resolução para o modo MS1 foi definida como 120.000 (a 400 m/z), o alvo de controle automático de ganho em 4 x 10^5 e a faixa de 400 m/z a 1.600 m/z foi monitorada. O MS1 foi seguido por *scans* de MS2 dependentes de dados com resolução de 30.000 (400 m/z), tempo de preenchimento do *trap* de 54 ms, janela de isolamento de 1,2 Th e energia de colisão normalizada de 30.

Para a identificação das proteínas, os espectros MS/MS foram comparados aos do banco de dados internacional UniProt [116] (agosto de 2018, versão 109, 20.404 entradas), usando a ferramenta de busca MaxQuant (versão 1.6.3.3) com carbamidometilação de Cys como modificação fixa e oxidação de Met variável [117]. Empregou-se tolerância de massa estabelecida pelo MaxQuant para íons precursores e para produtos iônicos. A enzima tripsina foi selecionada, permitindo, durante a busca, dois sítios de clivagem perdidos, sendo pelo menos

dois peptídeos monitorados para cada proteína. Os resultados foram processados por método de quantificação *label free.*

3.4.4.2.3 Seleção de proteínas contidas nas amostras de HDL

A seleção de peptídeos e proteínas para a etapa da quantificação foi realizada por meio da análise dos dados de proteômica de *Shotgun* e comparação com proteínas consistentemente detectadas em HDL em estudos anteriores relevantes [117–120].

3.4.4.2.4 Cromatografia líquida para proteômica quantitativa

Configurações cromatográficas semelhantes ao método *Shotgun* foram utilizadas, exceto algumas alterações descritas a seguir. Peptídeos digeridos (50 ng) foram concentrados na coluna tipo *trap,* fixando a pressão em 980 bar e passando 12 µl de solvente A. Em seguida, os peptídeos aprisionados foram eluídos da coluna *trap* para a coluna analítica a 350 nL/min, usando um gradiente linear de 5 % a 28 % de B por 15 min e 28 % a 40 % de B por 2 min. A coluna foi subsequentemente lavada durante 2 min a 95 % de B e reequilibrada com o mesmo gradiente durante 8 min.

3.4.4.2.5 Análise quantitativa do proteoma por monitoramento de reações em paralelo (do inglês, Parallel reaction monitoring, PRM)

Os experimentos foram realizados utilizando o espectrômetro de massas *Orbitrap Fusion Lumos* (*Thermo Scientific*®). A resolução para MS2 foi estabelecida em 15.000 (400 m/z); o alvo AGC, em 5 × 104; e o tempo máximo de preenchimento do *trap,* em 22 ms. Utilizou-se energia de colisão de 27 e janela de isolamento de 1,6 Th.

3.4.4.2.6 Processamento de dados

O *Skyline* (versão 4.2), um *software* aberto para processamento de dados qualitativos e quantitativos de proteômica, foi empregado para análise dos dados [121]. Todos os picos integrados foram avaliados manualmente para garantir a detecção correta do pico e evitar erros de integração.

3.5 Aspectos éticos

O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) do HCFMUSP em 11 de janeiro de 2017 (número do parecer: 1.888.865 – anexo C) e foi conduzido de acordo com os requerimentos desta comissão. Todos os pacientes e voluntários controles consentiram para a participação na pesquisa após leitura, compreensão e assinatura do TCLE (anexo D).

A pesquisa (submetida como projeto de iniciativa do investigador) foi realizada com recursos financeiros fornecidos pela Abbvie Farmacêutica Ltda. (número 4.062).

Os protocolos experimentais foram conduzidos de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL).

Para a aquisição do EC foram utilizadas baixas dose de radiação (cerca de 0,9 mSv a 1,3 mSv), o que é comparável a uma mamografia (0,8 mSv) [58,122]. Pesquisas em humanos demonstram que não existe efeito carcinogênico com doses de radiação isoladas de até 100 mSv e dose acumulada de até 500 mSv [123–125].

Diante do achado de um EC > 100 ou acima do percentil 75 % para idade, deve-se considerar a reclassificação do paciente para alto risco cardiovascular [56]. Desta forma, os participantes que se encaixaram nesses critérios foram devidamente encaminhados a ambulatório específico para adequado seguimento.

3.6 Análise estatística

Na análise estatística descritiva, as variáveis quantitativas foram apresentadas por meio de média, mediana, desvio padrão (DP), amplitude (mínimo e máximo) e intervalo quartílico (1º quartil e 3º quartil). As variáveis qualitativas foram expressas pelas frequências absoluta (n) e relativa (%).

Utilizamos o teste t-Student ou o Mann-Whitney para comparação entre variáveis quantitativas (dois grupos), dependendo da suposição de normalidade dada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Para comparação entre três grupos ou mais, aplicamos o teste ANOVA (paramétrico) ou o Kruskall-Wallis (não paramétrico). Já para as variáveis qualitativas foi utilizado o teste exato de Fisher.

Para verificar a associação entre variáveis quantitativas foi utilizada a correlação de Spearman ou de Pearson.

Para comparação entre os grupos nas variáveis de expressão das proteínas, foi inicialmente feito teste de Mann-Whitney e, então, aplicado o método de Benjamini e Hochberg para corrigir os valores de p pelas múltiplas comparações existentes na hipótese.

Modelo logístico foi realizado tendo como variável dependente o escore de cálcio maior que zero. As variáveis que tiveram importância estatística na análise univariada ($p<0,15$) ou importância clínica em outros estudos foram adicionadas no modelo como variáveis independentes.

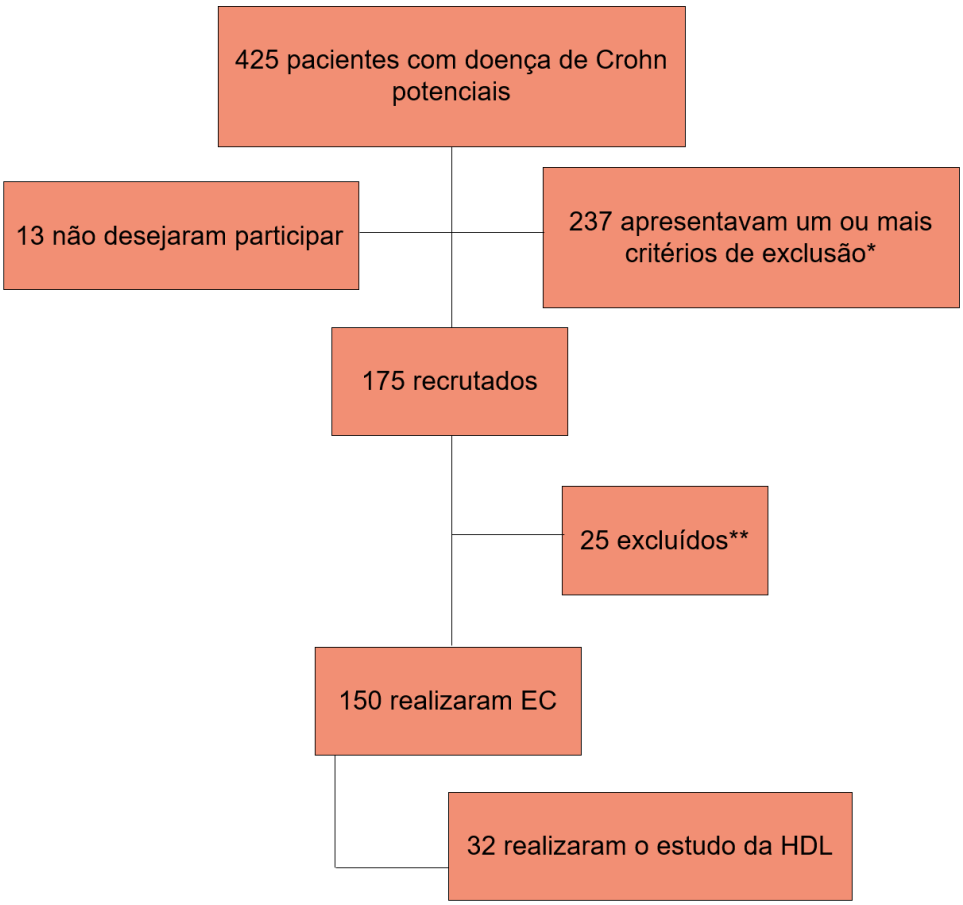
O nível de significância adotado foi de 5% e os cálculos foram realizados pelo programa estatístico RStudio, versão 1.1.383.

4 RESULTADOS

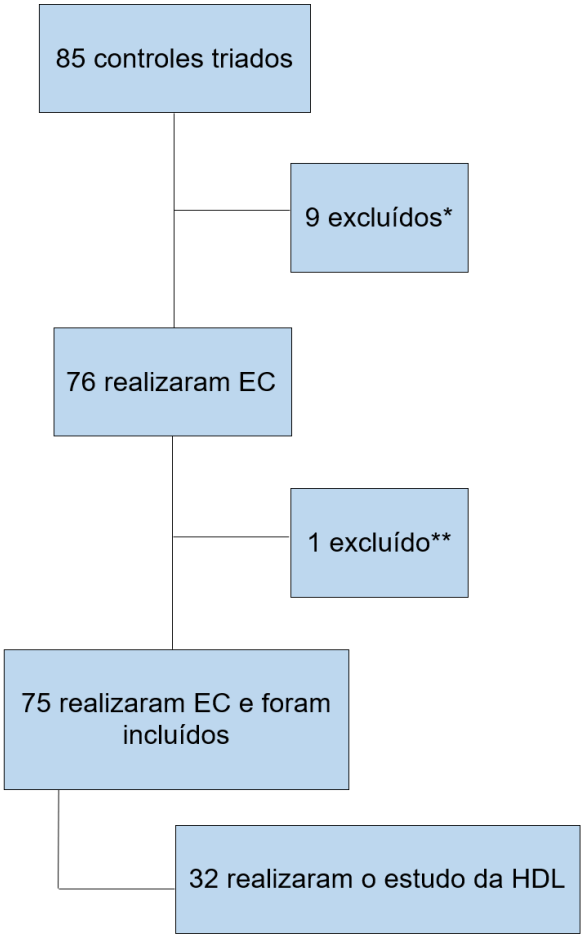
4 RESULTADOS

4.1 Caracterização da amostra

O recrutamento dos pacientes e controles ocorreu entre 29/03/2017 e 21/07/2018 (detalhes demonstrados nos fluxogramas abaixo), sendo possível atingir o tamanho amostral de 150 pacientes com DC e 75 controles.



* História familiar ou pessoal de DCV, DM, HAS, dislipidemia, doença do tecido conjuntivo, uso de corticoide, IMC ≥ 30 kg/m^2 e, ou tabagismo.
** 11 por dislipidemia após coleta dos exames (todos por TG ≥ 200 mg/dL, sendo que 2 também apresentavam LDL ≥ 160 mg/dL), 8 por não desejarem continuar, 3 por perda de seguimento, 2 por gravidez e 1 por óbito devido a complicações infecciosas da DC.
*** Por problemas com as amostras durante os experimentos, no estudo do efluxo 2 pacientes foram excluídos e na proteômica 1 também foi excluído.



* 1 por perda de seguimento e 8 por dislipidemia após coleta dos exames (todos por TG ≥ 200 mg/dL, sendo que 2 também apresentavam LDL ≥ 160 mg/dL).
** Excluído devido a presença de calcificação coronariana em angiotomografia cardíaca prévia (paciente não havia informado).
*** Por problemas com as amostras durante os experimentos, no estudo do efluxo 2 controles foram excluídos e na proteômica 1 foi excluído.

4.2 Dados demográficos

4.2.1 Características demográficas gerais

Os grupos foram homogêneos em relação à idade, ao sexo, à pressão arterial e às medidas de gordura corporal (GV, GS e relação GV/GS). Os valores de hemoglobina, leucócitos e glicemia de jejum não diferiram entre os pacientes e os controles. No que se refere à etnia, foi observada uma distribuição

significativamente diferente entre os grupos (p=0,0025) às custas, principalmente, da presença de etnia amarela nos controles e ausência de pacientes amarelos (5,3 % *vs*. 0 %), além de maior frequência de controles brancos (60 % *vs*. 46,7 %) e pacientes pardos (35,3 % *vs*. 20 %). A média do IMC, apesar de estar nos limites da normalidade, foi maior no grupo controle (p=0,0060). Como esperado, os valores de plaquetas e PCR foram significativamente maiores nos pacientes e a albumina se apresentou menor no grupo Crohn (p=0,0362, p=0,0003 e p=0,0017, respectivamente). Em relação ao perfil lipídico, os valores de TG foram semelhantes entre os grupos, enquanto as médias de LDL e HDL foram significativamente menores nos pacientes em relação aos controles (88 *vs*. 107; p=0,0000 e 53 *vs*. 57; p=0,0460, respectivamente). Apesar de todos os participantes terem sido classificados como baixo risco para DCV em dez anos pelo ERF, a média do grupo controle se apresentou maior que a do grupo Crohn (3,59 % *vs*. 3,08 %; p=0,0413). *Vide* tabela 1.

Tabela 1 – Características demográficas gerais dos pacientes com doença de Crohn e controles

Variável	**Doença Crohn n=150**		**Controles n=75**		**P-valor**
	Média ou n	**D.P. ou %**	**Média ou n**	**D.P. ou %**	
Idade (anos)	43,31	5,98	43,27	5,47	0,9211
Sexo (masculino)	78	52,0	39	52,0	1,0000
Etnia					
Amarelo	0	0,0	4	5,3	0,0025
Branco	70	46,7	45	60,0	
Negro	27	18,0	11	14,7	
Pardo	53	35,3	15	20,0	
IMC (kg/m^2)	23,65	3,48	24,88	2,68	0,0060
Hemoglobina (g/dL)	13,91	2,47	14,02	1,32	0,2063
Leucócitos (mil/mm^3)	7,328	11,104	6,011	1,410	0,1894
Plaquetas (mil/mm^3)	267	80	238	43	0,0362
PCR (mg/L)	6,24	11,08	2,02	3,19	0,0003
Glicemia de jejum (mg/dL)	84,85	9,50	86,81	9,51	0,1299
Colesterol total (mg/dL)	161,45	37,45	184,56	29,66	<0,0001
LDL (mg/dL)	88,19	33,03	107,44	26,97	<0,0001
HDL (mg/dL)	53,47	14,44	57,64	15,62	0,0460
Triglicerídeos (mg/dL)	103,06	38,52	97,63	41,10	0,1876

Albumina (g/dL)	4,41	0,75	4,58	0,24	0,0017
Pressão arterial sistólica (mmHg)	115,55	13,27	119,35	13,05	0,0644
Pressão arterial diastólica (mmHg)	72,81	10,33	74,33	9,36	0,3597
Framingham (%)	3,08	2,23	3,59	2,28	0,0413
Gordura visceral (cm^2)	102,34	58,66	99,35	46,45	0,8765
Gordura subcutânea (cm^2)	176,24	84,36	189,44	73,66	0,3116
Relação GV/GS (%)	64,64	36,07	59,57	44,48	0,2095

4.2.2 Características gerais dos pacientes com doença de Crohn

Como exposto na tabela 2, a maioria dos pacientes apresentava longa duração da doença, com média de cerca de 15 anos de diagnóstico. A maior parte dos casos (92 %) teve o diagnóstico da DC entre os 17 anos e 40 anos de idade, 43 % apresentavam localização ileocolônica; 32 %, ileal; e 23 %, apenas colônica. Quanto ao comportamento, quase 60% dos pacientes foram classificados como doença penetrante; 22 %, estenosante; e 18 %, inflamatória, dos quais 46 % exibiam componente perianal da doença. No que se refere às manifestações extraintestinais, cerca de um terço dos casos (36 %) se queixava de artrite ou artralgia e apenas dois pacientes exibiam eritema nodoso.

Em relação aos escores de atividade da doença, a maioria dos casos se encontrava em remissão clínica, com média do CDAI de 118 e do HBI de cerca de três pontos. A média do escore de gravidade global foi de 24 de um máximo de 100 pontos. Ao serem questionados diretamente, cerca de um terço dos pacientes (38 %) referiu ter apresentado atividade da doença no último ano, sendo que 11 % necessitaram de internação hospitalar devido a atividade.

No que se refere ao tratamento, quase 25 % estavam em uso de algum imunossupressor em monoterapia (azatioprina, 6-mercaptopurina ou metotrexato), cerca de 14 % em uso apenas de terapia biológica (infliximabe, adalimumabe, certolizumabe ou vedolizumabe) e 44 % em terapia combinada. Previamente, quase metade dos casos já havia utilizado algum biológico ou imunossupressor.

Cerca de metade dos pacientes (51,4 %) já havia sido submetida a alguma ressecção intestinal, sendo que quase um terço necessitou ressecar

mais de 40 cm de intestino. Ao comparar os valores séricos de CT, LDL, HDL e TG com a história de cirurgia intestinal prévia, foi possível observar que os valores de CT e LDL diferiram significativamente entre aqueles sem ressecção prévia, com alguma ressecção < 40 cm e os que haviam ressecado 40 cm ou mais de intestino (CT: 173 mg/dL *vs*. 158 mg/dL *vs*. 144 mg/dL, respectivamente; p=0,0004 / LDL: 101 mg/dL *vs*. 82 mg/dL *vs*. 71 mg/dL, respectivamente; p<0,0001). *Vide* figuras 8 e 9. Não houve diferença estatisticamente significante nos valores de HDL e TG entre os grupos de acordo com o histórico cirúrgico prévio (HDL: 51 mg/dL *vs*. 56 mg/dL *vs*. 54 mg/dL, respectivamente; p=0,1348 / TG: 104 mg/dL *vs*. 103 mg/dL *vs*. 101 mg/dL, respectivamente; p=0,9129).

Tabela 2 – Características relacionadas à doença de Crohn

Variável		**Média ou n**	**Desvio padrão ou %**
Tempo de doença (anos)		14,9	6,1
Montreal			
Idade do diagnóstico			
	< 16 anos	4	2,7
	Entre 17 anos e 40 anos	138	92,0
	> 40 anos	8	5,3
Localização			
	Ileal	48	32,0
	Colônia	35	23,3
	Ileocolônica	65	43,3
	TGI superior isolado	12	8,0
Comportamento			
	Inflamatório	28	18,7
	Estenosante	33	22,0
	Penetrante	89	59,3
	Perianal	69	46,0
Manifestações extraintestinais			
	Artrite ou artralgia	54	36,0
	Oculares	0	0,0
	Eritema nodoso	2	1,3
	Pioderma gangrenoso	0	0,0
Escores de atividade clínica			
	CDAI (n=131)*	118,8	91,1
	HBI (n=131)*	2,8	2,9
	Escore de gravidade global	24,3	15,1

O paciente apresentou atividade da doença no último ano?		58	38,7
O paciente foi internado no último ano devido a doença?		17	11,3
A internação ou a atividade da doença ocorreram nos últimos 3 m?		32	21,3
Tratamentos prévios			
	Biológico**	36	24,0
	Imunossupressor***	34	22,7
Tratamento atual			
	Biológico em monoterapia	21	14,0
	Imunossupressor em monoterapia	37	24,7
	Terapia combinada****	67	44,7
	Sem biológico ou imunossupressor	25	16,0
Ressecção intestinal			
	Sem ressecção	73	48,7
	Pelo menos uma ressecção < 40 cm	34	22,7
	Pelo menos uma ressecção ≥ 40 cm	43	28,7

* 19 pacientes eram ostomizados, por isso não foi possível calcular o CDAI e o HBI.
** Infliximabe, adalimumabe, certolizumabe ou vedolizumabe.
*** Azatioprina, 6-mercaptopurina ou metotrexato.
**** Biológico associado a imunossupressor.

