LÍVIA MELO CARONE LINHARES

**Avaliação dos preditores de risco cardiovascular no
pós-transplante hepático: uma análise de 4 anos**

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

Programa de Ciências em Gastroenterologia

Orientador: Prof. Dr. Luiz Augusto
Carneiro D`Albuquerque

São Paulo

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Linhares, Livia Melo Carone

Avaliação dos preditores de risco cardiovascular no pós-transplante hepático : uma análise de 4 anos / Livia Melo Carone Linhares -- São Paulo, 2017.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Ciências em Gastroenterologia.

Orientador: Luiz Augusto Carneiro D'Albuquerque.

Descritores: 1.Transplante de fígado 2.Doenças cardiovasculares 3.Síndrome X metabólica 4.Doença da artéria coronariana 5.Aterosclerose 6.Biomarcadores 7. Medição de risco

"Medicina é uma ciência de incerteza e uma arte de probabilidade"

Sir William Osler

Dedicatória

*A **Deus**, que me permitiu concluir mais uma etapa importante da minha jornada.*

*Aos meus pais, **Vitor** e **Hilda**, que me ensinaram o valor do estudo e do esforço.*

*À minha tia **Iray** e avó **Lázara**, por terem desde cedo me inspirado a seguir a carreira acadêmica.*

*Ao meu marido, **Fred**, que me amparou nos momentos de desânimo e dificuldade.*

*Ao meu filho, **Eduardo**, pelos abraços e palavras carinhosas quando mais precisei.*

*Aos meus irmãos, **Júlia**, **Márcia** e **Augusto**, por estarem sempre ao meu lado.*

Agradecimientos

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Luiz Augusto Carneiro D`Albuquerque, pela competência com que conduziu este processo.

À Profa. Dra. Cláudia P. Oliveira, por todos os ensinamentos, pela disponibilidade e pelo apoio na elaboração deste trabalho e principalmente, pelo exemplo de profissional dedicada e competente.

Aos colegas Mario Reis Alvares-da-Silva, José Tadeu Stefano, Eloisa Maria Mello Santiago Gebrim, Hermes Vieira Barbeiro, Denise Frediani Barbeiro, que contribuíram para a elaboração de diversas etapas deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa durante todo o período de realização deste doutorado.

À Debora Raquel Benedita Terrabuio e Aline Lopes Chagas, que nos anos de convivência que tivemos, muito me ensinaram e incentivaram, contribuindo para o meu crescimento científico e intelectual.

Aos professores doutores, Francisco Garcia Soriano, Luciana Bertocco P. Haddad e Wellington Andraus pelas valiosas sugestões no Exame de Qualificação.

Aos pacientes, pela contribuição inestimável e indispensável à elaboração deste trabalho.

NORMATIZAÇÃO

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

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journal 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. 3^a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação;2011.

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

Sumário

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas e siglas	
Lista de tabelas	
Lista de ilustrações	
Resumo	
Abstract	
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Sobrevida no pós-transplante hepático	2
1.2 Síndrome metabólica antes e depois do transplante hepático	6
1.2.1 Definição	6
1.2.2 Prevalência	7
1.2.3 Imunossupressão e síndrome metabólica	10
1.3 Risco cardiovascular no pós-transplante hepático	12
1.4 Biomarcadores de aterosclerose	14
1.5 O escore de cálcio coronariano	18
2 OBJETIVOS	22
2.1 Objetivo geral	23
2.2 Objetivos específicos	23
3 METODOLOGIA	24
3.1 Aspectos éticos	25
3.2 Casuística e delineamento do estudo	25
3.3 Coleta de dados clínicos e avaliação antropométrica	27
3.4 Avaliação laboratorial	28
3.5 Aplicação do escore de Framingham	29
3.6 Pannel de biomarcadores de aterosclerose	29
3.7 Obtenção do escore de cálcio coronariano	30
3.8 Análise estatística	31
4 RESULTADOS	32
4.1 Análise do primeiro ano pós-transplante	33
4.2 Análise do quarto ano pós-transplante	35
4.2.1 Análise geral	35

4.2.2	Análise do escore de cálcio coronariano.....	41
4.3	Análise comparativa entre o primeiro e o quarto ano pós-transplante.....	45
5	DISCUSSÃO	48
6	CONCLUSÕES	55
7	REFERÊNCIAS	57
APÊNDICE		68
	APÊNDICE A- Artigo em língua inglesa enviado para publicação	69
ANEXOS		90
	ANEXO A- Aprovação da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa	91
	ANEXO B- Termo de consentimento livre e esclarecido	93
	ANEXO C- Escore de Framingham (NCEP/ATPIII)	97

Listas

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIT	Ataque isquêmico transitório
ALT	Alanina aminotransferase
ASA	Amiloide sérico A
AST	Aspartato aminotransferase
AVC	Acidente vascular cerebral
CA	Circunferência abdominal
DAC	Doença arterial coronariana
DCV	Doenças cardiovasculares
DHGNA	Doença hepática gordurosa não alcoólica
DLP	Dislipidemia
DM	Diabetes <i>mellitus</i>
DP	Desvio padrão
ECC	Escore de cálcio coronariano
EF	Escore de Framingham
EHNA	Esteato-hepatite não alcoólica
FA	Fosfatase alcalina
GGT	Gama glutamil-transferase
HAS	Hipertensão arterial sistêmica
HDL	<i>High-density lipoprotein</i>
HOMA-IR	<i>Homeostasis model assessment of insulin resistance</i>
HU	<i>Hounsfield unit</i>
IAM	Infarto agudo do miocárdio
ICAM-1	Molécula de adesão intercelular-1
ICN	Inibidores de calcineurina
IDF	<i>International Diabetes Federation</i>
IFN-γ	Interferon-gama
IL-1	Interleucina-1
IL-6	Interleucina-6
IMC	Índice de massa corpórea

JNC	<i>Joint National Committee</i>
LDL	<i>Low-density lipoprotein</i>
MAC	Moléculas de adesão celular
MESA	<i>Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis</i>
MPO	Mieloperoxidase
mTOR	<i>Mammalian target of rapamycin</i>
NCEP/ATP III	<i>National Cholesterol Education Program/ Adult Treatment Panel III</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
PA	Pressão arterial
PCR-as	Proteína C reativa de alta sensibilidade
RBT	Registro Brasileiro de Transplantes
RCV	Risco cardiovascular
RR	Risco relativo
sICAM-1	Molécula solúvel de adesão intercelular-1
SM	Síndrome metabólica
sVCAM-1	Molécula solúvel de adesão celular vascular-1
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
TXH	Transplante hepático
VCAM-1	Moléculas de adesão celular vascular-1

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Critérios para definição de síndrome metabólica (NCEP/ATP III)	7
Tabela 2 -	Efeitos metabólicos dos imunossupressores	11
Tabela 3 -	Dados clínicos e demográficos da amostra (n=36)	36
Tabela 4 -	Descrição dos eventos cardiovasculares e ECC relacionado.....	38
Tabela 5 -	Correlação entre biomarcadores de aterosclerose e valores do escore de cálcio coronariano.....	39
Tabela 6 -	Associação entre biomarcadores e o tempo uso de prednisona	40
Tabela 7 -	Classificação segundo valores do escore de cálcio coronariano	41
Tabela 8 -	Correlação entre dados clínicos do 4º ano e escore de cálcio coronariano	43
Tabela 9 -	Correlação entre testes laboratoriais bioquímicos do 4º ano e escore de cálcio coronariano.....	44
Tabela 10 -	Correlação entre níveis de biomarcadores no primeiro ano e os valores do escore de cálcio coronariano.....	46
Tabela 11 -	Comparação entre os níveis de biomarcadores no primeiro e quarto ano	47

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1-	Evolução do transplante hepático no Brasil.....	2
Figura 2-	Curva de sobrevida no transplante hepático no Brasil (2010-2017).....	3
Figura 3-	Sobrevida do transplante hepático ao longo dos anos (1969-2009)	4
Figura 4-	Delineamento do estudo.....	26
Figura 5-	Prevalência dos fatores de risco para doenças cardiovasculares	45

Resumo

Linhares LMC. *Avaliação dos preditores de risco cardiovascular no pós-transplante hepático: uma análise de 4 anos* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2017.

Objetivo: A doença cardiovascular é uma das principais causas de mortalidade tardia não relacionada ao fígado após o transplante hepático. O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos a longo prazo do transplante hepático sobre o perfil metabólico e o sistema cardiovascular. **Métodos:** Trinta e seis receptores de fígado foram avaliados um ano após o transplante hepático para avaliar a prevalência da síndrome metabólica e outros preditores de doenças cardiovasculares. Foram coletados dados antropométricos, exames bioquímicos, biomarcadores de aterosclerose e calculado o escore de Framingham. Quatro anos após o transplante, essa avaliação foi repetida e todos os participantes foram submetidos a uma tomografia de coronárias para obtenção do escore de cálcio coronariano. Os dados obtidos foram comparados para estimar a progressão do risco cardiovascular. **Resultados:** A população era constituída na sua maioria por indivíduos do sexo masculino, de cor branca e transplantados por hepatite C. Observou-se um aumento estatisticamente significativo na circunferência abdominal e na prevalência de dislipidemia, obesidade e síndrome metabólica ao longo do tempo. Todos os biomarcadores de aterosclerose estudados apresentaram aumento importante dos seus níveis no quarto ano ($p < 0,001$) após o transplante. Quanto ao escore de cálcio, 25% dos pacientes apresentaram calcificação coronariana moderada a grave, conferindo maior risco de evento cardíaco. A mediana do escore de Framingham aumentou substancialmente do primeiro ao quarto ano ($p = 0,022$), alterando a estratificação de baixo para alto risco. Isso se refletiu em um aumento significativo de eventos cardiovasculares após quatro anos de transplante hepático. **Conclusões:** A prevalência de síndrome metabólica e risco cardiovascular aumenta significativamente do primeiro ao quarto ano após transplante hepático. O escore de cálcio coronariano e os biomarcadores de aterosclerose podem melhorar a estratificação de risco e ajudar a prevenir a progressão de doenças cardiovasculares.

Descritores: Transplante de fígado; Doenças cardiovasculares; Síndrome X metabólica; Doença da artéria coronariana; Aterosclerose; Biomarcadores; Medição de risco.

Abstract

Linhares LMC. *Assessment of cardiovascular risk predictors after liver transplantation: a four-year analysis* [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2017.

Objective: Cardiovascular diseases are a major non-liver-related contributor to late mortality after liver transplantation. The aim of this study was to assess the long-term effects of liver transplantation on the metabolism and cardiovascular system.

Methods: Thirty-six liver recipients were assessed one year after transplantation to evaluate the prevalence of metabolic syndrome and other predictors of cardiovascular diseases. The data collected included anthropometric features, biochemical test results, Framingham risk score and atherosclerosis biomarkers. This evaluation was repeated four years after transplantation, and a coronary artery calcium score was obtained from all participants. Data were compared to estimate cardiovascular risk progression. **Results:** The population consisted mostly of white male subjects who underwent transplantation for hepatitis C. Significant increases were observed in waist circumference and the prevalence of dyslipidemia, obesity and metabolic syndrome over time. All biomarkers of atherosclerosis studied showed increased levels at the fourth year ($p<0.001$). Regarding the calcium score, 25% of patients had moderate to severe coronary artery calcification, conferring an enhanced risk of a cardiac event. The median Framingham risk score substantially increased from the first to fourth year ($p=0.022$), changing the stratification from low to high risk. This change was reflected in a significant increment of cardiovascular events four years after liver transplantation. **Conclusions:** The prevalence of metabolic syndrome and cardiovascular risk significantly increased from the first to fourth year after liver transplantation. Coronary artery calcium scores and atherosclerosis biomarkers may improve risk stratification and help prevent symptomatic cardiovascular disease.

Descriptors: Liver transplantation; Cardiovascular diseases; Metabolic syndrome X; Coronary artery disease; Atherosclerosis; Biomarkers; Risk assessment.

1 Introdução

1 INTRODUÇÃO

1.1 SOBREVIDA NO PÓS-TRANSPLANTE HEPÁTICO

O transplante hepático (TXH) consiste atualmente na terapia padrão para a doença hepática crônica terminal e para casos selecionados de insuficiência hepática aguda grave. A primeira tentativa de transplante de fígado em humanos foi realizada nos Estados Unidos, em Denver, por Thomas Starzl, em 1963. Desde então, um grande número de pacientes tem se beneficiado desse procedimento, agora realizado em centenas de centros médicos distribuídos em cerca de 80 países ¹. No Brasil, o primeiro transplante hepático ocorreu em 1968, no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo ², e assim como no restante do mundo, um número crescente vem sendo realizado anualmente. Em 2016, ocorreram 1.880 transplantes de fígado, realizados por 62 equipes, segundo dados do Registro Brasileiro de Transplantes (RBT) (Figura 1).

* Adaptado do Registro Brasileiro de Transplantes 2014 e 2016 ^{3,4}.

Figura 1 - Evolução do transplante hepático no Brasil

Em 2015, o Brasil foi o segundo país com maior número absoluto de transplantes hepáticos com doador cadáver ³. A figura 2 mostra a curva de sobrevida do paciente/enxerto desde 2010.

* Adaptado do Registro Brasileiro de Transplantes, 2016 ⁴.

** Registro iniciado em 01/01/2010, que incluiu 9.298 transplantes e contempla apenas as equipes que informaram 100% dos seus resultados.

Figura 2 - Curva de sobrevida no transplante hepático no Brasil (2010-2017)

Ao longo do tempo, os cuidados com os pacientes transplantados têm evoluído rapidamente, o que tornou a sobrevida em um ano cada vez maior, ultrapassando 85% nos melhores centros transplantadores atualmente. A evolução da técnica cirúrgica e os avanços em diversos aspectos como nos cuidados perioperatórios, preservação do fígado, alocação de órgãos, seleção de doadores, profilaxia das infecções e prevenção das doenças recorrentes, bem como o surgimento de novos agentes imunossupressores e a melhoria no seu manejo, foram

responsáveis pelos resultados atuais ¹. No entanto, novos desafios surgiram com o sucesso dos transplantes, tais como a escassez de órgãos, receptores com idade mais avançada, doadores limítrofes, maior necessidade de retransplante, toxicidade dos imunossupressores, além do crescente número de indivíduos com obesidade e esteato-hepatite não alcoólica após o TXH ⁵.

Um estudo europeu baseado em um grande banco de dados (*European Liver Transplant Registry*) incluiu 83.818 pacientes transplantados entre 1969 e 2009 e analisou a evolução dos resultados do transplante hepático ao longo dos anos. Nos primeiros seis meses ocorreram 46% dos óbitos e 65% dos retransplantes. A sobrevida em um ano melhorou progressivamente com o tempo, pois passou de apenas 33% nos anos anteriores a 1985, para 81% no período de 1990 a 1994, e alcançou 85% em 2004 ⁶. A figura 3 mostra as curvas de sobrevida de cada período analisado nesse estudo.

*Adaptado do *European Liver Transplant Registry*, 2012 ⁶.

Figura 3 - Sobrevida do transplante hepático na Europa ao longo dos anos (1969-2009)

Apesar do aumento da sobrevida a curto prazo, a sobrevida a longo prazo (> 1 ano) não parece estar crescendo na mesma proporção, a despeito dos recentes avanços na área ⁷. Após o primeiro ano do transplante, as principais causas de morte são as enfermidades relacionadas ao fígado (geralmente recorrência da doença de base), infecções, neoplasias e as doenças cardiovasculares (DCV), sendo estas últimas responsáveis por 12-16% dos óbitos ^{8, 9, 10}. Outras enfermidades também ocorrem em maior incidência do que na população em geral, e contribuem com o aumento da morbimortalidade tardia, como diabetes *mellitus* (DM), obesidade, osteoporose e a doença renal crônica ⁸.

Outro estudo foi conduzido nos Estados Unidos e incluiu 108.707 adultos transplantados de fígado, no período de 1987 a 2013, registrados no banco de dados nacional (*Scientific Registry of Transplant Recipients*). A mortalidade perioperatória (durante a internação em que foi realizado o transplante) apresentou redução expressiva, de 21,82% no período de 1987 a 1993, para 8,17% nos anos de 2007 a 2013. A mortalidade após a alta, em 1, 3 e 5 anos variou de 6,7% a 8%, 15,2% a 17,2% e 22,5% a 24,5%, respectivamente. Esse estudo concluiu que a mortalidade perioperatória e taxas de rejeição, perda do enxerto e infecções foram reduzidas drasticamente com o tempo, porém, o mesmo não aconteceu com a mortalidade tardia, que permaneceu estável devido à presença cada vez mais frequente de receptores mais idosos e com comorbidades não relacionadas com o fígado ¹¹.

Um estudo nos países nórdicos, com 3.299 indivíduos, comparou a sobrevida a longo prazo de pacientes transplantados com a população geral. Foi observado que após o primeiro ano do TXH, a taxa de mortalidade foi 2,4 vezes superior quando

comparada a da população geral, e ainda, o risco de morte prematura (com menos de 75 anos) foi 5,8 vezes maior ¹².

1.2 SÍNDROME METABÓLICA ANTES E DEPOIS DO TRANSPLANTE HEPÁTICO

1.2.1 Definição

A síndrome metabólica (SM) é um transtorno composto por doenças que compartilham fatores de risco semelhantes, como sedentarismo, dieta inadequada, resistência insulínica e deposição central de gordura, que conferem um risco cardiovascular (RCV) aumentado. Esta síndrome está associada a um aumento na mortalidade geral de 1,5 vez, e na mortalidade por causa cardiovascular de 2,5 vezes ¹³.

