ADRIANA RIBAS ANDRADE

**Avaliação da hemostasia na Doença de Crohn subclínica:
papel da atividade endoscópica**

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

Programa de Ciências em Gastroenterologia

Orientador: Prof. Dr. Flair José Carrilho

**São Paulo
2018**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Andrade, Adriana Ribas
Avaliação da hemostasia na doença de Crohn
subclínica : papel da atividade endoscópica /
Adriana Ribas Andrade. -- São Paulo, 2018.
Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Ciências em Gastroenterologia.
Orientador: Flair José Carrilho.

Descritores: 1.Doença de Crohn 2.Colonoscopia
3.Coagulação sanguínea 4.Tromboembolia venosa
5.Tromboplastina

USP/FM/DBD-258/18

Responsável: Kátia Maria Bruno Ferreira - CRB-8/6008

*Ao tempo, que me fez presente em
todos os momentos desta tese.*

*Ao tempo, que me faz lembrar que
mais importante que a resposta é a busca
pela resposta.*

*Ao tempo, senhor e mestre de todas
as coisas.*

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. André Zonetti de Arruda Leite, mentor que me acompanhou desde a confecção até a conclusão desta tese, obrigada pela confiança e pelos aprendizados durante esse processo.

Ao Prof. Dr. Flair José Carrilho, pela oportunidade de ser sua aluna de pós-graduação e por disponibilizar as condições para realização desse trabalho por meio do alicerce Gastro-USP.

Ao meu amado esposo, pelo apoio e pela injeção de ânimo durante todos os obstáculos dos últimos anos.

Aos meus pais, pela base familiar que me impulsiona a ter foco, perseverança e fé no que me proponho a fazer. Aos demais familiares, em especial, à Dinda, companheira de desabafos, e Priscila Ribas, epidemiologista que me mostrou qual caminho seguir inúmeras vezes.

Aos amigos, por colorirem minha vida, em especial, à Juliana Caldas, fonte de inspiração, e aos amigos da Gastro-USP, pelo apoio durante o processo de coleta de dados.

À equipe do Centro Diagnóstico em Gastroenterologia HC-FMUSP, em especial, a Dr. Alexandre Carlos e Dr. Cláudio Hashimoto, por embarcarem no projeto e me ensinarem a fazer o que mais gosto de fazer na Medicina: Colonoscopia. À Mari, que me ajudou enormemente com a coleta das amostras de sangue.

À equipe do Laboratório de Hemostasia do HC-FMUSP, em especial, à Tania Rubia Flores da Rocha, Valéria Oliveira, Dra. Paula Villaça e ao Prof. Dr. Elbio D'Amico, por me guiarem nos campos obscuros da hemostasia.

Às queridas do LIM-7, Fabiana Santos, Carmen Ortiz e Iêda Nishitokukado, e aos queridos do ambulatório de Doenças Inflamatórias Intestinais (DII), em especial, a Matheus Azevedo, Dr. Aderson Damião e Prof. Dr. Aytan Sipahi, por abrirem os caminhos na DII.

A vocês, gratidão.

NORMALIZAÇÃO ADOTADA

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

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

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

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

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

RESUMO

ABSTRACT

1	INTRODUÇÃO	2
1.1	O modelo celular de hemostasia	5
1.2	O endotélio e sua relação com a inflamação: o papel do FT	7
1.3	A geração de trombina como teste global da hemostasia	10
1.4	O fator de Von Willebrand como marcador de disfunção endotelial....	11
1.5	A trombomodulina como moduladora da cascata	12
1.6	O FVIII	12
1.7	A ADAMTS-13	13
1.8	Fibrinogênio e D-Dímero	13
1.9	Proteína C, proteína S, resistência à proteína C ativada e antitrombina	14
1.10	Mutação do FV de Leiden e mutação do gene da protrombina.....	15
1.11	Anticorpos antifosfolípides	15
2	OBJETIVOS.....	18
2.1	Objetivo primário.....	18
2.2	Objetivos secundários	18
3	MÉTODOS.....	20
3.1	Desenho do estudo	20
3.2	Casuística.....	20
3.2.1	Seleção	20
3.2.2	Critérios de inclusão.....	21
3.2.3	Critérios de exclusão	21
3.2.4	Cálculo amostral.....	22
3.2.5	Amostragem	22
3.3	Avaliação da atividade da doença na DII	24

3.3.1	Avaliação da atividade clínica.....	24
3.3.2	Avaliação da atividade endoscópica	26
3.3.3	Avaliação da qualidade de vida	28
3.3.4	Avaliação da atividade laboratorial: papel da calprotectina fecal	29
3.3.5	Marcadores laboratoriais de atividade.....	30
3.4	Parâmetros relacionados à hemostasia.....	30
3.4.1	Potencial de geração de trombina.....	32
3.4.2	Determinação da atividade do fator tecidual plasmático.....	34
3.4.3	Determinação do antígeno do FVW (FVW:Ag) e da atividade do FVW (Cofator de Ristocetina ou FVW:RCo)	35
3.4.4	Determinação da atividade do ADAMTS-13.....	36
3.4.5	Determinação da trombomodulina.....	37
3.4.6	Determinação do fator VIII coagulante.....	38
3.5	Delineamento da pesquisa	38
3.6	Análise estatística	39
4	RESULTADOS.....	41
4.1	Caracterização da amostra	41
4.2	Dados demográficos dos pacientes incluídos	42
4.3	Fatores de risco para trombose venosa profunda	46
4.4	Testes específicos da hemostasia	48
4.4.1	Avaliação dos fatores pró-coagulantes	48
4.4.1.1	<i>Avaliação da atividade do fator tecidual.....</i>	48
4.4.1.2	<i>Fator de Von Willebrand (antígeno e cofator) e Fator VIII.....</i>	49
4.4.1.3	<i>ADAMTS 13</i>	52
4.4.1.4	<i>Avaliação da Trombomodulina</i>	54
4.4.1.5	<i>Avaliação da balança da hemostasia sob a ótica do potencial de geração de trombina</i>	54
4.5	Seguimento dos pacientes.....	59
4.6	Pacientes com trombose prévia.....	63
5	DISCUSSÃO.....	66
6	CONCLUSÃO	77
7	ANEXOS.....	79
7.1	Anexo A – Aprovação CAPPESP	79
7.2	Anexo B - Termo de Outorga - FAPESP.....	80

7.3	Anexo C – Critérios de Elegibilidade	81
7.4	Anexo D – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	84
7.5	Anexo E – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (grupo- controle).....	89
7.6	Anexo F – Formulário de avaliação da atividade clínica pelo CDAI e HB	91
7.7	Anexo G – Características laboratoriais dos pacientes incluídos no estudo, incluindo grupo controle	92
8	REFERÊNCIAS	94
9	APÊNDICES	
9.1	Apêndice A – Artigo publicado	
9.2	Apêndice B – Paper enviado para publicação	

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADAMTS-13 -	<i>Disintegrin and metalloproteinase with a thrombospondin type 1 motif member 13</i>
APC -	Proteína C ativada
AT -	Antitrombina
CDAI -	<i>Crohn's disease activity index</i>
CF -	Calprotectina Fecal
DC -	Doença de Crohn
DII -	Doença Inflamatória Intestinal
EPCR -	Receptor endotelial da proteína C
ETP -	Potencial de trombina endógeno
FII -	Fator II
FIIa -	FII ativado
FIX-	Fator FIX
FIXa -	Fator FIX ativado
FT-	Fator Tecidual
FV -	Fator V
FVa -	Fator V ativado
FVII -	Fator FVII
FVIIa -	Fator FVII ativado
FVW -	Fator de Von Willebrand
FVW:Ag -	Fator de Von Willebrand Antígeno
FVW:RCo -	Fator de Von Willebrand Cofator de Ristocetina
FX -	Fator X
FXa -	Fator X ativado
FXIII -	Fator XIII
GPIIbIIIa -	Glicoproteína IIbIIIa
HBI -	<i>Harvey-Bradshaw Index</i>

HBPM -	Heparina de Baixo Peso Molecular
HMK -	Cininogênio de Alto Peso Molecular
IBDQ -	<i>Inflammatory Bowel Disease Questionnaire</i>
IHR -	Índice de Hiperemia Reativa
MEI -	Manifestações Extraintestinais
PAI-1 -	Inibidor do Ativador do Plasminogênio Tipo 1
PAI-2 -	Inibidor do Ativador do Plasminogênio Tipo 2
PC -	Proteína C
PCDAI -	<i>Pediatric Crohn's Disease Activity Index</i>
PCR -	Proteína C Reativa
PK -	Pré-caliceína
PS -	Proteína S
RCU -	Retocolite Ulcerativa
ROS -	Espécies Reativas de Oxigênio
RPCa -	Resistência à Proteína C ativada
SES-CD -	<i>Simplified Endoscopic Activity Score for Crohn's Disease</i>
TAFI -	Inibidor de Fibrinólise Ativado pela Trombina
TAT -	Complexos Trombina-Antitrombina
TEP -	Tromboembolismo Pulmonar
TEV -	Tromboembolismo Venoso
TFPI -	<i>Tissue Factor Pathway Inhibitor</i>
TLR -	<i>Toll Like Receptors</i>
TM -	Trombomodulina
TP -	Tempo de Protombina
tPA -	<i>Tissue Plasminogen Activator</i>
TTP -	<i>Time to Peak</i>
TTPA -	Tempo de Tromboplastina Parcialmente Ativada
TVP -	Trombose Venosa Profunda
uPA -	<i>Urokinase- Type Plasminogen Activator</i>
VHS -	Velocidade de Hemossedimentação

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Interação entre a inflamação e a coagulação na DII	9
Figura 2 -	O potencial de Geração de Trombina sob a ótica dos fatores pró e anticoagulantes endógenos	11
Figura 3 -	Alterações nos fatores pró-coagulantes, anticoagulantes e da fibrinólise que podem ser encontrados nos pacientes com DC.	16
Figura 4 -	Curva gerada a partir da análise do CAT e seus principais parâmetros	34
Figura 5 -	Kit HemosIL - aglutinação em látex do FVW na presença da ristocetina.....	36
Figura 6 -	Determinação das concentrações de ADAMTS-13 por ELISA	37
Figura 7 -	Correlação entre CDAI e HB; $p<0,001$; $r=0,79$	43
Figura 8 -	Correlação entre CDAI e IBDQ, $p<0,001$; $r=-0,59$	43
Figura 9 -	Correlação SES-CD vs. CDAI, $r=0,09$; $p=0,136$	44
Figura 10 -	Comparação entre os valores de fator tecidual entre os grupos de atividade endoscópica vs. remissão endoscópica vs. controles.....	48
Figura 11 -	Correlação entre a atividade endoscópica e a atividade do fator tecidual, $r=0,266$; $p<0,0001$	49
Figura 12 -	Correlação entre o Fator de Von Willebrand (FVW:Ag) vs. Cofator ristocetina (FVW:RCo); $p<0,001$; $r=0,92$	50
Figura 13 -	Comparação entre os valores de Fator de Von Willebrand (FVW:Ag) entre os grupos de atividade endoscópica vs. remissão endoscópica vs. controles	50
Figura 14 -	Comparação entre os valores de Fator de Von Willebrand atividade (FVW:RCo) entre os grupos de atividade endoscópica vs. remissão endoscópica vs. controles	51
Figura 15 -	Comparação entre os valores de Fator VIII entre os grupos de atividade endoscópica vs. remissão endoscópica vs. controles.....	51
Figura 16 -	Correlação do FVIII e do Cofator FVW; $p<0,001$; $r=0,60$	52