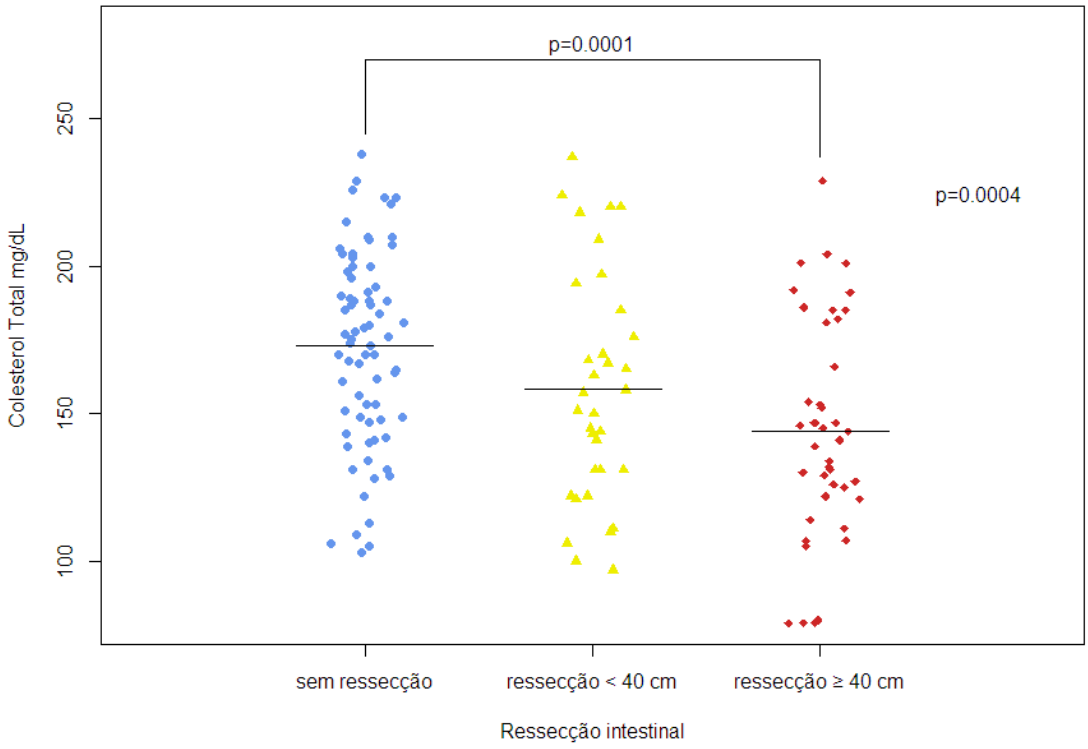


Figura 8 – Colesterol total e ressecção intestinal prévia

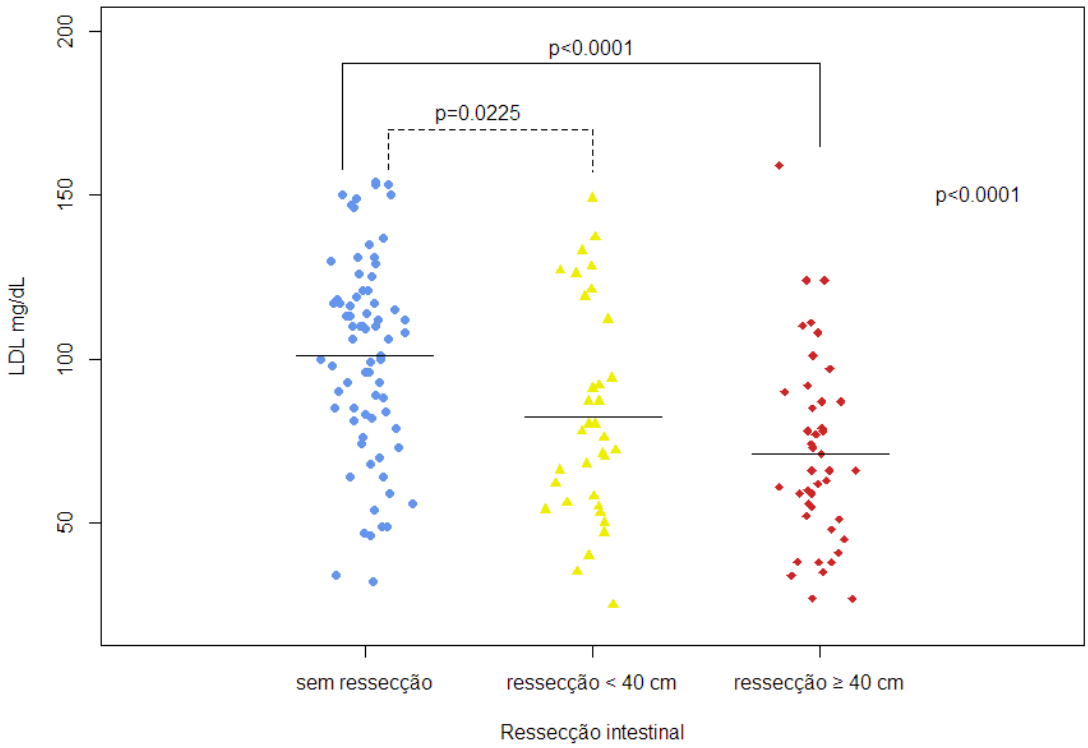


Figura 9 – LDL e ressecção intestinal prévia

4.3 Avaliação do escore de cálcio coronariano

Ao comparar a prevalência de EC > 0 entre os pacientes e os controles, não houve diferença estatisticamente significante entre os grupos (figura 10), assim como não foi observada diferença ao avaliar por faixa de EC e ao confrontar as médias do escore (tabela 3). Ao comparar a prevalência de calcificação coronariana de acordo com a faixa etária, como esperado, pode-se observar que, à medida que a idade aumentou, cresceu a prevalência de EC > 0 (p=0,0080) em todos os participantes. *Vide* figura 11.

Tabela 3 – Prevalência e extensão da calcificação coronariana nos pacientes com DC e controles

Variável	Doença Crohn n=150		Controles n=75		P-valor
	Média ou n	D.P. ou %	Média ou n	D.P. ou %	
Faixas de escore de cálcio					
0	139	92,7	70	93,3	
0-10	5	3,3	3	4,0	0,8325
10-100	5	3,3	1	1,3	
> 100	1	0,7	1	1,3	
Escore de cálcio (média)	54,50	112,23	37,79	57,70	0,3356

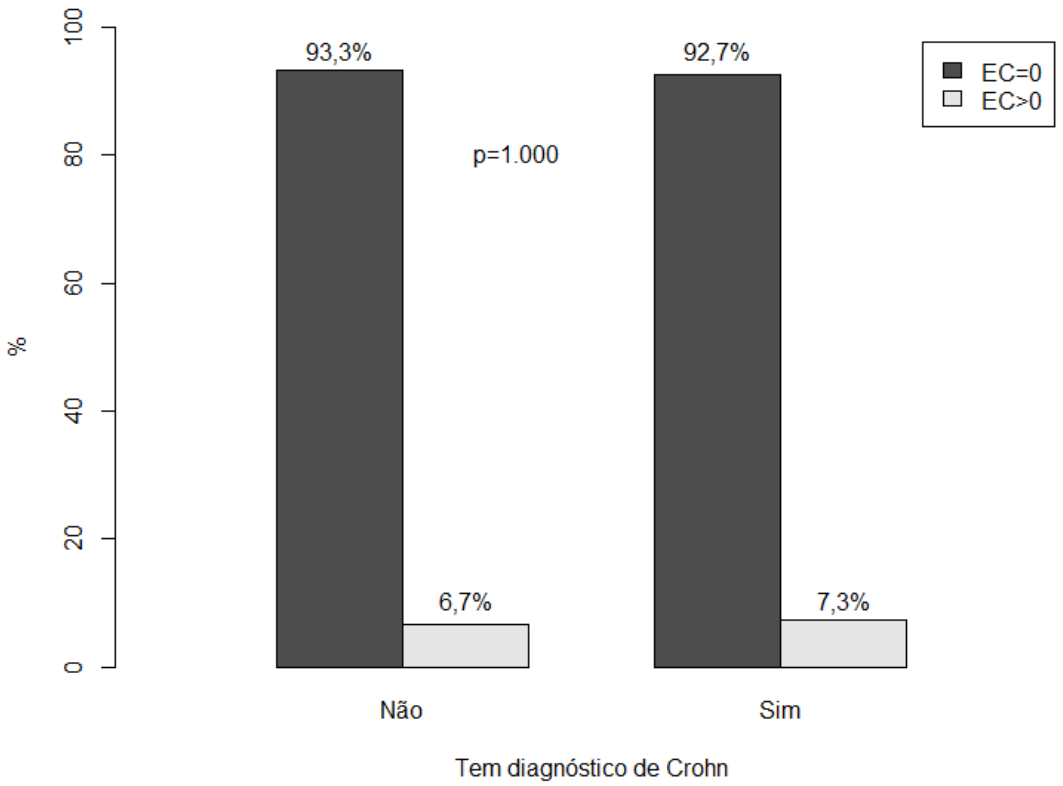


Figura 10 – Prevalência de EC > 0 e EC = 0 entre os grupos Crohn e controle

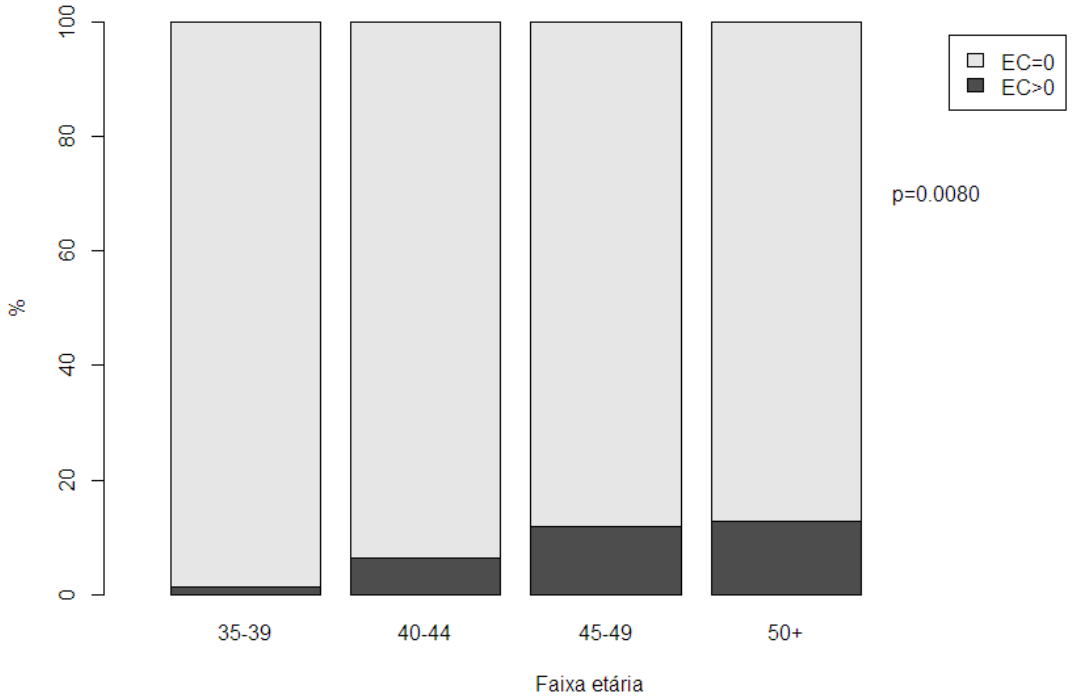


Figura 11 – Prevalência de EC > 0 e EC = 0 de acordo com a faixa etária

Ao dividir todos os participantes em dois grupos de acordo com a presença ou ausência de calcificação coronariana (EC > 0 *vs*. EC = 0, Tabela 4), foi possível observar que, como esperado, os participantes com EC > 0 apresentavam média superior de idade com relação aos com EC = 0 (47,4 *vs*. 42,9; p=0,0029), e o grupo com EC > 0 teve predominância do sexo masculino (81,3 % *vs*. 49,8 %; p=0,0185). Em concordância com o conceito de que pacientes com EC alterado apresentam maior risco cardiovascular, quando avaliamos os parâmetros IMC, GV, relação GV/GS e ERF, foi constatado que no grupo com EC > 0 os valores de todas essas variáveis foram significativamente maiores quando comparados com o grupo sem calcificação coronariana (p=0,0001; p=0,0001; p=0,0037 e p=0,0004, respectivamente). Etnia, pressão arterial e todos os parâmetros laboratoriais foram semelhantes entre os dois grupos.

Tabela 4 – Características demográficas gerais de acordo com a presença ou ausência de calcificação coronariana

Variável	EC = 0 n=209		EC > 0 n=16		P-valor
	Média ou n	D.P. ou %	Média ou n	D.P. ou %	
Idade (anos)	42,98	5,76	47,44	4,79	0,0029
Sexo (masculino)	104	49,8	13	81,3	0,0185
Etnia					
Amarelo	4	1,9	0	0	0,6853
Branco	108	51,7	7	43,8	
Negro	36	17,2	2	12,5	
Pardo	61	29,2	7	43,8	
IMC (kg/m^2)	23,82	3,19	27,19	2,91	0,0001
Hemoglobina (g/dL)	13,92	2,20	14,26	1,33	0,3540
Leucócitos (mil/mm^3)	6,913	9,444	6,570	1,884	0,4856
Plaquetas (mil/mm^3)	257	71	263	63	0,5394
PCR (mg/L)	4,81	9,47	5,13	9,29	0,9729
Glicemia de jejum (mg/dL)	85,61	9,68	84,06	7,41	0,5793
Colesterol total (mg/dL)	168,42	36,74	178,69	35,06	0,3230
LDL (mg/dL)	94,00	32,52	102,44	30,49	0,2955
HDL (mg/dL)	54,84	15,07	55,06	13,63	0,8405
Triglicerídeos (mg/dL)	100,15	38,72	115,63	46,34	0,2219
Albumina (g/dL)	4,47	0,64	4,36	0,41	0,2567
Pressão arterial sistólica (mmHg)	116,59	13,39	119,75	12,02	0,2719
Pressão arterial diastólica (mmHg)	73,09	10,13	76,31	8,11	0,2656
Framingham (%)	3,11	2,20	5,05	2,21	0,0004
Gordura visceral (cm^2)	95,34	49,79	169,12	65,54	0,0001
Gordura subcutânea (cm^2)	177,71	81,33	211,54	74,11	0,0932
Relação GV/GS (%)	60,88	38,59	86,89	35,48	0,0037

Quando foram avaliadas as características específicas dos pacientes com DC com EC = 0 *vs*. EC > 0 (tabela 5), não foi possível observar diferenças estatisticamente significantes em relação a nenhum dos seguintes parâmetros: duração da doença, classificação de Montreal, escores de atividade clínica e gravidade da doença (CDAI, HBI e escore de gravidade global), manifestações extraintestinais, tratamento ou histórico cirúrgico prévio.

Tabela 5 – Características relacionadas à doença de Crohn de acordo com a presença ou ausência de calcificação coronariana

Variável		EC = 0 n=139		EC > 0 n=11		P-valor
		Média ou n	D.P. ou %	Média ou n	D.P. ou %	
Tempo de doença (anos)		14,78	6,21	17,45	5,05	0,1121
Montreal						
Idade do diagnóstico						
	< 16 anos	4	2,9	0	0,0	
	Entre 17 anos e 40 anos	129	92,8	9	81,8	0,1316
	> 40 anos	6	4,3%	2	18,2	
Localização						
	Ileal	45	32,4	3	27,3	1,0000
	Colônica	31	22,3	4	36,4	0,2836
	Ileocolônica	61	43,9	4	36,4	0,7573
	TGI superior isolado	12	8,6	0	0,0	0,6015
Comportamento						
	Inflamatório	26	18,7	2	18,2	1,0000
	Estenosante	32	23,0	1	9,1	0,4571
	Penetrante	81	58,3	8	72,7	0,5262
	Perianal	63	45,3	6	54,5	0,7550
Manifestações extraintestinais						
	Artrite ou artralgia	50	36,0	4	36,4	1,0000
	Eritema nodoso	2	1,4	0	0,0	1,0000
Escores de atividade clínica						
	CDAI (n=131)*	120,96	92,19	86,75	69,48	0,2795
	HBI (n=131)*	2,91	3,03	2,13	1,96	0,6265
	Escore de gravidade global	24,39	15,16	23,27	15,04	0,8625
Tratamentos prévios						
	Biológico	33	23,7	3	27,3	0,7257
	Imunossupressor	34	24,0	0	0,0	0,0702
Tratamento atual						
	Biológico monoterapia	18	12,9	3	27,3	0,1852
	Imunossupressor monoterapia	35	25,2	2	18,2	1,0000
	Terapia combinada**	61	43,9	6	54,5	0,5413
	Sem biológico ou imunossupressor	25	18,0	0	0,0	0,2122
Ressecção intestinal						
	Sem ressecção	68	48,9	5	45,5	
	Pelo menos uma ressecção < 40 cm	32	23,0	2	18,2	0,8484
	Pelo menos uma ressecção ≥ 40 cm	39	28,1	4	36,4	

* 19 pacientes eram ostomizados, por isso não foi possível calcular o CDAI e o HBI.
** Biológico associado a imunossupressor.

4.4 Avaliação da HDL

Os subgrupos de pacientes (n = 32) e controles (n = 32) que realizaram a avaliação da HDL foram homogêneos com relação a idade, sexo e etnia. Como esperado, os valores de leucócitos, plaquetas e PCR foram significativamente maiores no grupo com DC (p=0,0070; p=0,0011 e p=0,0044, respectivamente). Perfil lipídico, pressão arterial e ERF não diferiram entre os grupos, mas a gordura visceral e a relação GV/GS foram superiores nos pacientes com DC (p=0,0071 e p=0,0109, respectivamente). *Vide* tabela 6.

Tabela 6 – Características demográficas gerais do subgrupo que realizou a avaliação da HDL

Variável		Doença Crohn n=32		Controles n=32		P-valor
		Média ou n	D.P. ou %	Média ou n	D.P. ou %	
Idade (anos)		44,69	6,12	44,69	5,18	0,9732
Sexo (masculino)		16	50	16	50	1,0000
Etnia	Amarelo	0	0	2	6,3	0,0624
	Branco	16	50	18	56,3	
	Negro	3	9,4	7	21,9	
	Pardo	13	40,6	5	15,6	
IMC (kg/m^2)		25,24	3,99	24,34	2,98	0,2167
Hemoglobina (g/dL)		13,57	1,36	14,20	1,39	0,0240
Leucócitos (mil/mm^3)		7,088	2,341	5,786	1,136	0,0070
Plaquetas (mil/mm^3)		284	73	228	37	0,0011
PCR (mg/L)		8,34	9,99	1,99	1,98	0,0044
Glicemia de jejum (mg/dL)		85,19	8,80	85,81	10,66	0,6915
Colesterol total (mg/dL)		174,25	38,18	183,50	31,08	0,2920
LDL (mg/dL)		99,75	32,68	104,13	25,62	0,5534
HDL (mg/dL)		53,75	13,65	59,66	19,55	0,1667
Triglicerídeos (mg/dL)		110,16	36,66	100,88	48,65	0,1950
Albumina (g/dL)		4,38	0,47	4,60	0,27	0,0079
Pressão arterial sistólica (mmHg)		118,44	12,10	121,13	11,61	0,4299
Pressão arterial diastólica (mmHg)		74,97	9,76	75,34	9,23	0,7710
Framingham (%)		3,82	2,70	3,92	2,27	0,6192
Gordura visceral (cm^2)		135,13	63,69	94,66	46,63	0,0071
Gordura subcutânea (cm^2)		203,64	91,36	187,64	67,39	0,5303

Relação GV/GS (%)	71,88	31,24	52,37	23,87	0,0109

4.4.1 Estudo funcional da HDL

O efluxo de ^{14}C-colesterol mediado por HDL não diferiu entre o grupo Crohn e o grupo controle (12,3 *vs*. 13,5 %, p=0,3911 – figura 12). No anexo E encontram-se todos os valores de efluxo de ^{14}C-colesterol mediado por HDL discriminados.