A SM é definida por critérios do *National Cholesterol Education Program/ Adult Treatment Panel III* (NCEP/ATP III- Tabela 1) ¹⁴, que determinam seu diagnóstico quando ocorre a combinação de três ou mais componentes, dentre os cinco: hipertensão (HAS), obesidade central, hiperglicemia, hipertrigliceridemia e baixo HDL-colesterol (*high-density lipoprotein*) ¹⁵. São critérios facilmente obtidos e aplicados na prática clínica diária. No entanto, a resistência insulínica não foi inclusa nos critérios diagnósticos, o que é considerado por alguns como uma falha nessa definição do NCEP/ATP III. Existem ainda outras definições, como a do IDF (*International Diabetes Federation*) e da OMS (Organização Mundial da Saúde),

porém, os critérios do NCEP/ATP III são os mais amplamente usados, tanto na prática clínica como em estudos epidemiológicos.

Tabela 1 - Critérios para definição de síndrome metabólica (NCEP/ATP III)

Presença de três ou mais dos critérios abaixo:	
Glicemia	Glicemia de jejum ≥ 100 mg/dL
Obesidade central	
Homens	Circunferência abdominal > 102 cm
Mulheres	Circunferência abdominal > 88 cm
Triglicerídeos	≥ 150 mg/dL
HDL-colesterol	
Homens	< 40 mg/dL
Mulheres	< 50 mg/dL
Pressão arterial	$\geq 130/85$ mmHg

* Adaptado de NCEP/ATPIII, 2002 ¹⁴.

1.2.2 Prevalência

Dados sobre a prevalência dessa síndrome na população brasileira são escassos. Em 2007, foi realizado um estudo transversal na cidade de Vitória - Espírito Santo, com 1.663 indivíduos com idades entre 25-64 anos, onde a prevalência de SM encontrada, de acordo com os critérios do NCEP/ATP III, foi de 29,8%. Essa prevalência foi maior com o avançar da idade, alcançando 48,3% na faixa de 55-64 anos ¹⁶.

Em 2013, uma revisão sistemática sobre esse assunto foi publicada, mas apenas dez estudos preencheram os critérios de seleção, dos quais cinco utilizaram critérios do NCEP/ATP III. Nesse estudo, a prevalência média encontrada foi de 29,6%, com variação de 14,9-65,3%. A maior prevalência foi encontrada em uma população indígena, enquanto a menor, foi reportada em uma área rural. Os componentes mais frequentemente presentes foram HAS (52,5%) e o baixo HDL-colesterol (59,3%)¹⁷. Em outros países, as taxas variam de 12,4% a 28,5% em homens e de 10,7% a 40,5% em mulheres¹³. Esses números aumentam conforme são analisadas faixas etárias mais avançadas, sendo superior a 40% nos indivíduos com mais de 60 anos de idade. A SM é praticamente ausente em indivíduos com índice de massa corpórea (IMC) abaixo de 25, e em paralelo com o aumento do IMC, observa-se também um incremento na prevalência da SM^{18,19}.

O aumento da prevalência mundial de obesidade e síndrome metabólica está afetando vários aspectos do transplante de fígado, desde a indicação, até os tipos e a incidência de complicações pós-operatórias. A doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA), sabidamente relacionada à SM, vem se destacando como uma das principais causas de cirrose hepática, ocupando atualmente o terceiro lugar nas indicações de transplante de fígado²⁰. Segundo projeções, em 10 a 20 anos, essa será a principal causa de hepatopatia crônica²¹.

Acompanhando o envelhecimento da população em geral, os candidatos ao transplante de fígado têm hoje em dia idade mais avançada e, portanto, um maior número de comorbidades associadas, como hipertensão e diabetes. Essas enfermidades podem agravar-se com o tempo e com a toxicidade dos

imunossupressores utilizados no pós-transplante, colaborando com o aumento da morbimortalidade tardia ^{11, 22}.

Parekh et al. estudaram a presença de SM antes e depois do TXH, e analisaram a sua correlação com a mortalidade de 598 pacientes adultos, no período de 1997-2009. Verificaram que no pré-transplante as prevalências de diabetes, hipertensão e dislipidemia (DLP) eram, respectivamente, 22%, 30% e 12%. Essas taxas aumentaram gradativamente com o passar dos anos, de forma que sete anos após o transplante, a prevalência de DM era 35%, de HAS 56% e de dislipidemia 22%. Apesar do incremento significativo na prevalência dessas três doenças, a duração do DM foi o único parâmetro que teve impacto negativo na sobrevida a longo prazo ²³.

Outro estudo, com 252 pacientes transplantados de fígado, revelou a presença de SM em 5,4% dos indivíduos no pré-transplante, enquanto no pós-transplante essa taxa aumentou para 51,9%, equivalente ao dobro da prevalência de SM estimada na população em geral. Preditores independentes para SM no pós-transplante, identificados na análise de regressão logística, foram: idade, IMC, diagnóstico de DHGNA no pré-transplante, triglicerídeos e diabetes ²⁴.

Nos cirróticos a prevalência de SM varia de 5-29%, sendo mais frequente naqueles com DHGNA. No entanto, devemos lembrar que a diminuição da resistência vascular periférica e a deterioração do estado nutricional que ocorrem com o agravamento da cirrose hepática podem mascarar a presença dos componentes da SM. Após o TXH, a prevalência de SM aumenta significativamente, estando em torno de 43-58% ^{24, 25, 26}. A presença de DM no pós-transplante chega a 30-40%, de HAS 60-70% e dislipidemia 50-70% ¹⁸.

1.2.3 Imunossupressão e síndrome metabólica

A imunossupressão é uma das causas implicadas no aumento da frequência de SM após o TXH. Atualmente, os medicamentos utilizados na manutenção da imunossupressão a longo prazo são: corticosteroides, inibidores de calcineurina (ICN), inibidores mTOR (*mammalian target of rapamycin*) e antimetabólitos. A exposição prolongada a essas drogas confere uma maior probabilidade de efeitos metabólicos no organismo (Tabela 2).

Os corticosteroides são utilizados, geralmente, apenas durante os primeiros seis meses após o TXH. Seus efeitos no organismo, portanto, são na maioria das vezes transitórios e dose-dependentes, regredindo após a suspensão da droga. Os efeitos mais comumente observados são a hipertensão, o aumento do LDL (*low-density lipoprotein*) e HDL-colesterol, a deposição de gordura no tronco, face e pescoço, o diabetes e a resistência insulínica. Uma metanálise incluiu 19 estudos randomizados que comparavam imunossupressão com e sem corticosteroides em receptores de TXH, e demonstrou que os pacientes que não receberam a droga no seu esquema imunossupressor apresentavam níveis de colesterol e risco de diabetes significativamente mais baixos ²⁷.

Tabela 2 - Efeitos metabólicos dos imunossupressores

Classe de imunossupressores	Efeitos metabólicos
Corticosteroides	Aumento do apetite Aumento da gliconeogênese Diminuição da produção de insulina Resistência insulínica Efeito mineralocorticoide Aumento do colesterol (LDL e HDL) Deposição anormal de gordura (tronco, face e pescoço)
Inibidores de calcineurina	Diminuição da utilização periférica de glicose Diminuição da produção de insulina Vasoconstrição renal Diminuição da taxa de filtração glomerular Retenção de sódio e água
Inibidores mTOR	Diminuição das células beta pancreáticas Resistência insulínica Aumento da gliconeogênese Diminuição da proliferação de adipócitos Diminuição da atividade da lipase lipoproteica

* Adaptado de Watt, 2011 ²⁸

O primeiro inibidor de calcineurina a ser usado no TXH foi a ciclosporina, em 1979. Com a sua descoberta, a sobrevida dos pacientes aumentou drasticamente. Em 1984, foi descoberto o composto do tacrolimus, um macrolídeo que atualmente é o ICN mais utilizado devido ao seu efeito imunossupressor mais potente e níveis sanguíneos mais estáveis. No entanto, seus efeitos adversos são semelhantes ao da ciclosporina, e consistem no aumento de pressão arterial, nefrotoxicidade, DM, DLP e neurotoxicidade. A lesão renal ocorre devido a vasoconstrição da arteríola aferente, com consequente redução da taxa de filtração glomerular e ativação do sistema renina-angiotensina-aldosterona que, por sua vez, leva à hipertensão. O

diabetes é causado por lesão direta às células beta pancreáticas, o que leva à diminuição da síntese e secreção da insulina, além de aumentar a resistência insulínica. Estudos que comparam o perfil de segurança das duas drogas sugerem que a ciclosporina induza mais à hipertensão e dislipidemia (às custas do aumento do LDL-colesterol), enquanto o tacrolimus parece ser mais diabetogênico. Ambas as drogas são neuro e nefrotóxicas ²⁸.

Os inibidores mTOR (sirolimus e everolimus) interagem com o metabolismo da glicose e dos lipídeos, de forma que seu uso crônico produz resistência insulínica, hipertrigliceridemia e aumento do LDL-colesterol ²⁹. Os antimetabólitos (azatioprina e derivados do ácido micofenólico) não costumam interferir com a SM ou qualquer das enfermidades a ela relacionadas, de forma que são considerados bons adjuvantes na terapia imunossupressora por serem capazes de possibilitar a redução das doses dos ICN ou inibidores mTOR.

1.3 RISCO CARDIOVASCULAR NO PÓS-TRANSPLANTE HEPÁTICO

A síndrome metabólica e as doenças cardiovasculares têm se tornado mais frequentes nos pacientes transplantados, o que é justificado não somente pelo aumento da sobrevida deles, mas também pelo uso crônico dos imunossupressores, sedentarismo, ganho de peso e maus hábitos alimentares ³⁰.

Lakka et al. acompanharam 2.682 pacientes (não transplantados) do gênero masculino, de 42 a 60 anos, por um período de quase doze anos, e verificaram que o

óbito por doença arterial coronariana (DAC) em pacientes com SM foi 2,9 a 4,2 vezes maior do que naqueles que não preenchiam critérios para a síndrome ³¹.

Dados sobre o impacto da SM na morbimortalidade após o TXH ainda são escassos. Apesar de cada componente da SM, isoladamente, ser um fator de risco para DCV, quando três ou mais deles estão associados, esse risco se torna maior que 50% para eventos coronarianos. Estima-se que 19 a 42% da mortalidade não relacionada ao fígado nesse grupo, seja atribuível aos eventos cardiovasculares ¹⁸.

Uma metanálise que incluiu 12 estudos, com 7.792 transplantados de fígado, concluiu que o risco de um evento cardiovascular em dez anos era de 13,6%, o que é considerado como risco moderado. Os pacientes que preenchiam critérios para SM tinham um RCV quatro vezes maior do que os transplantados sem SM ³².

Um estudo americano incluiu 389 pacientes submetidos ao TXH e observou que após o primeiro ano da cirurgia, a morbidade por DCV (síndrome coronariana aguda, insuficiência cardíaca, arritmia, parada cardíaca revertida, acidente vascular cerebral - AVC e doença arterial obstrutiva periférica) foi de 3,9% e a mortalidade de 2%. As DCV foram a terceira causa de óbito nesse estudo ³³.

Albeldawi et al. fizeram um estudo de coorte com 775 transplantados, para avaliar o risco cardíaco cumulativo, e observaram que 10,7% apresentaram pelo menos um evento cardiovascular, num período de acompanhamento de pouco mais que três anos. Além disso, identificaram como preditores independentes desses eventos, a idade na época do TXH, DM pós-transplante, HAS pós-transplante, gênero masculino e uso de micofenolato mofetil ³⁴.

1.4 BIOMARCADORES DE ATEROSCLEROSE

A aterosclerose é uma doença que acomete as artérias, onde ocorre formação de placas fibroadiposas que se projetam para o interior do vaso, obstruindo o lúmen vascular. O processo se dá inicialmente, pela lesão endotelial gerada pelos fatores de risco da doença (por exemplo, HAS, DM, tabagismo). Com isso, o LDL-colesterol penetra e se deposita na camada íntima das artérias, onde sofre oxidação e estimula a expressão de moléculas de adesão leucocitária na superfície endotelial. Ocorre então, atração de macrófagos, que se transformam em células espumosas após a fagocitose do conteúdo lipídico. Outras células inflamatórias são recrutadas por quimiotaxia e migração transendotelial e, assim, a permeabilidade vascular aumenta ainda mais, favorecendo a entrada do LDL-colesterol no espaço subendotelial o que, por sua vez, promove a expansão da placa de ateroma. As placas com maior grau de atividade inflamatória possuem também grande atividade proteolítica, o que leva à fragilização da matriz extracelular e à instabilidade, ou seja, a um maior risco de ruptura e trombose do vaso pela exposição do material lipídico ³⁵.

O reconhecimento da aterosclerose como uma doença inflamatória crônica, fez com que citocinas, fatores de crescimento e diversas outras moléculas envolvidas nesse processo fossem estudadas. Marcadores séricos de inflamação têm sido pesquisados, na busca de algo que pudesse identificar a presença de aterosclerose enquanto estivesse ainda em uma fase precoce e assintomática, e as medidas terapêuticas seriam então mais eficazes. Dentre os biomarcadores mais pesquisados, estão as moléculas de adesão celular (MAC), pois possuem papel crucial nas fases iniciais da aterosclerose. São moléculas expressas no endotélio vascular e nos leucócitos circulantes em resposta a um estímulo inflamatório, e promovem a adesão

de uma célula à outra ou à matriz extracelular ³⁶. As principais MAC envolvidas no processo de aterosclerose são as selectinas, as integrinas e as moléculas de adesão celular vascular e intercelular (VCAM-1 e ICAM-1).

As selectinas são glicoproteínas expressas em leucócitos, células endoteliais, e plaquetas. A P-selectina é estocada nos grânulos plaquetários e recrutada em questão de minutos para a superfície da célula quando ocorre ativação da mesma. A E-selectina é encontrada no endotélio horas após a indução por citocinas inflamatórias. Apenas algumas classes de integrinas participam do processo aterosclerótico, se ligando às MAC e promovendo maior aderência das células recrutadas. Ao contrário das selectinas e das outras MAC, nenhuma forma solúvel das integrinas foi identificada até o momento, o que dificulta a sua avaliação em estudos clínicos ³⁷.

A expressão de ICAM-1 em leucócitos e células endoteliais é também estimulada por citocinas pró-inflamatórias. A VCAM-1, por sua vez, é expressa principalmente nas células endoteliais, e interage com uma integrina para induzir a alterações morfológicas no endotélio que permitem a transmigração leucocitária. Além disso, também participa do recrutamento de células sanguíneas e permite sua firme adesão ao endotélio. Embora sejam moléculas estruturais, podem ser mensuradas *in vivo* através de sua forma solúvel ³⁷.

Em estudo com camundongos deficientes em P-selectina e ICAM-1, alimentados com dieta rica em lipídeos, observou-se que eles desenvolveram menor número de lesões ateroscleróticas do que camundongos normais ³⁸.

Um grande estudo americano comparou os níveis de sICAM-1 (molécula solúvel de adesão intercelular-1) em 474 pacientes que haviam apresentado infarto agudo do miocárdio (IAM) e 474 controles. Foi verificada uma associação significativa entre o aumento da concentração de sICAM-1 e o risco de IAM ($p=0,003$), especialmente nos indivíduos com dosagem basal >260 ng/mL, que tiveram um risco 80% maior (risco relativo=1,8; $p=0,02$)³⁹.

Connolly et al. acompanharam 378 transplantados renais por uma média de 2.441 dias, realizando dosagens sequenciais de sVCAM-1 (molécula solúvel de adesão celular vascular-1) e sICAM-1, e observaram que os níveis séricos das moléculas de adesão foram preditores independentes de mortalidade nessa população⁴⁰. A dosagem de moléculas de adesão celular solúveis no sangue parece ser útil na estratificação de risco cardiovascular tanto em indivíduos assintomáticos, quanto naqueles com doença preexistente⁴¹. No entanto, o valor preditivo das MAC ainda não foi estabelecido nos transplantados de fígado.

A mieloperoxidase (MPO) é uma enzima derivada de leucócitos, capaz de promover aterosclerose via estresse oxidativo, e instabilidade das placas de ateroma já existentes. Um estudo com 1.138 indivíduos, concluiu que níveis de MPO maiores que 728 pmol/L correlacionam-se com o surgimento de eventos coronarianos, independentemente da presença dos fatores preditores de RCV tradicionais⁴².

O amiloide sérico A (ASA) é uma proteína de fase aguda sintetizada pelo fígado, induzida por citocinas como fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina-1 (IL-1) e interleucina-6 (IL-6). O ASA foi identificado em placas de ateroma e no tecido adiposo e, por isso, um possível papel causal na aterosclerose tem sido estudado⁴³. Ridker et al. acompanharam uma coorte de 4.159 pacientes

com história prévia de IAM. Realizaram a dosagem de proteína C reativa de alta sensibilidade (PCR-as) e ASA em 391 pacientes que evoluíram com novo episódio de IAM, fatal ou não, e em outros 391 indivíduos que permaneceram estáveis durante o acompanhamento. Esse estudo concluiu que a chance de um novo evento coronariano está associada à elevação de ambas as proteínas dosadas ($p=0,05$ para PCR-as; $p=0,006$ para ASA) ⁴⁴.

Em trabalho publicado em 2014, nosso grupo demonstrou que indivíduos que tinham realizado TXH há um ano apresentavam níveis de sVCAM-1 e sICAM-1 maiores do que os níveis dos controles saudáveis ($p<0,001$ e $p=0,05$, respectivamente) e semelhantes aos dos pacientes com esteato-hepatite não alcoólica (EHNA). No entanto, quando se estimou o RCV com base na dosagem de PCR-as e no cálculo do escore de Framingham (EF), o risco foi baixo. Isso sugere que, após um ano de transplante, os indivíduos estariam em uma fase precoce da aterosclerose em que os marcadores tradicionalmente utilizados (PCR-as e EF) ainda não mostrariam risco significativo ⁴⁵.

Dessa forma, acredita-se que a dosagem sérica de moléculas de adesão celular (sICAM-1, sVCAM-1), marcadores séricos de inflamação (amiloide sérico A) e estresse oxidativo (mieloperoxidase) possam ser úteis para incrementar a estratificação do risco cardiovascular, especialmente em pacientes assintomáticos.