Figura 17 -	Comparação entre os valores de ADAMTS-13 entre os grupos de atividade endoscópica vs. remissão endoscópica vs. controles.....	53
Figura 18 -	Comparação entre a relação FVW:Ag/ADAMTS-13 entre os grupos de atividade endoscópica vs. remissão endoscópica vs. controles.....	53
Figura 19 -	Comparação entre os valores de Trombomodulina entre os grupos de atividade endoscópica vs. remissão endoscópica vs. controles.....	54
Figura 20 -	ETP sem TM nos grupos de atividade endoscópica vs. remissão endoscópica vs. Controles	55
Figura 21 -	ETP com TM nos grupos de atividade endoscópica vs. remissão endoscópica vs. controles	55
Figura 22 -	Comparação entre os valores da relação do potencial de geração de trombina com e sem trombomodulina entre os grupos de atividade endoscópica vs. remissão endoscópica vs. controles.....	56
Figura 23 -	Lag Time sem TM nos grupos de atividade endoscópica vs. remissão endoscópica vs. controles	57
Figura 24 -	Lag Time com TM nos grupos de atividade endoscópica vs. remissão endoscópica vs. controles	57
Figura 25 -	Peak sem TM nos grupos de atividade endoscópica vs. remissão endoscópica vs. controles	58
Figura 26 -	Peak com TM nos grupos de atividade endoscópica vs. remissão endoscópica vs. controles	58
Figura 27 -	Resumo dos resultados da tese.....	59
Figura 28 -	Comportamento do CDAI durante 1 ano entre os pacientes com atividade e remissão endoscópica	60
Figura 29 -	Evolução do IBDQ no grupo de atividade endoscópica ao longo de 1 ano	61
Figura 30 -	Evolução do IBDQ no grupo de remissão endoscópica ao longo de 1 ano	61
Figura 31 -	Redução de apenas 19% no ETP após adição de TM em paciente com atividade endoscópica intensa que evoluiu com trombose venosa profunda. (ETP sem trombomodulina: 1723; ETP com trombomodulina: 1264).....	62
Figura 32 -	ETP sem e com trombomodulina em controle saudável; redução de 47% do ETP após adição de trombomodulina ao teste (1866-> 999).....	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Índice de atividade na Doença de Crohn.....	25
Tabela 2 -	Classificação de Montreal	26
Tabela 3 -	Escore Endoscópico Simplificado para Doença de Crohn	27
Tabela 4 -	Escore de Rutgeerts.....	28
Tabela 5 -	Escore de Rutgeerts modificado	28
Tabela 6 -	Características basais e demográficas dos participantes incluídos no estudo	45
Tabela 7 -	Tratamento prévio e atual dos participantes incluídos no estudo	46
Tabela 8 -	Fatores associados à trombose dos pacientes incluídos no estudo	47
Tabela 9 -	Característica dos pacientes com episódio prévio de trombose nessa casuística.....	64
Tabela 10 -	Tabela extraída do artigo de Saskia Middeldorp ⁸⁷ com valores sobre a prevalência das principais trombofilias na população geral.....	74

RESUMO

Andrade AR. *Avaliação da hemostasia na Doença de Crohn subclínica: papel da atividade endoscópica* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2018.

Introdução: Pacientes com Doença de Crohn (DC) apresentam alto risco de eventos tromboembólicos (TE), muitas vezes, associados a alta morbimortalidade. É conhecido o papel da inflamação na fisiopatologia da trombose na doença Inflamatória Intestinal (DII), entretanto, o significado da inflamação subclínica ainda se mantém obscuro na literatura. Este estudo avaliou o efeito da atividade endoscópica no perfil de coagulação dos pacientes com DC em remissão clínica. **Métodos:** entre os dias 22 de maio de 2015 e 26 de abril de 2017, foram triados 261 pacientes com DC em possível remissão clínica, sendo realizadas ao todo 229 colonoscopias. Das 229 colonoscopias realizadas, 164 pacientes estavam realmente em remissão clínica (confirmados com CDAI ≤ 150) e foram alocados em dois grupos: 75 no grupo de atividade endoscópica (AE) (SES-CD ≥ 7), 89 no grupo de remissão endoscópica (RE) (SES-CD ≤ 2). Cinquenta controles saudáveis pareados por sexo e idade foram eleitos. Medimos, nos 3 grupos, além da geração de trombina – pelo método *Calibrated Automated Thrombogram* (CAT), com e sem trombomodulina, – a atividade do fator tecidual (FT), fibrinogênio, D-dímero, Fator VIII, ADAMTS-13, Fator de von Willebrand – antígeno e cofator de ristocetina (cWF). Coletamos dados sobre a duração da doença, extensão, comportamento, localização, tratamento farmacológico, história prévia de cirurgias, calprotectina fecal, qualidade de vida (por meio do IBDQ), além dos fatores de risco para TE, como hospitalização recente, uso de corticoide atual, *status* do tabagismo, assim como marcadores de trombofilia hereditária ou adquirida. Seguimos os pacientes por 1 ano de observação, avaliando a variação no CDAI e IBDQ no período. **Resultados:** A maioria dos pacientes apresentou comprometimento ileocolônico (43%), com comportamento inflamatório (40%), seguido de estenosante (30%) e fistulizante (30%). 67% estavam em uso de imunossupressores e 52% em uso de biológicos. Os fatores de risco para TE e todos os outros marcadores de trombofilia, incluindo deficiência de proteína C e S, anticardiolipina, resistência à proteína C, antitrombina, mutações da protrombina e do Fator V, foram semelhantes em ambos os grupos, exceto pelo anticoagulante lúpico, maior no grupo de AE (8,1% vs. 1,3%, $p=0,047$). Como esperado, o grupo de AE apresentou níveis significativamente maiores de PCR, calprotectina fecal e plaquetas. Além disso, este grupo apresentou uma maior atividade do fator tecidual vs. o grupo de RE vs. controles (127 vs. 103 vs. 84, $p = 0,001$). Embora o grupo DC tivesse maiores níveis de FVW:Ag e FVW:RCO, FVW/ADAMTS-13, Fator VIII e trombomodulina vs. controles, não houve diferença estatística entre os grupos de AE e RE. Os níveis de geração de trombina foram semelhantes entre os 3 grupos, com ou sem trombomodulina. **Conclusão:** Esses dados evidenciam que existe uma disfunção endotelial inerente à DC, e, que, em pacientes com AE, essa disfunção pode ser ainda maior pela maior exposição do FT. Embora, a presença de inflamação e dano endotelial contribuam para esse estado procoagulante,

em pacientes com doença subclínica, há um estado de compensação permanente, uma vez que a quantidade de trombina gerada foi a mesma entre os grupos. Este equilíbrio pode estar comprometido diante de outros fatores tromboembólicos, aumentando, assim, o risco de trombose.

Descritores: Doença de Crohn; atividade endoscópica; coagulação; tromboembolismo venoso; fator tecidual.

ABSTRACT

Andrade AR. *Hemostatic parameters in Crohn's Disease in clinical remission: role of endoscopic activity* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2018.

Background: Crohn's disease patients (CD) have a high risk of thromboembolic events (TE), often associated with high morbidity and mortality. Involvement of inflammation in TE is well known, but significance of the sub-clinical inflammation in this process is not the rule. Thus, the aim of this study is to evaluate the effect of the endoscopic activity in the coagulation profile in CD in clinical remission. **Methods:** Between May/2015 and April/2017, 261 CD patients in supposed clinical remission, were screened, and 229 had a colonoscopy done, resulting in the inclusion of 164 CD patients in clinical remission confirmed by a CDAI ≤ 150 . They were allocated in two groups: 75 in the endoscopic activity (EA) group (SES-CD ≥ 7), and 89 in the endoscopic remission (ER) group (SES-CD ≤ 2). 50 healthy controls matched for sex and age were chosen. We measured in the 3 groups, in addition to the generation of thrombin - through the Calibrated Automated Thrombogram (CAT), with and without thrombomodulin, - the activity of tissue factor (TF), fibrinogen, D-dimer, Factor VIII, ADAMTS-13 and von Willebrand Factor - antigen (VWF) and ristocetin cofactor (VWF:RCo). We collected data regarding the duration of the disease, extension, behavior, location, pharmacological treatment, previous history of surgeries, fecal calprotectin, quality of life (through IBDQ), as well as risk factors for TE such as recent hospitalization, current corticoid use, smoking status, as well as markers of hereditary or acquired thrombophilia. We followed the patients for 1 year of observation, evaluating the variation in CDAI and IBDQ. **Results:** Most of the patients had ileocolonic involvement (43%), with inflammatory behavior (40%), followed by stenosing (30%) and fistulizing (30%). 67% were in use of immunosuppressors and 52% in use of biological drugs. Risk factors for TE besides other markers of thrombophilia, including protein C and S deficiency, anticardiolipin, protein C resistance, antithrombin, prothrombin and Factor V mutations, were similar in both groups except for the lupus anticoagulant, higher in the EA group (8.1% vs. 1.3%, $p = 0.047$). As expected, the EA group had significantly higher levels of CRP, fecal calprotectin and platelets. In addition, this group had a higher activity of TF vs. ER group vs. controls (127 vs. 103 vs. 84, $p = 0.001$). Although the EA group had had higher levels of VWF and VWF:RCo, VWF/ADAMTS-13, Factor VIII and thrombomodulin vs. controls, there was no statistical difference between the EA and ER groups. Thrombin generation levels were similar between the 3 groups, with or without thrombomodulin. **Conclusion:** These data show that there is an inherent endothelial dysfunction in CD, moreover in patients with EA, this dysfunction may be even greater, due to the exposure of TF. Although the presence of inflammation and endothelial damage contribute to this procoagulant condition, in patients with subclinical disease, there is a permanent compensatory state, since the amount of

thrombin generated was the same between the groups. This balance may be compromised by other thromboembolic factors, thus increasing the risk of thrombosis.

Descriptors: Crohn's disease; endoscopic activity; coagulation; venous thromboembolism; tissue factor.

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A Doença de Crohn (DC) é uma enfermidade imunomediada, marcada por inflamação crônica e transmural do trato gastrointestinal, com períodos de surto e remissão. De etiologia ainda indefinida, a inflamação pode se estender da boca até o ânus e, como é considerada uma doença de caráter progressivo, as complicações como estenoses e fístulas podem surgir com o tempo, frequentemente, necessitando de abordagens cirúrgicas, entre outras intervenções terapêuticas. Aproximadamente, 80% dos pacientes apresentam envolvimento do intestino delgado e, mais comumente, do íleo distal, destes, 50% apresentam comprometimento de cólon associado¹. A trombose na Doença Inflamatória Intestinal (DII) – que corresponde a DC e a Retocolite Ulcerativa (RCU) – seja ela arterial ou venosa, é considerada uma manifestação extraintestinal com curso que pode variar ou não com a atividade clínica da doença.

A Trombose Venosa Profunda (TVP) acomete cerca de 130-314/100.000 pacientes com DC por ano, enquanto o TEP ocorre em 105-110/100.000 pacientes por ano, o que corresponde a um risco 2 a 3 vezes maior de trombose se comparado à população em geral. A prevalência de TEV varia de 1-10%, atingindo até 39% em estudos *post-mortem* em pacientes com DC, e o risco relativo quando comparado com controles, gira em torno de 1,5 a 4,6, sendo esse risco também aumentado em pacientes ambulatoriais²⁻⁴. Provavelmente, a alta prevalência de trombose por necropsia reflita o baixo índice suspeição clínica, tanto pela dificuldade em diferenciar a DC em atividade da trombose mesentérica quanto por episódios de trombose assintomáticos, contribuindo para a manutenção de altas taxas de mortalidade ainda hoje⁴⁻⁶. A mortalidade é maior nos pacientes com tromboembolismo pulmonar (TEP) aos com TVP apenas, principalmente nos primeiros 30 dias após o episódio, permanecendo aumentada nos 30 anos subsequentes⁷. A taxa de recorrência de tromboembolismo venoso (TEV) também é alta entre os pacientes com DII, em torno de 13% a 33% após cinco anos da descontinuação da anticoagulação⁸. O risco é maior no sexo masculino, em indivíduos com menos de 40 anos – diferentemente de outras doenças crônicas, nas

quais a chance de TEV aumenta com a idade –, na doença colônica extensa e quando presentes fístulas e estenoses⁹.

Mieshsler *et al.*¹⁰ compararam a frequência de episódios de TEV na DII com outras patologias com potencial inflamatório como artrite reumatóide e doença celíaca, e, concluiu que o risco de TEV é muito maior nos pacientes com DII, com OR 3.6 vs 0.7 vs 0.4, respectivamente. Desta forma, inúmeros são os estudos que tentam decifrar o que levaria a trombose nesse grupo de pacientes, porém ainda não há uma resposta elucidativa.

A qualidade de vida do paciente com trombose é comprometida não só pelo evento agudo, mas pelo risco aumentado de episódios recorrentes, que variam de 6-18% em 1-2 anos após o primeiro episódio de TEV^{11,12} e pela síndrome pós-trombótica. Esta é caracterizada por complicações crônicas, como hipertensão pulmonar quando TEV recorrente ou dano irreversível às válvulas das veias profundas dos membros inferiores após episódio de TVP, levando à insuficiência venosa crônica, edema, dor, estase venosa e ulcerações, com consequente redução da expectativa e qualidade de vida do paciente.