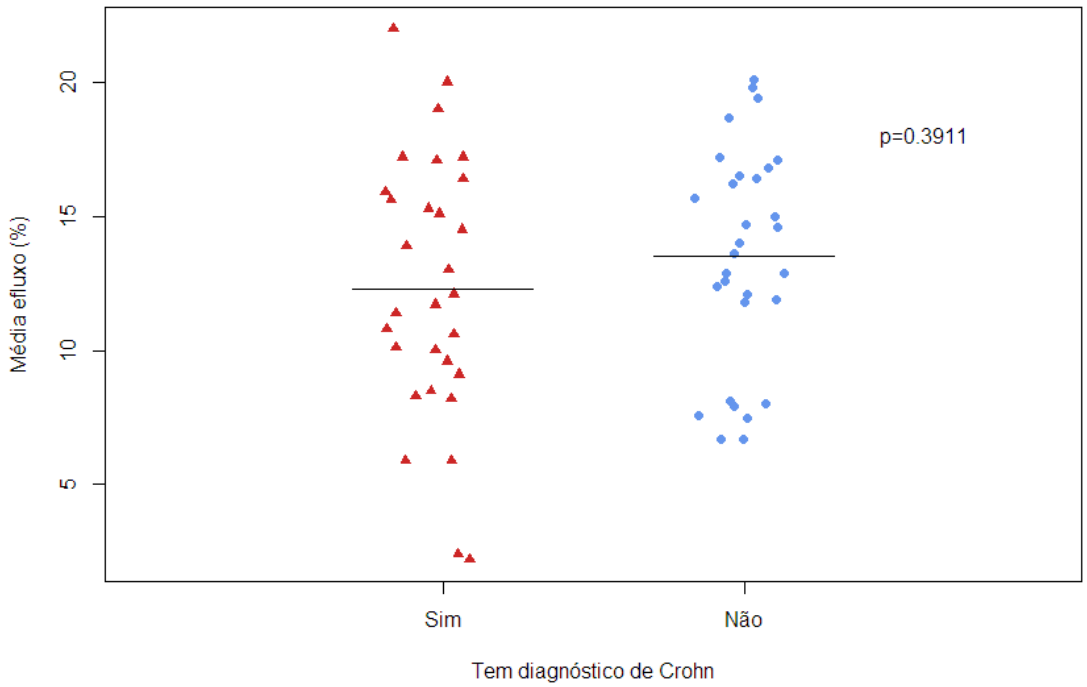


Figura 12 – Efluxo de ^{14}C-colesterol mediado por HDL nos pacientes com doença de Crohn e controles

4.4.1.1 Relação do efluxo de colesterol de macrófagos com o escore de cálcio coronariano

Foi interessante notar que a média do efluxo de colesterol nos participantes com EC > 0 (n=14) se mostrou menor do que naqueles com EC = 0 (n=46), com significância estatística (10,5 *vs*. 13,6 %, p=0,0220 – figura 13).

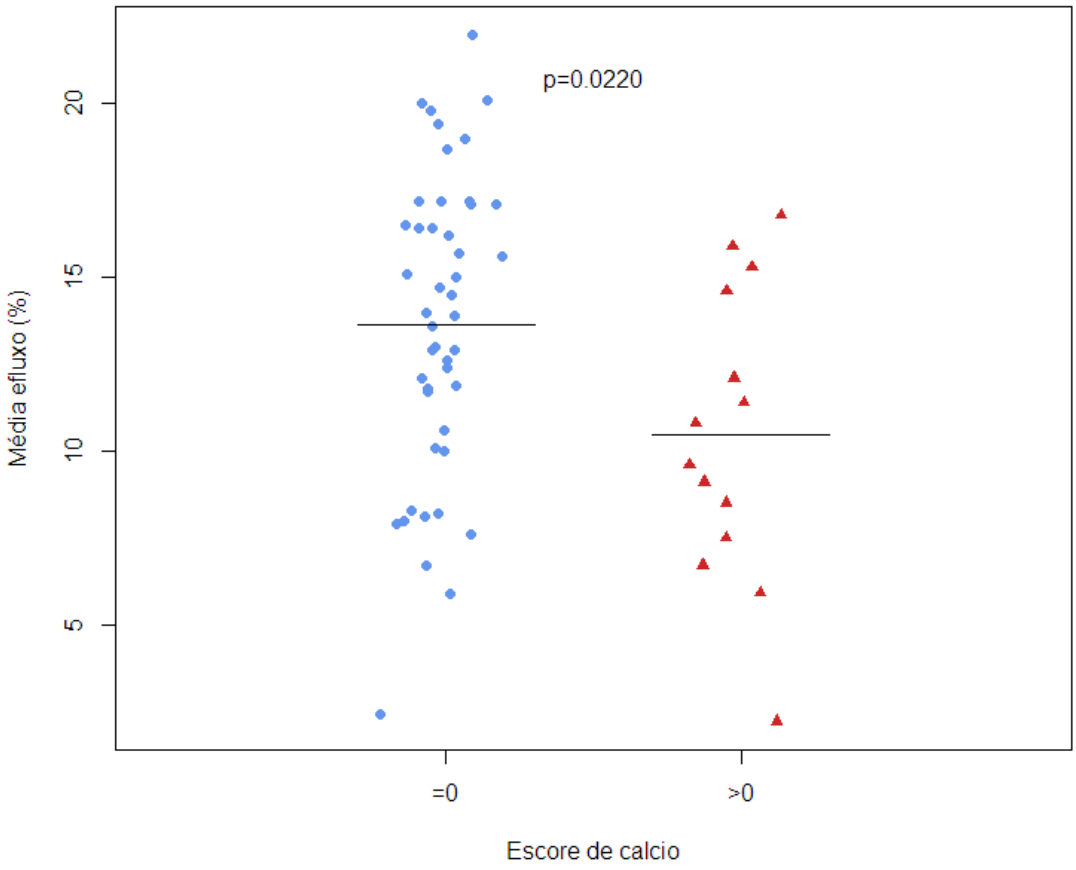


Figura 13 – Efluxo de ^{14}C-colesterol mediado por HDL nos participantes com EC = 0 *vs*. EC > 0

4.4.1.2 Parâmetros inflamatórios da doença de Crohn e o efluxo de colesterol

Ao avaliar o efluxo de colesterol mediado por HDL nos pacientes com DC em remissão (CDAI < 150, n=15) e em atividade clínica (CDAI ≥ 150, n=9), foi possível observar que nos pacientes inflamados a média do efluxo foi numericamente menor do que naqueles em remissão mas sem significância estatística (10,1 *vs*. 13,7 %, p=0,0836 – figura 14). Quando foi analisada a correlação de Spearman entre o efluxo e os escores de atividade clínica da doença (CDAI e HBI), obtivemos correlações moderadas e inversamente proporcionais, ou seja, quanto maiores os valores de CDAI e HBI, menores os

valores do efluxo (r -0,4716, p=0,0200 e r -0,4103, p=0,0465, respectivamente – figuras 15 e 16).

Também foi avaliado se pacientes com DC com PCR < 5 (n=14) e PCR ≥ 5 (n=16) apresentavam valores de efluxo distintos, mas não foi encontrada diferença estatisticamente significante entre os grupos, apesar de os pacientes com PCR < 5 apresentarem uma porcentagem de efluxo maior que aqueles com PCR ≥ 5 (13,8 *vs*. 10,9 %, p=0,1833).

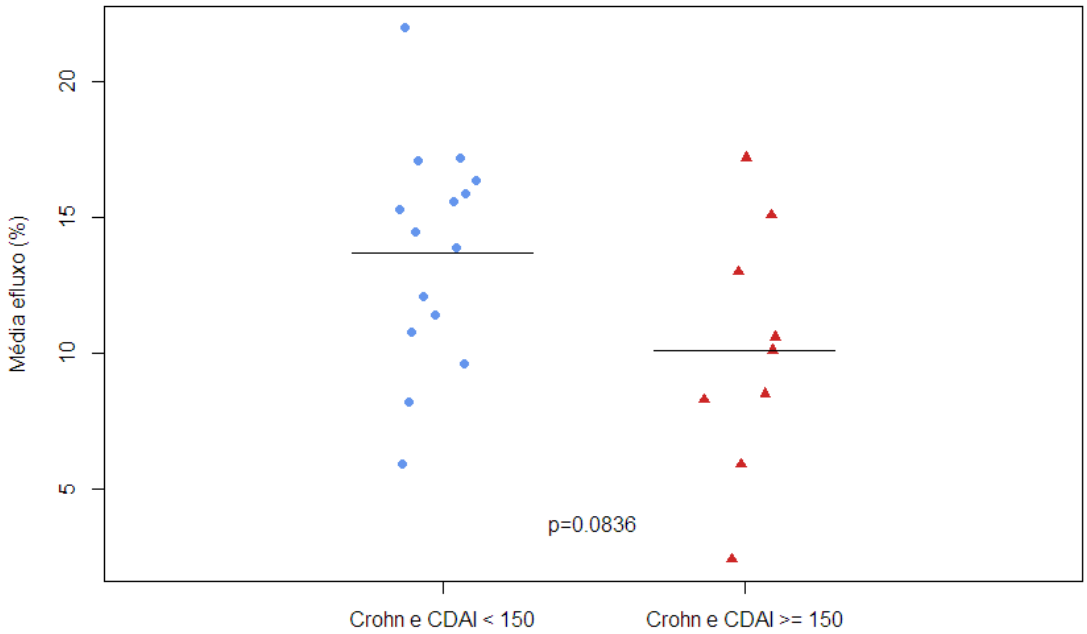


Figura 14 – Efluxo de ^{14}C-colesterol mediado por HDL nos pacientes com doença de Crohn em remissão clínica (CDAI < 150) e em atividade clínica (CDAI ≥ 150)

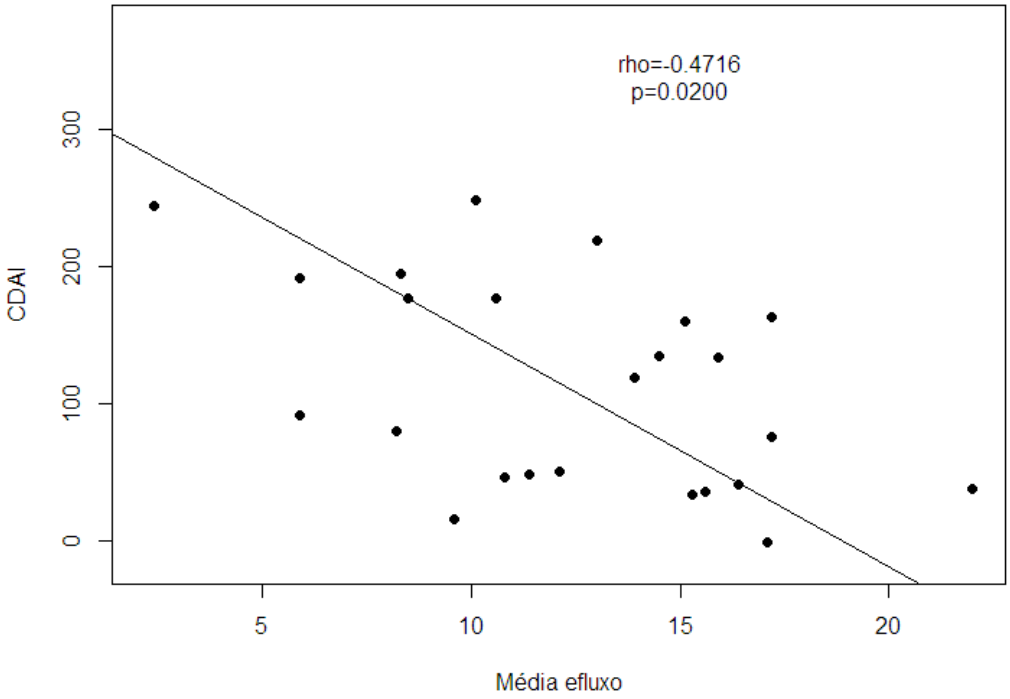


Figura 15 – Correlação entre efluxo de ^{14}C-colesterol mediado por HDL e o CDAI

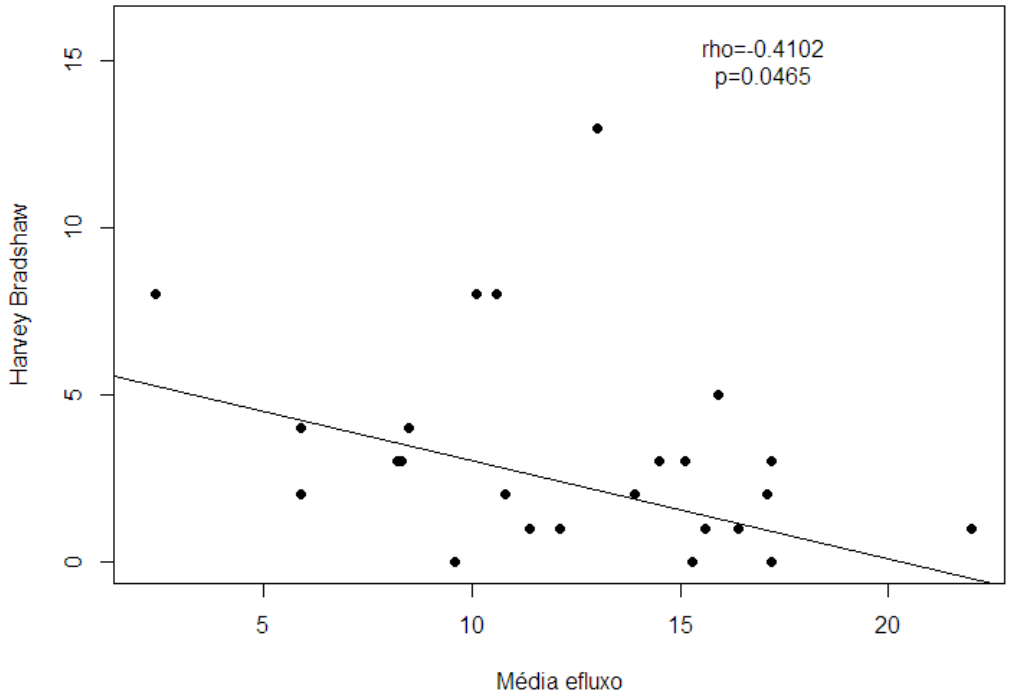


Figura 16 – Correlação entre efluxo de ^{14}C-colesterol mediado por HDL e o Harvey Bradshaw

4.4.2 Estudo da proteômica da HDL

A análise qualitativa da proteômica por *Shotgun* foi realizada em 20 amostras randomicamente selecionadas, sendo determinadas 63 proteínas no total (anexo F). Posteriormente, na etapa quantitativa pelo método PRM, foi possível quantificar 36 proteínas no total. As mesmas foram quantificadas nas 62 amostras (31 pacientes com DC e 31 controles). Para a escolha do peptídeo a ser utilizado como representante de cada proteína, realizamos a correlação de Pearson e foi escolhido o par de peptídeos com o maior *r* para cada proteína, com posterior eleição do que apresentava o menor coeficiente de variação (anexo G). É importante ressaltar que, como controle de qualidade interno, o peptídeo angiotensina I teve sua área avaliada com todas as outras proteínas e apresentou um coeficiente de variação de 34,1 % para 62 medidas (Crohn e controles), o que demonstra alta precisão e confiabilidade do método quantitativo, de acordo com os limites estabelecidos na literatura [126].

Ao comparar o grupo Crohn com o grupo controle, após ajuste do p-valor para comparações múltiplas, observamos que os pacientes com DC apresentaram menor abundância de cinco apolipoproteínas (APOA1, p=0,0378; APOA2, p=0,0378; APOD, p=0,0069; APOF, p=0,0076; e APOM, p=0,0337) e da principal proteína antioxidante (PON1, p=0,0272) em relação aos controles. As proteínas FIBA e RET4 foram mais abundantes no grupo Crohn (p=0,0337 e p=0,0378, respectivamente) (figuras 17 e 18).

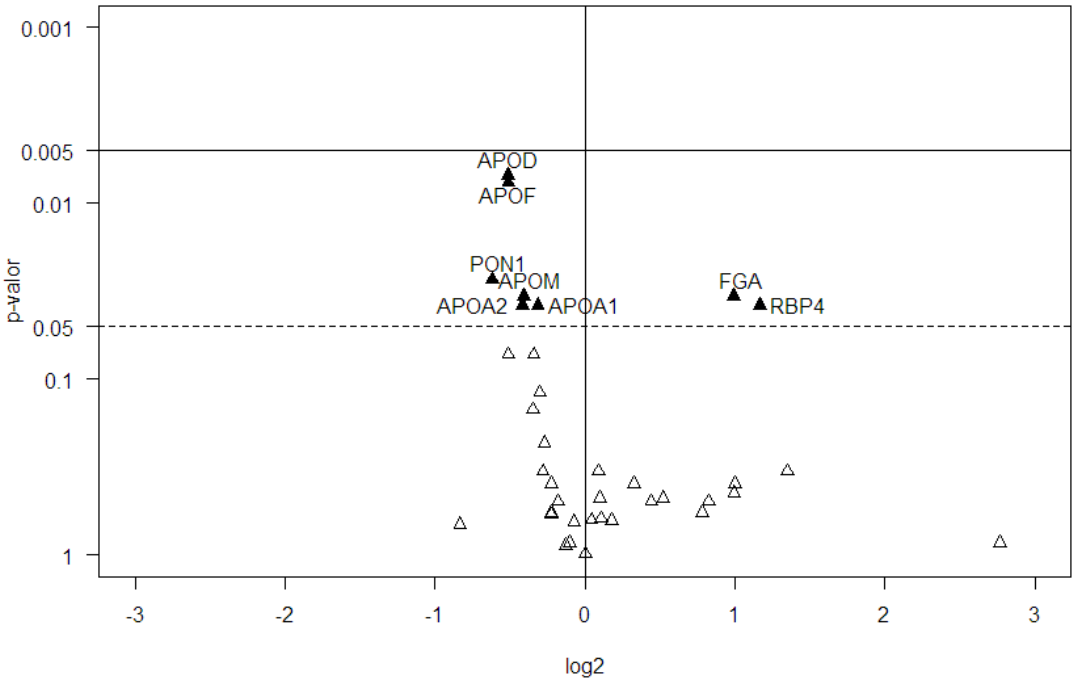


Figura 17 – Análise por PRM das proteínas da HDL nos pacientes com DC e controles

Legenda: Para cada proteína, o p-valor do teste não paramétrico é plotado contra o log2 da diferença encontrada entre casos e controles. Proteínas elevadas nos casos estão exibidas à direita do valor 0 no eixo x, enquanto as proteínas reduzidas nos casos estão demonstradas à esquerda. A nomenclatura expressa na figura representa os genes correspondentes das proteínas (*Hugo Gene Nomenclature Committee* - www.genenames.org).