1.5 O ESCORE DE CÁLCIO CORONARIANO

Na fase inicial do processo de formação da placa aterosclerótica, o LDL que penetra na camada subendotelial do vaso dá início a um processo inflamatório que é amplificado pela exposição de moléculas de adesão celular e secreção de interleucinas e proteínas morfogênicas de osso pelo endotélio e células musculares lisas. Essas substâncias retroalimentam o estresse oxidativo e levam à redução de inibidores da calcificação, como a proteína glutâmica de matriz e a osteopontina ⁴⁶. A presença de proteínas reguladoras e a existência de células desdiferenciadas a partir de células musculares lisas vasculares, chamadas células vasculares calcificadoras, foram implicadas na síntese e reabsorção óssea em placas ateroscleróticas ⁴⁷. Dessa forma, semelhante ao que ocorre no osso, um desequilíbrio entre os fatores de reabsorção óssea e osteossíntese desencadeado pelo processo de aterosclerose parece estar envolvido na deposição de cálcio nos vasos.

A calcificação vascular confere diminuição da complacência vascular, elevação da pressão de pulso, caracterizada por pressão arterial sistólica elevada e diastólica baixa, e alterações distributivas do fluxo. São descritos como fatores contribuintes para a deposição de cálcio nas artérias, a idade mais avançada, insuficiência renal, DM, hipercolesterolemia, osteoporose, obesidade, tabagismo, menopausa e sedentarismo ⁴⁶.

A calcificação das artérias coronarianas é encontrada mais frequentemente em lesões ateroscleróticas avançadas, possuindo correlação com o tamanho da placa e consequentemente, com o grau de estenose resultante. No entanto, nem toda placa aterosclerótica é calcificada, e aquelas que o são, possuem uma porção calcificada

correspondente a apenas cerca de 20% do seu volume total. Assim, a presença de cálcio no ateroma deve nos alertar para a presença de doença mais extensa subjacente⁴⁸. Quanto à estabilidade da placa, não parece haver relação causal direta entre a presença da calcificação e a ruptura da mesma, porém, vários estudos demonstraram que indivíduos com maior quantidade de placas calcificadas apresentam também, um maior risco de eventos cardiovasculares isquêmicos e óbito⁴⁹. O local de ruptura do ateroma não necessariamente ocorre junto à calcificação e por isso, acredita-se que a presença de calcificações vasculares seja, na verdade, um marcador de doença aterosclerótica avançada, onde haverá maior proporção de placas instáveis que, por sua vez, aumentam o risco de deflagração de um evento isquêmico^{50, 51}.

A tomografia cardíaca com determinação do escore de cálcio coronariano (ECC) é um método sensível, não invasivo, que detecta e quantifica o cálcio depositado nas artérias coronárias. Atualmente, utiliza-se a tomografia com múltiplos detectores, que realizam uma série de finos cortes axiais (2,5 a 3 mm de espessura) em toda a área cardíaca, ao final da diástole, deflagrados por eletrocardiograma. Para adquirir essas imagens, não se faz necessária a injeção endovenosa de contraste. A calcificação é definida como uma lesão hiperatenuante, com intensidade de sinal acima de 130 unidades Hounsfield (HU) e área ≥ 3 pixels adjacentes (pelo menos 1 mm²). A determinação do escore de cálcio pode ser realizada a partir da soma ponderada das densidades acima de 130 HU (Escore de Agatston), ou por métodos que determinam volume e massa. Em nenhum dos métodos citados, a localização da calcificação (proximal ou distal no vaso) ou a distribuição das placas (difusa ou localizada) são levadas em consideração, o que pode ter algum efeito negativo sobre o valor preditivo do exame. Os escores de volume e massa são os mais reprodutíveis,

enquanto o escore de Agatston é o mais estudado. Em geral, os três métodos são considerados adequados e se correlacionam bem entre si ⁴⁸.

Greenland et al. acompanharam 1.461 pacientes assintomáticos com fatores de risco para DAC e observaram que aqueles com risco intermediário pelo EF e ECC > 300 apresentaram uma taxa de IAM e óbito relacionado a evento cardiovascular, de 2,8% ao ano, o que os reclassificaria como alto risco (> 20% em 10 anos) ⁵². Uma compilação de seis estudos importantes, que incluíram um total de 27.622 pacientes assintomáticos, registrou que em pacientes com ECC=0, a taxa de eventos cardiovasculares foi de 0,4%. Comparado a esse grupo, aqueles com ECC entre 100 e 400 apresentaram um risco relativo (RR) de 4,3; os que possuíam ECC entre 400 e 1000 tiveram um RR de 7,2; e, por fim, aqueles com ECC > 1000 apresentaram um RR de 10,8 ⁴⁹.

Um estudo americano (*Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis - MESA*) acompanhou 6.722 indivíduos sem histórico de DCV, por um período médio de 3,8 anos, e observou que o ECC era um fator de risco independente para a ocorrência de evento coronariano. Além disso, quando o ECC dobrava, a chance de um evento coronariano também aumentava em 25% ⁵³.

Com bases nos dados apresentados na literatura, o consenso da sociedade americana de cardiologia estabelece, com nível B de evidência, que o ECC é útil na estratificação de pacientes assintomáticos considerados de risco intermediário (10-20% em 10 anos; classe de recomendação IIa) ou de baixo a intermediário (6 a 10% em 10 anos; classe de recomendação IIb) ⁵⁴.

Portanto, o ECC é um forte preditor de eventos coronarianos e serve, na prática clínica, como importante ferramenta na avaliação de pacientes assintomáticos com risco intermediário, pois é capaz de tornar a estratificação de risco mais fidedigna nesses casos, melhorando o manejo e a prevenção de eventos cardiovasculares.

Os pacientes transplantados de fígado parecem estar sujeitos a uma maior incidência de DCV, o que compromete a sobrevida a longo prazo dessa população. Pressupõe-se então que uma avaliação rotineira do RCV seria capaz de induzir a intervenções clínicas e medicamentosas precoces, reduzindo assim a morbimortalidade por DCV. A associação do escore de Framingham a outros instrumentos, como os biomarcadores séricos de aterosclerose e o escore de cálcio coronariano, contribui para melhorar a estratificação do RCV. O presente estudo é o primeiro a combinar o uso dessas ferramentas na avaliação e acompanhamento de pacientes transplantados de fígado.

2 Objetivos

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos do transplante hepático a longo prazo, no que se refere ao aumento do risco cardiovascular, utilizando o escore de Framingham, biomarcadores de aterosclerose e o escore de cálcio coronariano.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a prevalência da síndrome metabólica e doenças relacionadas;
- Avaliar a incidência de eventos cardiovasculares;
- Correlacionar biomarcadores séricos de aterosclerose, escore de Framingham e escore de cálcio coronariano.

3 Metodologia

3 METODOLOGIA

3.1 ASPECTOS ÉTICOS

O projeto foi enviado à Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e aprovado em 09/09/2010, sob o número 0418/10 (Anexo A). Todos os participantes receberam informações claras e detalhadas sobre o estudo e o pesquisador responsável obteve de cada um a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido previamente ao início do estudo (Anexo B).

3.2 CASUÍSTICA E DELINEAMENTO DO ESTUDO

No período de agosto de 2010 a julho de 2011, 72 indivíduos concluíram o primeiro ano de acompanhamento após terem sido submetidos ao transplante de fígado no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Foram excluídos portadores de doenças malignas, portadores de hepatite C em tratamento com interferon e os que apresentavam suspeita de infecção ou rejeição. Sendo assim, 44 pacientes participaram da primeira fase do estudo, porém, apenas 36 indivíduos concluíram a avaliação do quarto ano (2 pacientes recusaram-se a participar da segunda fase do estudo, não houve êxito em contatar 3 pacientes, 1 óbito de causa indeterminada, 2 pacientes em uso de interferon). A figura 4 ilustra o delineamento do estudo.

A avaliação dos pacientes foi realizada em dois momentos: no primeiro e no quarto ano após o transplante. Em ambos os tempos, foi realizada avaliação antropométrica, pesquisa de hábitos (tabagismo, atividade física, ingestão alcoólica) e comorbidades e, por fim, coleta de sangue para exames bioquímicos. A presença de critérios para síndrome metabólica foi então, analisada segundo a definição do NCEP/ATP III descrita anteriormente ¹⁴. Os eventos cardiovasculares foram definidos como IAM fatal ou não, necessidade de intervenção coronariana, angina com necessidade de ida à emergência hospitalar, ou ainda, evento cerebrovascular (ataque isquêmico transitório - AIT ou AVC). O cálculo do escore de Framingham e a dosagem de biomarcadores séricos de aterosclerose também foram realizados em ambos os momentos. Apenas ao final do seguimento, foi realizada tomografia de coronárias para obtenção do ECC.

Figura 4 - Delineamento do estudo

3.3 COLETA DE DADOS CLÍNICOS E AVALIAÇÃO ANTROPOMÉTRICA

Dados clínicos e epidemiológicos relevantes foram coletados através de uma entrevista médica. Hábitos (tabagismo, atividade física e ingestão alcoólica), comorbidades, antecedentes pessoais e medicações em uso foram registrados. O questionário de atividade física internacional foi utilizado e sedentarismo foi descrito como execução de exercício contínuo por menos de 10 min/semana⁵⁵. Os pacientes também foram questionados especificamente quanto à presença de fatores de risco para doenças cardiovasculares (HAS, DM, DLP, tabagismo), sintomas de doença coronariana (angina, dispneia, tontura, por exemplo) e evento cardiovascular prévio.

Exame físico detalhado, com registros do peso, altura e circunferência abdominal, cálculo do IMC, e medida da pressão arterial (PA), foram realizados. Para aferição da circunferência abdominal, uma fita métrica não extensível foi posicionada no ponto médio entre a crista ilíaca anterossuperior e o último arco costal, com o paciente em pé e braços posicionados ao longo do corpo, na fase expiratória da respiração. Obesidade central foi considerada quando a circunferência abdominal era > 102 cm para homens e > 88 cm para mulheres, de acordo com os critérios do NCEP/ATPIII¹⁴. O IMC foi calculado dividindo-se o peso (kg) pela altura ao quadrado (m^2). Conforme critério da OMS, foi utilizado $IMC > 25 \text{ kg/m}^2$ para a definição de sobrepeso e $> 30 \text{ kg/m}^2$ para obesidade⁵⁶.

Para aferição da PA foi utilizada a técnica auscultatória, com esfigmomanômetro de coluna de mercúrio e manguito adequado à circunferência do braço, com o indivíduo sentado e braço direito estendido sobre uma superfície ao

nível do átrio esquerdo. Foram realizadas três medidas consecutivas de PA, sendo considerada pressão final a média das duas últimas medidas. A definição de HAS utilizada foi a recomendada pelo sétimo relatório do JNC (*“Joint National Committee”*): pressão arterial sistólica ≥ 140 mmHg, pressão arterial diastólica ≥ 90 mmHg ou uso de drogas anti-hipertensivas⁵⁷.

3.4 AVALIAÇÃO LABORATORIAL

A avaliação laboratorial incluiu hemograma, aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), gama-glutamil transferase (GGT), colesterol total e frações, triglicerídeos, glicose, hemoglobina glicosilada e insulina. Esses parâmetros foram dosados no sangue do paciente em jejum de 12 horas, com a utilização de técnicas bioquímicas padrão (Modular P800, Hitachi, Roche Applied Science, Indianapolis, IN, United States).

Os critérios diagnósticos para diabetes mellitus, segundo a Associação Americana de Diabetes, incluem: glicemia de jejum ≥ 126 mg/dL ou glicemia pós-prandial ≥ 200 mg/dL. Os pacientes que já faziam uso de insulina ou hipoglicemiantes orais também foram considerados diabéticos. A presença de resistência insulínica foi avaliada com a utilização do modelo de avaliação da homeostase (*Homeostasis model assessment of insulin resistance* - HOMA-IR), que consiste no produto do valor da glicemia de jejum (mg/dL) pela concentração de insulina no sangue (μ UI/L), dividido por 405. Valores superiores a 3,0 foram considerados indicativos de resistência insulínica. Dislipidemia foi considerada

segundo as diretrizes do NCEP/ATP III ¹⁴: triglicerídeos ≥ 150 mg/dL; colesterol total ≥ 200 mg/dL; LDL ≥ 130 mg/dL; HDL < 40 mg/dL.

3.5 APLICAÇÃO DO ESCORE DE FRAMINGHAM

O EF foi calculado através da atribuição de pontos específicos para cada gênero, de acordo com idade, tabagismo, diabetes, pressão arterial, LDL-colesterol e HDL-colesterol. As equações específicas para os gêneros feminino e masculino foram, então, usadas para calcular o risco de eventos cardiovasculares em 10 anos (Anexo C). Os pacientes foram classificados de baixo risco ($< 10\%$), de risco de intermediário ($10\%-20\%$), e de risco elevado ($> 20\%$), de acordo com o NCEP/ATP III ¹⁴. Neste consenso, a presença de DM, bem como de doença arterial obstrutiva periférica e aneurisma de aorta, foram interpretados como equivalentes à doença coronariana já instalada, e por isso, os pacientes com essas enfermidades foram classificados como portadores de alto risco cardiovascular, ou seja $> 20\%$ em 10 anos.

3.6 PAINEL DE BIOMARCADORES DE ATEROSCLEROSE

O painel de biomarcadores de aterosclerose utilizado nesse estudo incluiu: molécula solúvel de adesão intercelular-1 (sICAM-1), molécula solúvel de adesão vascular-1 (sVCAM-1), amiloide sérico A (ASA) e mieloperoxidase (MPO). Foi

utilizado um ensaio multiplex com a tecnologia MAGPIX® (Merck/ Millipore, Darmstadt, Germany), e as medidas foram feitas em ng/mL.

3.7 OBTENÇÃO DO ESCORE DE CÁLCIO CORONARIANO

A ferramenta utilizada para o cálculo do escore de cálcio coronariano foi a tomografia computadorizada com 64 fileiras de detectores e colimação de 2,5 mm (Toshiba Aquilion CXL, 128-slice CT scanner, Toshiba Medical Systems, Otawara, Japan), sem a administração endovenosa de contraste iodado. A determinação do ECC se baseia na aquisição não contrastada de uma série de cortes axiais cobrindo toda a extensão do coração. As imagens foram tomadas durante a diástole do ciclo cardíaco, definida pelo intervalo entre as ondas R do eletrocardiograma e ajustadas pela frequência cardíaca do participante. A aquisição do escore de cálcio foi realizada durante pausa inspiratória de 15 segundos, para minimizar artefatos de movimento. A técnica descrita está em concordância com protocolos já validados ⁵⁸.

As imagens foram reconstruídas, enviadas para a estação de trabalho disponível (Smartscore 4.0, Advantage Workstation, GE Medical Systems, Milwaukee, WIS, USA) e analisadas por médico experiente e que não tinha acesso aos dados clínicos e laboratoriais dos participantes. A calcificação é definida como uma lesão hiperatenuante, com intensidade de sinal acima de 130 HU e área ≥ 3 pixels adjacentes (pelo menos 1 mm²).

Para o cálculo do escore de cálcio, foi utilizado o método de escore de volume, sugerido por Callister et al. em 1998 ⁵⁹. Este é calculado multiplicando-se o

número de voxels (unidades tridimensionais) com calcificação pelo volume de cada voxel, incluindo todos os voxels com atenuação > 130 UH. Dessa forma, os valores obtidos foram classificados de acordo com pontos de corte fixos quanto ao grau de calcificações encontrado:

- 0: Ausência de placas ateroscleróticas coronarianas calcificadas;
- 1-10: Mínima quantidade de placas calcificadas;
- 11-100: Leve quantidade de placas calcificadas;
- 101-400: Moderada quantidade de placas calcificadas;
- >400 : Grande quantidade de placas calcificadas.

3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O cálculo para estimativa da amostra não foi realizado, tendo em vista que no início do estudo não existiam publicações semelhantes que servissem como base para esta avaliação. Foram digitados os dados no programa Excel e posteriormente exportados para o programa SPSS v. 18.0 para análise estatística. As variáveis foram descritas pela mediana e o intervalo interquartil (percentis 25 e 75) e comparadas entre os anos pelo teste de Wilcoxon. Foram comparadas entre duas categorias pelo teste de Mann-Whitney e entre três ou mais categorias pelo teste de Kruskal-Wallis. As variáveis quantitativas foram correlacionadas pelo coeficiente de correlação de Spearman. Foi considerado um nível de significância de 5%.

4 Resultados

4 RESULTADOS

4.1 ANÁLISE DO PRIMEIRO ANO PÓS-TRANSPLANTE

A maioria dos pacientes era do gênero masculino, de cor branca (50%) ou parda (38,9%), com idade média de $49,9 \pm 12,0$ anos. Quanto à etiologia da doença que levou ao transplante, a maioria tinha diagnóstico de hepatite C (11 pacientes) ou B (7 pacientes; um deles era coinfestado por ambos os vírus). Seis indivíduos tinham cirrose alcoólica, 6 tinham cirrose criptogênica e 7 tinham outras doenças (hepatite autoimune, polineuropatia amiloidótica familiar, colangite esclerosante primária, hemangioendotelioma e doença de Caroli). Em quatro dos pacientes com cirrose criptogênica, foi possível dar o diagnóstico de EHNA com base na avaliação histológica do explante. Doze pacientes transplantaram com carcinoma hepatocelular.