Em estudo retrospectivo sobre a prevalência de trombose no HC-FMUSP em pacientes com DII, publicado recentemente por nós⁶, mostramos que, entre 654 pacientes com DC e 439 pacientes com RCU, a prevalência de trombose foi de 5,1%, com um aumento significativo da mortalidade nos pacientes com DC com trombose (10,71% vs. 1,45%, OR 8.0). Também chama a atenção que metade das trombozes aconteceu em pacientes ambulatoriais. Destes, 52% estavam com a doença ativa, 17% tinham hospitalização recente e 10% tinham apresentado trombose prévia. Um terço das trombozes não tiveram manifestação clínica, sendo detectadas em exames de rotina. Outro ponto muito importante é que a grande maioria dos pacientes internados que apresentou trombose estava fazendo uso de profilaxia com heparina, sugerindo que a heparina possa não ser suficiente para prevenir TEV nesses pacientes. Os fatores preditores de trombose nessa casuística foram tabagismo (OR 14.3; 1.27-160; p=0.03) e a deficiência de proteína S (OR 27.1; 2.52-292; p=0.006). O artigo na íntegra se encontra impresso no final da tese (Apêndice A).

O risco de trombose está associado à extensão da lesão, à atividade da doença e à necessidade de internação e, por isso, recomenda-se profilaxia para TVP com

heparina (não-fracionada ou de baixo peso molecular) em todo paciente com DC em atividade clínica durante a internação, exceto naqueles com sangramento importante ou choque hipovolêmico em que a profilaxia não-farmacológica é recomendada. No entanto, não existe uma recomendação padrão de profilaxia de TEV para pacientes ambulatoriais. A indicação deve ser individualizada e considerada principalmente nos pacientes com demais fatores de risco como TEV prévia ou familiar, tabagismo, corticoterapia, idade avançada, desordem cardiovascular, câncer, obesidade, imobilização prolongada, gestação, uso de contraceptivos orais ou cirurgia recente ⁹.

O Consenso Canadense em 2014¹³ defende que a profilaxia ambulatorial seja realizada apenas em pacientes com atividade moderada a grave com trombose prévia não-provocada ou que esteve associada à atividade da doença.

Nguyen *et al.*¹⁴ estimaram que seriam necessários fazer a profilaxia em 32 pacientes com DII em atividade da doença de modo a prevenir 1 episódio tromboembólico. O custo de cada ano de vida ajustado pela qualidade (QALY) ficou em torno de \$1.267,450, não sendo desta forma, custo-efetivo¹⁴, apesar da diminuição na incidência de TVP, e aumento da qualidade de vida e sobrevida. No entanto, essa avaliação poderia mudar se fosse possível identificar um grupo específico de maior risco de trombose.

A identificação de um subgrupo de pacientes ambulatoriais com DC com maior risco de desenvolver trombose, pode justificar que medidas sejam desenvolvidas a fim de otimizar a profilaxia de TEV nos pacientes com atividade inflamatória subclínica. Apesar de todo avanço no tratamento das DII com as novas drogas ou biológicos, cerca de 50% dos pacientes em remissão clínica ainda mantêm atividade endoscópica¹⁵ e faltam estudos acerca da melhor abordagem profilática de trombose para esses pacientes, inclusive no que se refere à utilização dos novos anticoagulantes orais.

Apesar do risco de trombose ser bem conhecido e estar associado à extensão da lesão, à atividade da doença e à necessidade de internação, a importância do processo inflamatório subclínico nesse risco é desconhecido, e esse é o objetivo principal desse estudo. Os resultados desse estudo podem ajudar na compreensão da fisiologia do binômio trombose vs. inflamação e, por conseguinte, na avaliação de um subgrupo de pacientes com maior risco de TEV ambulatorial, e que possa se beneficiar de uma terapia anticoagulante profilática específica.

1.1 O modelo celular de hemostasia

Entende-se por hemostasia, a capacidade de manter o sangue em seu estado líquido, reparando possíveis danos teciduais e removendo os coágulos formados de modo a manter a integridade vascular. Dada sua grande complexidade, pode ser compreendida por meio do modelo em cascata¹⁶, em que a coagulação é dividida em duas fases, a intrínseca e a extrínseca, protagonizada por reações proteolíticas sequenciais de ativação de fatores pró e anticoagulantes. Esse modelo explica muito bem a coagulação *in vitro* – avaliada pelo Tempo de Protrombina (TP) e Tempo de Tromboplastina Ativado (TTPA) – mas não reflete todo o processo que ocorre *in vivo*, representando apenas a fase inicial da coagulação.

Na via intrínseca o FXIa, sob condições fisiológicas é ativado pelo sistema de contato (que basicamente são o FXII, a pré-caliceína e o cininogênio de alto peso molecular), seguido da ativação do FIX e do FVIII, que também é ativado pela trombina. Já na via extrínseca, a ativação se inicia a partir da ligação do FVII ao Fator Tecidual (FT), ativando-o e formando o complexo FT/FVIIa. As vias intrínseca e extrínseca seguem uma via comum até a ativação do FX e do fibrinogênio, com formação de fibrina, após a ativação da protrombina em trombina¹⁷.

O TP, que avalia a via extrínseca e o TTPA, que corresponde à via intrínseca, estimam apenas 5% da trombina formada, pois desconsideram a participação celular nesse processo. Nos últimos anos, com o avanço da biologia molecular, as células inflamatórias e plaquetas vêm sendo considerados fatores primordiais e precipitantes da coagulação, em detrimento dos antigos fatores ativadores da via intrínseca, como o FXII, cininogênio de alto peso molecular (HMK) e pré-caliceína (PK)^{18,19}.

O modelo atual de coagulação¹⁷, conhecido como Modelo Celular da Hemostasia, foi criado de modo a ampliar o conceito da hemostasia, no qual o Fator Tecidual (FT) se torna o principal gatilho da coagulação. Ele está presente no tecido extravascular, e, sob condições fisiológicas, não entra em contato com os fatores da coagulação circulantes. Quando há lesão tecidual há formação do tampão hemostático no local, rico em plaquetas e fibrina, de modo a obliterar e interromper o sangramento. Este modelo celular da hemostasia é dividido em três etapas distintas e superpostas: iniciação, amplificação e propagação.

Na fase de iniciação, a ruptura do endotélio expõe o FT presente nas células mesenquimais, como os fibroblastos, aos fatores de coagulação circulantes, fazendo com que este se ligue ao FVIIa com formação de pequenas quantidades de trombina, FIXa e FXa, porém ainda insuficientes para a formação de fibrina.

Na fase seguinte, chamada de amplificação, a trombina formada na fase anterior estimula a sua própria formação por meio da ativação e agregação plaquetária – através dos ligantes P-selectina e das pontes do fator de von Willebrand (FVW) –, além da ativação dos fatores XI (com ativação subsequente dos fatores da via intrínseca), FV e FVIII, que potencializarão a atividade do FX.

A fase de propagação é marcada pela geração de grande quantidade de trombina sobre a membrana das plaquetas ativadas, com ligação do FIXa ao FVIIIa e ativação do FX diretamente da superfície plaquetária. Esta é tomada pelo complexo FXa/FVa, com geração de trombina suficiente para a formação de fibrina. A estabilização do coágulo decorre da ação do FXIII, que também foi ativado pela trombina.

De acordo com o modelo celular da coagulação, os conceitos de vias extrínseca e intrínseca persistem, entretanto são modificados. A via extrínseca se desenvolve sobre a célula que expressa o FT, consistindo nos complexos FT/FVIIa e FXa/FVa, com ativação de pequenas quantidades de trombina. A via intrínseca acontece sobre a superfície plaquetária, com a ação do FIXa e dos complexos FIXa/FVIIIa e FXa/FVa, finalizando com a geração de elevadas concentrações de trombina²⁰.

Em condições normais, esse processo, chamado coagulação basal, não causa a formação do trombo, pois os maiores componentes da coagulação (plaquetas, FVIII e FVW) permanecem no espaço intravascular. Contudo, quando uma lesão possibilita a passagem desses componentes para o espaço extravascular, a coagulação se desencadeia²¹.

Para modular a formação exagerada de trombina, as células endoteliais exercem um papel fundamental na medida em que são responsáveis pela expressão dos anticoagulantes endógenos como: **a)** a proteína C, que é ativada pelo complexo trombina-trombomodulina e junto com a proteína S como cofator, e, o receptor endotelial de proteína C (EPCR) vão inativar FVa e FVIIIa; **b)** a antitrombina, que é ativada por interações com glicosaminoglicanos endoteliais com ação inibitória no FX

e **c)** o inibidor do fator tecidual (TFPI), um dos mais potentes anticoagulantes endógenos, que inibe o complexo FT/FVII²².

Deficiências ou disfunções nessas vias podem predispor à trombose. Por outro lado, a estase vascular e consequente falha no *clearance* de fatores pró-coagulantes no sítio da injúria vascular, com hipóxia e ativação de moléculas de superfície nas células endoteliais, somada à formação de micropartículas de FT-células mesenquimais, são fatores pró-coagulantes que também predispoem à formação do trombo²³.

Os coágulos de fibrina que se formam sobre a superfície endotelial podem desempenhar atividade protetora ao limitar o dano vascular induzido por infecção, trauma e inflamação; porém, qualquer disfunção nessa balança da coagulação, seja na superexpressão de fatores pró-coagulantes seja na perda da atividade anticoagulante pode predispor a eventos tromboembólicos²³.

1.2 O endotélio e sua relação com a inflamação: o papel do FT

O endotélio é considerado um epitélio altamente especializado que determina funções importantes da coagulação, do fluxo sanguíneo e da inflamação. Ele regula a função vascular, principalmente por meio da liberação de óxido nítrico (NO), endotelina, prostaciclina, FVW, além de regular moléculas de adesão importantes na interação com os leucócitos circulantes²⁴. O TNF- α é uma das principais citocinas efetoras na resposta inflamatória mediada pela resposta imune Th1, mas também atua diretamente: **a)** na diminuição da biodisponibilidade do NO; **b)** no estímulo da via NF- κ B; **c)** no aumento da expressão de interleucinas e marcadores trombogênicos, como a IL-1, IL-6, FT e o CD-40L e **d)** na interação com a trombomodulina e com o EPCR.

O NO, considerado um potente vasodilatador, tem o potencial de inibir a expressão de citocinas, quimiocinas e de substâncias de adesão leucocitária e plaquetária, além de limitar a proliferação de células da musculatura lisa vascular²⁵. O TNF- α pode interferir na biodisponibilidade do NO por diminuir a atividade da NO sintetase endotelial, determinando alterações estruturais, como a proliferação endotelial e o remodelamento vascular²⁴. Esses fatores podem contribuir para um

estado de hipercoagulabilidade, uma vez que a estase venosa é considerada um dos fatores da tríade de Virchow.

A via NF- κ B, quando estimulada pelo TNF- α , propicia uma maior expressão dos *Toll Like Receptors* (TLR), com aumento da expressão de genes pró-inflamatórios – responsáveis pela quimiotaxia, fagocitose e citotoxicidade – além do aumento da expressão de moléculas de adesão (ICAM-1 e VCAM-1), com migração leucocitária para o local da inflamação. Esses, entre outros fatores, contribuem para a hipóxia tecidual por meio do edema tissular, e do acúmulo de células e bactérias mortas, com consequente geração de espécies reativas de oxigênio (ROS)²⁶.

A hipóxia nas áreas inflamadas libera mediadores da angiogênese por macrófagos, linfócitos, mastócitos e fibroblastos, como o fator de crescimento endotelial (VEGF), fator de crescimento de fibroblastos e, ainda mais, TNF- α ^{24,27,28}. ROS na área inflamada gera *stress* oxidativo nas moléculas do FVW e inibição de sua clivagem pela *Disintegrin and Metalloproteinase with a Thrombospondin Type 1 Motif, Member 13* (ADAMTS-13), favorecendo a formação de multímeros do FVW, que, por terem alto peso molecular, levam a uma maior agregação plaquetária na microvasculatura.

Diante do processo inflamatório, o estímulo da via NF- κ B leva a outro fator importante, que torna o ambiente ainda mais pró-coagulante, que é a superexpressão do FT²⁷. O gene que codifica o FT é sensível à formação de radicais livres. Desta forma, a exposição das células endoteliais aos ROS leva a um aumento do RNAm do FT, e, por conseguinte, de sua expressão. O fator tecidual exerce um papel primordial na coagulação induzida pela inflamação, na medida em que, quando exposto, ativa os demais fatores a partir do complexo de iniciação com o FVII, conforme já dito anteriormente.

Dentre as citocinas pró-inflamatórias com potencial trombogênico, destacam-se a IL-1 β e a IL-6²⁸. A coagulação *per si* estimula a expressão do gene da IL-1 β , que, por conseguinte, induz ainda mais a produção de TNF- α , que, além de perpetuar a ativação da coagulação, promove uma redução da expressão da trombomodulina e do EPCR, inibindo, desta forma, uma das principais vias regulatórias da coagulação, a via da proteína C²⁹. Em paralelo, a IL-6 favorece a ativação plaquetária por meio da

hiperexpressão da glicoproteína IIb/IIIa (GPIIb/IIIa)²⁸, tornando o ambiente mais hipercoagulável.