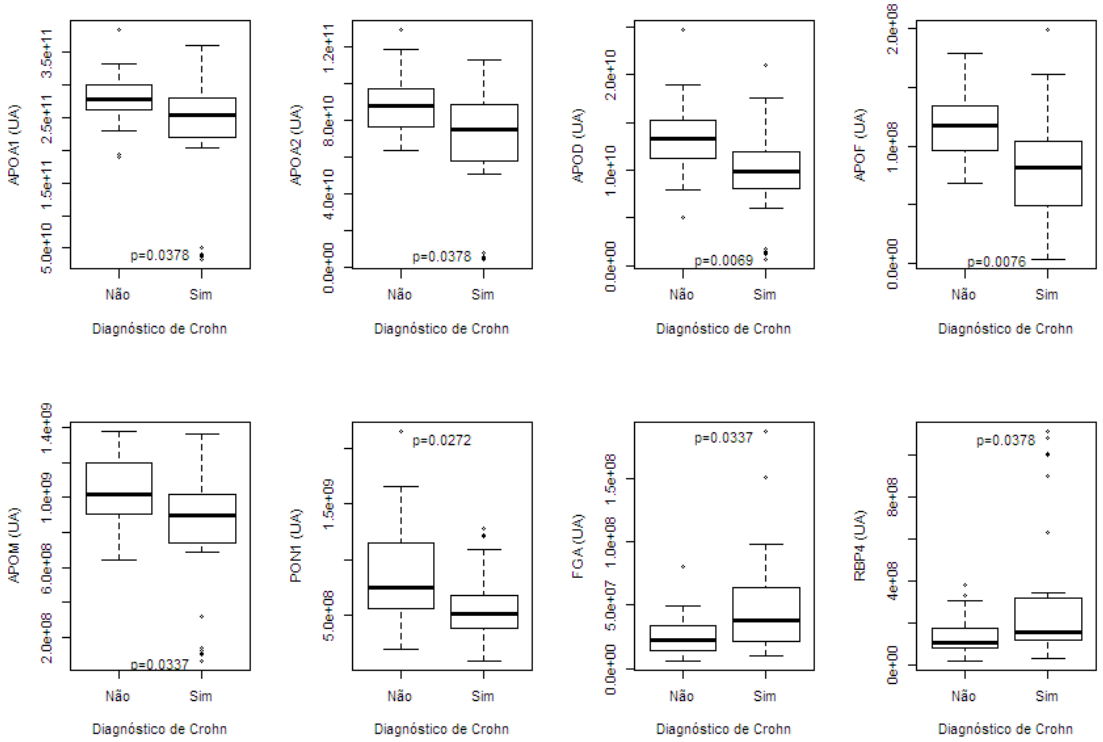


Figura 18 – Proteínas da HDL que apresentaram valores diferentes entre pacientes com doença de Crohn *vs*. controles

Legenda: UA = unidade arbitrária. A nomenclatura expressa na figura representa os genes correspondentes das proteínas (*Hugo Gene Nomenclature Committee* - www.genenames.org).

Quando comparamos os valores de APOA1 nas HDLs dos controles *vs*. Crohn com PCR < 5 *vs*. Crohn com PCR ≥ 5, percebemos que houve uma redução significativa entre aqueles inflamados e os controles (p=0,0001), sendo que essa diferença não foi notada ao comparar os controles e os que apresentavam PCR baixo (p=0,9503). *Vide* figura 19.

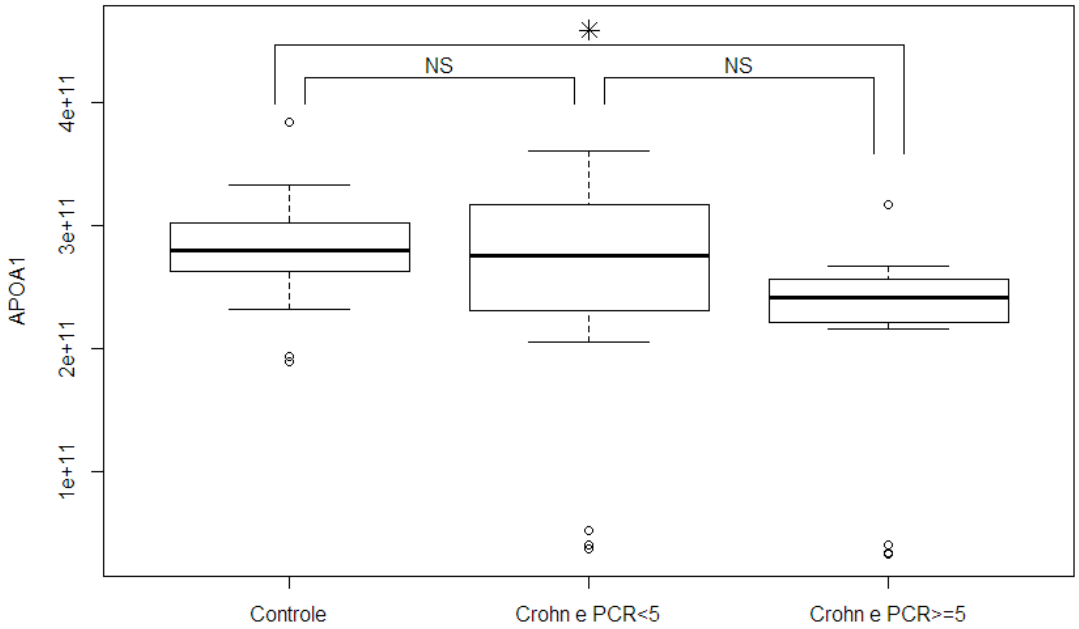


Figura 19 – Níveis de APOA1 na HDL dos controles *vs*. Crohn com PCR < 5 *vs*. Crohn com PCR ≥ 5
Legenda: *p < 0,05 e NS não significante

4.5 Análise integrada dos dados

Realizamos um modelo de regressão logística tendo como variável resposta EC > 0 e variáveis independentes DC, idade, sexo, gordura visceral, PCR, efluxo e os valores de *z score* das seguintes proteínas da HDL: APOA1, LCAT, PLTP, PON1 e SAA1. A gordura visceral apresentou associação como uma variável de risco para EC > 0 (OR 1,03 e p=0,0187) e o efluxo como uma variável protetora para calcificação coronariana (OR 0,73 e p=0,0361), o que significa que incrementos no efluxo diminuem a probabilidade de o indivíduo apresentar EC > 0 (tabela 7).

Tabela 7 – Modelo de regressão logística tendo como variável resposta EC > 0

Variável	OR	IC do OR		P-valor
		Limite inferior	Limite superior	
Doença de Crohn	1,3236	0,1138	15,3939	0,8228
Idade	1,0395	0,8579	1,2596	0,6924
Sexo	8,3425	0,3235	215,1731	0,2008
Gordura visceral	1,0342	1,0056	1,0636	0,0187
PCR	0,8965	0,7626	1,0540	0,1857
Efluxo	0,7309	0,5451	0,9799	0,0361
APOA1*	0,1821	0,0249	1,3342	0,0937
LCAT*	0,5468	0,1135	2,6333	0,4516
PLTP*	9,5836	0,8936	102,7826	0,0619
PON1*	0,2905	0,0361	2,3393	0,2455
SAA1*	0,7580	0,1601	3,5893	0,7269

Legenda: OR *Odds ratio*, IC intervalo de confiança.
*valor de *z score.*

5 DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

A questão cardiovascular no contexto das doenças inflamatórias crônicas se tornou tão relevante nos últimos anos que as duas sociedades mais respeitadas no cenário da cardiologia mundial (*American College of Cardiology* e *American Heart Association*) publicaram, na mais nova diretriz de prevenção primária de doenças cardiovasculares (2019), a recomendação de que doenças inflamatórias crônicas devem ser consideradas fatores agravantes de risco CV e, portanto, a presença dessas doenças pode pautar decisões quanto a intervenções preventivas, como introdução de estatinas para aqueles considerados de risco intermediário ou limítrofe [18]. Ainda, Harvey S. Hecht sugere que indivíduos portadores de doenças inflamatórias crônicas, como a DII, deveriam ser classificados como de risco CV intermediário independentemente da presença de fatores de risco clássicos, uma vez que a inflamação poderia ser considerada um grande fator de risco independente [58]. Diante disso, a importância de estudos como o nosso que avaliam diferentes aspectos da questão CV no contexto inflamatório se torna inegável.

5.1 Aterosclerose subclínica medida pelo EC coronariano

Nosso trabalho demonstrou que pacientes com DC apresentaram a mesma prevalência de EC alterado que indivíduos sem a doença. Grandes estudos populacionais demonstram que quanto mais jovem é o sujeito e quanto menos fatores de risco CV tradicionais apresenta, menor a prevalência de calcificação coronariana [127,128]. A DC acomete, majoritariamente, jovens (diagnóstico, na maioria dos casos, entre 15 anos e 30 anos de idade), e os pacientes com DII apresentam menor incidência de fatores de risco tradicionais para DCV, como HAS, DM, obesidade e dislipidemia [23,96]. Em congruência com essas evidências, nossos dados demonstraram ERF, IMC, colesterol total e LDL significativamente menores no grupo Crohn. Ainda, a idade média dos nossos pacientes foi de 43 anos, o que demonstra uma preponderância de jovens na

amostra. Ao comparar a idade dos nossos doentes com outros dez estudos que evidenciaram maior prevalência de calcificação coronariana em pacientes com doenças inflamatórias, como LES, AR e psoríase, é possível observar que nove [59–61,64,66–70] envolveram pacientes com médias de idade maiores, entre 45 anos e 55 anos, com apenas um trabalho apresentando média de idade menor que a nossa (40 anos) [65]. Além disso, em concordância com a ideia de que existe uma relação direta da idade com a calcificação coronariana, os participantes com EC > 0 apresentaram maior média de idade com relação aos com EC = 0 e, à medida que a idade dos pacientes aumentou, cresceu também a prevalência de EC > 0.

Grande parte dos autores que avaliaram incidência e prevalência de eventos CV e aterosclerose subclínica nas doenças inflamatórias crônicas (DII, LES, AR e psoríase) não excluíram os indivíduos que apresentavam fatores de risco CV tradicionais, como obesidade, tabagismo, hipertensão arterial, diabetes e dislipidemia. No nosso trabalho, escolhemos por excluir esses pacientes com o objetivo de avaliar a DC *per se* como fator de risco para aterosclerose. Contudo, ao proceder desta forma, não pudemos analisar a influência da doença em potencializar os fatores de risco CV tradicionais no desenvolvimento da aterosclerose. Fan *et al*., ao estudarem pacientes com DII e AR, reportaram que fatores de risco tradicionais, mais do que marcadores inflamatórios, foram importantes preditores de risco para rigidez arterial nesses indivíduos inflamados [129]. Ainda, Staniak *et al*. demonstraram associação de psoríase grave com maior risco de EC > 400, mas afirmaram que a maior prevalência de fatores de risco CV tradicionais nesses pacientes inflamados contribuiu sobremaneira, se não totalmente, para essa associação [67].

O tempo de doença foi escolhido como o principal critério de inclusão em nosso estudo, pois o processo de calcificação coronariana não é um fenômeno dinâmico, mas algo que ocorre ao longo de vários anos de exposição ao fator de risco. Sendo assim, como a DC tem a evolução marcada por períodos de surtos e remissão, um paciente em atividade inflamatória no momento poderia estar em remissão nos anos anteriores e, uma vez que não temos disponível um marcador de atividade inflamatória persistente, a duração da doença foi escolhida como o critério mais representativo da exposição crônica ao processo inflamatório. Contudo, o tempo de doença nem sempre traduz gravidade e inflamação

persistente. Kristensen *et al*. [34], ao investigarem uma coorte dinamarquesa com mais de 20.000 pacientes com DII, demonstraram que aqueles com atividade inflamatória persistente apresentaram maior risco de infarto agudo do miocárdio e maior mortalidade por DCV.

Apesar de o EC coronariano ser o exame de maior acurácia em predizer aterosclerose, a extensão da estenose luminal coronariana nem sempre é proporcional à calcificação detectada na mesma, ou seja, tanto lesões obstrutivas quanto não obstrutivas podem ocorrer sem calcificação [130]. Marwan *et al*. [131] observaram que pacientes com lesões coronarianas obstrutivas não calcificadas detectadas por angiotomografia eram mais jovens que aqueles com lesões calcificadas. Ainda, Aubry *et al*. [132] , em estudo de autópsia com pacientes portadores de AR, demonstraram que esses indivíduos apresentam maior quantidade de placas vulneráveis e de conteúdo altamente inflamatório ao exame histológico, apesar de terem uma carga aterosclerótica menos extensa em comparação com controles. É importante ressaltar que não há relação direta entre calcificação e vulnerabilidade da placa. Nossos pacientes, como já mencionado, eram, majoritariamente, jovens e não foram avaliadas placas não calcificadas. Para a análise de placas não calcificadas seria necessária a realização de angiotomografia de coronárias. No entanto, esse exame não foi incluído no trabalho pela necessidade da injeção de contraste e por expor o paciente a doses mais elevadas de radiação.

Em congruência com o fato de que não observamos maior prevalência de aterosclerose subclínica medida pelo EC nos pacientes com DC, diversos autores, ao analisarem espessura íntima-média de carótida, outro marcador reconhecido de doença aterosclerótica, igualmente não encontraram diferença entre o grupo com DII e os controles [41,48,133–138]. Além disso, apesar de muitos autores salientarem que há uma maior incidência de eventos CV nos pacientes com DC [20–34], alguns estudos demonstram que o risco de doença isquêmica do miocárdio e a mortalidade por DCV não são superiores nos pacientes com DC em comparação com a população geral [25,139–142].

É interessante notar que, para outras doenças inflamatórias crônicas imunomediadas, como AR, LES e psoríase, as evidências confluem para o conceito de que as mesmas estão fortemente ligadas à aterosclerose acelerada

e ao aumento da incidência de eventos CV [59,60,70,132,61–63,65–69]. Contudo, como exposto anteriormente, a associação da DC com maior risco CV ainda é controversa. Baena-Díez *et al*. [14] , ao estudarem a incidência de DCV em mais de 900 mil pacientes com diversas doenças inflamatórias crônicas imunomediadas, dentre elas a DII, evidenciaram que a taxa de incidência anual de DCV foi inferior naqueles com DII em relação aos portadores de poliartropatias inflamatórias e doenças do tecido conjuntivo. Fatores que podem fundamentar essa diferença no risco CV encontrado na DII em comparação com outras doenças inflamatórias são vistas no estudo de Fan *et al*. que, ao avaliarem indivíduos com AR e DII, demonstraram que os pacientes com AR apresentaram níveis séricos de PCR mais altos, além de maior prevalência de fatores de risco CV tradicionais que aqueles com DII [129].

5.2 Perfil lipídico quantitativo

Processos inflamatórios e infecciosos, sabidamente, podem prejudicar o metabolismo das lipoproteínas e alterar as concentrações plasmáticas de lipídios e lipoproteínas [143]. Essas alterações podem ser resumidas por aumento nos triglicérides pelo acúmulo de lipoproteína de densidade muito baixa (VLDL) e diminuição nos níveis de HDL e LDL [143,144]. Embora os níveis de LDL diminuam durante processos inflamatórios e infecciosos em humanos, há aumento de partículas pequenas e densas de LDL [145] que parecem ser mais aterogênicas que partículas de tamanhos maiores [146].

A fisiopatologia exata implicada na queda dos níveis de colesterol em situações de resposta de fase aguda ainda não foi totalmente elucidada. No entanto, a ação das citocinas na redução dos níveis de colesterol é bem reconhecida em doentes críticos [147]; outros fatores que podem contribuir para as alterações nas concentrações lipídicas nesses pacientes são insuficiência adrenal, hemodiluição por perda sanguínea, aumento da necessidade de colesterol para a reparação tecidual e baixa ingesta de colesterol por meio das dietas enterais e parenterais [148–151].

Em nosso estudo, os níveis de HDL e LDL se apresentaram mais baixos nos pacientes, enquanto que os valores de triglicérides não diferiram entre os grupos. Hrabovsky *et al*., ao avaliarem indivíduos com DC ativa, também detectaram valores de LDL e HDL mais baixos nos doentes e, ainda, concluíram que a síntese e a absorção de colesterol nesses pacientes são alteradas [152]. Cinco outros trabalhos, assim como o nosso, evidenciaram níveis de LDL e HDL reduzidos nos casos com DC [35,44,45,96,153]. Quanto aos triglicerídeos, alguns autores detectaram valores aumentados [45,96,154] e outros reduzidos [35,153] nos pacientes com DC.

Outro fator que pode ter contribuído para valores de CT e LDL mais baixos nos pacientes com relação aos controles é o histórico cirúrgico, uma vez que cerca de metade dos indivíduos com DC já havia sido submetida a alguma ressecção intestinal prévia. Por meio da circulação entero-hepática, os ácidos biliares são reabsorvidos, predominantemente, no íleo terminal e transportados para o fígado. Portanto, ressecções do segmento distal do íleo podem causar má absorção de ácidos biliares e aumento da perda fecal dos mesmos. Consequentemente, com o intuito de aumentar a produção de ácidos biliares, o colesterol é consumido para que ocorra a conversão do mesmo em ácido biliar [155]. A interrupção da circulação entero-hepática pode afetar, ainda, a solubilização micelar do colesterol e a exclusão do íleo terminal pode, portanto, resultar em absorção prejudicada do mesmo. Em congruência com o conceito de que ressecções intestinais podem alterar o metabolismo das lipoproteínas, Akerlund *et al*. [156], ao avaliarem um pequeno grupo de pacientes com DC submetidos a ressecções intestinais, demonstraram que CT e LDL foram menores nesses indivíduos, assim como em nosso estudo, e negativamente correlacionados ao comprimento do segmento ileal ressecado.

5.3 Funcionalidade da HDL

Diferentemente de Ripollés *et al.* [45] que evidenciaram prejuízo no efluxo de colesterol nos indivíduos com DII, nossos dados demonstram que não houve diferença no efluxo de colesterol de macrófagos nos pacientes com DC quando

comparados com controles. É importante ressaltar que, apesar de nosso *n* não ter sido grande, o estudo anteriormente citado avaliou um número ainda menor de indivíduos (21 doentes) e utilizou metodologia distinta da nossa no experimento. No referido estudo, o efluxo foi avaliado no soro depletado em apolipoproteína B de pacientes com DII (e não HDL isolada) e em linhagem celular de hepatoma de rato [45]. Ao utilizar o soro e não a HDL isolada, a análise do efluxo embute as variações quantitativas de HDL de cada indivíduo e, ainda, é influenciada por outros componentes da circulação, como albumina, que, reconhecidamente, exercem efeitos sobre o efluxo de colesterol. Portanto, este experimento com soro não representa a capacidade intrínseca da HDL em remover colesterol celular. Há, além disso, o tipo celular diferente (células de hepatoma e não macrófagos) que apresenta distinção na expressão de receptores de HDL.

O experimento que avalia o efluxo de colesterol de macrófagos pode ser realizado de duas formas distintas: utilizando HDL isolada por ultracentrifugação do plasma ou por meio do soro depletado em apolipoproteína B. Em nosso estudo avaliamos o efluxo mediado por HDL isolada. Sabe-se que, ao isolar a HDL por ultracentrifugação, as moléculas de pré-beta HDL, importantes para o efluxo de colesterol mediado por ABCA1, podem não ser selecionadas, uma vez que a faixa de densidade da mesma é diferente da faixa de densidade da HDL total [157]. Ainda, albumina, transferrina e outras proteínas plasmáticas estão presentes no soro e as mesmas apresentam múltiplas atividades biológicas que podem interferir no efluxo [71]. Contudo, cabe ressaltar que não há evidências de que um ensaio possa ser fisiologicamente mais relevante ou melhor que o outro para avaliar a capacidade de efluxo da HDL.

5.3.1 Efluxo e atividade inflamatória

Holzer *et al*. [99], ao analisarem pacientes com psoríase, evidenciaram que o efluxo de colesterol de macrófagos se mostrou reduzido. Cabe ressaltar que, diferentemente dos nossos pacientes que estavam, em sua maioria, em remissão clínica, no trabalho anteriormente citado, apenas aqueles com doença

moderada a grave foram selecionados. Ainda, houve uma relação inversa do efluxo com o PASI (*Psoriasis Area and Severity Index*), ou seja, naqueles em que a doença era mais grave, o efluxo se mostrou mais débil.