Na primeira avaliação, todos os indivíduos estavam em uso de tacrolimus, como principal droga imunossupressora, e o corticosteroide foi utilizado em associação por um tempo médio de $6,95 \pm 3,56$ meses. Durante o primeiro ano de seguimento, obesidade não foi uma comorbidade prevalente, já que o IMC médio foi de $24,3 \pm 4,1$ kg/m². A média das medidas da circunferência abdominal foi de $89,4 \pm 12,3$ cm. Com relação às doenças associadas à SM, 44,4% dos pacientes tinham DM, 41,7% eram hipertensos e 33,3% possuíam dislipidemia. Preenchiam critérios para SM, 25% dos casos, o que é compatível com a prevalência na população geral. Quanto aos hábitos, as taxas de tabagismo e etilismo foram baixas, de apenas, 13,9%

e 5,6%, respectivamente. Porém, a inatividade física foi elevada, presente em 72,2% da amostra (Tabela 3).

A mediana e o intervalo interquartil (percentis 25 e 75) dos resultados encontrados com a dosagem dos biomarcadores de aterosclerose foram: sVCAM-1= 1792 (1478-2178) ng/ml; sICAM-1= 0,22 (0,16-0,31) ng/ml; MPO= 0,07 (0,04-0,11) ng/ml; ASA= 5643,00 (2917-18649) ng/ml. Ainda não existem valores de referência para definir a normalidade nos níveis séricos dos biomarcadores de aterosclerose e, por isso, uma análise comparativa será feita mais adiante com a mesma população, no quarto ano após o transplante.

Em relação à estimativa do RCV, a mediana do EF obtida foi 7,5%, valor que indica baixo risco. Foi registrado um evento cardiovascular (IAM) após três meses de transplante, em um indivíduo de 60 anos, hipertenso, ex-tabagista (50 maços-ano). O paciente em questão foi submetido a angioplastia coronariana com colocação de “*stent*”. Todos os pacientes haviam realizado eletrocardiograma e ecocardiograma no pré-transplante, como parte do protocolo pré-operatório, mas nenhum sinal sugestivo de doença arterial coronariana foi encontrado por meio desses métodos.

4.2 ANÁLISE DO QUARTO ANO PÓS-TRANSPLANTE

4.2.1 Análise geral

Na segunda fase do estudo, a idade média passou a ser de $53,8 \pm 11,9$. Quanto aos imunossupressores, 77,8% estavam em uso de ICN isoladamente ou em associação ao micofenolato mofetil / sódico, 16,7% utilizavam ICN associados à prednisona, e 5,5% usavam sirolimus. O sedentarismo continuava elevado, relatado por 66,7% dos pacientes. Menos de 10% eram tabagistas ou ingeriam bebida alcoólica com frequência. História familiar positiva para DCV estava presente em 25% dos casos.

Quatro anos após o TXH, sobrepeso e obesidade se tornaram mais prevalentes. O IMC médio era $27,1 \pm 5,1$ kg/m² e a circunferência abdominal média era $97,1 \pm 13,1$ cm. A prevalência de SM aumentou, assim como a prevalência das doenças relacionadas. Dezoito (50%) pacientes possuíam critérios para SM, 24 (66,7%) indivíduos eram hipertensos, 20 (55,6%) diabéticos e 21 (58,3%) dislipidêmicos. Da mesma forma, o escore de Framingham também sofreu um incremento, passando para o valor de 21%, correspondente a um alto risco cardiovascular e compatível com a elevada prevalência de SM encontrada (Tabela 3).

Tabela 3 - Comparação entre os dados clínicos e demográficos obtidos no primeiro e quarto ano após o transplante hepático (n=36)

Variável	1º ano	4º ano	p
Circunferência abdominal (cm)- média ± DP	89,4±12,3	97,1±13,1	<0,001
IMC (kg/m ²)- média ± DP	24,3±4,1	27,1±5,1	<0,001
IMC >30 (kg/m ²) - n (%)	1 (3)	9 (25)	<0,001
Etilismo- n (%)	2 (5,6)	2 (5,6)	1,000
Tabagismo- n (%)	5 (13,9)	3 (8,3)	0,500
Sedentarismo- n (%)	26 (72,2)	24 (66,7)	0,791
HAS- n (%)	15 (41,7)	24 (66,7)	0,064
DM- n (%)	16 (44,4)	20 (55,6)	0,289
DLP- n (%)	12 (33,3)	21 (58,3)	0,049
SM- n (%)	9 (25)	18 (50)	0,049
EF- Risco em 10 anos (%) (mediana- intervalo interquartil)	7,5 (0-21,0)	21,0 (2,0-21)	0,022
Evento cardiovascular- n (%)	1 (2,8)	7 (19,4)	0,031

Legenda: DP- desvio padrão; IMC- índice de massa corpórea; HAS- hipertensão arterial sistêmica; DM- diabetes *mellitus*; DLP- dislipidemia; SM- síndrome metabólica, EF- escore de Framingham.

Ao final do estudo, cinco (13,9%) pacientes já haviam sofrido pelo menos um evento cardiovascular na vida, totalizando sete eventos em quatro anos de seguimento após o transplante (Tabela 4). Destes, quatro ocorreram em território cerebrovascular (AIT e AVC isquêmico). Na maioria dos casos, eram indivíduos com SM e ex-tabagistas. Um paciente teve IAM no primeiro ano de transplante, conforme foi descrito acima. Outros dois pacientes apresentaram angina, com ida à emergência e necessidade de tratamento específico. É importante acrescentar que os ecocardiogramas e eletrocardiogramas obtidos antes do transplante não mostravam quaisquer sinais de doença arterial coronariana em nenhum dos casos. Observa-se que três destes pacientes obtiveram valores elevados do ECC, com presença de moderada a grande quantidade de placas ateroscleróticas em coronárias. Os outros dois pacientes com escores menores, curiosamente, apresentaram eventos no território cerebrovascular, e não cardíaco.

Tabela 4 - Características dos pacientes que apresentaram eventos cardiovasculares

Paciente	Idade*	Tabagismo	IMC	HAS	DM	SM	Evento	ECC**
6	65	Prévio (4.5 anos- maço)	21,52	Sim	Não	Não	AIT	6 (mínima)
12	69	Prévio (18 anos- maço)	29,94	Sim	Não	Não	AVC isquêmico	92 (leve)
18	65	Prévio (50 anos- maço)	21,62	Sim	Sim	Sim	AIT IAM	1700 (grande)
20	60	Prévio (54 anos- maço)	26,21	Sim	Sim	Sim	Angina	324 (moderada)
35	58	Não	36,01	Sim	Sim	Sim	AVC isquêmico Angina	109 (moderada)

*- Idade em anos, ao final do seguimento; **- Classificação segundo o grau de calcificação

Legenda: ECC- escore de cálcio coronariano; AIT- ataque isquêmico transitório; AVC- acidente vascular cerebral; IAM- infarto agudo do miocárdio.

Com relação aos biomarcadores, obtivemos as seguintes medianas: sVCAM-1= 7,82 (4,31-12,14) ng/ml; sICAM-1= 1,66 (0,95-2,81) ng/ml; MPO= 2,30 (1,37-3,26) ng/ml; ASA= 50,21 (25,51-88,92) ng/ml. Não foi possível demonstrar correlação estatisticamente significativa entre esses marcadores e eventos cardiovasculares, EF ou com o ECC (Tabela 5).

Tabela 5 - Correlação entre biomarcadores de aterosclerose no 4º ano e escore de cálcio coronariano

Biomarcadores	r_s	p
sVCAM-1	-0,31	0,053
sICAM-1	-0,12	0,475
MPO	-0,11	0,496
ASA	0,01	0,944

Dados correlacionados pelo coeficiente de correlação de Spearman.

Legenda: sVCAM-1- molécula solúvel de adesão celular vascular-1; sICAM-1- molécula solúvel de adesão intercelular-1; MPO- mieloperoxidase; ASA- amiloide sérico A.

O marcador ASA se correlacionou de forma direta com o HOMA-IR ($r_s=0,43$, $p=0,018$). sICAM-1 se correlacionou de forma moderada e direta com a GGT ($r_s=0,34$, $p=0,030$) e com o tempo de uso de prednisona ($r_s=0,34$, $p=0,031$), conforme é mostrado na tabela 6.

Tabela 6 - Correlação entre biomarcadores no 4º ano e tempo de uso de prednisona

Biomarcadores	r_s	p
sVCAM-1	0,29	0,068
sICAM-1	0,34	0,031
MPO	-0,25	0,118
ASA	-0,13	0,444

Dados correlacionados pelo coeficiente de correlação de Spearman.

Legenda: sVCAM-1- molécula solúvel de adesão celular vascular-1; sICAM-1- molécula solúvel de adesão intercelular-1; MPO- mieloperoxidase; ASA- amiloide sérico A.

4.2.2 Análise do escore de cálcio coronariano

Após a determinação dos escores de cálcio coronariano, os pacientes foram estratificados. Dessa forma, observamos que 55,6% dos pacientes tinham ECC= 0, ou seja, não possuíam calcificações coronarianas, enquanto que 25% possuíam moderada a grande quantidade de placas ateroscleróticas calcificadas em suas artérias coronárias (Tabela 7).

Tabela 7 - Classificação segundo o escore de cálcio coronariano

Classificação	n=36
Ausência de placas calcificadas (ECC=0)	20 (55,6%)
Mínima quantidade de placas calcificadas (ECC= 0-10)	3 (8,3%)
Pequena quantidade de placas calcificadas (ECC= 11-100)	4 (11,1%)
Moderada quantidade de placas calcificadas (ECC= 101-400)	7 (19,4%)
Grande quantidade de placas calcificadas (ECC> 400)	2 (5,6%)

Legenda: ECC- escore de cálcio coronariano.

Foi encontrada uma correlação estatisticamente significativa, direta e forte entre a idade e o ECC ($r_s=0,56$ $p<0,001$). Hipertensos tiveram valores mais altos do ECC (mediana= 10,5; intervalo interquartil de 0-163,0) quando comparados aos pacientes não hipertensos (mediana= 0; intervalo interquartil de 0-0). O mesmo ocorreu quando comparamos diabéticos (mediana= 67,0; intervalo interquartil de 0-168,5) e não diabéticos (mediana= 0; intervalo interquartil de 0-1,5). O ECC se mostrou ainda significativamente mais elevado em pacientes dislipidêmicos (mediana= 10,5; intervalo interquartil de 0-171,3) quando comparados aos não

dislipidêmicos (mediana=0, intervalo interquartil de 0-4,5). Não houve diferença significativa nos valores do ECC, quando se avaliou a circunferência abdominal e IMC, mas parece haver correlação entre o ECC e a presença de SM ($p=0,054$).

Diferença estatisticamente significativa, direta e forte, foi encontrada entre o EF e o ECC ($r_s=0,58$ $P<0,001$). Os pacientes com evento cardiovascular também tiveram maiores valores do ECC (mediana=140; intervalo interquartil de 92-1000) quando comparados com pacientes que não apresentaram evento cardiovascular (mediana=0; intervalo interquartil de 0-31,5). Não houve diferença significativa entre os valores do ECC quanto ao tipo de imunossupressão utilizado. A associação entre os dados clínicos e o ECC está descrita na tabela 8.

Tabela 8 - Associação entre dados clínicos do 4º ano e escore de cálcio coronariano

	ECC	r _s	p
Sexo			0,305
Masculino	6 (0-136)		
Feminino	0 (0-92)		
Idade		0,56	<0,001
Imunossupressão			0,981
ICN	0 (0-140)		
ICN+Prednisona	4 (0-96)		
Sirolimus	0 (0-2190)		
HAS			0,014
Sim	10,5 (0-163)		
Não	0 (0-0)		
DM			0,009
Sim	67 (0-169)		
Não	0 (0-2)		
DLP			0,034
Sim	11 (0-171)		
Não	0 (0-5)		
SM			0,054
Sim	9 (0-185)		
Não	0(0-32)		
Evento cardiovascular			0,001
Sim	140 (92-1000)		
Não	0(0-32)		
Tabagismo			0,699
Sim	77 (13-131)		
Não	0(0-6)		
Sedentarismo			0,286
Sim	3(0-146)		
Não	0(0-59)		
Escore de Framingham		0,58	<0,001

Variáveis categóricas descritas pela mediana (intervalo interquartil) e correlacionadas pelo teste de Mann-Whitney. Variáveis quantitativas correlacionadas pelo coeficiente de correlação de Spearman.

Legenda: ECC- escore de cálcio coronariano; ICN- inibidor de calcineurina; HAS- hipertensão arterial sistêmica; DM- diabetes *mellitus*; DLP- dislipidemia; SM- síndrome metabólica.

Quando analisamos os dados laboratoriais bioquímicos obtidos no quarto ano pós-transplante e o ECC, vemos que existe uma correlação direta estatisticamente significativa entre o ECC e glicose, hemoglobina glicosilada e triglicerídeos (Tabela 9).

Tabela 9 - Correlação entre testes laboratoriais bioquímicos do 4º ano e escore de cálcio coronariano

Exames	r_s	p
Insulina	0,05	0,799
Glicose	0,36	0,021
Hemoglobina glicosilada	0,54	<0,001
HOMA-IR	0,04	0,821
Triglicerídeos	0,47	0,002
Colesterol total	0,11	0,521
HDL-colesterol	-0,18	0,276
LDL-colesterol	0,01	0,942
ALT	-0,19	0,252
AST	-0,18	0,268
FA	0,06	0,709
GGT	0,10	0,549

Legenda: HOMA-IR- *Homeostasis model assessment of insulin resistance*; HDL- *high density lipoprotein*; LDL- *low density lipoprotein*; ALT- alanina aminotransferase; AST- aspartato aminotransferase; FA- fosfatase alcalina; GGT- gama-glutamil transferase.

4.3 ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE O PRIMEIRO E O QUARTO ANO PÓS-TRANSPLANTE

A proporção de indivíduos hipertensos aumentou de 41,7%, no primeiro ano, para 66,7% no quarto ano. O mesmo ocorreu com relação ao DM e à dislipidemia, cujas prevalências eram 44,4% e 33,3%, e passaram a ser 55,6% e 58,3%, respectivamente (Figura 5). Após um ano do transplante, 25% dos indivíduos tinham critérios diagnósticos para SM, enquanto no quarto ano, essa proporção dobrou, passando a 50%. A mediana do EF aumentou de 7,5% no primeiro ano, para 21% ao final do seguimento, alterando a estratificação de RCV desse grupo, de baixo para alto risco. Durante os quatro anos que se seguiram após o transplante, cinco (13,9%) pacientes apresentaram pelo menos um evento cardiovascular.

Legenda: HAS- hipertensão; DM- diabetes *mellitus*; DLP- dislipidemia; SM- síndrome metabólica.

Figura 5 - Prevalência dos fatores de risco para doenças cardiovasculares

Não houve correlação entre os níveis de biomarcadores de doença aterosclerótica obtidos no primeiro ano e o ECC (Tabela 10).

Tabela 10 - Correlação entre níveis de biomarcadores no primeiro ano e os valores do escore de cálcio coronariano

Biomarcadores	r_s	p
sVCAM-1	0,05	0,780
sICAM-1	0,06	0,728
MPO	0,07	0,682
ASA	0,12	0,501

Dados correlacionados pelo coeficiente de correlação de Spearman.

Legenda: sVCAM-1- molécula solúvel de adesão celular vascular-1; sICAM-1- molécula solúvel de adesão intercelular-1; MPO- mieloperoxidase; ASA- amiloide sérico A.

Quando comparamos os níveis de sVCAM-1, sICAM-1, ASA e MPO no primeiro e quarto ano, observamos que todos os biomarcadores aumentaram de forma estatisticamente significativa ($p < 0,001$), conforme demonstrado na tabela 11.

Tabela 11 - Comparação entre os níveis de biomarcadores no primeiro e quarto ano

Biomarcadores	Primeiro ano	Quarto ano	p
sVCAM-1 (ng/ml)	1,79 (1,48-2,18)	7,82 (4,31-12,14)	<0,001
sICAM-1 (ng/ml)	0,22 (0,16-0,31)	1,66 (0,95-2,81)	<0,001
MPO (ng/ml)	0,07 (0,04-0,11)	2,30 (1,37-3,26)	<0,001
ASA (ng/ml)	5,64 (2,92-1,86)	50,21 (25,51-88,92)	<0,001

Dados apresentados pela mediana e o intervalo interquartil (percentis 25 e 75) e comparados pelo teste de Wilcoxon.

Legenda: sVCAM-1- molécula solúvel de adesão celular vascular-1; sICAM-1- molécula solúvel de adesão intercelular-1; MPO- mieloperoxidase; ASA- amiloide sérico A.

5 Discussão

5 DISCUSSÃO

A síndrome metabólica atinge, hoje em dia, proporções epidêmicas nas sociedades ocidentais industrializadas e as doenças cardiovasculares estão entre as principais causas de mortalidade. O TXH parece estar relacionado a uma prevalência de SM e DCV ainda maior que a da população em geral, o que compromete a sobrevida, a longo prazo, dos pacientes transplantados^{17, 18, 30}. Uma meta-análise, com 7.792 pacientes transplantados de fígado, observou um RCV de 13,6% em dez anos, consistente com um risco intermediário³². Se considerarmos apenas o número de transplantes realizados de 2012 a 2016 no Brasil, e um RCV igual ao da metanálise supracitada, estimaremos 1.192 óbitos por DCV em 10 anos. Múltiplos fatores parecem estar implicados nisso, como o uso crônico de drogas imunossupressoras, dieta inadequada e sedentarismo. Contudo, em muitos centros transplantadores, ainda não há protocolo para rastreamento de SM ou DCV, de modo que a doença aterosclerótica pode se desenvolver silenciosamente durante anos sem ser identificada, até que um evento súbito e potencialmente fatal ocorra. O presente estudo registrou a prevalência de fatores de risco para DCV um ano após o TXH e comparou esses dados com as mesmas variáveis obtidas três anos depois na mesma população. Uma piora significativa do perfil metabólico e cardiovascular foi encontrada ao final do estudo.