Como exemplo utilizado de disfunção endotelial nesta tese, a DC, uma doença de alto potencial inflamatório, também é reconhecida pelo alto potencial trombogênico. Entretanto, não está claro, na literatura, se a disfunção endotelial é causada pelo próprio processo inflamatório, que levaria a um estado de hipercoagulabilidade, ou se essa disfunção endotelial já estaria presente na DII e seria apenas exacerbada pelo processo inflamatório. A Figura 1 ilustra a interação entre a coagulação e a inflamação na DC.

Figura 1 - Interação entre a inflamação e a coagulação na DII

Legenda: A presença de úlceras intestinais expõe o Fator Tecidual, aos fatores coagulantes circulantes, na formação do complexo FT/FVIIa, seguida de agregação plaquetária por meio dos ligantes (P-Selectina e CD40-L) e das pontes de FVW. Esse processo é regulado por fatores anticoagulantes, como a via da proteína C (ativada pela trombomodulina e o EPCR-receptor endotelial da proteína C) além da antitrombina/heparioides endógenos. As citocinas inflamatórias (TNF, IL-1 e IL-6) estimulam a expressão de moléculas de adesão (VCAM e ICAM) e o recrutamento de células inflamatórias para a mucosa intestinal, além de ativarem a via intracelular do NF-κB com geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), que, entre outros fatores, levarão ao bloqueio na produção de NO com vasoconstrição local, favorecendo a estase venosa e aumentando o risco de TEV.

1.3 A geração de trombina como teste global da hemostasia

O potencial de geração de trombina ou potencial de trombina endógeno (ETP) estima a capacidade total do plasma em formar trombina, e, avalia em conjunto, a atuação dos fatores pró-coagulantes, inibidores da coagulação e do sistema fibrinolítico. O teste se baseia na ativação da coagulação, em plasma pobre em plaquetas, após a adição de fator tecidual e fosfolípidos, e registra, continuamente, a geração da trombina em um gráfico que representa a curva de geração de trombina ou trombograma calibrado automaticamente (CAT – *Calibrated Automated Thrombogram*®, Maastricht, Holanda)³⁰.

O gráfico se inicia com o tempo de latência (*lag time*), representando o momento em que a trombina ainda não foi formada. Após a formação exponencial da trombina, a curva atinge um pico conhecido como *peak* ou pico, que é a máxima concentração de trombina e o tempo que leva para atingir esse pico é *time to peak* (TTP). O ETP, ou a área sob a curva do trombograma, representa a quantidade total de trombina formada durante todo o período de observação (em torno de 40 minutos). A adição da trombomodulina ao teste possibilita a ativação da via da proteína C, seguida de diminuição dos níveis de ETP em pessoas normais e manutenção de níveis elevados de ETP em pessoas com resistência desta via, como exemplo, na deficiência de antitrombina, anticorpo lúpico positivo, cirrose hepática, entre outras desordens^{31–33}. A Figura 2 ilustra e resume o funcionamento do teste.

O estudo do perfil de coagulação por meio do ETP reflete o balanço entre as três fases da coagulação e, portanto, consegue predizer se o paciente tem maior risco de sangramento (perfil hipocoagulante) ou de desenvolver algum episódio de TEV (perfil hipercoagulante). Estes riscos são estimados a partir de estudos analíticos de associação, em que se percebe que pacientes com doenças trombogênicas estão associados principalmente a ETP mais elevados³⁰.

1.5 A trombomodulina como moduladora da cascata

Durante a inflamação, as células endoteliais regulam a expressão de citocinas e moléculas de adesão, sendo um dos principais sistemas regulatórios, a via da proteína C. As duas moléculas mais importantes dessa via são a trombomodulina (TM) e o EPCR. Para que a Proteína C exerça sua função como anticoagulante endógeno, ela tem que se ligar ao seu receptor (EPCR), e, a trombina ligada à trombomodulina, presente no endotélio, tornam a Proteína C ativa (APC). Uma vez ativada, a capacidade da trombina em ativar plaquetas no endotélio é bloqueada. Esse processo ocorre, principalmente, na microcirculação, em que há um maior contato de células endoteliais com o sangue.

1.6 O FVIII

O FVIII é uma glicoproteína plasmática sintetizada no fígado que circula no plasma ligada ao FVW. Durante a coagulação, ele é convertido em sua forma ativa, o FVIIIa, pela trombina ou pelo FXa. O FVIIIa funciona como um cofator para o FIX (que é ativado pelo FXIa assim como pelo complexo FT/FVIIa), acelerando a conversão do FX para FXa, perpetuando, assim, a coagulação na via intrínseca. Conforme já dito anteriormente, o FVIIIa é inativado pela proteína C e seu cofator, a proteína S.

O domínio C2 do FVIII é capaz de ligar-se à fosfatidilserina, fosfolípido pró-coagulante exposto em plaquetas ativadas e em células endoteliais durante o processo inflamatório, principalmente estimulado pela trombina gerada na fase de iniciação²². É considerado uma proteína de fase aguda, responsiva a citocinas inflamatórias, como a IL-6, mas também aos lipopolissacarídeos de bactérias (LPS), ambos aumentados na DC⁴⁰.

1.7 A ADAMTS-13

A ADAMTS-13 é uma enzima, primariamente, sintetizada pelo fígado, que cliva os multímeros do FVW de alto peso que poderiam induzir agregação plaquetária e desencadear a formação do trombo. Se a atividade da enzima estiver baixa, os multímeros de FVW se agregam de forma desordenada, podendo favorecer a trombose, como na Púrpura Trombocitopênica Trombótica, quando há mutação no gene da ADAMTS-13 (extremamente rara), ou na microangiopatia que pode ocorrer tanto na sepse, como na síndrome hemolítico urêmica ou em malignidades, em que há uma redução da ADAMTS-13 por anticorpos, na maioria dos casos^{41,42}. Ela é encontrada habitualmente nas células estelares hepáticas, porém pode ser sintetizada em pequenas quantidades pelas células endoteliais, megacariócitos, plaquetas, podócitos glomerulares e células gliais.

Durante a injúria tissular, as plaquetas ativadas liberam seus grânulos pró-inflamatórios e pró-trombóticos, que contêm, entre outros fatores, o FVW. A liberação endotelial de pequenas quantidades da ADAMTS-13 exerce um efeito inibitório na perpetuação desse processo. Seu efeito proteolítico é proporcional à ligação da GP1b e/ou do FVIII ao FVW solúvel em estudos experimentais⁴³.

1.8 Fibrinogênio e D-Dímero

O fibrinogênio é uma proteína de produção hepática que está envolvida nas etapas finais da coagulação, atuando como precursor da fibrina na formação do coágulo, após ativação da trombina. Sua deficiência pode levar a hemorragias e seus altos níveis podem estar relacionados a episódios tromboembólicos.

Além da disfunção endotelial e plaquetária, os pacientes com DII também podem apresentar disfunção da fibrinólise – sistema em que o plasminogênio (forma inativa) é convertido em plasmina (forma ativa) através dos ativadores fisiológicos que basicamente são os ativadores do plasminogênio do tipo tecidual (tPA) e uroquinase (uPA). A plasmina fará a proteólise da fibrina, modulada por seus inibidores que são

o inibidor do ativador do plasminogênio 1 e 2 (PAI-1 e PAI-2, respectivamente) e os inibidores de plasmina (alfa 2-antiplasmina, alfa 2-macroglobulina)⁴⁴.

O inibidor da fibrinólise ativado pela trombina (TAFI), é um potente antifibrinolítico, encontrado nas plaquetas, e, na presença da trombomodulina, a trombina acelera a ativação do TAFI em 1250 vezes. Condições que aumentam a geração de trombina acaba por aumentar a ativação do TAFI, bloqueando a fibrinólise e aumentando o risco de TEV. A ativação da coagulação leva à formação de fibrina, seguida de lise e formação dos produtos da degradação da fibrina, como o D-dímero⁴⁴. Os estudos que avaliaram o D-dímero na DC ainda são conflitantes embora haja uma tendência de maiores níveis na DC quando comparados a controles saudáveis⁴⁵.

1.9 Proteína C, proteína S, resistência à proteína C ativada e antitrombina

A formação do complexo endotelial da Proteína C, junto à trombina, trombomodulina e o EPCR, tendo como cofator da reação à proteína S, fazem com que os fatores Va e VIIIa – primordiais na fase de propagação – sejam inativados, de modo a conter a ativação descontrolada da trombina. A proteína S não atua somente como cofator da APC. Ela pode competir diretamente com a protrombina no sítio de ligação do FVa, inibindo diretamente o FXa ou promovendo a interação do FXa-TFPI. A maioria (60%) da Proteína S circulante é ligada a proteína ligadora de C4. Como esta é uma proteína reguladora do sistema do complemento e considerada uma proteína de fase aguda, diante de processos inflamatórios, como na DC, a biodisponibilidade da Proteína S livre para atuar como cofator da APC pode estar diminuída, favorecendo episódios tromboembólicos^{46,47}. Somente a proteína S livre tem atuação na coagulação. Conforme já abordado anteriormente, em nosso estudo retrospectivo, a deficiência de proteína S foi considerado um fator preditor de trombose (OR 27.1; 2.52-292; p=0.006)⁶. O teste da Resistência à Proteína C ativada sendo positivo pode indicar a presença do Fator V mutante, como a mutação do Fator V de Leiden (sendo necessária sua confirmação através do teste genético) assim como pode indicar a presença do anticorpo antifosfolípide ou excesso de FVIII, etc.

A antitrombina é capaz de neutralizar a maioria das enzimas da cascata, especialmente os fatores IIa (trombina), Xa e IXa. Sua atividade é exercida por meio

da interação com os heparans sulfatos (endógenos e exógenos) na superfície endotelial, com alteração conformacional da AT e inativação dos fatores de coagulação.

Esses mecanismos, em conjunto, servem tanto para frear a formação de trombina quanto para inativar a trombina já formada, principalmente na microcirculação em que 1ml de sangue pode ser exposto a 5000 cm² de superfície endotelial. É interessante notar que, tanto em estudos experimentais quanto em humanos, a ativação da proteína C está comprometida, tanto no intestino inflamado como na periferia, provavelmente por uma menor expressão do receptor da proteína C e trombomodulina no endotélio inflamado^{48,49}.

1.10 Mutação do FV de Leiden e mutação do gene da protrombina

As duas mutações mais frequentes, relacionadas à trombofilia hereditária, são a mutação do fator V de Leiden e do gene da protrombina. O Fator V de Leiden é a forma mutante do Fator V, que se torna insensível à inativação pela proteína C, provocando, assim, um aumento do tempo de coagulação. Pode ser avaliada pela pesquisa da mutação, mas também pelo teste da resistência da proteína C ativada.

A segunda desordem mais comum entre as trombofilias hereditárias é a mutação do gene da protrombina. A protrombina, precursor da trombina, é sintetizada no fígado, uma proteína dependente da vitamina K. A mutação do gene que codifica a protrombina leva a uma produção exagerada desta proteína, principalmente quando em homozigose, aumentando o risco de trombose tanto arterial quanto venosa. Vários estudos tentaram demonstrar a relação entre DII e marcadores de trombofilia hereditária, mas não há evidência de mutações relacionadas a genes de coagulação na DII.

1.11 Anticorpos antifosfolípidos

Os anticorpos antifosfolípidos são considerados anticorpos dirigidos contra proteínas plasmáticas com afinidade para superfícies (fosfolípidos) aniônicas. Fazem parte da Síndrome do Anticorpo Antifosfolípide, que além da positividade de pelo

menos 01 deles (com a confirmação da positividade em período mínimo de 12 semanas), necessita de um critério clínico como trombose vascular (venosa ou arterial) ou complicações gestacionais como aborto espontâneo. Os anticorpos antifosfolípides são o anticorpo anticardiolipina IgM e IgG, anti- β 2-glicoproteína-I IgM e IgG e o anticoagulante lúpico. Ainda não se sabe ao certo se a presença deles em doenças crônicas inflamatórias ou pós-infecciosas de fato é trombogênica ou se são apenas achados laboratoriais, sendo necessário a repetição dos testes, caso positivo⁵⁰.

Um resumo das alterações já descritas da coagulação na DC pode ser melhor visualizado na Figura 3 abaixo.

Figura 3 - Alterações nos fatores pró-coagulantes, anticoagulantes e da fibrinólise que podem ser encontrados nos pacientes com DC.