Charles-Schoeman *et al*. [158] investigaram indivíduos com AR e detectaram, assim como em nosso estudo, que não houve diferença entre a capacidade de efluxo da HDL dos indivíduos com AR e controles. No entanto, a HDL daqueles pacientes em atividade (medida pelo DAS28 – *Disease activity score* utilizando 28 articulações) apresentou a capacidade de promover efluxo de colesterol significativamente reduzida comparada com a HDL daqueles em remissão clínica. Ainda, assim como no estudo com psoríase, foi observada uma correlação inversa entre o efluxo de colesterol e o DAS28.

Em concordância com os autores acima citados, nossos resultados também demonstraram correlação inversa do efluxo com o CDAI e o HBI e, quando comparamos o efluxo daqueles pacientes em atividade clínica com aqueles em remissão, é notável a redução do efluxo naqueles com a doença ativa, com um p-valor próximo da significância. Diante disso, a atividade inflamatória vigente pode ser um fator que influencie a funcionalidade da HDL.

5.3.2 Efluxo e escore de cálcio coronariano

Ao comparar o efluxo de colesterol entre os indivíduos com EC = 0 e EC > 0, foi possível observar redução estatisticamente significante do efluxo naqueles que apresentaram calcificação coronariana. No modelo de regressão logística foi evidente que incrementos no efluxo diminuem a probabilidade de o indivíduo apresentar EC > 0, com um OR de 0,73. Khera *et al*. [159] evidenciaram que a capacidade da HDL em promover o efluxo de colesterol dos macrófagos foi forte e inversamente associada à aterosclerose subclínica (medida pela espessura íntima-média de carótida) e à doença arterial coronariana obstrutiva (aferida por angiotomografia de coronárias).

5.4 Proteômica da HDL

Tanto as apolipoproteínas contidas na HDL quanto as concentrações plasmáticas das mesmas podem sofrer alterações em vigência de inflamação aguda e crônica. Algumas apolipoproteínas importantes no metabolismo lipídico se apresentaram reduzidas na análise de proteômica dos nossos pacientes em relação aos controles: APOA1, APOA2, APOD, APOF e APOM.

A APOA1 é a principal proteína da HDL e, com isso, a mais profundamente estudada. É a apolipoproteína estrutural mais importante da HDL, tem papel central no transporte reverso de colesterol, é um cofator da LCAT [160], a enzima responsável pela esterificação do colesterol na HDL e, ainda, atua na estabilização de certas enzimas antioxidantes, como a PON1 [161]. Em vigência de inflamação, essa apolipoproteína central para as funções protetoras da HDL pode se encontrar depletada tanto pela redução da síntese hepática quanto pela substituição da mesma por proteínas de fase aguda, como a SAA [162,163]. A APOA2, a segunda proteína mais abundante da HDL, também demonstrou ter papel no efluxo de colesterol de macrófagos *in vivo* [164] e a APOM participa na produção de óxido nítrico endotelial [75], além de desempenhar, igualmente, papel no efluxo de colesterol em modelos animais [165].

Holzer *et al.* [99], ao analisarem a proteômica da HDL em pacientes com psoríase, em concordância com nossos achados, evidenciaram níveis de APOA1, APOF e APOM reduzidos nos indivíduos com a doença inflamatória. Contudo, a APOA2 se mostrou elevada naqueles com psoríase. Não existem trabalhos reportados, até o momento, sobre proteômica da HDL na DC, mas Ripollés *et al.* [45] e van Leuven *et al.* [44] relataram valores séricos diminuídos de APOA1 nos pacientes com DC em atividade clínica, mas não naqueles em remissão da doença. Foi interessante notar em nosso estudo que pacientes com PCR elevado apresentaram níveis de APOA1 significativamente menores que os controles, o que não foi observado naqueles com PCR baixo. Esse achado corrobora o fato de a inflamação ativa ter papel importante na depleção da APOA1.

Outra proteína depletada na HDL dos pacientes com DC foi a PON1, uma enzima com importante papel na atividade antioxidante da HDL ao interagir com a APOA1 e a LCAT e inibir a oxidação da LDL [166]. Sabe-se que a inflamação

pode, além de reduzir os níveis de PON1, tornar esta enzima disfuncional, como demonstrado em pesquisas com AR [98] e psoríase [167]. Boehm *et al*. avaliaram a atividade da PON1 em pacientes com DC e perceberam que a mesma estava reduzida naqueles com a doença ativa, mas não naqueles em remissão clínica [168]. Adicionalmente, Szczeklik *et al*. encontraram níveis circulantes de PON1 reduzidos em indivíduos com DC em comparação com controles [153].

Os pacientes com DC apresentaram maiores níveis de fibrinogênio (FIBA) e proteína ligadora de retinol 4 (RET4) na avaliação da proteômica da HDL. Vaiser *et al*., ao descreverem as funções biológicas das proteínas da HDL, incluíram o FIBA e a RET4 como proteínas relacionadas à resposta de fase aguda [117]. Em concordância com nosso estudo, Holzer *et al*. também encontraram níveis de RET4 aumentados na HDL de pacientes com psoríase [99]. Com relação ao FIBA, sabe-se que pacientes com DII apresentam níveis séricos aumentados do mesmo devido a hiperfibrinólise, o que contribui para o conhecido estado de hipercoagulabilidade [169]. Cabe ressaltar que não se pode descartar que o FIBA e a RET4 sejam apenas contaminantes do plasma na análise e não proteínas de fato constituintes da molécula da HDL.

5.5 Limitações do estudo

Os participantes foram pareados por idade e sexo e, com relação a etnia, houve heterogeneidade entre os grupos com predominância da etnia branca nos controles. Uma vez que o estudo MESA evidenciou que indivíduos de etnia caucasiana, tanto do sexo masculino quanto feminino, apresentam mais calcificação coronariana com relação às outras etnias [128], a predominância de etnia branca nos controles pode ser considerada um viés que contribuiu para a prevalência de calcificação coronariana superior à esperada nesse grupo.

A maioria dos trabalhos que envolvem medida do efluxo de colesterol utilizam macrófagos murinos tratados com AMP cíclico para que o transportador ABCA1 seja regulado positivamente. Pesquisas em animais sugerem que o efluxo mediado por ABCA1 é um tipo importante de efluxo, uma vez que está associado com a gravidade da aterosclerose. Assim, é postulado que o efluxo

mediado por ABCA1 forneça uma avaliação seletiva do modo de efluxo de maior relevância na avaliação da gravidade da aterosclerose e suas consequências clínicas [170]. Em nosso estudo optamos por avaliar o efluxo de forma global e não o efluxo com regulação positiva da ABCA1. Cabe ressaltar que não existe um padrão estabelecido para a medição da capacidade de efluxo de colesterol de macrófagos, portanto, não se pode inferir superioridade de um método em relação a outro.

Ademais, apesar de o efluxo de colesterol de macrófagos ser a função protetora contra a aterosclerose mais destacada e estudada da HDL, é relevante considerar que esta lipoproteína possui diversas outras propriedades, como melhora da disfunção endotelial [75], atividade anti-inflamatória [76,77], antitrombótica [78] e antioxidante [79], além de atuação antiapoptótica endotelial [80]. No presente trabalho, como não foram avaliadas as outras funções da HDL, não podemos inferir que esta lipoproteína apresente sua funcionalidade absolutamente preservada nos pacientes com DC.

6 CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

Pacientes com DC sem fatores de risco CV tradicionais não apresentam maior prevalência de calcificação coronariana. No entanto, exibem alterações na constituição proteica da HDL que não afetam o efluxo de colesterol, mas apontam para uma molécula menos protetora e com potencial de impactar o desenvolvimento de doenças cardiovasculares em longo prazo.

7 ANEXOS

7.1 Anexo A – Convite aos funcionários e servidores do HCFMUSP (grupo controle)

Prezados,

Nós, do grupo de intestino (Departamento de Gastroenterologia do HC-FMUSP), queremos fazer um convite a vocês! Começamos um estudo para avaliação de risco de infarto do coração nos pacientes com doença de Crohn (uma doença que inflama o intestino).

Mas o que eu tenho a ver com essa pesquisa?
Precisamos além dos pacientes com doença de Crohn, de pessoas saudáveis para fazermos um grupo de comparação e você pode ser um desses voluntários!

E o que eu terei que fazer no estudo?
Exames de sangue para avaliar a presença de fatores de risco de doenças coronarianas, como a dosagem do colesterol e glicose, além de uma tomografia do coração no INCOR (sem contraste, com baixa radiação e duração de cerca de 5 minutos) que pode mostrar lesões precoce nas artérias do coração. Todos os resultados dos exames serão disponibilizados para você!

E o que eu ganho participando dessa pesquisa?
A participação é voluntária, sem custos e você não receberá nenhuma bonificação. As vantagens estão nos exames de *check-up* que você fará.

Qualquer um de nós pode participar do estudo?
Não! Você precisa preencher alguns critérios principais:
1- Ter entre 35 e 55 anos;
2- Não estar gestante;
3- Não ter história pessoal de infarto ou AVC;
4- Não ter história em parente de primeiro grau de infarto;
5- Não ter diabetes ou estar em uso de remédios para diabetes;
6- Não ter pressão alta ou estar em uso de remédios para a pressão;
7- Não ter colesterol alto ou estar em uso de remédios para colesterol.

Se você se encaixa dentro dos critérios para o estudo e quer fazer parte da pesquisa, acesse http://j.mp/2oCxsqA para preencher alguns dados pessoais ou entre em contato por whatsapp com a Dra. Beatriz Rocha (Tel.: 11 985864354).

Atenciosamente, Dr. André Zonetti de Arruda Leite e Dra. Beatriz da Cunha Lopes Rocha

7.2 Anexo B – Critérios de elegibilidade (modelo de formulário do *RedCap*)

Confidential

Cópia de segurança Escore de cálcio coronariano e sua correlação com a análise da proteômica do colesterol HDL em pacientes com doença de Crohn

Page 1 of 3

Critérios de Inclusão e Exclusão

Study ID	_____
Tem diagnóstico de Crohn?	◯ Yes ◯ No
Como você se define em relação a cor da pele	◯ Branca ◯ Negra ◯ Pardo ◯ Amarela ◯ Não informado
Sexo	◯ Feminino ◯ Masculino
Data de nascimento	_____
Idade na inclusão(anos)	_____
Data do diagnóstico	_____
Tempo de doença	_____
Você está gestante ?	◯ Yes ◯ No
História pessoal atual ou prévia de doença coronariana (dor anginosa típica, síndrome coronariana aguda, revascularização miocárdica, angioplastia percutânea ou teste não invasivo com evidência de isquemia), doença arterial obstrutiva periférica, doença cerebrovascular ou doença carotídea obstrutiva documentada?	◯ Yes ◯ No
História familiar de doença arterial coronariana prematura (parente de primeiro grau masculino < 55 anos ou feminino < 65 anos) ?	◯ Yes ◯ No
Diabetes Mellitus tipo 1 ou tipo 2 (em uso de insulina, hipoglicemiantes orais ou hemoglobina glicada ≥ 6,5% em duas dosagens ou glicemia de jejum ≥ 126 mg/dl em duas dosagens ou teste oral de tolerância a glicose com glicemia de 2h ≥ 200 mg/dl em duas dosagens ou uma única glicemia aleatória ≥ 200 mg/dl em paciente com sintomas clássicos de hiperglicemia) ?	◯ Yes ◯ No

06/02/2019 08:45 www.projectredcap.org REDCap

Hipertensão arterial sistêmica (em uso de anti-hipertensivos ou pressão arterial ≥140/90 mmHg) ?	◯ Yes ◯ No
Dislipidemia (em uso de hipolipemiantes ou LDL ≥ 160 mg/dl ou triglicerídeos ≥ 150 mg/dl) ?	◯ Yes ◯ No
Doença renal crônica com clearance de creatinina < 60 ml/min/1,73m2 ou em terapia renal substitutiva ?	◯ Yes ◯ No
Doenças do tecido conjuntivo (AR, LES, psoríase, esclerose sistêmica, espondilite anquilosante e doença mista do tecido conjuntivo) ?	◯ Yes ◯ No
Dependência atual de prednisona, definida pelo uso de dose maior ou igual a 7,5mg/dia ou dose equivalente de outro corticosteroide por mais de 3 meses?	◯ Yes ◯ No
Altura (cm)	_____
Peso (kg)	_____ (use ponto para casa decimal)
Peso Ideal	_____
IMC	_____
Você fuma ?	◯ Yes ◯ No
Fumou nos últimos 10 anos?	◯ Yes ◯ No
O paciente preenche os critérios para participar do estudo? 1 = Sim 2 = Não	_____
Imprimir selecionando a opção frente-verso na impressora [Attachment: "Pedido de exames.pdf"]	
Imprimir selecionando a opção frente-verso na impressora [Attachment: "Pedido de exames - fem.pdf"]	

Confidential

O paciente concorda em ser contactado por telefone para orientações sobre o protocolo e agendamento de retorno para realização de escore de cálcio?	◯ Yes ◯ No
Nome (completo)	_____
CPF	_____
E-mail	_____
RG-HC	_____ (Apenas para pacientes HC)
Telefone de contato do paciente	_____ (Incluir código de área (DD))
Telefone residencial (paciente)	_____ (Incluir código de área (DD))
Telefone comercial (paciente)	_____ (Incluir código de área (DD))
Celular (paciente)	_____ (Incluir código de área (DD))

Imprimir, pedir ao paciente para assinar o TCLE na consulta e orientar a preencher o diário de sintomas em casa na semana anterior a realização do escore de cálcio e trazer no dia do exame

[Attachment: "Arquivo para impressão - Crohn.pdf"]

Imprimir, pedir ao paciente para assinar o TCLE na consulta e trazer no dia do exame

[Attachment: "tcle.pdf"]

O termo de consentimento e o diário de sintomas, quando aplicável, foram impressos e entregues ao paciente?	◯ Yes ◯ No
Informações adicionais	_____
Médico responsável pelo preenchimento	_____

7.3 Anexo C – Parecer consubstanciado do comitê de ética em pesquisa

USP - HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE

Plataforma Brasil

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Escore de cálcio coronariano e sua correlação com as alterações funcionais e estruturais do colesterol HDL em pacientes com doença de Crohn

Pesquisador: André Zonetti de Arruda Leite

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 63076516.4.0000.0068

Instituição Proponente: HOSPITAL DAS CLINICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA U S P

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.888.865

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um projeto onde os pesquisadores vão avaliar a aterioscerose coronariana através do escore de cálcio em pacientes com doença de Crohn e correlacionar com alterações funcionais e estruturais do HDL colesterol. O projeto apresenta relevância na área médica, não apresenta riscos para o sujeito da pesquisa e poderá trazer benefícios a curto prazo. A metodologia está adequada para o desenvolvimento do projeto e análise dos seus resultados.

Objetivo da Pesquisa:

Os pesquisadores vão avaliar a aterioscerose coronariana através do escore de cálcio em pacientes com doença de Crohn e correlacionar com alterações funcionais e estruturais do HDL colesterol. Os objetivos estão claros e apresentam relevância na especialidade médica.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

O protocolo apresenta risco baixo para o sujeito da pesquisa.Será realizada uma coleta de sangue e para a aquisição do EC serão utilizadas uma dose baixa de radiação, que não apresenta riscos para o sujeito da pesquisa. Ainda o paciente poderá se beneficiar com a tratamento se for detectada a aterisclerose por este método.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa importante no apoio ao diagnóstico clínico.

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar
Bairro: Cerqueira Cesar **CEP:** 05.403-010
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)2661-7585 **Fax:** (11)2661-7585 **E-mail:** cappesq.adm@hc.fm.usp.br

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O TCLE está adequado para o desenvolvimento da pesquisa.

Recomendações:

Recomendamos sua aprovação.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovado.

Considerações Finais a critério do CEP:

Em conformidade com a Resolução CNS nº 466/12 – cabe ao pesquisador: a) desenvolver o projeto conforme delineado; b) elaborar e apresentar relatórios parciais e final; c)apresentar dados solicitados pelo CEP, a qualquer momento; d) manter em arquivo sob sua guarda, por 5 anos da pesquisa, contendo fichas individuais e todos os demais documentos recomendados pelo CEP; e) encaminhar os resultados para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico participante do projeto; f) justificar perante ao CEP interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_619595.pdf	15/12/2016 13:40:32		Aceito
Outros	CAAPesq_ass.pdf	15/12/2016 13:39:19	André Zonetti de Arruda Leite	Aceito
Folha de Rosto	Folha_rosto.pdf	15/12/2016 13:37:33	André Zonetti de Arruda Leite	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	tcle.pdf	02/12/2016 18:03:50	André Zonetti de Arruda Leite	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto.pdf	30/11/2016 10:16:35	André Zonetti de Arruda Leite	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 11 de Janeiro de 2017

Assinado por:
Joel Faintuch
(Coordenador)

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar
Bairro: Cerqueira Cesar **CEP:** 05.403-010
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)2661-7585 **Fax:** (11)2661-7585 **E-mail:** cappesq.adm@hc.fm.usp.br

7.4 Anexo D – Termo de consentimento livre e esclarecido

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO - HC-FMUSP

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME:.....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº: ..... CPF:.....

SEXO: Masculino ☐ Feminino ☐ DATA NASCIMENTO: ...../...../.....

ENDEREÇO:.....

Nº ..... APTO: ..... BAIRRO: .....

CIDADE ..... CEP:.....

TELEFONE: DDD (.....) .....

DADOS SOBRE A PESQUISA

TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA:
Avaliação do escore de cálcio coronariano e da capacidade funcional da HDL em pacientes com doença de Crohn

PESQUISADOR: **André Zonetti de Arruda Leite**

CARGO/FUNÇÃO: **Médico** INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº **77910**

UNIDADE DO HC-FMUSP: **Gastroenterologia**

2. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO ☐ RISCO MÉDIO ☐

RISCO BAIXO ☒ RISCO MAIOR ☐

3. DURAÇÃO DA PESQUISA : **2 anos**

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO - HC-FMUSP

Proposta

Você está sendo convidado a participar de um estudo clínico com objetivo de avaliar a presença de doença nas artérias do coração e a capacidade do colesterol bom (HDL) de proteger as coronárias. A participação desse estudo é voluntária, não remunerada e você terá total liberdade de deixar de participar a qualquer momento, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição.

Este estudo avaliará a presença de doença nas artérias do coração através da quantificação da calcificação presentes nas artérias do coração por meio da tomografia computadorizada e, também, irá analisar como está funcionando o seu colesterol bom (HDL). Os avanços na área de saúde ocorrem através de estudos como este, por isso sua participação e consentimento são muito importantes. Este documento faz parte do processo de consentimento livre e esclarecido e tem como objetivo informar-lhe sobre o estudo e o que pode acontecer se você decidir participar dele.

Leia este documento atentamente para ter certeza de que entendeu todas as informações que ele apresenta.

Procedimentos previstos

Se você decidir participar do estudo, passará em uma consulta onde serão feitas várias perguntas sobre a sua doença inflamatória intestinal, seus antecedentes patológicos e sua história familiar. Ainda, algumas medidas serão realizadas: peso, altura e pressão arterial. Será agendado um dia para a realização de uma tomografia computadorizada do coração para avaliar as artérias coronárias. Para realizar este exame não é necessária punção de veia, pois não é administrado contraste. Não é necessário jejum e no dia do exame você deita numa maca e entra em um tubo rapidamente. A duração do exame é de, no máximo, 5 minutos a partir do momento em que deita na maca. No mesmo dia, serão coletados 50ml de sangue por punção periférica de veia do antebraço para análise experimental em laboratório do funcionamento do seu colesterol bom (HDL) e dosagem de alguns outros elementos: creatinina, hemograma completo, glicemia de jejum, hemoglobina glicada, colesterol total e frações, PCR, ácido fólico, vitamina B12, albumina e betaHCG para pacientes do sexo feminino em idade fértil.