A prevalência da SM na população geral é estimada em 20 a 30%⁶⁰, o que é semelhante aos nossos achados no primeiro ano pós-transplante. No entanto, 4 anos após o TXH, registramos uma alta prevalência de SM e um RCV estimado em 10

anos também elevado, o que é consistente com dados publicados por outros grupos^{25, 26, 61} e sugere que o transplante esteja fortemente relacionado, ainda que indiretamente, às doenças cardiovasculares. Devido à baixa incidência de EHNA como causa do transplante neste estudo, a mesma não contribuiu para os resultados obtidos.

Em nosso estudo, verificamos que houve uma mudança na classificação dos pacientes segundo o EF em um curto período pois, após o primeiro ano de transplante, o RCV era de 7,5% (baixo risco) e após o quarto ano, a população estudada passou a ter um EF maior que 20%, considerado alto risco. Este achado pode estar relacionado ao uso das drogas imunossupressoras, como o tacrolimus e a prednisona, que sabidamente estão relacionadas a diversas alterações metabólicas após uso prolongado. De fato, constatamos um aumento da prevalência de vários fatores de risco cardiovasculares, tais como DLP, obesidade e SM, ao longo do tempo, que justificam o RCV encontrado no quarto ano.

Sabe-se que mais da metade das síndromes coronarianas agudas e mortes súbitas ocorrem em indivíduos previamente assintomáticos⁶². Portanto, a identificação precoce do subgrupo que apresenta maior risco de desenvolver eventos cardiovasculares é fundamental para diminuir a ocorrência desses eventos no futuro⁴⁸. O diagnóstico da doença aterosclerótica na fase assintomática ainda é desafiador, mas quando possível, permite que medicamentos e mudanças no estilo de vida tornem-se mais eficientes, aumentando a sobrevida dessa população.

A estratificação de risco cardiovascular é feita primeiramente através de escores clínicos, sendo o mais utilizado, o escore de Framingham. No entanto, alguns estudos têm observado que uma parcela significativa da população recebe uma

classificação de risco inadequada ⁶². Portanto, são necessárias ferramentas complementares que possam melhorar a acurácia dessa estratificação.

No presente estudo, utilizamos a dosagem de biomarcadores séricos de aterosclerose como meio para incrementar a estratificação do RCV, e encontramos uma diferença estatisticamente significativa entre os valores no primeiro e no quarto ano para todos os biomarcadores estudados. Os valores de sVCAM-1, sICAM-1, ASA e MPO aumentaram ao longo do seguimento, indicando provavelmente, a presença de lesão endotelial e, portanto, maior predisposição à formação de placas ateromatosas. Entende-se, hoje em dia, que a resistência insulínica é uma peça fundamental no desenvolvimento da síndrome metabólica, e esta, por sua vez, está intimamente relacionada à aterosclerose. Com relação a isso, foi observado que GGT e HOMA-IR associaram-se diretamente aos valores do ASA. Contudo, não fomos capazes de demonstrar correlação entre os biomarcadores, SM, EF ou ECC, o que pode ser atribuído ao reduzido tamanho da amostra. A instabilidade e curta meia-vida das moléculas, bem como as variações com o ciclo circadiano, também podem justificar a dificuldade em obter dosagens séricas que se correlacionem fielmente com o RCV ⁶³.

O escore de risco de Framingham é a ferramenta mais utilizada para estratificar o RCV, devido ao seu baixo custo e fácil aplicabilidade clínica. No entanto, por ser um modelo embasado em fatores de risco, existem limitações na sua capacidade de discriminar aqueles indivíduos que realmente vão ter algum evento cardiovascular ⁶². A acurácia em predizer o risco na população diabética, por exemplo, é menor do que na não-diabética ⁶⁴. Isso ocorre provavelmente porque no Estudo de Framingham a prevalência de DM era baixa (<10%), e não se incluíam no

seu escore os níveis de triglicerídeos ⁶⁵. Por este motivo, o consenso do NCEP/ ATP III considera o diabetes como equivalente à doença coronariana já instalada, ou seja, com um escore > 20%.

Para melhorar a predição de risco, Greenland et al. associaram o ECC ao EF na avaliação de 84 adultos assintomáticos, e concluíram que a associação fornece informações prognósticas mais fidedignas do que cada método isoladamente. De forma objetiva, observaram que o ECC > 300 aumentou o RCV em 10 anos, em 3% a 9% em comparação ao EF isoladamente ⁵². Muitos estudos demonstraram índices de reclassificação com o uso do ECC, variando de 52,0-65,6% no risco intermediário, 34,0-35,8% no alto risco e 11,6-15,0% em coortes de baixo risco ¹². Estudos anteriores também demonstraram que o ECC foi preditor independente de eventos cardiovasculares, enquanto a PCR-as deixou de ser um preditor significativo nas análises multivariadas ^{21, 22, 31}. Quando comparado à medida da espessura da camada íntima/média da carótida, o ECC revelou ser um melhor preditor de eventos subsequentes ⁴⁸. No entanto, nenhum desses estudos incluiu pacientes transplantados de fígado. Portanto, este é um estudo pioneiro na realização de seguimento, a longo prazo, de pacientes submetidos à TXH, com determinação da progressão da síndrome metabólica, escore de risco de Framingham, biomarcadores séricos de aterosclerose e ECC.

Em nosso estudo, o ECC identificou 25% da população estudada com calcificação moderada / grave das artérias coronárias. Além disso, pacientes com dislipidemia, hipertensão e diabetes apresentaram valores significativamente mais elevados do escore. Observou-se uma correlação significativa entre ECC,

Framingham, idade, eventos cardiovasculares, a ingestão de álcool, glicose, hemoglobina glicosilada e triglicérides quatro anos após o transplante.

Cinco pacientes (13,9%) apresentaram pelo menos um evento cardiovascular após TXH. Três deles obtiveram valores elevados do ECC. Curiosamente, os outros dois pacientes com escores baixos apresentaram eventos apenas no território cerebrovascular. Isto provavelmente ocorreu porque a doença aterosclerótica, apesar de difusa, pode acometer de forma heterogênea os diferentes territórios vasculares.

Este trabalho apresenta limitações, pois foi realizado em um único centro e incluiu um pequeno número de indivíduos, o que impossibilita a realização de uma análise multivariada e reduz o poder do estudo. Ainda assim, foi possível demonstrar um aumento significativo do RCV no quarto ano de transplante em relação ao primeiro ano. Embora não se possam fazer generalizações, outros estudos têm feito observações semelhantes, o que nos leva a crer que os pacientes submetidos à TXH sejam um importante grupo de risco para doenças cardiovasculares. Neste estudo, não foi possível avaliar o ECC na avaliação do primeiro ano, de modo que a falta de dados comparativos também é uma limitação importante. Estudos adicionais são necessários para demonstrar a progressão acelerada da doença aterosclerótica após transplante hepático. Também não foi possível avaliar a mortalidade por causas cardiovasculares antes dos pacientes completarem um ano de transplante, de modo que os resultados obtidos poderiam ser ainda mais significativos.

Baseados nos resultados obtidos, sugerimos que, após o transplante, os pacientes sejam acompanhados por uma equipe multidisciplinar composta por um hepatologista, cardiologista, endocrinologista, nutricionista, fisioterapeuta, farmacêutico e psicólogo para reforçar a adesão a hábitos de vida mais saudáveis e

tratar alterações metabólicas precoces que possam surgir. Além disso, deve-se sempre desencorajar o tabagismo e etilismo, e incentivar o paciente a manter uma rotina de exercícios e dieta equilibrada.

A comunidade de transplantes ainda não definiu os melhores testes de triagem para DCV ou um intervalo adequado para a realização desses testes após o TXH, mas é razoável que o clínico calcule o EF regularmente para estimar o RCV. Segundo diretrizes da Associação Americana de Cardiologia, a realização do ECC é recomendada em indivíduos assintomáticos com risco intermediário, de acordo com métodos de estratificação clínicos tradicionais, como o escore de Framingham. Os indivíduos de alto risco pelo EF não têm indicação para realização do ECC, já que medidas preventivas agressivas já estariam indicadas nesses pacientes ⁵⁴. Sendo assim, aplicar esta recomendação para melhorar a estratificação de risco nos pacientes transplantados deverá resultar na identificação mais precoce da aterosclerose e, conseqüentemente, no seu melhor manejo.

6 Conclusões

6 CONCLUSÕES

- A prevalência da síndrome metabólica e a estimativa do risco cardiovascular aumentam significativamente após quatro anos do transplante de fígado. A elevada incidência de eventos cardiovasculares corrobora esta afirmação. Assim sendo, os pacientes transplantados de fígado provavelmente se beneficiariam com um rastreamento de doenças cardiovasculares e seus fatores de risco, mesmo que sejam assintomáticos ou tenham poucos anos de transplante.
- O aumento significativo entre os níveis de biomarcadores do primeiro e quarto ano sugere a presença de doença aterosclerótica mesmo que em estágios iniciais. Contudo, não foi possível correlacionar esses marcadores com o escore de Framingham ou o escore de cálcio coronariano. São necessários mais estudos nessa área para validar o uso desses biomarcadores na prática clínica.
- O escore de cálcio coronariano correlaciona-se bem com idade, eventos cardiovasculares e escore de Framingham. Também há correlação com os níveis de glicose, hemoglobina glicosilada, triglicerídeos e ingestão alcoólica. Seu uso já está bem estabelecido em pacientes assintomáticos e com risco cardiovascular intermediário. Dessa forma, essa ferramenta parece ser útil para auxiliar também a estratificação de risco dos pacientes transplantados.

7 Referências

7 REFERÊNCIAS

1. Song AT, Avelino-Silva VI, Pecora RA, Pugliese V, D'Albuquerque LA, Abdala E. Liver transplantation: Fifty years of experience. **World J Gastroenterol**. 2014 May 14; 20(18): 5363-74.
2. Bacchella T, Machado MC. The first clinical liver transplantation of Brazil revisited. **Transplant Proc**. 2004;36(4):929-30.
3. **Registro Brasileiro de Transplantes (RBT)**, publicação da Associação Brasileira de Transplante de Órgãos (ABTO), ano XX, número 4, 2014.
4. **Registro Brasileiro de Transplantes (RBT)**, publicação da Associação Brasileira de Transplante de Órgãos (ABTO), ano XXII, número 4, 2016.
5. Zarrinpar A, Busuttil RW. Liver transplantation: past, present and future. **Nat Rev Gastroenterol Hepatol**. 2013;10: 434-40.
6. Adam R, Karam V, Delvart V, O'Grady J, Mirza D, Klempnauer J, Castaing D, Neuhaus P, Jamieson N, Salizzoni M, Pollard S, Lerut J, Paul A, Garcia-Valdecasas JC, Rodríguez FS, Burroughs A; All contributing centers (www.eltr.org); European Liver and Intestine Transplant Association (ELITA). Evolution of indications and results of liver transplantation in Europe. A report from the European Liver Transplant Registry (ELTR). **J Hepatol**. 2012 Sep;57(3):675-88.
7. Futagawa Y, Terasaki PI, Waki K, Cai J, Gjertson DW. No improvement in long-term liver transplant graft survival in the last decade: an analysis of the UNOS data. **Am J Transplant**. 2006 Jun;6(6):1398-406.

8. Watt KD, Pedersen RA, Kremers WK, Heimbach JK, Charlton MR. Evolution of causes and risk factors for mortality post-liver transplant: results of the NIDDK long-term follow-up study. **Am J Transplant.** 2010 Jun;10(6):1420-7.
9. Pfitzmann R, Nüssler NC, Hippler-Benscheidt M, Neuhaus R, Neuhaus P. Long-term results after liver transplantation. **Transpl Int.** 2008 Mar;21(3):234-46.
10. Jain A, Reyes J, Kashyap R, Dodson SF, Demetris AJ, Ruppert K, Abu-Elmagd K, Marsh W, Madariaga J, Mazariegos G, Geller D, Bonham CA, Gayowski T, Cacciarelli T, Fontes P, Starzl TE, Fung JJ. Long-term survival after liver transplantation in 4,000 consecutive patients at a single center. **Ann Surg.** 2000 Oct;232(4):490-500.
11. Stepanova M, Wai H, Saab S, Mishra A, Venkatesan C, Younossi Z. The outcomes of adult liver transplants in the united states from 1987 to 2013. **Liver Int.** 2015 Aug;35(8):2036-41.
12. Åberg F, Gissler M, Karlsten TH, Ericzon B, Foss A, Rasmussen A, Bennet W, Olausson M, Line P, Nordin A, Bergquist A, Boberg KM, Castedal M, Pedersen CR, Isoniemi H. Differences in long-term survival among liver transplant recipients and the general population: a population-based Nordic study. **Hepatology.** 2015 Feb;61(2):668-77.
13. Sociedade Brasileira de Hipertensão, Sociedade Brasileira de Cardiologia, Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia, Sociedade Brasileira de Diabetes, Sociedade Brasileira de Estudos da Obesidade: I Diretriz brasileira de diagnóstico e tratamento da síndrome metabólica. **Arq Bras Cardiol.** 2005, 84:3-28.

14. National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report. **Circulation**. 2002 Dec 17;106(25):3143-421.
15. Grundy SM, Becker D, Clark LT, Cooper RS, Denke MA, Howard WJ, et al. **NIH, third report of the National Cholesterol Education Program expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood pressure in adults (Adult Treatment Panel III)**. Bethesda, MD: National Institutes of Health; 2001.
16. Salaroli LB, Barbosa GC, Mill JG, Molina MC. Prevalence of metabolic syndrome in population-based study, Vitória, ES-Brazil. **Arq Bras Endocrinol Metabol**. 2007 Oct;51(7):1143-52.
17. de Carvalho Vidigal F, Bressan J, Babio N, Salas-Salvadó J. Prevalence of metabolic syndrome in Brazilian adults: a systematic review. **BMC Public Health**. 2013 Dec 18;13:1198.
18. Watt KD, Charlton MR. Metabolic syndrome and liver transplantation: a review and guide to management. **J Hepatol**. 2010 Jul;53(1):199-206.
19. Ford ES, Giles WH, Mokdad AH. Increasing prevalence of the metabolic syndrome among U.S. adults. **Diabetes Care**. 2004;27:2444-9.
20. Shaker M, Tabbaa A, Albeldawi M, Alkhouri N. Liver transplantation for nonalcoholic fatty liver disease: new challenges and new opportunities. **World J Gastroenterol**. 2014;20(18):5320-30.
21. Charlton M. Nonalcoholic fatty liver disease: review of current understanding and future impact. **Clin Gastroenterol Hepatol**. 2004;2(12):1048-58.

22. Stepanova M, Wai H, Saab S, Mishra A, Venkatesan C, Younossi ZM. The portrait of an adult liver transplant recipient in the United States from 1987 to 2013. **JAMA Internal Medicine**. 2014;174(8):1407-9.
23. Parekh J, Corley DA, Feng S. Diabetes, hypertension and hyperlipidemia: prevalence over time and impact on long-term survival after liver transplantation. **Am J Transplant**. 2012 Aug;12(8):2181-7.
24. Laish I, Braun M, Mor E, Sulkes J, Harif Y, Ben Ari Z. Metabolic syndrome in liver transplant recipients: prevalence, risk factors, and association with cardiovascular events. **Liver Transpl**. 2011 Jan;17(1):15-22.
25. Bianchi G, Marchesini G, Marzocchi R, Pinna AD, Zoli M. Metabolic syndrome in liver transplantation: relation to etiology and immunosuppression. **Liver Transpl**. 2008 Nov;14(11):1648-54.
26. Laryea M, Watt KD, Molinari M, Walsh MJ, McAlister VC, Marotta PJ, Nashan B, Peltekian KM. Metabolic syndrome in liver transplant recipients: prevalence and association with major vascular events. **Liver Transpl**. 2007 Aug;13(8):1109-14.
27. Segev DL, Sozio SM, Shin EJ, Nazarian SM, Nathan H, Thuluvath PJ, Montgomery RA, Cameron AM, Maley WR. Steroid avoidance in liver transplantation: meta-analysis and meta-regression of randomized trials. **Liver Transpl**. 2008 Apr;14(4):512-25.
28. Watt KD. Metabolic syndrome: is immunosuppression to blame? **Liver Transpl**. 2011 Nov;17 Suppl 3:S38-42.
29. Houde VP, Brûlé S, Festuccia WT, Blanchard PG, Bellmann K, Deshaies Y, Marette A. Chronic rapamycin treatment causes glucose intolerance and hyperlipidemia by upregulating hepatic gluconeogenesis and impairing lipid deposition in adipose tissue. **Diabetes**. 2010 Jun;59(6):1338-48.

-
30. Oliveira CP, Stefano JT, Alvares-da-Silva MR. Cardiovascular risk, atherosclerosis and metabolic syndrome after liver transplantation: a mini review. **Expert Rev Gastroenterol Hepatol**. 2013;7:361-4.
 31. Lakka H, Laaksonen DE, Lakka TA, Niskanen LK, Kumpusalo E, Tuomilehto J, Salonen JT. The metabolic syndrome and total and cardiovascular disease mortality in middle-aged men. **JAMA**. 2002;288:2709-16.
 32. Madhwal S, Atreja A, Albeldawi M, Lopez R, Post A, Costa MA. Is liver transplantation a risk factor for cardiovascular disease? A meta-analysis of observational studies. **Liver Transpl**. 2012 Oct;18(10):1140-6.
 33. Nicolau-Raducu R, Gitman M, Ganier D, Loss GE, Cohen AJ, Patel H, Girgrah N, Sekar K, Nossaman B. Adverse cardiac events after orthotopic liver transplantation: A cross-sectional study in 389 consecutive patients. **Liver Transpl**. 2015 Jan;21(1):13-21.
 34. Albeldawi M, Aggarwal A, Madhwal S, Cywinski J, Lopez R, Egtesad B, Zein NN. Cumulative risk of cardiovascular events after orthotopic liver transplantation. **Liver Transpl**. 2012 Mar;18(3):370-5.
 35. Ross R. Atherosclerosis- an inflammatory disease. **N Engl J Med**. 1999 Jan 14;340(2):115-26.
 36. Price DT, Loscalzo J. Cellular adhesion molecules and atherogenesis. **Am J Med**. 1999 Jul;107(1):85-97.
 37. Blankenberg S, Barbaux S, Tiret L. Adhesion molecules and atherosclerosis. **Atherosclerosis**. 2003 Oct;170(2):191-203.