2 OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo primário

Comparar os parâmetros específicos da coagulação (Atividade do FT, ADAMTS-13, FVIII, FVW:Ag, FVW:RCo, Trombomodulina e Potencial de Geração de Trombina) em pacientes com DC em remissão clínica com ou sem atividade endoscópica e controles saudáveis.

2.2 Objetivos secundários

- a) Avaliar a prevalência de trombofilias conhecidas assim como os fatores de risco de trombose na população;
- b) Comparar os fatores de risco de trombose entre os grupos de atividade e remissão endoscópica;
- c) Descrever as principais características dos pacientes com trombose prévia nesta casuística;
- d) Avaliar a incidência de trombose nos pacientes por 1 ano e observar a variabilidade do CDAI (*Crohn's Disease Activity Index*) e do IBDQ (*Inflammatory Bowel Disease Questionnaire*).

3 MÉTODOS

3 MÉTODOS

3.1 Desenho do estudo

Estudo observacional prospectivo em pacientes com DC em remissão clínica, com ou sem atividade endoscópica. O diagnóstico da DC foi realizado por meio da história clínica, de provas de atividade inflamatória (PCR, VHS, calprotectina fecal), de exames radiológicos e de ileocoloscopia com realização de biópsias.

3.2 Casuística

3.2.1 Seleção

Foram incluídos pacientes provenientes dos ambulatórios de gastroenterologia clínica e da coloproctologia do HC-FMUSP, que preenchem os critérios de elegibilidade entre o período de maio de 2015 até abril de 2017.

Pacientes com provável remissão clínica, com indicação de colonoscopia, eram recrutados e os que manifestavam interesse em participar do estudo recebiam o diário de sintomas (CDAI), diário de qualidade de vida (IBDQ), e o termo de consentimento para preenchimento e entrega no dia da colonoscopia. No dia do exame, o sangue era coletado antes do início do uso do manitol, utilizado para o preparo de cólon no Centro Diagnóstico em Gastroenterologia HC-FMUSP.

A atividade clínica foi definida pelo CDAI e Harvey-Bradshaw Index (HBI), sendo incluídos no estudo os pacientes com CDAI menor que 150. Pacientes com HB menor que seis eram considerados em remissão clínica, embora o HB não foi utilizado como critério de inclusão. A avaliação de atividade endoscópica foi definida pelo escore simplificado de atividade endoscópica para DC (SES-CD), sendo excluídos do estudo os pacientes com escore entre 3 e 6.

A coleta de dados foi realizada de forma sistematizada, via Internet, com auxílio do programa RedCap (*Research Electronic Data Capture*)⁵¹.

3.2.2 Critérios de inclusão

- a) Assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido;
- b) Diagnóstico de DC comprometendo o íleo terminal e/ou o cólon estabelecido há, pelo menos, 6 meses, com envolvimento de íleo distal, colônico ou ileocolônico;
- c) Ter necessidade de repetir exame colonoscópico, seja por aumento da calprotectina seja PCR, seja por rastreamento de câncer colorretal, individualizando caso a caso;
- d) Ter mais de 18 anos;
- e) Sem alteração da dose de medicações em uso (aminosalicilatos, imunossupressores e/ou anti-TNF) há, pelo menos, 3 meses.

3.2.3 Critérios de exclusão

- a) Pacientes com evidência de colite infecciosa (CMV, TB, clostridium), colite isquêmica, colite actínica ou por AINE;
- b) Uso de drogas há, pelo menos, 3 meses do início do estudo, que alteram a hemostasia, como anticoagulantes orais, AAS, clopidogrel, heparina, antifibrinolítico e eritropoietina;
- c) Desordem hepática descompensada ou IRA;
- d) Gestantes ou em amamentação;
- e) Presença de câncer ativo;
- f) Transfusão de hemocomponentes nos últimos 10 dias;
- g) Realização de cirurgia de médio e grande porte nas últimas 4 semanas da inclusão;

- h) Pacientes com comprometimento da doença em local não acessível à colonoscopia, portanto, pacientes com doença de delgado proximal não foram incluídos no estudo;
- i) Ressecção intestinal, há menos, de 6 meses;
- j) Colectomia total;
- k) Presença de estoma;
- l) Pacientes com SES-CD entre 3-6, ou seja, aqueles com atividade leve, de modo a aumentar o poder do estudo.

3.2.4 Cálculo amostral

Elegemos para cálculo do tamanho amostral o estudo desenvolvido por Saibeni *et al.*⁵² por não haver estudo na literatura voltado para coagulação e atividade endoscópica na DC, e por considerarmos o potencial de geração de trombina como o teste atual mais global para avaliação da coagulação. Nesse estudo, o ETP de pacientes com DII foi categorizado em doença ativa ou remissão baseado no valor do PCR e comparados com controles. O tamanho da amostra para que fosse alcançada diferença estatística entre os grupos foi calculado em 75 pacientes por grupo (com atividade endoscópica e sem atividade endoscópica), totalizando 150 pacientes, considerando a probabilidade de erro alfa de 0,05 e poder de 0,9.

3.2.5 Amostragem

A inclusão no estudo foi realizada após a leitura, compreensão, assinatura do TCLE, e explanação do procedimento e objetivo da pesquisa. A população do estudo foi definida de acordo com os critérios de inclusão e exclusão, constituída por indivíduos selecionados sucessivamente por meio do adequado preenchimento do CDAI e da realização da colonoscopia, sendo considerados como fatores determinantes para inclusão no estudo os pacientes com CDAI menor que 150, SES-CD menor ou igual a dois e SES-CD maior ou igual a sete.

Um grupo-controle com 50 indivíduos saudáveis sem DC, pareados por sexo e idade, foi utilizado como referência para comparação dos parâmetros da coagulação. Esses indivíduos responderam um questionário de avaliação de risco de trombofilia e doaram 20ml de sangue periférico. Essa população não realizou colonoscopia tampouco teve algum seguimento durante o estudo.

Determinação dos grupos:

- a) grupo de remissão endoscópica: SES-CD $\leq$ 2;
- b) grupo de atividade endoscópica: SES-CD $\geq$ 7;
- c) grupo-controle: indivíduos saudáveis, sem fatores de risco conhecidos para trombose.

Os 10 pacientes que apresentaram trombose prévia participaram também de um estudo recém-publicado por nós, possibilitando uma análise mais pormenorizada do perfil trombofílico de cada paciente.

O estudo foi conduzido de acordo com os requerimentos do Comitê de Ética do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (CAPPESQ), Projeto número 1.076.648 (Anexos A e B). Todos os participantes foram voluntários e incluídos somente após a leitura e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. O estudo foi realizado com recursos fornecidos pela FAPESP, Projeto 2015/06196-0, baseado nas recomendações estabelecidas na Declaração de Helsinki 2013. Todos os pacientes e voluntários sadios tiveram pleno conhecimento dos objetivos e métodos do experimento, e deram seu consentimento por escrito (termo de consentimento livre e esclarecido). Foram devidamente avisados de que todas as informações fornecidas são estritamente sigilosas. Os dados obtidos foram utilizados exclusivamente para fins de obtenção das informações concernentes à pesquisa.

3.3 Avaliação da atividade da doença na DII

3.3.1 Avaliação da atividade clínica

O CDAI (Tabela 1) é composto de oito variáveis com pesos diferentes, incluindo o número de evacuações líquidas ou pastosas, dor abdominal (0=nenhuma, 1=leve, 2=moderada, 3=severa) e bem-estar (0=nenhum, 1=comprometimento leve, 2=comprometimento moderado, 3=comprometimento importante, 4=comprometimento muito importante) na última semana, número de complicações (artrite ou artralgia, irite ou uveíte, eritema nodoso ou pioderma gangrenoso ou aftas orais, fissura anal, fístula ou abscesso, febre acima de 37,8 graus). É uma escala de pontuação que vai de 0 a 600 e pode ser assim classificada:

- a) valor total ≤ 150 pontos: sugere remissão;
- b) valores entre 150 a 250: sugerem atividade leve;
- c) valores > 250 pontos: sugerem atividade moderada.

Esse escore foi rigorosamente validado e serve de referência ou *gold standard* para os outros escores em estudos de correlação. No entanto, apresenta muitos pontos negativos como: (a) necessidade de um diário de sintomas a ser preenchido por sete dias consecutivos; (b) não tem boa correlação com atividade endoscópica; (c) utiliza dados subjetivos, como dor abdominal e bem-estar; (d) não é muito utilizado na prática médica; e (e) não leva em consideração a presença de complicações como a formação de fístulas ou estenoses. O escore varia de 0 a 600, sendo que valores abaixo de 150 estão associados à doença quiescente, maior que 220 em atividade clínica moderada e acima de 450 são interpretados como atividade clínica severa¹. O termo recaída é quando o paciente estava em remissão clínica e apresenta um surto da doença.

O escore de HBI é um índice também numérico, reproduzível, independente dos achados laboratoriais e baseado em cinco itens que devem ser lembrados pelos pacientes nas últimas 24h: (a) bem-estar, (b) dor abdominal, (c) número de fezes líquidas por dia, (d) massa abdominal, (e) complicações: artralgia, uveíte, eritema

nodoso, úlceras aftosas, pioderma gangrenoso, fissura anal, fístula nova ou abscesso. Por ser um escore mais objetivo, pode ser mais aplicado, mas também não é utilizado na prática clínica.

No ambulatório de DII, a partir de um paciente com DC em possível remissão clínica, era entregue um diário de sintomas para preenchimento 10 dias antes da data agendada da colonoscopia. No dia da colonoscopia, antes da oferta do manitol, os pacientes tinham seu sangue colhido, entre outras finalidades, para cálculo completo do CDAI (que necessita dos valores de hematócrito).

Após a colonoscopia realizada e os dados dos questionários respondidos lançados no RedCap, apenas pacientes com CDAI menor que 150 foram incluídos.

Tabela 1 - Índice de atividade na Doença de Crohn

	Multiplicado por
Número de evacuações líquidas na última semana	2
Dor abdominal (nos últimos 7 dias)	
Nenhuma = 0	
Leve = 1	5
Moderada = 2	
Intensa = 3	
Estado geral (nos últimos 7 dias)	
Ótimo = 0	
Bom = 1	7
Regular = 2	
Ruim = 3	
Péssimo = 4	
Número de complicações (nos últimos 7 dias)	
Artralgia/artrite	
Irite/uveíte	20
Eritema nodoso/pioderma gangrenoso/aftas orais	(Multiplicar cada complicação que tiver por 20. O valor máximo aqui é 120)
Fissura anal, fístula ou abscesso anal	
Outras fístulas	
Febre 37,8°C	
Uso de antidiarreico	
Não = 0	30
Sim = 1	
Massa abdominal	
Ausente = 0	10
Duvidosa = 2	
Bem definida = 5	
Déficit do hematócrito:	
Homem: 47 – Ht%	6
Mulher: 42 – Ht%	
Peso: $1 - \frac{\text{Peso}}{\text{Peso padrão}} \times 100$	
(Adicionar ou subtrair segundo o sinal)	1

A classificação de Montreal na DC⁵³ não avalia diretamente a atividade clínica, entretanto foi utilizada nesta tese a fim de categorizar os pacientes segundo suas características fenotípicas como a idade do diagnóstico, localização e perfil da doença.

Tabela 2 - Classificação de Montreal

Idade (A)	A1 ≤ 16 anos
	A2 Entre 17-40 anos
	A3 ≥ 40 anos
Localização (L)	L1 Ileal
	L2 Colônico
	L3 Ileocolônico
	L4 TGI alto
Comportamento (B)	B1 Inflamatório
	B2 Estenosante
	B3 Penetrante
	p Perianal

TGI: Trato Gastrointestinal

3.3.2 Avaliação da atividade endoscópica

Endoscopicamente, para avaliação dos pacientes com DC ileal e/ou colônica, a colonoscopia configura exame essencial, na medida em que visualiza diretamente o padrão de úlceras, se profundas ou superficiais, edema, hiperemia, perda do padrão vascular, estenoses, entre outros achados. A aplicação de escores endoscópicos ajuda a uniformizar esses achados e, assim, auxiliar no seguimento e na resposta terapêutica desses pacientes. Na avaliação dos achados endoscópicos na DC que acomete íleo terminal e/ou cólon, o principal *score* endoscópico utilizado é o SES-CD, por meio da pontuação dos seguimentos avaliados (íleo, cólon direito, cólon transversos, cólon esquerdo, sigmoide e reto), superfície inflamatória acometida, superfície acometida por úlceras, tamanho das úlceras, presença ou não de estenose. Após a soma proporcional é gerado um número que varia de (a) menor ou igual a 2: remissão endoscópica; (b) entre 3 e 6: atividade leve; (c) maior que 7: atividade moderada; (d) atividade intensa: > 15 . A correlação interobservador para todos os parâmetros avaliados foi excelente (kappa entre 0,79 e 1,0).