Riscos esperados dos procedimentos rotineiros e experimentais

Você será exposto ao desconforto e risco adicional a uma coleta de sangue, que são mínimos como: possibilidade de desconforto ou dor no local da punção, além de hematoma ou inchaço temporário.

Para a realização da tomografia do coração são utilizadas baixas doses de radiação, comparável a realização de uma mamografia ou a 4 raios-x de tórax. Estudos em seres humanos demonstram que não existe risco de desenvolvimento de câncer com a exposição a apenas um exame de tomografia do coração, devido a quantidade pequena de radiação.

Benefícios

Se for encontrada doença nas suas artérias coronárias, você será encaminhado a um ambulatório específico para seu acompanhamento, com o objetivo de prevenir a ocorrência de doenças cardiovasculares, como infarto, acidente vascular cerebral ("derrame cerebral"), entre outros.

Armazenamento de amostras em biorrepositório

Uma amostra do seu plasma (parte liquida do sangue sem os glóbulos vermelhos ou brancos) será guardada por até 5 anos após o final do estudo para eventual repetição de algum exame. Se for necessário a realização de outros exames não previstos neste protocolo, mas que venham a contribuir para o objetivo deste ou de outro estudo, uma nova autorização será solicitada. A nova dosagem somente será realizada após a devida autorização do comitê de ética. Você poderá optar por autorizar as novas dosagens através da assinatura de novo termo de consentimento informado ou deixar a cargo do comitê de ética tal autorização.

Garantia de acesso:

Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é o Dr **André Zonetti de Arruda Leite**. que pode ser encontrado no endereço **Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 255, ICHC. 9º.andar, sala 9159; CEP 05403-000 - São Paulo / SP; Telefone 2661-6447**. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: 3069-6442 ramais 16, 17, 18 ou 20, FAX: 3069-6442 ramal 26 – E-mail: cappesq@hcnet.usp.br.

Garantida a liberdade da retirada de consentimento

Você poderá retirar esse consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição.

Direito de confidencialidade

As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgado a sua identificação ou de qualquer outro participante do estudo.

Direito de ser mantido atualizado

Os resultados dos exames serão lançados no sistema de laudos do laboratório central e o resultado do escore de cálcio será divulgado a você após a realização do exame e também constará no sistema de laudos e imagens do hospital. Os resultados dos estudos experimentais com o colesterol bom não poderá ser traduzido em um dado útil para você e, por esse motivo, o resultado dessa parte da pesquisa só será divulgado a você se solicitado.

Despesas e compensações

Você não receberá qualquer recompensa financeira para participar de qualquer fase do estudo, incluindo exames ou consultas.

O pesquisador assume o compromisso de utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, sobre o estudo "**Avaliação do escore de cálcio coronariano e da capacidade funcional da HDL em pacientes com doença de Crohn**".

Eu discuti com o Dr. **André Zonetti de Arruda Leite** sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficou claro para mim quais os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, a garantia de confidencialidade e de esclarecimento permanente. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou

durante o mesmo, sem penalidades, prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido.

_____

Assinatura do paciente Data ___/___/___

_____

Assinatura da testemunha Data ___/___/___

para casos de pacientes analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

_____

Assinatura do responsável pelo estudo Data ___/___/___

7.5 Anexo E – Valores de efluxo de ^{14}C-colesterol mediado por HDL

Grupo	n	Média	Mediana	Desvio padrão	Mínimo	Máximo	1º Quartil	3º Quartil	P-valor
Crohn	30	12,3	11,9	4,91	2,2	22	9,1	15,9	0,3911
Controle	30	13,5	13,8	4,07	6,7	20,1	11,8	16,5	
EC=0	46	13,64	13,95	4,37	2,40	22,00	10,60	17,10	0,0220
EC>0	14	10,46	10,20	4,23	2,20	16,80	7,50	14,60	
Crohn CDAI<150	15	13,73	14,5	4,1	5,9	22	11,1	16,15	0,0836
Crohn CDAI≥150	9	10,12	10,1	4,57	2,4	17,2	8,3	13	
Crohn e PCR<5	14	13,85	13,70	4,65	8,30	22,00	9,60	17,20	0,1833
Crohn e PCR≥5	16	10,94	11,55	4,86	2,20	17,20	7,05	14,80	

7.6 Anexo F – Proteínas determinadas pelo método *Shotgun*

Proteínas*	**Genes***
Apolipoproteína B	APOB
Albumina sérica	ALB
Complemento C3	C3
Lipoproteína (a)	LPA
Apolipoproteína A1	APOA1
Alfa-1-antitripsina	SERPINA1
Apolipoproteína A4	APOA4
Apolipoproteína E	APOE
Proteína ligadora de vitamina D	GC
Transferrina	TF
Clusterina	CLU
Beta-2-glicoproteína 1	APOH
Antitrombina III	SERPINC1
Alfa-2-antiplasmina	SERPINF2
Apolipoproteína D	APOD
Alfa-1-antiquimotripsina	SERPINA3
Apolipoproteína M	APOM
Fator derivado do epitélio pigmentar	SERPINF1
Apolipoproteína L1	APOL1
Paraoxonase 1	PON1
Alfa-1-beta-glicoproteína	A1BG
Proteína AMBP	AMBP
Angiotensinogênio	AGT
Inibidor da protease plasmática C1	SERPING1
Proteína ligadora de retinol	RBP4
Prenilcisteína oxidase 1	PCYOX1
Hemopexina	HPX
Gelsolina	GSN
Glicoproteína-alfa-2HS	AHSG
Apolipoproteína C3	APOC3
Fosfatidilcolina-esterol aciltransferase	LCAT
Vitronectina	VTN

Apolipoproteína A2	APOA2
Proteína sérica amiloide A4	SAA4
Transtiretina	TTR
Tetranectina	CLEC3B
Proteína transportadora de fosfolipídios	PLTP
Haptoglobina	HP
Subunidade lábil ácida complexa da proteína ligadora ao fator de crescimento insulina-like	IGFALS
Apolipoproteína C2	APOC2
Proteína sérica amiloide A1	SAA1
Apolipoproteína C1	APOC1
Beta-Ala-His dipeptidase	CNDP1
Proteína transporadora de ester de colesterol	CETP
Proteína relacionada a haptoglobina	HPR
Fator ativador de plaquetas acetil-hidrolase	PLA2G7
Proproteína convertase subtilisina / kexina tipo 9	PCSK9
Apolipoproteína F	APOF
Apolipoproteína C4	APOC4
Hornerina	HRNR
Peptídeo antimicrobiano catelicidina	CAMP
Complemento C9	C9
Subunidade beta da hemoglobina	HBB
Protrombina	F2
Globulina ligadora de corticosteroide	SERPINA6
N-acetilmuramoil-L-alanina amidase	PGLYRP2
Alfa-1-glicoproteína ácida	ORM2
Complemento C4-B	C4B
CD5 antígeno-like	CD5L
Paraoxonase 3	PON3
Proteína sérica amiloide A2	SAA2
Antígeno de diferenciação de monócitos CD14	CD14
Cistatina C	CST3

*A nomenclatura dos genes foi determinada de acordo com o *Hugo Gene Nomenclature Committee* (www.genenames.org) e as proteínas foram nomeadas de acordo com o banco de dados UniProt (www.uniprot.org).

7.7 Anexo G - Proteínas e peptídeos determinados pelo método PRM

Proteínas*	Genes*	Peptídeos detectados	Carga	Peptídeo utilizado
A1BG	A1BG	HQFLLTGDTQGR	3	HQFLLTGDTQGR
		LLELTGPK	2	
FETUA	AHSG	HTLNQIDEVK	2	CNLLAEK
		CNLLAEK	2	
ALBU	ALB	LVNEVTEFAK	2	AEFAEVSK
		AEFAEVSK	2	
APOA1	APOA1	DYVSQFEGSALGK	2	VQPYLDDFQK
		VQPYLDDFQK	2	
		THLAPYSDELR	2	
		THLAPYSDELR	3	
		AKPALEDLR	2	
APOA2	APOA2	SPELQAEAK	2	SPELQAEAK
		EQLTPLIK	2	
APOA4	APOA4	LGEVNTYAGDLQK	2	LGEVNTYAGDLQK
		LEPYADQLR	2	
		TQVNTQAEQLR	2	
		ISASAEELR	2	
		LAPLAEDVR	2	
APOB	APOB	GNVATEISTER	2	GNVATEISTER
		LTISEQNIQR	2	
APOC1	APOC1	EFGNTLEDK	2	EWFSETFQK
		EWFSETFQK	2	
APOC2	APOC2	TAAQNLYEK	2	TYLPAVDEK
		TYLPAVDEK	2	
APOC3	APOC3	DALSSVQESQVAQQAR	2	DALSSVQESQVAQQAR (carga 2)
		DALSSVQESQVAQQAR	3	
		DYWSTVK	2	
APOC4	APOC4	ELLETVVNR	2	ELLETVVNR
		AWFLESK	2	
APOD	APOD	CPNPPVQENFDVNK	2	VLNQELR
		CPNPPVQENFDVNK	3	
		IPTTFENGR	2	
		VLNQELR	2	

APOE	APOE	SELEEQLTPVAEETR	2	SELEEQLTPVAEETR (carga 3)
		SELEEQLTPVAEETR	3	
		LAVYQAGAR	2	
		LGPLVEQGR	2	
		LQAEAFQAR	2	
		VQAAVGTSAAPVPSDNH	2	
		VQAAVGTSAAPVPSDNH	3	
APOF	APOF	SLPTEDCENEK	2	SLPTEDCENEK
		DANISQPETTK	2	
APOH	APOH	ATVVYQGER	2	EHSSLAFWK
		EHSSLAFWK	2	
APOL1	APOL1	VTEPISAESGEQVER	2	VAQELEEK
		VAQELEEK	2	
		LNILNNNYK	2	
APOM	APOM	DGLCVPR	2	DGLCVPR
		SLTSCLDSK	2	
		NQEACELSNN	2	
CO3	C3	TGLQEVEVK	2	TGLQEVEVK
CD5L	CD5L	HQNQWYTVCQTGWSLR	3	LVGGDNLCSGR
		LVGGDNLCSGR	2	
CETP	CETP	ITKPALLVLNHETAK	4	ITKPALLVLNHETAK
		VIQTAFQR	2	
		ASYPDITGEK	2	
CLUS	CLU	EILSVDCSTNNPSQAK	2	ELDESLQVAER
		ELDESLQVAER	2	
FIBA	FGA	GGSTSYGTGSETESPR	2	QFTSSTSYNR
		QFTSSTSYNR	2	
VTDB	GC	VCSQYAAYGEK	2	VCSQYAAYGEK
		LCDNLSTK	2	
HBA	HBA1	VGAHAGEYGAEALER	3	VGAHAGEYGAEALER
LCAT	LCAT	SSGLVSNAPGVQIR	2	TYSVEYLDSSK
		TYSVEYLDSSK	2	
		LEPGQQEEYYR	2	
APOA	LPA	GTLSTTITGR	2	GTLSTTITGR
		GISSTTVTGR	2	
		GTFSTTVTGR	2	
PCYOX	PCYOX1	TLLETLQK	2	TLLETLQK
		IFSQETLTK	2	
PLTP	PLTP	AVEPQLQEEER	2	AVEPQLQEEER

		ATYFGSIVLLSPAVIDSPLK	3	
PON1	PON1	SFNPNSPGK	2	SFNPNSPGK
		STVELFK	2	
		IQNILTEEPK	2	
PON3	PON3	STVEIFK	2	HDNWDLTQLK
		HDNWDLTQLK	2	
CXCL7	PPBP	NIQSLEVIGK	2	GTHCNQVEVIATLK
		GTHCNQVEVIATLK	3	
		ICLDPDAPR	2	
RET4	RBP4	QEELCLAR	2	LIVHNGYCDGR
		LIVHNGYCDGR	3	
SAA1	SAA1	GPGGVWAAEAISDAR	2	FFGHGAEDSLADQAANEWGR
		GPGGVWAAEAISDAR	3	
		FFGHGAEDSLADQAANEWGR	3	
SAA4	SAA4	GPGGVWAAK	2	FRPDGLPK
		FRPDGLPK	2	
A1AT	SERPINA1	TDTSHHDQDHPTFNK	3	QINDYVEK
		TDTSHHDQDHPTFNK	4	
		QINDYVEK	2	
TTHY	TTR	GSPAINVAVHVFR	2	AADDTWEPFASGK
		AADDTWEPFASGK	2	

*A nomenclatura dos genes foi determinada de acordo com o *Hugo Gene Nomenclature Committee* (www.genenames.org) e as proteínas foram nomeadas de acordo com o banco de dados UniProt (www.uniprot.org).

8 REFERÊNCIAS

8 REFERÊNCIAS

1. Libby P. Inflammation and Atherosclerosis. Circulation. 2002;105(9):1135–43.
2. Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. N Engl J Med. 2005;352(16):1685–95.
3. Ridker PM, Rifai N, Pfeffer M, Sacks F, Lepage S, Braunwald E. Elevation of tumor necrosis factor-alpha and increased risk of recurrent coronary events after myocardial infarction. Circulation. 2000;101(18):2149–53.
4. Ridker PM, Hennekens CH, Buring JE, Rifai N. C-reactive protein and other markers of inflammation in the prediction of cardiovascular disease in women. N Engl J Med. 2000;342(12):836–43.
5. Ridker PM, Rifai N, Stampfer MJ, Hennekens CH. Plasma concentration of interleukin-6 and the risk of future myocardial infarction among apparently healthy men. Circulation. 2000;101(15):1767–72.
6. Hwang SJ, Ballantyne CM, Sharrett AR, Smith LC, Davis CE, Gotto AMJ, et al. Circulating adhesion molecules VCAM-1, ICAM-1, and E-selectin in carotid atherosclerosis and incident coronary heart disease cases: the Atherosclerosis Risk In Communities (ARIC) study. Circulation. 1997;96(12):4219–25.
7. Haverkate F, Thompson SG, Pyke SD, Gallimore JR, Pepys MB. Production of C-reactive protein and risk of coronary events in stable and unstable angina. European Concerted Action on Thrombosis and Disabilities Angina Pectoris Study Group. Lancet. 1997;349(9050):462–6.
8. Ridker PM, Buring JE, Shih J, Matias M, Hennekens CH. Prospective study of C-reactive protein and the risk of future cardiovascular events among apparently healthy women. Circulation. 1998;98(8):731–3.
9. Danesh J, Whincup P, Walker M, Lennon L, Thomson A, Appleby P, et al. Low grade inflammation and coronary heart disease: prospective study and updated meta-analyses. BMJ. 2000;321(7255):199–204.
10. Torzewski M, Rist C, Mortensen RF, Zwaka TP, Bienek M, Waltenberger J, et al. C-reactive protein in the arterial intima: role of C-reactive protein receptor-dependent monocyte recruitment in atherogenesis. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2000;20(9):2094–9.
11. Bhakdi S, Torzewski M, Klouche M, Hemmes M. Complement and atherogenesis: binding of CRP to degraded, nonoxidized LDL enhances complement activation. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 1999;19(10):2348–54.
12. Pasceri V, Willerson JT, Yeh ET. Direct proinflammatory effect of C-reactive protein on human endothelial cells. Circulation. 2000;102(18):2165–8.
13. Van Doornum S, McColl G, Wicks IP. Accelerated atherosclerosis: an extraarticular feature of rheumatoid arthritis? Arthritis Rheum. 2002;46(4):862–73.
14. Baena-Díez JM, Garcia-Gil M, Comas-Cufí M, Ramos R, Prieto-Alhambra

D, Salvador-González B, et al. Association between chronic immune-mediated inflammatory diseases and cardiovascular risk Cardiac risk factors and prevention. Heart. 2017;01136(1):2017–311279.
15. Avina-Zubieta JA, Thomas J, Sadatsafavi M, Lehman AJ, Lacaille D. Risk of incident cardiovascular events in patients with rheumatoid arthritis: A meta-analysis of observational studies. Ann Rheum Dis. 2012;
16. Thomas G, Mancini J, Jourde-Chiche N, Sarlon G, Amoura Z, Harlé J-R, et al. Mortality associated with systemic lupus erythematosus in France assessed by multiple-cause-of-death analysis. Arthritis Rheumatol. 2014;66(9):2503–11.
17. Bernatsky S, Boivin J-F, Joseph L, Manzi S, Ginzler E, Gladman DD, et al. Mortality in systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum. 2006;54(8):2550–7.
18. Arnett DK, Blumenthal RS, Albert MA, Michos ED, Buroker AB, Miedema MD, et al. 2019 ACC/AHA Guideline on the Primary Prevention of Cardiovascular Disease: Executive Summary. J Am Coll Cardiol. 2019;
19. Gomollón F, Dignass A, Annese V, Tilg H, Van Assche G, Lindsay JO, et al. 3rd European Evidence-based Consensus on the Diagnosis and Management of Crohn's Disease 2016: Part 1: Diagnosis and Medical Management. J Crohn's Colitis. 2017;11(1):3–25.
20. Panhwar MS, Mansoor E, Al-Kindi SG, Sinh P, Katz J, Oliveira GH, et al. Risk of Myocardial Infarction in Inflammatory Bowel Disease: A Population-based National Study. Inflamm Bowel Dis. 2018;25(6):1–8.
21. Sun H-H, Tian F. Inflammatory bowel disease and cardiovascular disease incidence and mortality: A meta-analysis. Eur J Prev Cardiol. 2018;25(15):1623–31.
22. Rungoe C, Basit S, Ranthe MF, Wohlfahrt J, Langholz E, Jess T. Risk of ischaemic heart disease in patients with inflammatory bowel disease: A nationwide Danish cohort study. Gut. 2013;62(5):689–94.
23. Yarur AJ, Deshpande AR, Pechman DM, Tamariz L, Abreu MT, Sussman D a. Inflammatory bowel disease is associated with an increased incidence of cardiovascular events. Am J Gastroenterol. 2011;106(4):741–7.
24. Haapamäki J, Roine RP, Turunen U, Färkkilä M a, Arkkila PET. Increased risk for coronary heart disease, asthma, and connective tissue diseases in inflammatory bowel disease. J Crohns Colitis. 2011;5(1):41–7.
25. Ha C, Magowan S, Accortt N a, Chen J, Stone CD. Risk of Arterial Thrombotic Events in Inflammatory Bowel Disease. Am J Gastroenterol. 2009;104(6):1445–51.
26. Bernstein CN, Wajda A, Blanchard JF. The Incidence of Arterial Thromboembolic Diseases in Inflammatory Bowel Disease: A Population-Based Study. Clin Gastroenterol Hepatol. 2008;6(1):41–5.
27. Kirchgesner J, Beaugerie L, Carrat F, Andersen NN, Jess T, Schwarzinger M. Increased risk of acute arterial events in young patients and severely active IBD: a nationwide French cohort study. Gut. 2018;67(7):1261–8.
28. Aniwan S, Pardi DS, Tremaine WJ, Loftus E V. Increased Risk of Acute Myocardial Infarction and Heart Failure in Patients With Inflammatory Bowel Diseases. Clin Gastroenterol Hepatol. 2018;16(10):1607-1615.e1.