-
38. Nageh MF, Sandberg ET, Marotti KR, Lin AH, Melchior EP, Bullard DC, Beaudet AL. Deficiency of inflammatory cell adhesion molecules protects against atherosclerosis in mice. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.** 1997 Aug; 17(8):1517-20.
 39. Ridker PM, Hennekens CH, Roitman-Johnson B, Stampfer MJ, Allen J. Plasma concentration of soluble intercellular adhesion molecule 1 and risks of future myocardial infarction in apparently healthy men. **Lancet.** 1998 Jan 10; 351(9096):88-92.
 40. Connolly GM, Cunningham R, McNamee PT, Young IS, Maxwell AP. Elevated soluble cellular adhesion molecules are associated with increased mortality in a prospective cohort of renal transplant recipients. **BMC Nephrol.** 2011 May 22;12:23.
 41. Mulvihill N, Foley B, Crean P, Walsh M. Prediction of cardiovascular risk using soluble cell adhesion molecules. **Eur Heart J.** 2002;23:1569-74.
 42. Meuwese MC, Stroes ES, Hazen SL, Van Miert JN, Kuivenhoven JA, Schaub RG, Wareham NJ, Luben R, Kastelein JJ, Khaw KT, Boekholdt SM. Serum myeloperoxidase levels are associated with the future risk of coronary artery disease in apparently healthy individuals: the EPIC-Norfolk Prospective Population Study. **J Am Coll Cardiol.** 2007 Jul 10;50(2):159-65.
 43. King VL, Thompson J, Tannock LR. Serum amyloid A in atherosclerosis. **Curr Opin Lipidol.** 2011 Aug;22(4):302-7.
 44. Ridker PM, Rifai N, Pfeffer MA, Sacks FM, Moye LA, Goldman S, Flaker GC, Braunwald E. Inflammation, pravastatin, and the risk of coronary events after myocardial infarction in patients with average cholesterol levels. Cholesterol and Recurrent Events (CARE) Investigators. **Circulation.** 1998 Sep 1;98(9): 839-44.

-
45. Alvares-da-Silva MR, de Oliveira CP, Stefano JT, Barbeiro HV, Barbeiro D, Soriano FG, Farias AQ, Carrilho FJ, D'Albuquerque LA. Pro-atherosclerotic markers and cardiovascular risk factors one year after liver transplantation. **World J Gastroenterol**. 2014 Jul 14;20(26):8667-73.
 46. Liberman M, Pesaro AE, Carmo LS, Serrano JR CV. Vascular calcification: pathophysiology and clinical implications. **Einstein (Sao Paulo)**. 2013 Jul-Sep;11(3):376-82.
 47. Shioi A, Nishizawa Y, Jono S, Koyama H, Hosoi M, Morii H. Betaglycerophosphate accelerates calcification in cultured bovine vascular smooth muscle cells. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**. 1995;15(11):2003-9.
 48. Azevedo CF, Rochitte CE, Lima JA. Coronary artery calcium score and coronary computed tomographic angiography for cardiovascular risk stratification. **Arq Bras Cardiol**. 2012 Jun;98(6):559-68.
 49. Greenland P, Bonow RO, Brundage BH, Budoff MJ, Eisenberg MJ, Grundy SM, Lauer MS, Post WS, Raggi P, Redberg RF, Rodgers GP, Shaw LJ, Taylor AJ, Weintraub WS, Harrington RA, Abrams J, Anderson JL, Bates ER, Grines CL, Hlatky MA, Lichtenberg RC, Lindner JR, Pohost GM, Schofield RS, Shubrooks SJ Jr, Stein JH, Tracy CM, Vogel RA, Wesley DJ; American College of Cardiology Foundation Clinical Expert Consensus Task Force (ACCF/AHA Writing Committee to Update the 2000 Expert Consensus Document on Electron Beam Computed Tomography); Society of Atherosclerosis Imaging and Prevention; Society of Cardiovascular Computed Tomography. ACCF/AHA 2007 clinical expert consensus document on coronary artery calcium scoring by computed tomography in global cardiovascular risk assessment and in evaluation of patients with chest pain: a report of the American College of Cardiology Foundation Clinical Expert Consensus Task Force (ACCF/AHA Writing Committee to Update the 2000 Expert Consensus Document on Electron Beam Computed Tomography). **Circulation**. 2007 Jan 23;115(3):402-26.

-
50. Wilson PW, Kauppila LI, O'Donnell CJ, Kiel DP, Hannan M, Polak JM, Cupples LA. Abdominal aortic calcific deposits are an important predictor of vascular morbidity and mortality. **Circulation**. 2001 Mar 20;103(11):1529-34.
 51. Wayhs R, Zelinger A, Raggi P. High coronary artery calcium scores pose an extremely elevated risk for hard events. **J Am Coll Cardiol**. 2002;39(2):225-30.
 52. Greenland P, Labree L, Azen SP, Doherty TM, Detrano RC. Coronary artery calcium score combined with Framingham score for risk prediction in asymptomatic individuals. **JAMA**. 2004 Jan 14;291(2):210-5. Erratum in: **JAMA**. 2004 Feb 4;291(5):563.
 53. Detrano R, Guerci AD, Carr JJ, Bild DE, Burke G, Folsom AR, Liu K, Shea S, Szklo M, Bluemke DA, O'Leary DH, Tracy R, Watson K, Wong ND, Kronmal RA. Coronary calcium as a predictor of coronary events in four racial or ethnic groups. **N Engl J Med**. 2008;358:1336-45.
 54. Greenland P, Alpert JS, Beller GA, Benjamin EJ, Budoff MJ, Fayad ZA, Foster E, Hlatky MA, Hodgson JM, Kushner FG, Lauer MS, Shaw LJ, Smith SC JR, Taylor AJ, Weintraub WS, Wenger NK, Jacobs AK, Smith SC JR, Anderson JL, Albert N, Buller CE, Creager MA, Ettinger SM, Guyton RA, Halperin JL, Hochman JS, Kushner FG, Nishimura R, Ohman EM, Page RL, Stevenson WG, Tarkington LG, Yancy CW; American College OF Cardiology Foundation; American Heart Association. 2010 ACCF/AHA guideline for assessment of cardiovascular risk in asymptomatic adults: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. **J Am Coll Cardiol**. 2010 Dec 14;56(25):e50-103.

-
55. Chobanian AV, Bakris GL, Black HR, Cushman WC, Green LA, Izzo JL Jr, Jones DW, Materson BJ, Oparil S, Wright JT Jr, Roccella EJ; Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. National Heart, Lung, and Blood Institute.; National High Blood Pressure Education Program Coordinating Committee. Seventh report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. **Hypertension**. 2003;42(6):1206-52. Epub 2003 Dec 1.
 56. World Health Organization. **Report of a WHO Consultation on Obesity. Obesity: preventing and managing the global epidemic**. Geneva, World Health Organization, 2000. WHO Technical Report Series, No. 894.
 57. Craig CL, Marshall AL, Sjöström M, Bauman AE, Booth ML, Ainsworth BE, Pratt M, Ekelund U, Yngve A, Sallis JF, Oja P. International physical activity questionnaire: 12-country reliability and validity. **Med Sci Sports Exerc**. 2003; 35(8):1381-95.
 58. Miller JM, Rochitte CE, Dewey M, Arbab-Zadeh A, Niinuma H, Gottlieb I, Paul N, Clouse ME, Shapiro EP, Hoe J, Lardo AC, Bush DE, de Roos A, Cox C, Brinker J, Lima JA. Diagnostic performance of coronary angiography by 64-row CT. **N Engl J Med**. 2008;359(22):2324-36.
 59. Callister TQ, Cooil B, Raya SP, Lippolis NJ, Russo DJ, Raggi P. Coronary artery disease: improved reproducibility of calcium scoring with an electron-beam CT volumetric method. **Radiology**. 1998;208(3):807-14.
 60. Grundy SM. Metabolic syndrome pandemic. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**. 2008;28:629-36.
 61. Francioso S, Angelico F, Baiocchi L, Tisone G, Lenci I, Carbone M, et al. High prevalence of metabolic syndrome and long-term survival after liver transplantation. **J Hepatol**. 2008;48:S82.

62. Greenland P, Smith SC, Grundy SM. Improving coronary heart disease risk assessment in asymptomatic people: role of traditional risk factors and noninvasive cardiovascular tests. **Circulation**. 2001;104(15):1863-7.
63. Ridker PM. Role of inflammatory biomarkers in prediction of coronary heart disease. **Lancet**. 2001 Sep 22;358(9286):946-8.
64. McEwan P, Williams JE, Griffiths JD, Bagust A, Peters JR, Hopkinson P, Currie CJ. Evaluating the performance of the Framingham risk equations in a population with diabetes. **Diabet Med**. 2004 Apr;21(4):318-23.
65. Yeo WW, Yeo KR. Predicting CHD risk in patients with diabetes mellitus. **Diabet Med**. 2001;18:341-4.

Apêndice

APÊNDICE A - Artigo em língua inglesa enviado para publicação**PREDICTORS OF POST-TRANSPLANT CARDIOVASCULAR EVENTS IN LIVER TRANSPLANT RECIPIENTS****Running Title:** Predictors of cardiac events in OLT recipients

Lívia Melo Carone Linhares¹, Claudia P. Oliveira¹, Mario Reis Alvares-da-Silva², José Tadeu Stefano¹, Eloisa Maria Mello Santiago Gebrim³, Hermes Vieira Barbeiro⁴, Denise Frediani Barbeiro⁴, Debora Raquel Benedita Terrabuio¹, Edson Abdala¹, Francisco Garcia Soriano⁴, Flair José Carrilho¹, Alberto Queiroz Farias¹, Luiz Augusto Carneiro D’Albuquerque¹

¹ Department of Gastroenterology (LIM-07/LIM-37), University of São Paulo School of Medicine, São Paulo, Brazil

² Division of Gastroenterology, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

³ Department of Radiology, University of São Paulo School of Medicine, São Paulo, Brazil

⁴ Division of Emergency Medicine (LIM-51), University of São Paulo School of Medicine, São Paulo, Brazil

ABSTRACT

Objective: Cardiovascular diseases are a major non-liver-related contributor to late mortality after liver transplantation. The aim of this study was to assess the long-term effects of liver transplantation on the metabolism and cardiovascular system.

Methods: Thirty-six liver recipients were assessed one year after transplantation to evaluate the prevalence of metabolic syndrome and other predictors of cardiovascular diseases. The data collected included anthropometric features, biochemical test results, Framingham risk score and atherosclerosis biomarkers. This evaluation was repeated four years after transplantation, and a coronary artery calcium score was obtained from all participants. Data were compared to estimate cardiovascular risk progression. **Results:** The population consisted mostly of white male subjects who underwent transplantation for hepatitis C. Significant increases were observed in waist circumference and the prevalence of dyslipidemia, obesity and metabolic syndrome over time. All biomarkers of atherosclerosis studied showed increased levels at the fourth year ($p < 0.001$). Regarding the calcium score, a significant proportion of patients had moderate to severe coronary artery calcification, conferring an enhanced risk of a cardiac event. The median Framingham risk score substantially increased from the first to fourth year ($p = 0.022$), changing the stratification from low to high risk. This change was reflected in a significant increment of cardiovascular events four years after liver transplantation.

Conclusions: The prevalence of metabolic syndrome and cardiovascular risk significantly increased from the first to fourth year after liver transplantation. Coronary artery calcium scores and atherosclerosis biomarkers may improve risk stratification and help prevent symptomatic cardiovascular disease.

Keywords: liver transplantation; cardiovascular diseases; metabolic syndrome X; coronary artery disease; atherosclerosis; biomarkers.

INTRODUCTION

Advances in both therapeutic and surgical techniques have increased the short-term survival rates of those who undergo orthotopic liver transplantation (OLT). However, long-term survival has not improved on the same scale. Cardiovascular (CV) diseases, malignancies and infections are the major non-liver-related contributors to late morbidity and mortality (1, 2); however, little has been done to address these factors. It is estimated that 19-42% of liver-unrelated mortality is attributable to CV events (3). Metabolic syndrome (MS) is the most important risk factor for CV diseases. Therefore, the prevention, early detection and management of post-transplant MS is a noteworthy issue for the transplant community. MS and related disorders (e.g., abdominal obesity, diabetes mellitus, hypertension and dyslipidemia) are often exacerbated by an inappropriate diet, smoking and a sedentary lifestyle, but transplant-specific factors, such as immunosuppressive regimen, also play important roles (4).

Although each component of MS alone is a risk factor for CV disease, when three or more are associated, the risk of coronary events becomes greater than 50% (3). Death from coronary artery disease in patients with MS is 3- to 4-times more frequent than in those who do not meet the criteria for the syndrome (5). Data on the impact of MS on morbidity and mortality after OLT remain scarce.

Clinical scores are often used to estimate the risk of a CV event. However, there are additional tools that can increase the accuracy of risk stratification. The recognition of atherosclerosis as a chronic inflammatory disease has stimulated research into serum markers of inflammation as early indicators of the disease. Cell adhesion molecules are expressed on the vascular endothelium and on circulating leukocytes in response to inflammatory stimuli and mediate the transendothelial migration of inflammatory cells from the circulatory system, which is an initial event in the course of atherosclerosis (6). Thus, measuring soluble cell adhesion molecule levels in blood seems to be useful in cardiovascular risk (CVR) stratification mainly in asymptomatic subjects (7,8). The coronary artery calcium score (CACS) is a noninvasive diagnostic method that detects the amount of calcium deposited in coronary arteries and has not been evaluated in a post-OLT setting. The CACS has

emerged as the most robust predictor of coronary events in the asymptomatic population, providing supplemental prognostic information to the assessment of traditional risk factors (9,10).

We hypothesized that liver transplantation aggravates MS and CVR over time. The aim of the present study was to assess the long-term effects of OLT on the metabolism and cardiovascular system.

METHODS

Study design

Between August 2010 and July 2011, 72 adult patients (>18 years) had survived 12 months after liver transplantation at the Liver Transplant Unit of the University of São Paulo, Brazil, and were eligible to enter this study. After the exclusion criteria (i.e., malignancies, treatment with interferon, clinical signs of infection or suspected rejection) were applied, 44 patients were included in the first phase of the study (first-year evaluation). In the second phase (fourth-year evaluation), 36 individuals participated (2 patients refused to participate, 1 death of undetermined cause occurred, 2 patients were using interferon, and we were unable to contact 3 patients). In both phases, anthropometric data (i.e., weight, height, body mass index, waist circumference, and blood pressure), MS components, habits (i.e., alcohol consumption, smoking and physical activity), glucose and lipid profiles, Framingham risk score and serum biomarkers of atherosclerosis were assessed. At the end of the follow-up period, cardiac computed tomography (CT) was performed, and the CACS was obtained. Pre-transplantation data concerning predictors of CV diseases were reviewed from patient charts.

The criteria used to define hypertension were those recommended by the seventh report of the Joint National Committee (11): systolic blood pressure ≥ 140 , diastolic blood pressure ≥ 90 mmHg or the use of anti-hypertensive drugs. Diagnosis with diabetes mellitus (DM) was considered according to the recommendations of the American Diabetes Association: fasting glycemia ≥ 126 mg/dL, postprandial glycemia ≥ 200 mg/dL or the use of insulin/oral hypoglycemic agents. MS was defined using the National Cholesterol Education Program/Adult Treatment Panel III

(NCEP/ATPIII) criteria (12): fasting glucose ≥ 100 ; systolic blood pressure ≥ 130 or diastolic ≥ 85 mmHg; triglycerides ≥ 150 mg/dL; low high-density lipoprotein (HDL) cholesterol, given as <40 mg/dL for men and <50 mg/dL for women; abdominal obesity, given as waist circumference >102 cm/ >40 in for men and >88 cm/ >35 in for women. Insulin resistance was considered when the glucose homeostasis model (HOMA-IR) value was >3 , as calculated using the following formula: fasting glucose (mg/dL) X fasting insulin (μ U/mL) / 405, or, for international units: fasting glucose (mmol/L) X fasting insulin (μ U/L) / 22.5 (12).

A CV event was defined as a fatal or nonfatal myocardial infarction, a coronary intervention (e.g., coronary artery bypass graft or percutaneous coronary intervention), angina requiring an emergency room visit, or a cerebrovascular event.

Laboratory evaluation

Blood cell counts and measurements of aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), alkaline phosphatase (AP), gamma-glutamyl transferase (GGT), glycosylated hemoglobin, total cholesterol and fractions, triglycerides, fasting glucose and insulin levels were assessed according to standard techniques.

Framingham risk score and physical activity

The Framingham risk score (FRS) was calculated by assigning gender-specific points for age, smoking, blood pressure, HDL and low-density lipoprotein cholesterol (LDL). The gender-specific FRS equations were then used to calculate the risk of having a CV event over the next ten years. Patients were graded as low risk ($<10\%$), intermediate risk ($10\%-20\%$), or high risk ($>20\%$), according to NCEP/ATPIII guidelines (12). The International Physical Activity Questionnaire was used to assess physical activity. A sedentary lifestyle was described as less than 10 min/wk of continuous exercise (14).

Biomarkers of atherosclerosis

To detect early endothelial dysfunction, we analyzed the levels of soluble intercellular adhesion molecule 1 (sICAM-1) and soluble vascular cell adhesion molecule 1 (sVCAM-1). The presence of inflammation and oxidative stress were

evaluated using serum amyloid A and myeloperoxidase plasma levels. Each measurement was performed using commercially available kits in a multiplex assay on the MAGPIX®, according the instructions of the manufacturer (Merck/Millipore, Darmstadt, Germany). Laboratory staff members were blinded to the CACS results.