O SES-CD (Tabela 2) é também um escore reprodutível e validado, baseado na pontuação do tamanho das úlceras, superfície ulcerada, superfície afetada e presença de estenose. É calculado de forma setorizada no íleo terminal, ceco, transverso, ascendente e reto, mas o resultado final representa a avaliação global do intestino avaliado.

Durante seu processo de validação, o SES-CD demonstrou excelente correlação com o escore de referência, o *Crohn's Disease Index of Severity* (CDEIS) com $r=0,92$. Uma redução de 50% no SES-CD tem sido proposta como boa resposta ao tratamento⁵⁴.

Tabela 3 - Escore Endoscópico Simplificado para Doença de Crohn

	0	1	2	3
Tamanho das úlceras	Nenhuma	Aftoides	até 2,0 cm	> 2 cm
Superfície ulcerada	Nenhuma	< 10%	10-30%	> 30%
Superfície afetada	Nenhuma	<50%	50-75%	> 75%
Presença de estenose	Nenhuma	única, transponível	múltiplas, transponíveis	não transponível

FONTE: Daperno *et al.* (2004)⁵⁵

Para avaliação da recidiva endoscópica após ressecção ileocolônica foi utilizado o escore de Rutgeerts (tabela 4)⁵⁶. As lesões endoscópicas são graduadas em 5 categorias de i0-i4 após observação do tamanho e quantidade de úlceras presentes na anastomose e no íleo neoterminal, sendo os pacientes com escore i3 e i4 aqueles com perfil endoscópico mais severos, em que a probabilidade de recidiva clínica é alta. Nos últimos anos, há uma tentativa de subclassificar o grupo i2 após observação de que os pacientes com úlceras no íleo neoterminal (i2b) apresentavam mais recidiva clínica aos pacientes com úlceras restritas à anastomose (i2a) (Tabela 5). Entretanto, estudo recente conduzido por Bayart *et al.* demonstrou que não há diferença na taxa de recidiva clínica entre i2a e i2b⁵⁷. Apesar de ainda não haver consenso na literatura sobre o benefício dessa subclassificação, utilizamos em nossos pacientes.

Tabela 4 - Escore de Rutgeerts

Grau	Achados endoscópicos
i0	Ausência de lesões
i1	≤ 5 erosões/úlceras aftóides > 5 úlceras aftóides intercaladas por mucosa normal ou úlceras maiores em áreas isoladas ou úlceras maiores confinadas à anastomose
i2	
i3	Inflamação difusa com erosões/úlceras aftóides
i4	Inflamação difusa com úlceras maiores, nódulos ou estenoses

Tabela 5 - Escore de Rutgeerts modificado

Grau	Achados endoscópicos
i0	Ausência de lesões
i1	≤ 5 erosões/úlceras aftóides
i2a	Lesões confinadas a anastomose
i2b	> 5 úlceras aftóides ou úlceras maiores, entremeadas por mucosa normal, no íleo neoterminal
i3	Inflamação difusa com erosões/úlceras aftóides
i4	Inflamação difusa com úlceras maiores, nódulos ou estenoses

3.3.3 Avaliação da qualidade de vida

Embora a qualidade de vida seja um parâmetro subjetivo, ela pode ser medida de forma objetiva com a utilização de questionários específicos. O IBDQ (*Inflammatory Bowel Disease Questionnaire*) foi desenvolvido em 1988 por Guyatt *et al.*⁵⁸, por meio de entrevistas com pacientes com DC e RCU. Após a sua criação, o questionário já passou por diversas reestruturações, com o objetivo de reduzir o número de perguntas, finalizando em 32 itens, e, hoje, é utilizado na avaliação da qualidade de vida na DII, já foi validado e mostrou-se reprodutível. Em 2004, ele foi traduzido e validado para Língua Portuguesa⁵⁹.

Compreendem quatro domínios do indivíduo: sintomas intestinais (fezes moles, dor abdominal, etc.), funções sistêmicas (fadiga, padrão de sono, etc.), função social (capacidade de trabalhar, ir a eventos sociais, etc.) e, por fim, estado emocional (depressão, raiva, irritabilidade, etc.). As respostas são pontuadas segundo a escala de Likert, variando de 1 (prejuízo significativo) a 7 (nenhum prejuízo). A pontuação final do IBDQ se dá pela soma dos pontos de cada resposta, podendo ser de 32 (qualidade

de vida relacionada à saúde muito fraca) até 224 (qualidade de vida relacionada à saúde perfeita). Apresenta uma boa correlação com o CDAI ($r = -0,67$, $P < 0,001$) e uma pobre correlação com o *Physician Global Assessment* ($r = 0,35$, $P = 0.001$)⁶⁰.

O questionário para avaliação da qualidade de vida (IBDQ), conforme já apresentado anteriormente, é um questionário validado, reproduzível e traduzido para a Língua Portuguesa (Anexo D). Ele foi entregue no dia do recrutamento, o paciente preenchia o formulário em casa e entregava no dia da colonoscopia, junto com demais formulários.

Cada questão dentro de cada um dos domínios aferidos tem sete alternativas de respostas. Cada opção de resposta vale seu próprio número em pontos, sendo 1 pior qualidade de vida e 7 a melhor, somando-se o total de pontos obtidos em cada domínio. A soma simples de todos os domínios resultará no escore total obtido pelo paciente.

3.3.4 Avaliação da atividade laboratorial: papel da calprotectina fecal

A calprotectina fecal (CF) é uma proteína ligadora de cálcio e zinco encontrada no citoplasma dos neutrófilos, liberada quando há dano à mucosa do trato gastrointestinal. É um teste não invasivo, fidedigno e de baixo custo, que pode ser utilizado no seguimento desses pacientes. Existe boa correlação da CF com o grau de atividade endoscópica por meio do escore de atividade endoscópica tanto na DC (SES-CD) quanto na RCU (*Mayo Score*).

Na literatura, há evidência da superioridade da calprotectina em relação à proteína C reativa, velocidade de hemossedimentação ou fibrinogênio na avaliação da atividade inflamatória dos pacientes com DII^{61–63}.

Para avaliação dos valores de calprotectina fecal, foi utilizado o kit sanduíche ELISA da Bühlmann (Suíça). O anticorpo monoclonal de captura específico para complexos da calprotectina fecal heterodiméricos e poliméricos é revestido na placa de microtitulação. Os pacientes recebiam os tubos extratores (Calex Cap Device) para coleta domiciliar 2 dias antes da colonoscopia e os mantinham em temperatura ambiente, seguindo as orientações do fornecedor. No LIM-07 da Faculdade de Medicina da FM-USP, essas amostras eram congeladas e armazenadas em freezer a -

20 graus C até a realização do teste. Resultados de calprotectina disponíveis com intervalo de até 30 dias da colonoscopia não eram repetidos. Essas análises eram realizadas no laboratório Álvaro, em Cascavel, utilizando o mesmo kit utilizado por nós.

Controles, calibradores e amostras, diluídas em 1:50, foram incubados à temperatura ambiente por 30 minutos. Depois de uma etapa de lavagem, um anticorpo de detecção (Ab) conjugado com peroxidase de raiz-forte (HRP) detectou moléculas de calprotectina ligadas ao anticorpo monoclonal recoberto na placa. Depois de nova incubação e lavagem, a tetrametilbenzina (TMB) foi acrescentada formando a cor azul seguida de uma reação de interrupção (solução *stop* de ácido sulfúrico), formando a cor amarela. A absorção foi medida a 450 nm com Bio-tek Instruments, Inc. ELX 800 (EUA) e interpolados com a curva padrão de cinco pontos. Os valores da calprotectina foram expressos em $\mu\text{g/g}$ de fezes e valores acima Ude 200 $\mu\text{g/g}$ foram considerados como indicativos de inflamação do trato gastrointestinal.

3.3.5 Marcadores laboratoriais de atividade

Análise bioquímica: hemograma (automatizado, microscopia coloração panóptica) e proteína C reativa (imunoturbidimétrico).

3.4 Parâmetros relacionados à hemostasia

As amostras foram colhidas no dia da colonoscopia, antes do uso do manitol, administrado aos pacientes no Centro Diagnóstico em Gastroenterologia HC-FMUSP. Foi coletada amostra de 20 ml de sangue venoso periférico por punção de veia periférica com scalpe a vácuo de 21G. Na intenção de diminuir a variabilidade pré-analítica, a coleta das amostras foi realizada com atenção especial para a redução do tempo de garroteamento e de lesão tecidual, com agulha de 21 gauge, preferencialmente realizada pelo mesmo profissional. As amostras foram encaminhadas para realização de:

Pesquisa de trombofilia e de parâmetros habituais da hemostasia: Esses testes foram realizados pelo laboratório central, seguindo a padronização pré-estabelecida da rotina do laboratório central do HCFMUSP. As técnicas utilizadas foram: avaliação da concentração plasmática de proteína S livre (imunoturbidimétrico, HemosIL® Free Protein S), proteína C (cromogênico automatizado, HemosIL® Protein C), antitrombina (cromogênico, *Liquid Antithrombin*, reagentes IL, *Instrumentation Laboratory*, Bedford, USA), teste de resistência à Proteína C Ativada (coagulorimétrico, *Kit Factor V Leiden*, APC™Resistance V, marca IL), fibrinogênio (Clauss modificado), anticoagulante lúpico (coagulométrico funcional), pesquisa do anticorpo anticardiolipina IGG e IGM (Elisa, QuantaLite ACA Inova IGIII), pesquisa do F2 G20210A (Mutação do gene da Protrombina), FV R506Q (Mutação do fator V de Leiden, reação de polimerização em cadeia – PCR), tempo de protrombina (Quick modificado, ISI ~ 1,2), tempo de tromboplastina parcial ativada (Proctos & Rapaport modificado) e determinação do D-dímero (imunoturbidimétrico, reagentes IL, *Instrumentation Laboratory*, Bedford, USA).

Testes específicos relacionados à hemostasia: As amostras (2 tubos a vácuo, com citrato de sódio a 3,2%) foram submetidas à centrifugação por 20 minutos a 3.000 G, em centrífuga refrigerada a 18°C. Todas as amostras foram processadas no mesmo laboratório, pela mesma equipe, até o seu congelamento, que não foi superior a dois anos.

Com o auxílio de uma pipeta, foi transferido um volume de plasma sem plaquetas, leucócitos ou hemácias para 2 tubos cônicos plásticos com tampa (1,5 ml em cada tubo). Em seguida, todas as amostras foram criopreservadas em temperaturas iguais ou inferiores a -80°C para realização dos testes específicos, a seguir (em duplicata):

- a) potencial de trombina endógeno ou ETP (aferido pelo método fluorogênico mais conhecido como CAT – *The Calibrated Automated Thrombogram* – Thrombinscope TM, SinaoseBV, Masdtrich, Holanda) com e sem trombomodulina (Thrombomodulin, rabbit lung, Sekisui);
- b) determinação da atividade do Fator Tecidual (método cromogênico);

- c) determinação quantitativa do FVW (FVW:Ag; imunoturbidimétrico);
- d) determinação da atividade do FVW (FVW:RCo; imunoturbidimétrico);
- e) ADAMTS-13 (ELISA);
- f) determinação da trombomodulina (ELISA);
- g) atividade coagulante do FVIII (coagulométrico funcional).

Os exames realizados por meio do método ELISA tiveram seus gráficos de 5 pontos gerados com auxílio do site elisaanalysis.com.

3.4.1 Potencial de geração de trombina

Composição dos reagentes utilizados (Thrombinoscope BV, Maastricht, Holanda):

- a) *PPP reagent* 5pM: é uma mistura de fosfolípides e fator tecidual. Após a reconstituição com 20 µL do reagente, 80 µL de plasma e 20 µL de FluCa, a mistura final contém 5pM de fator tecidual e 4µM de fosfolípides;
- b) FluCa-Kit: mistura de substrato fluorogênico e tampão (que contém cloreto de cálcio). O substrato fluorogênico sofre a ação da trombina gerada na amostra, e emite um sinal fluorogênico que é diretamente relacionado à concentração de trombina gerada ao longo do tempo. Ele é adicionado pelo distribuidor do aparelho, que determina o tempo zero da reação;
- c) *Thrombin Calibrator*: possui atividade similar à trombina. Age no substrato fluorogênico e funciona como um padrão de concentração conhecida de trombina, que é comparada à trombina gerada na amostra teste. Não sofre a ação de substratos ou inibidores plasmáticos;
- d) Trombomodulina (Sekisui Diagnosis): derivada de pulmão de coelho. A concentração utilizada foi aquela que reduziu em 50% o ETP de indivíduos normais.