29. Feng W, Chen G, Cai D, Zhao S, Cheng J, Shen H. Inflammatory Bowel Disease and Risk of Ischemic Heart Disease: An Updated Meta-Analysis of Cohort Studies. J Am Heart Assoc. 2017;6(8).
30. Xiao Z, Pei Z, Yuan M, Li X, Chen S, Xu L. Risk of Stroke in Patients with Inflammatory Bowel Disease: A Systematic Review and Meta-analysis. J Stroke Cerebrovasc Dis. 2015;24(12):2774–80.
31. Kristensen SL, Ahlehoff O, Lindhardsen J, Erichsen R, Lamberts M, Khalid U, et al. Inflammatory Bowel Disease Is Associated With an Increased Risk of Hospitalization for Heart Failure. Circ Hear Fail. 2014;7(5):717–22.
32. Singh S, Singh H, Loftus E V., Pardi DS. Risk of cerebrovascular accidents and ischemic heart disease in patients with inflammatory bowel disease: A systematic review and meta-analysis. Clin Gastroenterol Hepatol. 2014;12(3):382–93.
33. Fumery M, Xiaocang C, Dauchet L, Gower-Rousseau C, Peyrin-Biroulet L, Colombel J-F. Thromboembolic events and cardiovascular mortality in inflammatory bowel diseases: A meta-analysis of observational studies. J Crohn's Colitis. 2014;8(6):469–79.
34. Kristensen SL, Ahlehoff O, Lindhardsen J, Erichsen R, Jensen GV, Torp-Pedersen C, et al. Disease Activity in Inflammatory Bowel Disease Is Associated with Increased Risk of Myocardial Infarction, Stroke and Cardiovascular Death – A Danish Nationwide Cohort Study. PLoS One. 2013;8(2):e56944.
35. Cappello M, Licata A, Calvaruso V, Bravatà I, Aiello A, Torres D, et al. Increased expression of markers of early atherosclerosis in patients with inflammatory bowel disease. Eur J Intern Med. 2017;37:83–9.
36. Theocharidou E, Gossios TD, Griva T, Giouleme O, Douma S, Athyros VG, et al. Is There an Association Between Inflammatory Bowel Diseases and Carotid Intima-media Thickness? Preliminary Data. Angiology. 2014;65(6):543–50.
37. Dagli N, Poyrazoglu OK, Ferda Dagli A, Sahbaz F, Karaca I, Ali Kobat M, et al. Is Inflammatory Bowel Disease a Risk Factor for Early Atherosclerosis? Angiology. 2010;61(2):198–204.
38. van Leuven SI, Hezemans R, Levels JH, Snoek S, Stokkers PC, Hovingh GK, et al. Enhanced atherogenesis and altered high density lipoprotein in patients with Crohn's disease. J Lipid Res. 2007;48(12):2640–6.
39. Papa A, Santoliquido A, Danese S, Covino M, Campli C Di, Urgesi R, et al. Increased carotid intima-media thickness in patients with inflammatory bowel disease. Aliment Pharmacol Ther. 2005;22(9):839–46.
40. Zanoli L, Ozturk K, Cappello M, Inserra G, Geraci G, Tuttolomondo A, et al. Inflammation and Aortic Pulse Wave Velocity: A Multicenter Longitudinal Study in Patients With Inflammatory Bowel Disease. J Am Heart Assoc. 2019;8(3):1–9.
41. Ozturk K, Guler AK, Cakir M, Ozen A, Demirci H, Turker T, et al. Pulse Wave Velocity, Intima Media Thickness, and Flow-mediated Dilatation in Patients with Normotensive Normoglycemic Inflammatory Bowel Disease. Inflamm Bowel Dis. 2015;21(6):1.
42. Zanoli L, Rastelli S, Inserra G, Lentini P, Valvo E, Calcagno E, et al. Increased arterial stiffness in inflammatory bowel diseases is dependent

upon inflammation and reduced by immunomodulatory drugs. Atherosclerosis. 2014;234(2):346–51.
43. Schicho R, Marsche G, Storr M. Cardiovascular complications in inflammatory bowel disease. Curr Drug Targets. 2015;16(3):181–8.
44. van Leuven SI, Hezemans R, Levels JH, Snoek S, Stokkers PC, Hovingh GK, et al. Enhanced atherogenesis and altered high density lipoprotein in patients with Crohn's disease. J Lipid Res. 2007;48(12):2640–6.
45. Ripollés Piquer B, Nazih H, Bourreille A, Segain JP, Huvelin JM, Galmiche J-P, et al. Altered lipid, apolipoprotein, and lipoprotein profiles in inflammatory bowel disease: consequences on the cholesterol efflux capacity of serum using Fu5AH cell system. Metabolism. 2006;55(7):980–8.
46. Schinzari F, Armuzzi A, De Pascalis B, Mores N, Tesauro M, Melina D, et al. Tumor Necrosis Factor-α Antagonism Improves Endothelial Dysfunction in Patients With Crohn's Disease. Clin Pharmacol Ther. 2008;83(1):70–6.
47. Roifman I, Sun YC, Fedwick JP, Panaccione R, Buret AG, Liu H, et al. Evidence of endothelial dysfunction in patients with inflammatory bowel disease. Clin Gastroenterol Hepatol. 2009;7(2):175–82.
48. Principi M, Mastrolonardo M, Scicchitano P, Gesualdo M, Sassara M, Guida P, et al. Endothelial function and cardiovascular risk in active inflammatory bowel diseases. J Crohn's Colitis. 2013;7(10):e427–33.
49. McDonnell M, Liang Y, Noronha A, Coukos J, Kasper DL, Farraye FA, et al. Systemic Toll-like receptor ligands modify B-cell responses in human inflammatory bowel disease. Inflamm Bowel Dis. 2011;17(1):298–307.
50. Oussalah A, Guéant J-L, Peyrin-Biroulet L. Meta-analysis: hyperhomocysteinaemia in inflammatory bowel diseases. Aliment Pharmacol Ther. 2011;34(10):1173–84.
51. Scaldaferri F. Haemostatic system in inflammatory bowel diseases: New players in gut inflammation. World J Gastroenterol. 2011;17(5):594.
52. Danese S, Sans M, Scaldaferri F, Sgambato A, Rutella S, Cittadini A, et al. TNF- Blockade Down-Regulates the CD40/CD40L Pathway in the Mucosal Microcirculation: A Novel Anti-Inflammatory Mechanism of Infliximab in Crohn's Disease. J Immunol. 2006;176(4):2617–24.
53. Demer LL, Tintut Y. Vascular calcification: pathobiology of a multifaceted disease. Circulation. 2008;117(22):2938–48.
54. Wexler L, Brundage B, Crouse J, Detrano R, Fuster V, Maddahi J, et al. Coronary artery calcification: pathophysiology, epidemiology, imaging methods, and clinical implications. A statement for health professionals from the American Heart Association. Writing Group. Circulation. 1996;94(5):1175–92.
55. Detrano R, Guerci AD, Carr JJ, Bild DE, Burke G, Folsom AR, et al. Coronary Calcium as a Predictor of Coronary Events in Four Racial or Ethnic Groups. N Engl J Med. 2008;358(13):1336–45.
56. Sociedade Brasileira de Cardiologia, Xavier HT, Izar MC, Faria Neto JR, Assad MH, Rocha VZ, et al. V Brazilian Guidelines on Dyslipidemias and Prevention of Atherosclerosis. Arq Bras Cardiol. 2013;101(4 Suppl 1):1–20.
57. Yeboah J, McClelland RL, Polonsky TS, Burke GL, Sibley CT, O'Leary D,

et al. Comparison of Novel Risk Markers for Improvement in Cardiovascular Risk Assessment in Intermediate-Risk Individuals. JAMA. 2012;308(8):788.
58. Hecht HS. Coronary artery calcium scanning: past, present, and future. JACC Cardiovasc Imaging. 2015;8(5):579–96.
59. Giles JT, Szklo M, Post W, Petri M, Blumenthal RS, Lam G, et al. Coronary arterial calcification in rheumatoid arthritis: comparison with the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. Arthritis Res Ther. 2009;11(2):R36.
60. Wang S, Yiu K-H, Mok M-Y, Ooi GC, Khong P-L, Mak K-FH, et al. Prevalence and extent of calcification over aorta, coronary and carotid arteries in patients with rheumatoid arthritis. J Intern Med. 2009;266(5):445–52.
61. Kao AH, Wasko MCM, Krishnaswami S, Wagner J, Edmundowicz D, Shaw P, et al. C-reactive protein and coronary artery calcium in asymptomatic women with systemic lupus erythematosus or rheumatoid arthritis. Am J Cardiol. 2008;102(6):755–60.
62. Chung CP, Oeser A, Raggi P, Gebretsadik T, Shintani AK, Sokka T, et al. Increased coronary-artery atherosclerosis in rheumatoid arthritis: relationship to disease duration and cardiovascular risk factors. Arthritis Rheum. 2005;52(10):3045–53.
63. Kiani AN, Magder LS, Post WS, Szklo M, Bathon JM, Schreiner PJ, et al. Coronary calcification in SLE: comparison with the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. Rheumatology. 2015 Nov;54(11):1976–81.
64. Yiu K-H, Wang S, Mok M-Y, Ooi GC, Khong P-L, Mak K-FH, et al. Pattern of Arterial Calcification in Patients with Systemic Lupus Erythematosus. J Rheumatol. 2009;36(10):2212–7.
65. Asanuma Y, Oeser A, Shintani AK, Turner E, Olsen N, Fazio S, et al. Premature coronary-artery atherosclerosis in systemic lupus erythematosus. N Engl J Med. 2003;349(25):2407–15.
66. Santilli S, Kast DR, Grozdev I, Cao L, Feig RL, Golden JB, et al. Visualization of atherosclerosis as detected by coronary artery calcium and carotid intima-media thickness reveals significant atherosclerosis in a cross-sectional study of psoriasis patients in a tertiary care center. J Transl Med. 2016 Dec 22;14(1):217.
67. Staniak HL, Bittencourt MS, de Souza Santos I, Sharovsky R, Sabbag C, Goulart AC, et al. Association between psoriasis and coronary calcium score. Atherosclerosis. 2014;237(2):847–52.
68. Yiu K-H, Yeung C-K, Zhao C-T, Chan JC, Siu C-W, Tam S, et al. Prevalence and extent of subclinical atherosclerosis in patients with psoriasis. J Intern Med. 2013;273(3):273–82.
69. Ludwig RJ, Herzog C, Rostock A, Ochsendorf FR, Zollner TM, Thaci D, et al. Psoriasis: a possible risk factor for development of coronary artery calcification. Br J Dermatol. 2007;156(2):271–6.
70. Kao AH, Krishnaswami S, Cunningham A, Edmundowicz D, Morel P a, Kuller LH, et al. Subclinical coronary artery calcification and relationship to disease duration in women with rheumatoid arthritis. J Rheumatol. 2008;35(1):61–9.
71. Rosenson RS, Brewer HB, Ansell BJ, Barter P, Chapman MJ, Heinecke JW, et al. Dysfunctional HDL and atherosclerotic cardiovascular disease.

Nat Rev Cardiol. 2016;13(1):48–60.
72. Rosenson RS, Brewer HB, Chapman MJ, Fazio S, Hussain MM, Kontush A, et al. HDL Measures, Particle Heterogeneity, Proposed Nomenclature, and Relation to Atherosclerotic Cardiovascular Events. Clin Chem. 2011;57(3):392–410.
73. Rosenson RS, Brewer HB, Ansell B, Barter P, Chapman MJ, Heinecke JW, et al. Translation of high-density lipoprotein function into clinical practice: current prospects and future challenges. Circulation. 2013;128(11):1256–67.
74. Rosenson RS, Brewer HB, Davidson WS, Fayad ZA, Fuster V, Goldstein J, et al. Cholesterol efflux and atheroprotection: advancing the concept of reverse cholesterol transport. Circulation. 2012;125(15):1905–19.
75. Nofer J-R, van der Giet M, Tölle M, Wolinska I, von Wnuck Lipinski K, Baba HA, et al. HDL induces NO-dependent vasorelaxation via the lysophospholipid receptor S1P3. J Clin Invest. 2004;113(4):569–81.
76. Bursill CA, Castro ML, Beattie DT, Nakhla S, van der Vorst E, Heather AK, et al. High-density lipoproteins suppress chemokines and chemokine receptors in vitro and in vivo. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2010;30(9):1773–8.
77. Cockerill GW, Rye KA, Gamble JR, Vadas MA, Barter PJ. High-density lipoproteins inhibit cytokine-induced expression of endothelial cell adhesion molecules. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 1995;15(11):1987–94.
78. Calkin AC, Drew BG, Ono A, Duffy SJ, Gordon M V, Schoenwaelder SM, et al. Reconstituted high-density lipoprotein attenuates platelet function in individuals with type 2 diabetes mellitus by promoting cholesterol efflux. Circulation. 2009;120(21):2095–104.
79. Kontush A. HDL-mediated mechanisms of protection in cardiovascular disease. Cardiovasc Res. 2014;103(3):341–9.
80. Riwanto M, Rohrer L, Roschitzki B, Besler C, Mocharla P, Mueller M, et al. Altered activation of endothelial anti- and proapoptotic pathways by high-density lipoprotein from patients with coronary artery disease: role of high-density lipoprotein-proteome remodeling. Circulation. 2013;127(8):891–904.
81. Vaisar T, Tang C, Babenko I, Hutchins P, Wimberger J, Suffredini AF, et al. Inflammatory remodeling of the HDL proteome impairs cholesterol efflux capacity. J Lipid Res. 2015;56(8):1519–30.
82. Van Lenten BJ, Hama SY, de Beer FC, Stafforini DM, McIntyre TM, Prescott SM, et al. Anti-inflammatory HDL becomes pro-inflammatory during the acute phase response. Loss of protective effect of HDL against LDL oxidation in aortic wall cell cocultures. J Clin Invest. 1995;96(6):2758–67.
83. von Eckardstein A, Nofer JR, Assmann G. High density lipoproteins and arteriosclerosis. Role of cholesterol efflux and reverse cholesterol transport. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2001;21(1):13–27.
84. Rothblat GH, de la Llera-Moya M, Atger V, Kellner-Weibel G, Williams DL, Phillips MC. Cell cholesterol efflux: integration of old and new observations provides new insights. J Lipid Res. 1999;40(5):781–96.
85. Adorni MP, Zimetti F, Billheimer JT, Wang N, Rader DJ, Phillips MC, et al.

The roles of different pathways in the release of cholesterol from macrophages. J Lipid Res. 2007;48(11):2453–62.
86. Dikkers A, Tietge U-J. Biliary cholesterol secretion: more than a simple ABC. World J Gastroenterol. 2010;16(47):5936–45.
87. McGillicuddy FC, de la Llera Moya M, Hinkle CC, Joshi MR, Chiquoine EH, Billheimer JT, et al. Inflammation Impairs Reverse Cholesterol Transport In Vivo. Circulation. 2009;119(8):1135–45.
88. de la Llera Moya M, McGillicuddy FC, Hinkle CC, Byrne M, Joshi MR, Nguyen V, et al. Inflammation modulates human HDL composition and function in vivo. Atherosclerosis. 2012;222(2):390–4.
89. Mallick P, Kuster B. Proteomics: a pragmatic perspective. Nat Biotechnol. 2010;28(7):695–709.
90. Green PS, Vaisar T, Pennathur S, Kulstad JJ, Moore AB, Marcovina S, et al. Combined Statin and Niacin Therapy Remodels the High-Density Lipoprotein Proteome. Circulation. 2008;118(12):1259–67.
91. Heinecke JW. The HDL proteome: a marker and perhaps mediator of coronary artery disease. J Lipid Res. 2009;50(Supplement):S167–71.
92. Hahn BH, Grossman J, Ansell BJ, Skaggs BJ, McMahon M. Altered lipoprotein metabolism in chronic inflammatory states: proinflammatory high-density lipoprotein and accelerated atherosclerosis in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. Arthritis Res Ther. 2008;10(4):213.
93. Navab M, Berliner JA, Subbanagounder G, Hama S, Lusis AJ, Castellani LW, et al. HDL and the inflammatory response induced by LDL-derived oxidized phospholipids. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2001;21(4):481–8.
94. Khovidhunkit, W, Memon RA, Feingold KR, Grunfeld C. Infection and Inflammation-Induced Proatherogenic Changes of Lipoproteins. J Infect Dis. 2000;181(s3):S462–72.
95. Van Lenten BJ, Wagner AC, Nayak DP, Hama S, Navab M, Fogelman AM. High-density lipoprotein loses its anti-inflammatory properties during acute influenza a infection. Circulation. 2001;103(18):2283–8.
96. Levy E, Rizwan Y, Thibault L, Lepage G, Brunet S, Bouthillier L, et al. Altered lipid profile, lipoprotein composition, and oxidant and antioxidant status in pediatric Crohn disease. Am J Clin Nutr. 2000;71(3):807–15.
97. Marsillach J, Becker JO, Vaisar T, Hahn BH, Brunzell JD, Furlong CE, et al. Paraoxonase-3 is depleted from the high-density lipoproteins of autoimmune disease patients with subclinical atherosclerosis. J Proteome Res. 2015;14(5):2046–54.
98. Watanabe J, Charles-Schoeman C, Miao Y, Elashoff D, Lee YY, Katselis G, et al. Proteomic profiling following immunoaffinity capture of high-density lipoprotein: Association of acute-phase proteins and complement factors with proinflammatory high-density lipoprotein in rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum. 2012;64(6):1828–37.
99. Holzer M, Wolf P, Curcic S, Birner-Gruenberger R, Weger W, Inzinger M, et al. Psoriasis alters HDL composition and cholesterol efflux capacity. J Lipid Res. 2012;53(8):1618–24.
100. American Diabetes Association. 2. Classification and Diagnosis of Diabetes. Diabetes Care. 2016;39 Suppl 1(Supplement 1):S13-22.
101. Malachias M, Souza W, Plavnik F, Rodrigues C, Brandão A, Neves M, et

al. Capítulo 2 - Diagnóstico e Classificação. Arq Bras Cardiol. 2016;107(3):01–22.
102. van der Velde M, Matsushita K, Coresh J, Astor BC, Woodward M, Levey A, et al. Lower estimated glomerular filtration rate and higher albuminuria are associated with all-cause and cardiovascular mortality. A collaborative meta-analysis of high-risk population cohorts. Kidney Int. 2011;79(12):1341–52.
103. McMahon M, Grossman J, FitzGerald J, Dahlin-Lee E, Wallace DJ, Thong BY, et al. Proinflammatory high-density lipoprotein as a biomarker for atherosclerosis in patients with systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum. 2006;54(8):2541–9.
104. Harris PA, Taylor R, Thielke R, Payne J, Gonzalez N, Conde JG. Research electronic data capture (REDCap)--a metadata-driven methodology and workflow process for providing translational research informatics support. J Biomed Inform. 2009;42(2):377–81.
105. Best WR, Becktel JM, Singleton JW, Kern F. Development of a Crohn's disease activity index. National Cooperative Crohn's Disease Study. Gastroenterology. 1976;70(3):439–44.
106. Harvey RF, Bradshaw JM. A simple index of Crohn's-disease activity. Lancet. 1980;315(8167):514.
107. Siegel CA, Whitman CB, Spiegel BMR, Feagan B, Sands B, Loftus E V., et al. Development of an index to define overall disease severity in IBD. Gut. 2018;67(2):244–54.
108. D'Agostino RB, 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(6):743–53.
109. Sara L, Szarf G, Tachibana A, Shiozaki AA, Villa AV, de Oliveira AC, et al. II Guidelines on Cardiovascular Magnetic Resonance and Computed Tomography of the Brazilian Society of Cardiology and the Brazilian College of Radiology. Arq Bras Cardiol. 2014;103(6 Suppl 3):1–86.
110. Agatston AS, Janowitz WR, Hildner FJ, Zusmer NR, Viamonte M, Detrano R. Quantification of coronary artery calcium using ultrafast computed tomography. J Am Coll Cardiol. 1990;15(4):827–32.
111. Havel RJ, Eder HA, Bragdon JH. The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum. J Clin Invest. 1955;34(9):1345–53.
112. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. Anal Biochem. 1985;150(1):76–85.
113. Basu SK, Goldstein JL, Anderson GW, Brown MS. Degradation of cationized low density lipoprotein and regulation of cholesterol metabolism in homozygous familial hypercholesterolemia fibroblasts. Proc Natl Acad Sci U S A. 1976;73(9):3178–82.
114. Lowry OH, Roserbrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem. 1951;193(1):265–75.
115. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem. 1976;72:248–54.
116. UniProt Consortium. UniProt: a worldwide hub of protein knowledge.