Coronary artery calcium score

The CACS was measured by a multidetector CT system (Toshiba Aquilion CXL, 128-slice CT scanner, Toshiba Medical Systems, Otawara, Japan) that acquires 64 slices of 2.5-mm sections each cardiac cycle with sequential prospectively activated acquisition in 60% of the RR interval. All images were analyzed on an offline workstation (Smartscore 4.0, Advantage Workstation, GE Medical Systems, Milwaukee, WIS, USA). A calcified lesion was defined as an area of CT attenuation above 130 Hounsfield units (HU). The volume score was calculated by multiplying the number of voxels (three-dimensional units) with volume calcification of each voxel, including all voxels with attenuation > 130 UH. The CACS was categorized as normal (0), minimal (1-10), mild (11-100), moderate (101-400), or severe calcification (>400).

Ethics

This study was performed in accordance with the ethical standards of the Helsinki Declaration. An institutional ethics review board approved the protocol, and written informed consent was obtained from each patient. The Department of Gastroenterology (LIM07/LIM-37), School of Medicine, University of São Paulo, Brazil, supported this work. The authors have no conflicts of interest related to this publication.

Statistical analysis

The data were entered into Microsoft Excel and then exported to SPSS v. 18.0 for statistical analysis. The variables are described by the median and the interquartile range (25th and 75th percentiles), and comparisons between the years were made using the Wilcoxon test. Comparisons between two categories were made using the Mann-Whitney test, and those between three or more categories were made using the Kruskal-Wallis test. Quantitative variables were correlated by the Spearman correlation coefficient. Significance was considered at the level of 5%.

RESULTS

First-year analysis

Most patients were male (66.7%) and white (50%), with a mean age of 49.9 ± 12.0 years. Only four (11.1%) patients underwent transplantation because of non-alcoholic steatohepatitis. The etiology of liver disease in the other patients was as follows: 11 had hepatitis C, 7 had hepatitis B (one patient was carrying both viruses), 6 had alcoholic cirrhosis, 2 patients had autoimmune hepatitis, and 7 had other diagnoses. Twelve patients underwent transplantation due to hepatocellular carcinoma.

In this first evaluation, all subjects were using tacrolimus, a major immunosuppressant. Corticosteroids were used in association with tacrolimus for a mean of 6.95 ± 3.56 months. Obesity was not a prevalent comorbidity, as the mean body mass index (BMI) was $24.3 \pm 4.1 \text{ kg/m}^2$. The mean waist circumference was $89.4 \pm 12.3 \text{ cm}$. Hypertension was detected in 41.7% of patients, DM in 44.4%, and dyslipidemia in 33.3%; 25% of patients met the criteria for MS. Smoking and alcohol consumption were low, only being present in 13.9% and 5.6% of patients, respectively. In contrast, physical inactivity was registered in 72.2% of cases (Table 1).

Regarding CVR assessment, the median FRS obtained was 7.5% (Table 1), which indicates low CVR. A 60-year-old, hypertensive male who was a former smoker (50 pack-years) and underwent transplantation for alcoholic cirrhosis presented with a myocardial infarction in the first year after transplantation and underwent angioplasty with stent placement.

Fourth-year analysis and comparison with the first year

In the second phase of the study, 77.8% of patients were using calcineurin inhibitors (CIN) alone or in combination with mycophenolate, 16.7% were taking CIN associated with prednisone, and 5.5% were using sirolimus. A sedentary lifestyle was reported by 66.7% of patients. Fewer than 10% of patients were smokers or drinkers. A positive family history for CV diseases was present in 25% of cases.

Four years after OLT, overweight and obesity became more prevalent. The mean BMI was $27.1 \pm 5.1 \text{ kg/m}^2$, and the mean waist circumference was $97.1 \pm 13.1 \text{ cm}$. A statistically significant difference was observed in both BMI and waist circumference between the first- and fourth-year findings. Hypertension and diabetes were also more frequent, accounting for 66.7% and 55.6% of patients, respectively. The prevalence of dyslipidemia increased significantly to 58.3% ($p=0.049$). The proportion of individuals diagnosed with MS doubled, reaching a prevalence of 50% ($p=0.049$). The median FRS significantly increased from 7.5% in the first year to 21% at the end of the follow-up period (Table 1).

Risk factors for CV diseases, such as diabetes, age, the male gender, smoking and BMI before OLT, were evaluated but did not demonstrate a correlation.

At the end of the study, five (13.9%) patients had experienced at least one CV event in life. Most of them had MS and were former smokers. There were seven CV events registered four years after OLT. Of these, four occurred in cerebrovascular territory (transient ischemic attack and ischemic stroke). As described above, one subject had a myocardial infarction within the first year after OLT. Two other patients had angina that required an emergency room visit and specific treatment. Three of these patients demonstrated a high CACS, reflecting the presence of a moderate to large amount of atherosclerotic plaque in the coronary arteries (Table 2). It is important to note that data from echocardiograms and electrocardiograms obtained before OLT showed no significant signs of coronary artery disease in any of the participants.

Significant ($p<0.001$) increases in the levels of sVCAM-1, sICAM-1, serum amyloid A and myeloperoxidase were observed from the first to fourth year after OLT, as shown in Table 3. However, we were not able to find any significant statistical correlations between the biomarker levels and the FRS or CACS.

After determination of the CACSs, patients were stratified according to the amount of atherosclerotic plaque as having normal (0), minimal (1-10), mild (11-100), moderate (101-400), or severe calcification (>400). Thus, we observed that four years after OLT, 25% of individuals had a moderate or large amount of atherosclerotic plaque in their coronary arteries (Table 4). There was a significant

correlation between age and CACS ($r_s=0.56$; $p<0.001$). We also observed that hypertensive, diabetic and dyslipidemic patients presented higher CACSs than did non-hypertensive ($p=0.014$), non-diabetic ($p=0.009$) and non-dyslipidemic patients ($p=0.034$), respectively. The presence of MS almost reached a significant correlation with the CACS ($p=0.054$). Patients with a CV event had higher CACSs (median=140.0; interquartile range: 92.0 to 1000.0) than did patients who did not experience any CV events (median=0; interquartile range from 0 to 31.5), and this difference was significant ($p=0.001$). As expected, we observed a significant correlation between the FRS and CACS ($r_s=0.58$; $p<0.001$). The associations between clinical data in the 4th year and the CACS are described in Table 5. No correlations were found between immunosuppressive drug use and MS or CVR. Significant correlations were found between the CACS and the levels of glucose, glycosylated hemoglobin and triglycerides. The correlations between the biochemical test results in the 4th year and the CACS are described in Table 6.

DISCUSSION

MS has reached epidemic proportions in western industrialized societies, and CV diseases are at the top of the all-cause mortality list. While liver transplantation seems to be related to a higher prevalence of MS and CV diseases (4, 15, 16), in many centers, there is no follow-up protocol to diagnose early and asymptomatic atherosclerosis. The present study registered the prevalence of risk factors for CV diseases one year after OLT and compared those data with the same variables obtained three years later in the same population. A significant worsening of the patient metabolic and CV profiles was found at the end of the study. A CV assessment typically consisting of echocardiography and electrocardiography was performed before OLT as part of the institutional preoperative protocol, but no specific signs of coronary artery disease were detected through those methods.

The prevalence of MS in the general population is estimated to be 20-30% (17), which is similar to our findings in the first year post-OLT. However, four years after OLT, we registered a high prevalence of MS and a high 10-year estimated CVR, which is consistent with data published by other groups (18-21) and suggests

that transplantation itself might be a risk factor for CV diseases. Notice that non-alcoholic steatohepatitis did not contribute to the high CVR and prevalence of MS observed. To the best of our knowledge, this is the first study to perform a long-term follow-up of patients after OLT and determine the progression of MS, FRS and atherosclerosis serum biomarkers while including the CACS.

This paper has some limitations. The study was conducted in a single center and included a small number of subjects, limiting the power of our analysis. However, this cohort could demonstrate that CVR increases over a short time and should be assessed in all patients after OLT. In this study, we were not able to assess the CACS at the first-year evaluation, so the lack of comparative data is also an important limitation. Additional studies are needed to demonstrate the acceleration of atherosclerotic disease after liver transplantation.

A meta-analysis with 7792 liver transplant patients observed a 13.6% CVR within ten years, consistent with an intermediate risk (22). In our study, the median FRS increased from 7.5% in the first year to 21% in the fourth year, meaning that the estimated CVR increased from a low to a high risk in a short period after OLT.

It has been shown that over half of acute coronary syndromes and sudden deaths occur in previously asymptomatic individuals (23). Therefore, the early identification of the subgroup that is at a higher risk for CV events in the asymptomatic population is essential to decrease prevalence of these events (9). Endothelial biomarkers of inflammation, including selectins, integrins and intercellular and vascular adhesion molecules (ICAM-1 and VCAM-1), are increased in blood in the early stages of atherosclerosis. Connolly et al. (7) followed 378 renal transplant recipients and performed sequential measurements of sVCAM-1 and sICAM-1 levels in the blood; they found that adhesion molecules were independent predictors of mortality. Myeloperoxidase and serum amyloid A are also proteins that seem to play a role in atherosclerotic disease. The former is an enzyme derived from leukocytes that can promote atherosclerosis through oxidative stress and the instability of pre-existing atherosclerotic plaque (24). The latter is an acute-phase protein synthesized in the liver and transported bound to HDL cholesterol (25). Our group recently demonstrated a similar pro-atherosclerotic serum profile in non-obese

OLT recipients and non-alcoholic steatohepatitis patients, suggesting a high risk of atherosclerosis in the transplant population (26). In a case-control study in which the role of MPO role was analyzed, levels >728 pmol/L were correlated with the development of coronary events regardless of the presence of traditional CVR factors (24). We believe that these molecules might be useful for identifying individuals more prone to CV events before they have symptoms or established artery lesions, thereby increasing the efficiency of prevention.

In the present study, we found significant differences between the first- and fourth-year values of all atherosclerosis biomarkers studied. The sVCAM-1, sICAM-1, serum amyloid A and myeloperoxidase values increased during the follow-up period, indicating the likely presence of endothelial lesions and therefore subjects more prone to the formation of atheromatous plaques. However, we were unable to demonstrate correlations between the biomarkers and MS, the FRS or the CACS, which can be attributed to the small size of the sample. The instability and short half-lives of the molecules, as well as variations in the circadian cycle, might also justify the difficulty in obtaining serum levels of the markers, which could explain why they did not correlate with the CVR in our study (27).

CVR stratification is accomplished primarily through clinical scores; the most widely used is the FRS. Prediction models of coronary artery disease based on risk factors have limitations in their ability to discriminate individuals who will experience a CV event (23). To improve risk prediction, Greenland et al. (28) performed a CACS assessment combined with the FRS among 84 asymptomatic adults and concluded that the combination provides prognostic information superior to that of either method alone. They found that a CACS >300 increased the 10-year CVR prediction by 3-9% compared with the FRS alone. Many studies have demonstrated reclassification indexes ranging from 52.0-65.6% in intermediate-risk, 34.0-35.8% in high-risk, and 11.6-15.0% in low-risk cohorts (10).

Notably, three of the cases with CV events exhibited a high CACS and the presence of a moderate to large amount of atherosclerotic plaque, as shown by coronary CT. Interestingly, the other two patients with a low CACS presented with

events only in cerebrovascular territory. This difference probably occurred because atherosclerosis can affect different vascular territories heterogeneously.

The present study identified that 27.5% of patients exhibited moderate/severe coronary artery calcification, meaning that this population is under a high risk of CV events and should therefore be carefully followed and medicated if necessary. We suggest that after OLT, patients should attend to consultation with a multidisciplinary team comprising a hepatologist, cardiologist, endocrinologist, nutritionist, physiotherapist, pharmaceutical, and psychologist to reinforce adherence to healthier life habits and treat early metabolic alterations that may arise. In addition, instructions must always discourage smoking and drinking habits and initiate routine exercise and a balanced diet. The transplant community has not yet defined the best screening tests for CV diseases or an adequate interval for performing these tests after OLT, but it is reasonable at least to calculate the FRS on a regular basis to estimate the CVR. Assessing the CACS in asymptomatic patients with an intermediate estimated CVR might be a good choice to ameliorate risk stratification.

In summary, our findings suggest that OLT is associated with deleterious long-term effects on the metabolism and cardiovascular system and that a routine evaluation of CV diseases should be performed in OLT recipients. The CACS seems to be useful in the evaluation of this population, correlating with age, CV events and the FRS and likely enhancing CVR stratification in this population.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Linhares LMC was responsible for data acquisition, bibliographic review and manuscript preparation. Oliveira CP was responsible for the study design, manuscript preparation and final review. Alvares-da-Silva conceived and designed the study and was responsible for data acquisition and manuscript drafting. Stefano JT was responsible for data acquisition and manuscript drafting. Gebrim EMMS, Barbeiro HV, Barbeiro DF were responsible for data acquisition. Terrabuio DRB, Abdala E and Soriano FG were responsible for data analysis and interpretation. Carrilho FJ and Farias AQ were responsible for data analysis and interpretation and critical revision.

D'Albuquerque LAC conceived and designed the study and was responsible for manuscript critical revision.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was conducted during a scholarship supported by Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) at the University of São Paulo.

REFERENCES

1. Desai S, Hong JC, Saab S. Cardiovascular risk factors following orthotopic liver transplantation: predisposing factors, incidence and management. *Liver Int* 2010;30(7):948-957.
2. Stravitz RT, Carl DE, Biskobing DM. Medical management of the liver transplant recipient. *Clin Liver Dis* 2011;15(4):821-843.
3. Watt KD, Charlton MR. Metabolic syndrome and liver transplantation: a review and guide to management. *J Hepatol* 2010;53(1):199-206.
4. Oliveira CP, Stefano JT, Alvares-da-Silva MR. Cardiovascular risk, atherosclerosis and metabolic syndrome after liver transplantation: a mini review. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* 2013;7(4):361-364.
5. Lakka HM, Laaksonen DE, Lakka TA, Niskanen LK, Kumpusalo E, Tuomilehto J et al. The metabolic syndrome and total and cardiovascular disease mortality in middle-aged men. *JAMA* 2002;288(21):2709-2716.
6. Price DT, Loscalzo J. Cellular adhesion molecules and atherogenesis. *Am J Med* 1999;107(1):85-97.
7. Connolly GM, Cunningham R, McNamee PT, Young IS, Maxwell AP. Elevated soluble cellular adhesion molecules are associated with increased mortality in a prospective cohort of renal transplant recipients. *BMC Nephrol* 2011;12:23.

8. Mulvihill NT, Foley JB, Crean P, Walsh M. Prediction of cardiovascular risk using soluble cell adhesion molecules. *Eur Heart J* 2002;23(20):1569-1574.
9. Azevedo CF, Rochitte CE, Lima JA. Coronary artery calcium score and coronary computed tomographic angiography for cardiovascular risk stratification. *Arq Bras Cardiol* 2012;98(6):559-568.
10. Hecht HS. Coronary artery calcium scanning: past, present, and future. *JACC Cardiovasc Imaging*. 2015;8(5):579-96
11. Chobanian AV, Bakris GL, Black HR, Cushman WC, Green LA, Izzo JL Jr, Jones DW, Materson BJ, Oparil S, Wright JT Jr, Roccella EJ; Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. National Heart, Lung, and Blood Institute.; National High Blood Pressure Education Program Coordinating Committee. Seventh report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. *Hypertension*. 2003 Dec;42(6):1206-52. Epub 2003 Dec 1.
12. National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report. *Circulation*. 2002 Dec 17;106(25):3143-421.
13. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and β -cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia*. 1985;28:412-419.
14. Matsudo SM, Matsudo VR, Araujo TL, Andrade DR, Andrade EL, de Oliveira LC et al. The Agita São Paulo Program as a model for using physical activity to promote health. *Rev Panam Salud Publica* 2003;14(4):265-272.
15. Pagadala M, Dasarathy S, Eghtesad B, McCullough AJ. Posttransplant metabolic syndrome: an epidemic waiting to happen. *Liver Transpl* 2009; 15(12): 1662-70.

16. Nicolau-Raducu R, Gitman M, Ganier D, Loss GE, Cohen AJ, Patel H et al. Adverse cardiac events after orthotopic liver transplantation: a cross-sectional study in 389 consecutive patients. *Liver Transpl* 2015;21(1):13-21.
17. Grundy SM. Metabolic syndrome pandemic. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008;28:629-636.
18. Stegall MD, Everson G, Schroter G, Bilir B, Karrer F, Kam I. Metabolic complications after liver transplantation. Diabetes, hypercholesterolemia, hypertension, and obesity. *Transplantation* 1995;60:1057-1060.
19. Laryea M, Watt KD, Molinari M, Walsh MJ, McAlister VC, Marotta PJ, et al. Metabolic syndrome in liver transplant recipients: prevalence and association with major vascular events. *Liver Transpl* 2007;13:1109-1114.
20. Francioso S, Angelico F, Baiocchi L, Tisone G, Lenci I, Carbone M, et al. High prevalence of metabolic syndrome and long-term survival after liver transplantation. *J Hepatol* 2008;48:S82.
21. Bianchi G, Marchesini G, Marzocchi R, Pinna AD, Zoli M. Metabolic syndrome in liver transplantation: relation to etiology and immunosuppression. *Liver Transpl* 2008;14: 1648-1654
22. Madhwal S, Atreja A, Albeldawi M, Albeldawdi M, Lopez R, Post A et al. Is liver transplantation a risk factor for cardiovascular disease? A meta-analysis of observational studies. *Liver Transpl* 2012;18(10):1140-1146.
23. Greenland P, Smith SC, Grundy SM. Improving coronary heart disease risk assessment in asymptomatic people: role of traditional risk factors and noninvasive cardiovascular tests. *Circulation* 2001;104(15):1863-1867.
24. Meuwese MC, Stroes ES, Hazen SL, van Miert JN, Kuivenhoven JA, Schaub RG et al. Serum myeloperoxidase levels are associated with the future risk of coronary artery disease in apparently healthy individuals: the EPIC-Norfolk Prospective Population Study. *J Am Coll Cardiol* 2007;50(2):159-165.
25. King VL, Thompson J, Tannock LR. Serum amyloid A in atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* 2011;22(4):302-307.