Parâmetros do trombograma (Figura 4):

- a) tempo de latência (*lagtime*): momento inicial da formação de trombina (a concentração de trombina atinge 1/6 do pico da concentração máxima de trombina). Unidade: minutos;
- b) ETP: área sob a curva de geração de trombina, expressa em concentração de trombina. Unidade: nM x minuto;
- c) pico (*peak*): concentração máxima de trombina. Unidade: nM de trombina;
- d) tempo para o pico (*time to peak, tpeak*): tempo para atingir a concentração máxima de trombina, em minutos.

Análise da geração de trombina

A análise foi realizada de acordo com a descrição de Hemker *et al.*³¹. Utilizando uma placa de microtitulação de polipropileno, com poços arredondados (Immulon 2HB, *Thermo Labsystems*, Helsinque, Finlândia), após descongelamento das amostras em banho-maria, a 37° C, no período de cinco minutos. Para cada placa utilizada, eram descongeladas 15 amostras, e cada amostra ocupava seis poços da placa, sendo feita a leitura em duplicata, ou seja, dois poços preenchidos com plasma e reagente (80 µL de PPP, 20 µL de *PPP-Reagent* 5pM), dois poços adicionais com plasma e trombomodulina na concentração de 6nM (volume 3 µL), além de dois poços adicionais para controles, preenchidos com o mesmo plasma e o calibrador de trombina (total de seis poços por paciente). A geração de trombina foi desencadeada utilizando FT 5pM e 4µM de fosfolípides sintéticos (*PPP-reagent* 5pM) sem e com a adição de trombomodulina (*PPP-reagent* 5pM + TM). Inicialmente, o *PPP-reagent* 5pM, o calibrador e a trombomodulina eram preparados e pipetados na placa (pipetagem reversa).

Após 15 minutos de incubação a 37°C, 20 µL de substrato fluorogênico diluído em tampão mais cálcio (FluCa) foram dispensados automaticamente em cada poço. A reação é monitorizada utilizando-se um fluorímetro (*Fluoroskan Ascent*, *Thermo Labsystems*, Helsinque, Finlândia), com um filtro de excitação de 390 nM e de emissão de 460 nM, a 37°C. O sinal fluorescente é convertido em concentração de trombina,

por meio de comparação contínua ao sinal gerado pelo calibrador de trombina. Um trombograma (curva de geração de trombina) com os seus parâmetros são gerados automaticamente pelo *software* (*Thrombinoscope TM*, *Sinapse BV*, Maastricht, Holanda). O ETP foi derivado do cálculo da área sob a curva de geração de trombina, ajustada para a atividade trombina- α_2 macroglobulina. Quatro parâmetros foram avaliados: o ETP, pico máximo de concentração de trombina, tempo para o pico e tempo de latência. A redução do ETP na presença de trombomodulina foi avaliada em cada amostra.

Todos os testes foram realizados pelo mesmo operador, acompanhados por farmacêutica-bioquímica com experiência em laboratório de hemostasia. Todos os experimentos foram interrompidos após 40 minutos do seu início, período suficiente para o término da reação.

Figura 4 - Curva gerada a partir da análise do CAT e seus principais parâmetros

3.4.2 Determinação da atividade do fator tecidual plasmático

A atividade do fator tecidual plasmático foi avaliada por meio do kit *Tissue Factor Human Chromogenic Activity Assay Kit* – ab108906, da Abcam. Esse kit foi desenvolvido para testar a atividade do FT no plasma, no soro, na urina, nos tecidos e na cultura celular. Ele avalia a habilidade do complexo FT/FVIIa em ativar o FX em

FXa, medido pela quantidade de FXa produzida por uma reação cromogênica, lida numa faixa de absorbância de 405 nm. A mudança da absorbância de 405 nm é diretamente proporcional à atividade enzimática do FT.

Após preparo dos reagentes (Mix de FVII, FX), do padrão para curva (P1 250pM de FT, P2 125pM, P3 62.5pM, P4 31.25 pM, P5 15.63 pM, P6 7.81pM e P7 0pM) e do FX, foram pipetados 70 µl de Mix, seguidos de 10 µl do FT e do plasma em cada *well*, incubados a 37°C por 30 minutos, em duplicata. Foram adicionados 20 µl de substrato com FXa em cada *well* seguidos da leitura das absorbâncias na faixa de 405 nm a cada 5 minutos por 25 minutos. A variação da OD de cada amostra em relação à curva padrão dividido pelos minutos da observação gera o $\Delta OD/min$. A partir desses dados, foi construído um gráfico com a concentração do FT em pM no eixo x e a OD₄₀₅ em nm no eixo y e uma curva de 4 pontos, a partir dos dados ajustados, permitindo a extrapolação da concentração em pM de FT em cada amostra.´

3.4.3 Determinação do antígeno do FVW (FVW:Ag) e da atividade do FVW (Cofator de Ristocetina ou FVW:RCo)

Tanto a determinação do FVW:Ag quanto do FVW:RCo foram feitas por meio de um sistema de leitura turbidimétrica automatizada, possibilitando o uso de partículas de látex sensibilizadas com anticorpos específicos, com sensibilidade e especificidade comparáveis ao método ELISA. Os resultados de ambos os testes são expressos em %.

Para avaliação do FVW:Ag no plasma citratado, foi utilizado o imunoensaio de látex, HemosIL VWF:Ag, que consiste de dois reagentes principais: o látex e o tampão. Quando o plasma contendo o FVW:Ag se mistura com o látex e o tampão, as partículas de látex se aglutinam e o grau de aglutinação é diretamente proporcional à concentração de FVW:Ag na amostra, medida por meio do decréscimo da luz transmitida.

Para avaliação quantitativa da atividade do FVW no plasma citratado, foi utilizado o imunoensaio de látex, HemosIL VWF:RCo, mais bem ilustrado na Figura 5. Nesse kit, as partículas de látex são revestidas com um fragmento recombinante do receptor plaquetário de FVW, do complexo de glicoproteínas GP1b-IX-V, que se

ligam ao FVW presente no soro dos pacientes analisados, na presença de ristocetina (antibiótico que tem a propriedade de aglutinar plaquetas na presença do FVW), resultando em aglutinação. A atividade do FVW é determinada pela medição do aumento da turvação e decréscimo da luz causados pela aglutinação do reagente látex. Reflete a atividade funcional do fator de FVW, avaliando em várias diluições do plasma do paciente sua capacidade de induzir a aglutinação de plaquetas normais, lavadas e formalizadas, na presença de uma concentração final de ristocetina.

Figura 5 - Kit HemosIL - aglutinação em látex do FVW na presença da ristocetina
Modificado de material ilustrativo da Werfen.

3.4.4 Determinação da atividade do ADAMTS-13

A atividade do ADAMTS-13 foi medida pelo kit 5450701 da empresa Technoclone, pelo método ELISA cromogênico, de acordo com as especificações do fabricante. A placa de Elisa é recoberta pelo anticorpo Anti-GST (ligante do FVW73) que, após incubação com o substrato, retém o FVW73 ligado à placa. O soro do paciente com a ADAMTS-13 adicionado à placa cliva o FVW73 e emite luz visível, alterando a cor da reação. Sua intensidade pode ser lida na faixa de densidade óptica de 450 nm. A densidade óptica é interposta à curva padrão para obtenção da atividade da ADAMTS-13. A absorção foi medida a 450 nm com Bio-tek Instruments, Inc. ELX

800 (EUA), e interpolados com a curva padrão de cinco pontos. Os resultados foram expressos em %. Esse processo está mais bem ilustrado na Figura 6 abaixo.

Figura 6 - Determinação das concentrações de ADAMTS-13 por ELISA
Modificado de material ilustrativo da Technozym.

3.4.5 Determinação da trombomodulina

A determinação quantitativa da trombomodulina humana (CD 141) sérica foi avaliada por meio do kit ab46508 da Abcam pelo método sanduíche ELISA. A placa de ELISA, recoberta pelo anticorpo monoclonal específico antitrombomodulina, recebeu as devidas quantidades de amostras, padrões e controles, seguindo as especificações do fabricante. Após incubação e lavagem, foi adicionado o anticorpo biotilado, que se liga à trombomodulina de cada amostra, seguido da adição da enzima Streptavidin-HRP em cada *well*. Para leitura da reação, foi adicionada uma solução com substrato TMB, seguido de uma solução *stop*. A intensidade da reação, por meio da cor formada, foi medida na faixa de DO de 450nm, com o leitor Bio-tek Instruments, Inc. ELX 800 (EUA), e interpolados com a curva padrão de cinco pontos. Os resultados foram expressos em ng/mL. Segundo o fabricante, a faixa de normalidade da trombomodulina sérica varia entre 2,9-7,6 ng/mL.

3.4.6 Determinação do fator VIII coagulante

Determinado pelo método coagulométrico funcional da marca Hemosil-IL, o teste baseia-se na determinação da atividade do fator VIII por meio do tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa). A um volume de plasma comercial contendo menos de 1% de fator VIII e acima de 50% dos outros fatores de coagulação (plasma deficitário em FVIII), é adicionado o mesmo volume do plasma-teste diluído. A correção do tempo de coagulação prolongado do plasma deficitário é proporcional à concentração (expressa em % de atividade) do fator específico no plasma do doente, que se obtém a partir de uma curva de calibração. Quanto maior atividade de fator do plasma teste, menor será o tempo de coagulação da mistura de plasmas. Valor de referência: 50-150%.

3.5 Delineamento da pesquisa

Inicialmente, foi descrita a população basal do estudo, composta por todos os pacientes que realizaram colonoscopia. Ainda com essa população basal, utilizando o SES-CD como variável contínua, foram feitas correlações com parâmetros laboratoriais em geral. Após categorização de acordo com o SES-CD e exclusão principalmente dos indivíduos com SES-CD intermediário e com CDAI>150, os grupos foram comparados de acordo com as características demográficas, clínicas e laboratoriais. Apenas os testes específicos relacionados à hemostasia (ETP sem trombomodulina, ETP com trombomodulina, relação ETP com TM/ETP sem TM, atividade do FT, FVW:Ag, FVW:RCo, ADAMTS-13, Trombomodulina e FVIII) foram comparados entre os grupos de atividade endoscópica, remissão endoscópica e grupo-controle. Esses pacientes foram seguidos a cada 3 a fim de avaliar a presença de episódios tromboembólicos, além de exames laboratoriais para o cálculo do CDAI e preenchimento do IBDQ no final do estudo.

3.6 Análise estatística

Na análise estatística descritiva, para variáveis quantitativas, a avaliação da normalidade foi feita por meio do teste Shapiro e do gráfico de histograma. Para a distribuição paramétrica, foram utilizados média e desvio padrão. Para distribuição não paramétrica, foram utilizados mediana e intervalos interquartis. Para análise estatística bivariada, foi utilizado o Teste qui-quadrado ou Fisher para variáveis categóricas, o Teste t de Students, nas variáveis com distribuição paramétrica, e o Wilcoxon, nas variáveis com distribuição não paramétrica. Os dados dos principais testes avaliados foram apresentados em *Boxplots* representando a mediana, os percentis 25% e 75%, e os valores extremos das concentrações séricas.

Para correlação entre atividade endoscópica e o potencial de geração de trombina, foi utilizado o teste de correlação de Spearman. Todas as conclusões foram consideradas significativas com valor de $p < 0,05$. O teste de Kruskal Wallis foi utilizado para avaliar se havia diferença estatística entre os testes específicos da hemostasia nos 3 grupos. Os cálculos foram realizados pelo programa estatístico RStudio, versão 1.1.383.

4 RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 Caracterização da amostra

Entre os dias 22/05/2015 e 26/04/2017, foram triados 261 pacientes com DC em possível remissão clínica, do ambulatório de gastroenterologia clínica ou do ambulatório de coloproctologia, sendo realizadas ao todo 236 colonoscopias. Houve inclusão de 164 pacientes, sendo 75 pacientes alocados no grupo de atividade endoscópica e 89 pacientes no grupo de remissão endoscópica, conforme organograma abaixo. Todos os pacientes incluídos foram do Hospital das Clínicas da FMUSP. Os indivíduos do grupo-controle (n=50) foram selecionados de forma voluntária, sendo que nenhum deles apresentava fatores de risco para trombose ou estavam em uso de drogas que poderiam interferir na coagulação. Esses indivíduos apenas doaram uma amostra de 20ml de sangue que foram utilizados como referência na análise dos parâmetros de coagulação.