Nucleic Acids Res. 2019;47(D1):D506–15.
117. Vaisar T, Pennathur S, Green PS, Gharib SA, Hoofnagle AN, Cheung MC, et al. Shotgun proteomics implicates protease inhibition and complement activation in the antiinflammatory properties of HDL. J Clin Invest. 2007;117(3):746–56.
118. Shah AS, Tan L, Long JL, Davidson WS. Proteomic diversity of high density lipoproteins: our emerging understanding of its importance in lipid transport and beyond. J Lipid Res. 2013;54(10):2575–85.
119. Gordon SM, Deng J, Tomann AB, Shah AS, Lu LJ, Davidson WS. Multi-dimensional co-separation analysis reveals protein-protein interactions defining plasma lipoprotein subspecies. Mol Cell Proteomics. 2013;12(11):3123–34.
120. Davidson WS, Silva RAGD, Chantepie S, Lagor WR, Chapman MJ, Kontush A. Proteomic analysis of defined HDL subpopulations reveals particle-specific protein clusters: relevance to antioxidative function. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2009;29(6):870–6.
121. MacLean B, Tomazela DM, Shulman N, Chambers M, Finney GL, Frewen B, et al. Skyline: an open source document editor for creating and analyzing targeted proteomics experiments. Bioinformatics. 2010;26(7):966–8.
122. Budoff MJ, Achenbach S, Blumenthal RS, Carr JJ, Goldin JG, Greenland P, et al. Assessment of coronary artery disease by cardiac computed tomography: a scientific statement from the American Heart Association Committee on Cardiovascular Imaging and Intervention, Council on Cardiovascular Radiology and Intervention, and Committee on C. Circulation. 2006;114(16):1761–91.
123. Suit H, Goldberg S, Niemierko A, Ancukiewicz M, Hall E, Goitein M, et al. Secondary Carcinogenesis in Patients Treated with Radiation: A Review of Data on Radiation-Induced Cancers in Human, Non-human Primate, Canine and Rodent Subjects. Radiat Res. 2007;167(1):12–42.
124. Tubiana M. Dose–effect relationship and estimation of the carcinogenic effects of low doses of ionizing radiation: The joint report of the Académie des Sciences (Paris) and of the Académie Nationale de Médecine. Int J Radiat Oncol. 2005;63(2):317–9.
125. Kleinerman RA. Cancer risks following diagnostic and therapeutic radiation exposure in children. Pediatr Radiol. 2006 Sep;36 Suppl 2:121–5.
126. Carr SA, Abbatiello SE, Ackermann BL, Borchers C, Domon B, Deutsch EW, et al. Targeted Peptide Measurements in Biology and Medicine: Best Practices for Mass Spectrometry-based Assay Development Using a Fit-for-Purpose Approach. Mol Cell Proteomics. 2014;13(3):907–17.
127. Okwuosa TM, Greenland P, Ning H, Liu K, Lloyd-Jones DM. Yield of screening for coronary artery calcium in early middle-age adults based on the 10-year Framingham Risk Score: the CARDIA study. JACC Cardiovasc Imaging. 2012;5(9):923–30.
128. McClelland RL, Chung H, Detrano R, Post W, Kronmal RA. Distribution of coronary artery calcium by race, gender, and age: results from the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA). Circulation. 2006;113(1):30–7.
129. Fan F, Galvin A, Fang L, White DA, Moore X, Sparrow M, et al.

Comparison of inflammation, arterial stiffness and traditional cardiovascular risk factors between rheumatoid arthritis and inflammatory bowel disease. J Inflamm. 2014;11(1):29.
130. Stary HC, Chandler AB, Dinsmore RE, Fuster V, Glagov S, Insull W, et al. A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 1995;15(9):1512–31.
131. Marwan M, Ropers D, Pflederer T, Daniel WG, Achenbach S. Clinical characteristics of patients with obstructive coronary lesions in the absence of coronary calcification: an evaluation by coronary CT angiography. Heart. 2009;95(13):1056–60.
132. Aubry M-C, Maradit-Kremers H, Reinalda MS, Crowson CS, Edwards WD, Gabriel SE. Differences in atherosclerotic coronary heart disease between subjects with and without rheumatoid arthritis. J Rheumatol. 2007;34(5):937–42.
133. Wu G-C, Leng R-X, Lu Q, Fan Y-G, Wang D-G, Ye D-Q. Subclinical Atherosclerosis in Patients With Inflammatory Bowel Diseases: A Systematic Review and Meta-Analysis. Angiology. 2017;68(5):447–61.
134. Bruzzese V, Palermo G, Ridola L, Lorenzetti R, Hassan C, Izzo A, et al. Preclinical atherosclerosis in patients with inflammatory bowel diseases: a case-control study. Ann Transl Med. 2017;5(7):158–158.
135. Kim KO, Jang BI, Lee SH. Does Carotid Intima-Media Thickness Increase in Patients With Inflammatory Bowel Disease? Intest Res. 2014;12(4):293.
136. Kayahan H, Sari I, Cullu N, Yuksel F, Demir S, Akarsu M, et al. Evaluation of Early Atherosclerosis in Patients with Inflammatory Bowel Disease. Dig Dis Sci. 2012;57(8):2137–43.
137. Broide E, Schopan A, Zaretsky M, Kimchi NA, Shapiro M, Scapa E. Intima-media thickness of the common carotid artery is not significantly higher in Crohn’s disease patients compared to healthy population. Dig Dis Sci. 2011;56(1):197–202.
138. Maharshak N, Arbel Y, Bornstein NM, Gal-Oz A, Gur AY, Shapira I, et al. Inflammatory bowel disease is not associated with increased intimal media thickening. Am J Gastroenterol. 2007;102(5):1050–5.
139. Barnes EL, Beery RM, Schulman AR, McCarthy EP, Korzenik JR, Winter RW. Hospitalizations for Acute Myocardial Infarction Are Decreased among Patients with Inflammatory Bowel Disease Using a Nationwide Inpatient Database. Inflamm Bowel Dis. 2016;22(9):2229–37.
140. Sridhar ARM, Parasa S, Navaneethan U, Crowell MD, Olden K. Comprehensive study of cardiovascular morbidity in hospitalized inflammatory bowel disease patients. J Crohns Colitis. 2011;5(4):287–94.
141. Osterman MT, Yang Y-X, Brensinger C, Forde K a, Lichtenstein GR, Lewis JD. No Increased Risk of Myocardial Infarction Among Patients With Ulcerative Colitis or Crohn’s Disease. Clin Gastroenterol Hepatol. 2011;9(10):875–80.
142. Dorn SD, Sandler RS. Inflammatory bowel disease is not a risk factor for cardiovascular disease mortality: results from a systematic review and meta-analysis. Am J Gastroenterol. 2007;102(3):662–7.

143. Hardardottir I, Grunfeld C, Feingold KR. Effects of endotoxin and cytokines on lipid metabolism. Curr Opin Lipidol. 1994;5(3):207–15.
144. Sammalkorpi K, Valtonen V, Kerttula Y, Nikkila E, Taskinen MR. Changes in serum lipoprotein pattern induced by acute infections. Metabolism. 1988;37(9):859–65.
145. Feingold KR, Krauss RM, Pang M, Doerrler W, Jensen P, Grunfeld C. The hypertriglyceridemia of acquired immunodeficiency syndrome is associated with an increased prevalence of low density lipoprotein subclass pattern B. J Clin Endocrinol Metab. 1993;76(6):1423–7.
146. Chapman MJ, Guerin M, Bruckert E. Atherogenic, dense low-density lipoproteins. Pathophysiology and new therapeutic approaches. Eur Heart J. 1998;19 Suppl A:A24-30.
147. Gordon BR, Parker TS, Levine DM, Saal SD, Wang JC, Sloan BJ, et al. Relationship of hypolipidemia to cytokine concentrations and outcomes in critically ill surgical patients. Crit Care Med. 2001;29(8):1563–8.
148. Giovannini I, Chiarla C, Greco F, Boldrini G, Nuzzo G. Characterization of biochemical and clinical correlates of hypocholesterolemia after hepatectomy. Clin Chem. 2003;49(2):317–9.
149. Bonville DA, Parker TS, Levine DM, Gordon BR, Hydo LJ, Eachempati SR, et al. The relationships of hypocholesterolemia to cytokine concentrations and mortality in critically ill patients with systemic inflammatory response syndrome. Surg Infect (Larchmt). 2004;5(1):39–49.
150. Bakalář B, Zadák Z, Pachl J, Hyšpler R, Crhová Š, Karásek J Č V. Severe hypocholesterolemia is associated with adrenal insufficiency in multiple trauma patients. Int Care Med. 2001;27(Suppl 2):253.
151. Zadák Z, Hyšpler R, Havel E, Bláha V, Sobotka L ŽP. Changes in metabolism of cholesterol and its precursors in critical patients on total parenteral nutrition. Nutrition. 2002;18:214.
152. Hrabovský V, Zadák Z, Bláha V, Hyspler R, Karlík T, Martínek A, et al. Cholesterol metabolism in active Crohn’s disease. Wien Klin Wochenschr. 2009;121(7–8):270–5.
153. Szczeklik K, Mach T, Cibor D, Owczarek D, Sapa J, Papiez M, et al. Correlation of paraoxonase-1 with the severity of Crohn’s disease. Molecules. 2018;23(10):1–15.
154. Koutroumpakis E, Ramos-Rivers C, Regueiro M, Hashash JG, Barrie A, Swoger J, et al. Association Between Long-Term Lipid Profiles and Disease Severity in a Large Cohort of Patients with Inflammatory Bowel Disease. Dig Dis Sci. 2016;61(3):865–71.
155. Xiao L, Pan G. An important intestinal transporter that regulates the enterohepatic circulation of bile acids and cholesterol homeostasis: The apical sodium-dependent bile acid transporter (SLC10A2/ASBT). Clin Res Hepatol Gastroenterol. 2017;41(5):509–15.
156. Akerlund JE, Reihnér E, Angelin B, Rudling M, Ewerth S, Björkhem I, et al. Hepatic metabolism of cholesterol in Crohn’s disease. Effect of partial resection of ileum. Gastroenterology. 1991;100(4):1046–53.
157. Miyazaki O, Ogihara J, Fukamachi I, Kasumi T. Evidence for the presence of lipid-free monomolecular apolipoprotein A-1 in plasma. J Lipid Res. 2014;55(2):214–25.

158. Charles-Schoeman C, Lee YY, Grijalva V, Amjadi S, FitzGerald J, Ranganath VK, et al. Cholesterol efflux by high density lipoproteins is impaired in patients with active rheumatoid arthritis. Ann Rheum Dis. 2012;71(7):1157–62.
159. Khera A V, Cuchel M, de la Llera-Moya M, Rodrigues A, Burke MF, Jafri K, et al. Cholesterol efflux capacity, high-density lipoprotein function, and atherosclerosis. N Engl J Med. 2011;364(2):127–35.
160. Sviridov D, Hoang A, Sawyer WH, Fidge NH. Identification of a sequence of apolipoprotein A-I associated with the activation of Lecithin:Cholesterol acyltransferase. J Biol Chem. 2000;275(26):19707–12.
161. Sorenson RC, Bisgaier CL, Aviram M, Hsu C, Billecke S, La Du BN. Human serum Paraoxonase/Arylesterase's retained hydrophobic N-terminal leader sequence associates with HDLs by binding phospholipids : apolipoprotein A-I stabilizes activity. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 1999;19(9):2214–25.
162. Esteve E, Ricart W, Fernandez-Real JM. Dyslipidemia and inflammation: an evolutionary conserved mechanism. Clin Nutr. 2005;24(1):16–31.
163. Khovidhunkit W, Kim M-S, Memon RA, Shigenaga JK, Moser AH, Feingold KR, et al. Effects of infection and inflammation on lipid and lipoprotein metabolism: mechanisms and consequences to the host. J Lipid Res. 2004;45(7):1169–96.
164. Rotllan N, Ribas V, Calpe-Berdiel L, Martín-Campos JM, Blanco-Vaca F, Escolà-Gil JC. Overexpression of human apolipoprotein A-II in transgenic mice does not impair macrophage-specific reverse cholesterol transport in vivo. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2005;25(9):e128-32.
165. Wolfrum C, Poy MN, Stoffel M. Apolipoprotein M is required for prebeta-HDL formation and cholesterol efflux to HDL and protects against atherosclerosis. Nat Med. 2005;11(4):418–22.
166. Hine D, Mackness B, Mackness M. Coincubation of PON1, APO A1, and LCAT increases the time HDL is able to prevent LDL oxidation. IUBMB Life. 2012;64(2):157–61.
167. Holzer M, Wolf P, Inzinger M, Trieb M, Curcic S, Pasterk L, et al. Anti-psoriatic therapy recovers high-density lipoprotein composition and function. J Invest Dermatol. 2014;134(3):635–42.
168. Boehm D, Krzystek-Korpacka M, Neubauer K, Matusiewicz M, Berdowska I, Zielinski B, et al. Paraoxonase-1 status in Crohn's disease and ulcerative colitis. Inflamm Bowel Dis. 2009 Jan;15(1):93–9.
169. Zhang J, Guo Z, Yang W, Zhu Z, Kong W, Zheng S, et al. D-Dimer levels are correlated with disease activity in Crohn's patients. Oncotarget. 2017;8(38):63971–7.
170. Rohatgi A, Khera A, Berry JD, Givens EG, Ayers CR, Wedin KE, et al. HDL Cholesterol Efflux Capacity and Incident Cardiovascular Events. N Engl J Med. 2014;371(25):2383–93.

APÊNDICE

***Pôster* apresentado no Congresso ECCO 2019 (*European Crohn's and Colitis Organization*)**

P 102

Subclinical atherosclerosis assessed by coronary artery calcium score in patients with Crohn's disease

B. Rocha[1], C. Nomura[2], M. Rocha[2], B. Lopes[2], M. Azevedo[1], A. Carlos[1], F. Carrillo[1], A. Damião[1], A. Sipahi[1], A. Leite[1]

1. University of São Paulo Medical School, Department of Gastroenterology and Hepatology, São Paulo, Brazil
2. University of São Paulo Medical School, Cardiovascular Magnetic Resonance and Computed Tomography Sector, Heart Institute, InCor, São Paulo, Brazil

This work was supported by a grant from Abbvie (number 4062)

Background

Several immune-mediated diseases such as rheumatoid arthritis, systemic lupus erythematosus and psoriasis are associated with an increased risk of cardiovascular disease (CVD)[1]. However, there are conflicting data as to whether inflammatory bowel diseases (IBD) increase risk for CVD[2]. We aimed to evaluate coronary artery calcium (CAC) score as an accurate predictor of cardiovascular event in patients with Crohn's disease.

Methods

We investigated 150 patients with Crohn's disease (mean age, 43.4 ± 5,9 years) and 75 age and sex-matched controls (mean age, 43.6 ± 5.6 years) without prior known CVD and traditional risk factors for atherosclerosis such as hypertension, dyslipidemia, diabetes, smoking, obesity and family history of coronary disease. All participants underwent a computed tomography for the measurement of CAC and the calcification extent was measured by means of the Agatston score. CAC was considered a qualitative variable (CAC = 0 and CAC > 0).

Results

The two groups were similar in respect to age and sex. Nevertheless, there were differences in body mass index and lipid profile, even though all these parameters were within normal range in both groups. Serum C reactive protein and Framigham Risk Score differed between groups (Table 1). CAC score > 0 was observed in 11 of 150 patients and in 5 of 75 control subjects with no significant difference between groups (p=1.0) (Figure 1). Among patients with Crohn, disease activity scores, years since diagnosis and use of immunomodulators and/or biologic therapy were similar in those with and without coronary artery calcification. Those with calcification were older (p=0.022) and more likely to be male (p=0.058) (Table 2).

Figure 1 - Prevalence of coronary artery calcification (CAC) among patients with Crohn's disease and control subjects

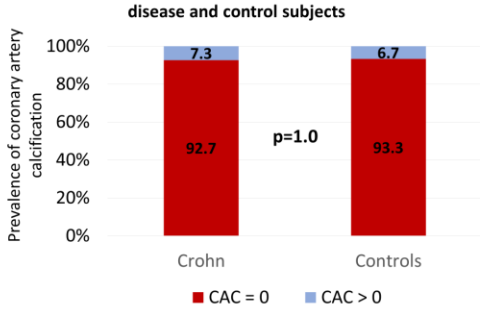


Table 1. General characteristics of Crohn's patients and controls

	Crohn (n=150)	Controls (n=75)	p value
Age (years)	43.4 ± 5.9	43.6 ± 5.6	0.72
Sex (male)	78 (52%)	39 (52%)	1.00
Race			0.002
White	70 (46%)	45 (60%)	
Black	27 (18%)	11 (14%)	
Brown	53 (35%)	15 (20%)	
Yellow	0 (0%)	4 (5%)	
Body mass index (Kg/m²)	23 ± 3	24 ± 2	0.007
Systolic blood pressure (mmHg)	115 ± 14	119 ± 13	0.06
Diastolic blood pressure (mmHg)	73 ± 9	74 ± 9	0.40
Total cholesterol (mg/dL)	161 ± 37	184 ± 29	<0.001
Low-density lipoprotein (mg/dL)	88 ± 33	107 ± 26	<0.001
High-density lipoprotein (mg/dL)	53 ± 14	57 ± 15	0.046
Triglycerides (mg/dL)	103 ± 38	97 ± 40	0.19
C reactive protein (mg/L)	6.24 ± 11.0	1.99 ± 3.17	0.0003
Framingham risk score (%)	3.0 ± 2.2	3.6 ± 2.2	0.04

Table 2. Characteristics of Crohn's patients according to CAC score

	CAC = 0 (n=139)	CAC > 0 (n=11)	p value
Age (years)	43.1 ± 5.9	48.1 ± 5.2	0.022
Sex (male)	69 (50%)	9 (82%)	0.058
Body mass index (Kg/m²)	23 ± 3	27 ± 3	0.0002
Framingham risk score (%)	2.9 ± 2.1	5.0 ± 2.5	0.003
Duration of disease (years)	15 ± 6	17 ± 5	0.13
C reactive protein (mg/L)	6.1 ± 11.1	6.9 ± 10.8	0.80
CDAI	129 ± 96	102 ± 75	0.39
Harvey Bradshaw	3 ± 3	2 ± 2	0.80
Azathioprine or Methotrexate therapy	94 (68%)	7 (64%)	0.74
Anti-TNF therapy	76 (55%)	7 (64%)	0.74

Conclusion

The current findings show that patients with Crohn's disease without traditional cardiovascular risk factors do not exhibit higher coronary artery calcification. Cardiovascular risk is still a conflicting issue in IBD and further studies are needed to clarify the relationship between CVD and IBD.

References:
1. Staniak HL, Bittencourt MS, de Souza Santos I, Sharovsky R, Sabbag C, Goulart AC, et al. Association between psoriasis and coronary calcium score. Atherosclerosis. 2014;237(2):847–52.
2. Osterman MT, Yang Y-X, Brensinger C, Forde K a, Lichtenstein GR, Lewis JD. No Increased Risk of Myocardial Infarction Among Patients With Ulcerative Colitis or Crohn's Disease. Clin Gastroenterol Hepatol. 2011;9(10):875–80.