26. Alvares-da-Silva MR, de Oliveira CP, Stefano JT, Barbeiro HV, Barbeiro D, Soriano FG et al. Pro-atherosclerotic markers and cardiovascular risk factors one year after liver transplantation. *World J Gastroenterol* 2014;20(26):8667-8673.
27. Ridker PM. Role of inflammatory biomarkers in prediction of coronary heart disease. *Lancet*. 2001 Sep 22;358(9286):946-8.
28. Greenland P, LaBree L, Azen SP, Doherty TM, Detrano RC. Coronary artery calcium score combined with Framingham score for risk prediction in asymptomatic individuals. *JAMA* 2004;291(2):210-215.

TABLES

Table 1- Comparison of demographic and clinical data obtained in the first and fourth years after OLT (n=36)

Variable	1 st year	4 th year	P
Waist circumference (cm), mean $\pm$ SD	89.4 $\pm$ 12.3	97.1 $\pm$ 13.1	<0.001
BMI (kg/m²), mean $\pm$ SD	24.3 $\pm$ 4.1	27.1 $\pm$ 5.1	<0.001
BMI >30 kg/m², n (%)	1 (3)	9 (25)	<0.001
Alcohol, n (%)	2 (5.6)	2 (5.6)	1.000
Smoking, n (%)	5 (13.9)	3 (8.3)	0.500
Sedentary lifestyle, n (%)	26 (72.2)	24 (66.7)	0.791
Hypertension, n (%)	15 (41.7)	24 (66.7)	0.064
Diabetes mellitus, n (%)	16 (44.4)	20 (55.6)	0.289
Dyslipidemia, n (%)	12 (33.3)	21 (58.3)	0.049
Metabolic syndrome, n (%)	9 (25)	18 (50)	0.049
FRS, 10-year (%) (median-interquartile range)	7.5 (0-21.0)	21.0 (2.0-21)	0.022
Cardiovascular event, n (%)	1 (2.8)	7 (19.4)	0.031

Categorical variables by the Mann-Whitney test.

Legend: OLT, orthotopic liver transplantation; SD, standard deviation; BMI, body mass index; FRS, Framingham risk score.

Table 2- Profile of patients who presented cardiovascular events

Patient	Age* (years)	Smoking	Hypertension	DM	MS	Event	Time **	CACS***
6	65	Former smoker (4.5 pack-years)	Yes	No	No	Transient ischemic attack	13	6 (minimal)
12	69	Former smoker (18 pack-years)	Yes	No	No	Ischemic stroke	33	92 (small)
18	65	Former smoker (50 pack-years)	Yes	Yes	Yes	Transient ischemic attack	10	1700 (large)
						Myocardial infarction	3	
20	60	Former smoker (54 pack-years)	Yes	Yes	Yes	Angina	23	324 (moderate)
35	58	No	Yes	Yes	Yes	Ischemic stroke	21	109 (moderate)
						Angina	14	

*Age at the end of follow-up, when CACS was measured; **Months after OLT; ***Classification according to the amount of calcified coronary artery plaque.

Legend: CACS, coronary artery calcium score; DM, diabetes mellitus; MS, metabolic syndrome; OLT, orthotopic liver transplantation.

Table 3- Comparison of serum atherosclerosis biomarkers between the 1st and 4th years

Biomarkers	1 st year	4 th year	p
sVCAM-1 (ng/ml)	1.79 (1.48-2.18)	7.82 (4.31-12.14)	<0.001
sICAM-1 (ng/ml)	0.22 (0.16-0.31)	1.66 (0.95-2.81)	<0.001
Myeloperoxidase (ng/ml)	0.07 (0.04-0.11)	2.30 (1.37-3.26)	<0.001
Serum amyloid A (ng/ml)	5.64 (2.92-18.65)	50.21 (25.51-88.92)	<0.001

* Data are presented as the median and interquartile range (25th and 75th percentiles) and were compared using the Wilcoxon test.

Legend: sVCAM-1, soluble vascular cell adhesion molecule 1; sICAM-1, soluble intercellular adhesion molecule 1.

Table 4- Patient classification according to CACS

Classification	n=36
Absence of atherosclerotic plaque (CACS=0)	20 (55.6%)
Minimal atherosclerotic plaque (CACS=0-10)	3 (8.3%)
Small amount of atherosclerotic plaque (CACS=11-100)	4 (11.1%)
Moderate atherosclerotic plaque (CACS=101-400)	7 (19.4%)
Large amount of atherosclerotic plaque (CACS>400)	2 (5.6%)

Legend: CACS, coronary artery calcium score.

Table 5- Association between clinical data and coronary artery calcium score (CACS) in the fourth year after liver transplantation

	CACS median (interquartile range)	r_s	p
Gender			0.305
Male	6 (0-136)		
Female	0 (0-92)		
Age		0.56	<0.001
Immunosuppression			0.981
CIN	0 (0-140)		
CIN+Prednisone	4 (0-96)		
Sirolimus	0 (0-2190)		
Hypertension			0.014
Yes	10.5 (0-163)		
No	0 (0-0)		
DM			0.009
Yes	67 (0-169)		
No	0 (0-2)		
Dyslipidemia			0.034
Yes	11 (0-171)		
No	0 (0-5)		
MS			0.054
Yes	9 (0-185)		
No	0 (0-32)		
CV event			0.001
Yes	140 (92-1000)		
No	0 (0-32)		
Smoking			0.699
Yes	77 (13-131)		
No	0 (0-6)		
Alcohol intake			0.018
No	0 (0-32)		
Yes, previously	1177 (163-2190)		
Yes, currently	83 (0-249)		
Sedentary lifestyle			0.286
Yes	3 (0-146)		
No	0 (0-59)		
FRS		0.58	<0.001

Quantitative variables were correlated by Spearman's rho coefficient. Categorical variables were compared by the Mann-Whitney test and are described by the median (interquartile range).

Legend: DM, diabetes mellitus; MS, metabolic syndrome; CV, cardiovascular; FRS, Framingham risk score.

Table 6- Correlation between biochemical tests in the 4th year and CACS

Biochemical test	r_s	p
Insulin	0.05	0.799
Glucose	0.36	0.021
Glucosylated hemoglobin	0.54	<0.001
HOMA-IR	0.04	0.821
Triglycerides	0.47	0.002
Total cholesterol	0.11	0.521
HDL cholesterol	-0.18	0.276
LDL cholesterol	0.01	0.942
ALT	-0.19	0.252
AST	-0.18	0.268
AP	0.06	0.709
GGT	0.10	0.549

Quantitative variables were correlated by Spearman's rho coefficient.

Legend: HOMA-IR, homeostatic model assessment of insulin resistance; HDL, high-density lipoprotein; LDL, low-density lipoprotein; ALT, alanine aminotransferase; AST, aspartate aminotransferase; AP, alkaline phosphatase; GGT, gamma-glutamyl transferase.

Anexos

ANEXO A- Aprovação da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa **APROVAÇÃO**

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 08/09/2010, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **0418/10**, intitulado: **"ESTUDO ACERCA DA INFLUÊNCIA DE SÍNDROME METABÓLICA E RESISTÊNCIA INSULÍNICA PRÉ E PÓS- TRANSPLANTE HEPÁTICO NA RECORRÊNCIA DA HEPATITE C "** apresentado pelo Departamento de **GASTROENTEROLOGIA**, inclusive o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10/10/1996, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: **Luiz Augusto Carneiro D´Albuquerque**

Pesquisador (a) Executante: **Mário Reis Álvares-da-Silva**

CAPPesq, 09 de Setembro de 2010

Prof. Dr. Eduardo Massad
Presidente da Comissão de
Ética para Análise de Projetos
de Pesquisa

Hospital das Clínicas da FMUSP
Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
CAPPesq

Nº Protocolo: 0418/10

Título: ESTUDO ACERCA DA INFLUÊNCIA DE SÍNDROME METABÓLICA E RESISTÊNCIA INSULÍNICA PRÉ E PÓS- TRANSPLANTE HEPÁTICO NA RECORRÊNCIA DA HEPATITE C

Pesquisador Responsável: Luiz Augusto Carneiro D´Albuquerque

Pesquisador Executante: Mário Reis Álvares-da-Silva, Livia Carone

Departamento: GASTROENTEROLOGIA

O Coordenador da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa – CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, **APROVOU / TOMOU CIÊNCIA ad-referendum** em 28/02/2013, do(s) documento(s) abaixo mencionado(s):

•Carta datada de 04/02/13 - Relatório Parcial; inclusão da Pesquisadora Executante Livia Carone

CAPPesq, 28 de Fevereiro de 2013

PROF. DR. LUIZ EUGÊNIO GARCEZ LEME
Coordenador
Comissão de Ética para Análise de
Projetos de Pesquisa - CAPPesq

ANEXO B- Termo de consentimento livre e esclarecido**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Convidamos o (a) senhor (a) para participar voluntariamente de projeto de pesquisa com objetivo de identificar que fatores clínico e laboratoriais podem influenciar que o vírus da hepatite C recorra (volte a infectar o fígado) no seu fígado após o transplante. Para tal serão avaliados exames de sangue de candidatos a transplante hepático por infecção secundária ao vírus da hepatite C, em comparação a pacientes nas mesmas situações, mas sem o vírus C, e exames de sangue e tecido hepático de pacientes transplantados de fígado. Espera-se encontrar resultados que possibilitem prever o retorno da hepatite C nos pacientes transplantados, e, assim, permitir sua prevenção e tratamento adequados. Como fatores do metabolismo parecem importantes para a evolução da hepatite C, este estudo irá avaliar a frequência de manifestações metabólicas, como diabetes melito e resistência insulínica, em portadores de vírus C em comparação a indivíduos não expostos ao vírus.

PROCEDIMENTOS

A rotina de atendimento no Ambulatório de Transplante Hepático continuará a mesma, através de consultas médicas e exames feitos como habitual para acompanhamento e tratamento, tanto antes como depois do transplante. Estes procedimentos de rotina incluem exames de sangue, através de punção periférica de veia do antebraço. Pedimos a permissão para utilização dessas informações no estudo em questão, através do armazenamento dos resultados dos exames, porém mantendo em sigilo a identificação do paciente. Além dos exames habituais, outros exames de caráter experimental serão solicitados. Para tal será necessária coleta de sangue por punção periférica de veia do antebraço, que será congelado para dosagem de algumas citocinas (substâncias produzidas em nosso organismo, e que regulam a inflamação). Não serão feitas coletas de sangue ou biópsias de fígado apenas para este estudo. Será ainda, necessária a realização de tomografia computadorizada (TC) para aferição do escore de cálcio nas artérias coronarianas. A TC é um exame radiológico que produz imagens internas dos nossos órgãos numa forma mais detalhada do que o

raio X convencional sendo utilizada, no nosso estudo, para determinar a quantidade de cálcio existente nas artérias coronárias. Estudos científicos demonstraram que, quanto mais calcificação nós tivermos pior é a doença coronária. Mesmo pequenas quantidades de cálcio nas nossas coronárias são um indicador de doença. Para avaliação do escore de cálcio das artérias coronárias não é necessária utilização de contraste de forma a não trazer riscos ao paciente.

DESCONFORTOS E RISCOS

A punção de veia periférica apresenta pequeno desconforto, e alguns riscos, como sangramento, hematoma, equimose, e dor local. As biópsias de fígado são procedimentos realizados sem necessidade de internação, sob anestesia local, e controle ecográfico. Tomografia sem contraste não oferece riscos ao paciente, exceto radiação mínima.

BENEFÍCIOS

A avaliação dos fatores associados à má-evolução da hepatite C pós-transplante poderá trazer informações importantes no que se refere ao prognóstico da sua doença, e auxiliar em uma estratégia de tratamento futuro. O diagnóstico de alterações metabólicas como resistência à insulina, síndrome metabólica ou diabetes mellitus, pode antecipar o seu tratamento, e ter impacto no controle da sua doença do fígado. A avaliação do risco cardiovascular possibilitará a equipe médica adotar medidas terapêuticas (medicamentos, dieta) para pacientes que apresentem risco elevado de apresentarem complicações cardiovasculares evitando desta forma, evolução para infarto agudo do miocárdio ou acidente vascular cerebral. Não haverá nenhum custo extra para o(a) senhor(a) pela sua participação nessa pesquisa. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se houver qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa. A participação não condiciona qualquer vantagem na lista de espera para transplante de fígado.

CONFIDENCIALIDADE

As informações médicas geradas por esta pesquisa farão parte do seu prontuário hospitalar. Aquelas informações que não constarem no seu prontuário serão mantidas no arquivo dos pesquisadores e identificadas apenas por um número. Os resultados desse estudo poderão ser publicados em uma revista ou livro texto da área médica com a finalidade de ensinamento. Os autores se comprometem a usar os dados apenas com os propósitos desta pesquisa.

SOLICITAÇÃO DE INFORMAÇÕES ADICIONAIS

O(a) senhor(a) poderá solicitar mais informações a respeito do estudo a qualquer momento. Em qualquer etapa do estudo, o senhor (a) terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa. O principal investigador é o Prof. Dr. Luiz Augusto Carneiro D’Albuquerque, que pode ser encontrado no endereço no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP, telefone (s) 30697940 Se o senhor (a) tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contado com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar, telefone 3069-6442, ramais 16,17,18 ou 20, fax 3069-6442, ramal 26, ou pelo email: cappesq@hcnet.usp.br.

O(a) senhor(a) será informado sobre novas descobertas que possam influenciar a continuidade da sua participação na pesquisa.

RECUSA OU ABANDONO DO ESTUDO

O(a) senhor(a) está livre a recusar-se a participar, retirar o seu consentimento informado ou abandonar o referido projeto, a qualquer momento, sem prejuízo à continuidade de seu tratamento na instituição.

Eu, _____, fui informado(a) dos objetivos e da justificativa do estudo “Hepatite c recorrente: estudo acerca da influência de fatores metabólicos antes e depois do transplante hepático”, de forma clara e detalhada, conforme especificados no termo de consentimento livre e esclarecido. Recebi informações específicas sobre os procedimentos aos quais serei

submetido (a), seus desconfortos e riscos, bem como da utilização de material biológico para estudo.

Todas as minhas dúvidas foram respondidas com clareza e sei que poderei solicitar novos esclarecimentos a qualquer momento. Além disso, terei liberdade de retirar meu consentimento de participação na pesquisa durante o andamento da mesma.

Eu discuti com o Dr. _____ sobre minha decisão em participar deste estudo. Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou foram lidas para mim.

Ficou claro que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia de acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Fui informado (a) que todos os custos relacionados a exames diagnósticos e tratamento médico serão cobertos por verbas próprias do Projeto de Pesquisa.

Declaro ser de livre vontade minha participação nesta pesquisa, e que poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, sem penalidades ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido.

Assinatura do paciente/representante legal Data ____/____/____

Assinatura da testemunha Data ____/____/____

para casos de pacientes menores de 18 anos, 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 ____/____/____

São Paulo, ____ de _____ de 200__.

ANEXO C- Escore de Framingham (NCEP/ATPIII)

Table III.1-5. Estimate of 10-Year Risk for Men (Framingham Point Scores)

Age	Points	Total Cholesterol	Points at Ages 20–39	Points at Ages 40–49	Points at Ages 50–59	Points at Ages 60–69	Points at Ages 70–79
20–34	-9	<160	0	0	0	0	0
35–39	-4	160–199	4	3	2	1	0
40–44	0	200–239	7	5	3	1	0
45–49	3	240–279	9	6	4	2	1
50–54	6	≥280	11	8	5	3	1
55–59	8						
60–64	10						
65–69	11						
70–74	12						
75–79	13						
			Points at Ages 20–39	Points at Ages 40–49	Points at Ages 50–59	Points at Ages 60–69	Points at Ages 70–79
		Nonsmoker	0	0	0	0	0
		Smoker	8	5	3	1	1
HDL	Points	Systolic BP	If Untreated		If Treated		
≥60	-1	<120	0		0		
50–59	0	120–129	0		1		
40–49	1	130–139	1		2		
<40	2	140–159	1		2		
		≥160	2		3		
					</		

Table III.1-6. 10-Year Risk Estimates for Women (Framingham Point Scores)

Age	Points	Total Cholesterol	Points at Ages 20-39	Points at Ages 40-49	Points at Ages 50-59	Points at Ages 60-69	Points at Ages 70-79
20-34	-7						
35-39	-3	<160	0	0	0	0	0
40-44	0	160-199	4	3	2	1	1
45-49	3	200-239	8	6	4	2	1
50-54	6	240-279	11	8	5	3	2
55-59	8	≥280	13	10	7	4	2
60-64	10						
65-69	12		Points at Ages 20-39	Points at Ages 40-49	Points at Ages 50-59	Points at Ages 60-69	Points at Ages 70-79
70-74	14	Nonsmoker	0	0	0	0	0
75-79	16	Smoker	9	7	4	2	1

HDL	Points	Systolic BP	If Untreated	If Treated
≥60	-1	<120	0	0
50-59	0	120-129	1	3
40-49	1	130-139	2	4
<40	2	140-159	3	5
		≥160	4	6

Point Total	10-Year Risk	Point Total	10-Year Risk
<9	<1%	20	11%
9	1%	21	14%
10	1%	22	17%
11	1%	23	22%
12	1%	24	27%
13	2%	≥25	≥30%
14	2%		
15	3%		
16	4%		
17	5%		
18	6%		
19	8%		