4.2 Dados demográficos dos pacientes incluídos

Em relação aos pacientes incluídos (Tabela 6), os grupos foram homogêneos na maioria das variáveis. Os grupos não diferem em relação à idade, ao índice de massa corpórea, à cor da pele, ao tabagismo, ao sexo, à idade do diagnóstico, ao tempo de doença e ao IBDQ. Em relação ao Montreal, houve diferença apenas no subitem comportamento, com maior porcentagem de doença estenosante no grupo atividade endoscópica (43% vs. 18%; $p=0,001$). Não houve diferença em relação aos parâmetros idade, localização da doença ou cirurgia intestinal prévia. Como esperado, a porcentagem de recidiva endoscópica pós-operatória, definida pela classificação de Rutgeerts, foi significativamente maior no grupo em atividade endoscópica, principalmente nos subgrupos i2 e i4.

Outros parâmetros que avaliam inflamação também foram diferentes entre os grupos, como valores de calprotectina fecal acima de 200 mcg/g e de PCR acima de 5 mg/L também foram maiores no grupo de atividade (59% vs. 41%; $P=0,001$ e 59% vs. 40%; $P=0,04$, respectivamente). Os resultados dos exames laboratoriais realizados, encontra-se como material suplementar no Anexo G.

A correlação entre o CDAI e o HB, e entre o CDAI e o IBDQ foi significativa ($p<0,001$), com r de 0,79 e -0,62, respectivamente, indicando congruência na coleta de dados (Figuras 7 e 8). Como esperado, não houve boa correlação entre o CDAI e o SES-CD ($r=0,1$, $P=0,112$) (Figura 9).

Figura 7 - Correlação entre CDAI e HB; $p < 0,001$; $r = 0,79$

Figura 8 - Correlação entre CDAI e IBDQ, $p < 0,001$; $r = -0,59$

Figura 9 - Correlação SES-CD vs. CDAI, $r=0,09$; $p=0,136$

Tabela 6 - Características basais e demográficas dos participantes incluídos no estudo

Variável	Atividade endoscópica N=75	Remissão endoscópica N=89	P Valor	Variável	Atividade endoscópica N=75	Remissão endoscópica N=89	P Valor
Sexo			0,326	IBDQ	133 [115-143]	140 [118-150]	0,087
Feminino	41 (42,3)	56 (57,7)		Sintomas intestinais	59 [51-64]	61 [54-67]	0,180
Masculino	34 (50)	34 (50)		Sintomas sistêmicos	26 [22-30]	28 [23-32]	0,081
Idade (anos)	41 [36-55]	47 [33-59]	0,566	Aspectos Sociais	31 [27-34]	32 [27-35]	0,218
Idade do diagnóstico	28 [23-40]	31 [22-43]	0,446	Aspectos Emocionais	17 [14-18]	18 [14-20]	0,058
IMC	24 [21-28]	25 [22-27]	0,512	IBDQ total			
Tempo de doença	12 [6-17]	10 [7-16]	0,451	Rutgeerts (n=55)			0,001
Montreal				Rutgeerts i0	0	21 (91,3)	
Idade			0,662	Rutgeerts i1	1	1	
< 16 anos	1	3		Rutgeerts i2	17 (53,1)	1	
Entre 17-40 anos	62 (82,7)	71 (78,9)		Rutgeerts i2a	2	1	0,004
> 40 anos	12 (1,6)	16 (17,8)		Rutgeerts i2b	15 (88,2)	0	
Localização			0,07	Rutgeerts i3	2	0	
Ileal	33 (44)	27 (30,3)		Rutgeerts i4	12 (37,5)	0	
Colônico	12 (16)	26 (29,2)		SES-CD	9 [7-14]	0	
Ileocolônico	30 (40)	36 (40,4)		Calprotectina fecal (>200 mcg/g)	41 (59,4)	28 (40,6)	0,001
Comportamento			0,002	PCR (> 5 mg/L)	22 (59,5)	15 (40,5)	0,04
Inflamatório	21 (28)	36 (40,4)	0,08	Hemoglobina	14 ± 1,49	14,5 ± 1,56	0,047
Estenosante	32 (42,7)	16 (18)	<0,001	Leuco	6.950 [5.810-8.125]	6.160 [5.190-7.982]	0,157
Penetrante	22 (29,3)	37 (41,6)	0,117	Plaquetas	276 [231-326]	242 [210-304]	0,012
Perianal	12 (36,4)	21 (63,6)	0,240	Artralgia	17 (50)	17 (50)	0,550
Doença perianal ativa	4	3	0,525	Cirurgia intestinal prévia	32 (56,1)	25 (43,9)	0,05

Os grupos também foram semelhantes em relação às medicações em uso, com exceção de uma diferença limítrofe, porém significativa, em relação ao uso de biológico. Uma porcentagem maior de pacientes no grupo de atividade (54% vs. 46%; $P=0,041$) utilizavam terapia biológica. Quando se analisa cada uma das drogas em separado, esta diferença aumenta em relação ao Adalimumabe (63% vs. 37%; $P=0,008$), refletindo, provavelmente, sua introdução posterior na nossa prática clínica, algumas vezes, em pacientes já refratários ao Infliximabe (Tabela 7).

Tabela 7 - Tratamento prévio e atual dos participantes incluídos no estudo

Variável	Atividade endoscópica N=75	Remissão endoscópica N=89	P Valor
Tratamento prévio			
Salicilatos	45 (60)	60 (67,4)	0,320
Imunossupressor	17 (22,7)	11 (12,3)	0,080
Biológico	3 (4)	7 (8)	0,302
Corticóide	43 (57,3)	51 (57,3)	0,996
Tratamento			
Salicilatos	14 (50)	14 (50)	0,618
Imunossupressor	47 (42)	65 (58)	0,155
Biológico	44 (53,7)	38 (46,3)	0,041
IFX	17 (43,6)	22 (56,4)	0,758
Otimização IFX	6 (35,3)	7 (31,8)	0,745
ADA	27 (62,8)	16 (37,2)	0,008
Otimização ADA	17 (62,9)	12 (75)	0,51
Corticóide	1 (50)	1 (50)	0,896
Nunca tratou	4 (33,3)	8 (66,7)	0,381

IFX, infliximabe; ADA, adalimumabe

4.3 Fatores de risco para trombose venosa profunda

Também não houve diferença entre os grupos em relação aos fatores de risco para TEV (Tabela 8), incluindo história prévia de TVP, uso de anticoncepcional entre as mulheres, antecedente de TVP em familiares de primeiro grau, tabagismo e uso de corticoide.

Em relação às principais trombofilias (Tabela 8), considerando os 236 pacientes com DC a prevalência de deficiência de antitrombina foi de 10% (21/206), deficiência

de proteína C de 3% (7/206), deficiência de proteína S de 3% (8/214), resistência à proteína C de 5% (4/81), anticoagulante lúpico 4% (7/191), anticardiolipina IgM 10% (11/109), anticardiolipina IgG 6% (7/109), mutação do gene da protrombina em 6% (4/67) e o Fator V de Leiden, dos 8 pacientes testados, 1 apresentou a mutação.

O único fator diferente entre os dois grupos foi a prevalência de anticoagulante lúpico positivo (testado em 141 pacientes), maior no grupo com atividade endoscópica (8% *vs.* 1%; $P=0,047$), entretanto, dois dos cinco pacientes com anticoagulante lúpico positivo não realizaram um segundo teste confirmatório. Os demais fatores, quando apresentados de forma categórica, não apresentaram diferença entre os dois grupos, como deficiência de antitrombina, deficiência de proteína C, deficiência de proteína S, resistência à proteína C, anticorpo anticardiolipina IgM e IgG, mutação do gene da protrombina, mutação do Fator V de Leiden. Também não houve diferença entre os grupos quando analisadas as concentrações séricas elevadas de fibrinogênio e D-dímero.

Tabela 8 – Fatores associados à trombose dos pacientes incluídos no estudo

Variável	Atividade endoscópica N=75	Remissão endoscópica N=89	P Valor
TVP prévia	1 (1,3)	5 (5,6)	0,149
TVP na família	3 (4)	8 (8,9)	0,209
Aborto espontâneo	5 (6,6)	7 (7,8)	0,784
Tabagismo prévio	16 (21,3)	20 (22,4)	0,962
Tabagismo atual	8 (10,6)	7 (7,8)	0,364
Uso de ACO	4 (5,3)	4 (4,5)	0,663
Fib (> 400) (n=141)	17 (27)	13 (16,7)	0,136
FVIII (>150) (n=148)	34 (51,5)	37 (45,1)	0,439
D-dímero (>500) (n=147)	20 (30,8)	19 (23,2)	0,3
Deficiência Antitrombina (<79) (n=148)	8 (12,3)	9 (10,8)	0,781
Deficiência proteína C (<64) (n=148)	1 (1,5)	4 (4,8)	0,272
Deficiência proteína S (<55) (n=154)	3 (4,4)	2 (2,3)	0,468
RPCA (n=50)	2 (10)	1 (0,3)	0,333
Anticoagulante lúpico (n=141)	5/62 (8,1)	1/79 (1,3)	0,047
Anticardiolipina IgM (n=70)	3 (10,7)	4 (9,5)	0,997
Anticardiolipina IgG (n=71)	3 (10,3)	4 (9,5)	0,651
Mutação protrombina (n=46)	1 (5,6)	2 (7,1)	0,831
Mutação Fator V Leiden (n=6)	0	1 (3,3)	0,273

TVP, trombose venosa profunda; AVC, acidente vascular cerebral; ACO, anticoncepcional oral; Fib, Fibrinogênio; RPCA, Resistência à Proteína C Ativada

4.4 Testes específicos da hemostasia

4.4.1 Avaliação dos fatores pró-coagulantes

4.4.1.1 Avaliação da atividade do fator tecidual

A atividade do fator tecidual (Figura 10) diferiu significativamente entre os 3 grupos (atividade 127 vs. remissão 103 vs. controles 84; $P=0,001$). Após avaliação entre o grau de atividade endoscópica e os níveis de marcadores laboratoriais, o FT foi o que expressou o maior $r=0,266$ com $p<0,0001$ (Figura 11). Interessante notar que 82% no grupo de atividade e 55% no grupo de remissão apresentavam valores de FT acima do 3º quartil do grupo-controle.

Esses dados mostram que mesmo pacientes com DC em remissão endoscópica apresentam algum grau de lesão endotelial, que resulta no aumento do fator tecidual, compensada por outros mecanismos e insuficiente, isoladamente, para desencadear a ativação da cascata de coagulação.

Figura 10 - Comparação entre os valores de fator tecidual entre os grupos de atividade endoscópica vs. remissão endoscópica vs. controles

Figura 11 - Correlação entre a atividade endoscópica e a atividade do fator tecidual, $r=0,266$; $p<0,0001$

4.4.1.2 Fator de Von Willebrand (antígeno e cofator) e Fator VIII

A correlação entre o FVW e sua atividade medida pelo cofator de ristocetina foi excelente, demonstrando a congruência dos dados (Figura 12). Tanto o FVW:Ag quanto o cofator de ristocetina (Figuras 13 e 14, respectivamente) assim como o Fator VIII (Figura 15) apresentaram diferença entre o grupo de atividade *vs.* controles e remissão *vs.* controles (160 *vs.* 168 *vs.* 110, $P=0,001$; 150 *vs.* 144 *vs.* 90, $P=0,001$ e 5,13 *vs.* 4,91 *vs.* 3,81, $P=0,001$, respectivamente). Ainda na tentativa de corroborar a congruência dos dados, foi realizada a correlação entre o FVIII e a atividade do FVW (Figura 16) com uma correlação moderada ($p<0,001$; $r=0,60$). O FVIII circula associado ao FVW, desta forma, a boa correlação entre o FVIII e o FVW corrobora a qualidade dos dados. Segundo esses dados, a própria doença e sua inflamação sistêmica, independentemente da atividade endoscópica, parece estar associada à disfunção endotelial, não visualizada macroscopicamente por meio das úlceras intestinais.

Figura 12 - Correlação entre o Fator de Von Willebrand (FVW:Ag) vs. Cofator ristocetina (FVW:RCo); $p < 0,001$; $r = 0,92$

Figura 13 - Comparação entre os valores de Fator de Von Willebrand (FVW:Ag) entre os grupos de atividade endoscópica vs. remissão endoscópica vs. controles

*p<0,001; N.S., não significativo

Figura 14 - Comparação entre os valores de Fator de Von Willebrand atividade (FVW:RCo) entre os grupos de atividade endoscópica vs. remissão endoscópica vs. controles

*p<0,001; N.S., não significativo

Figura 15 - Comparação entre os valores de Fator VIII entre os grupos de atividade endoscópica vs. remissão endoscópica vs. controles

Figura 16 - Correlação do FVIII e do Cofator FVW; $p < 0,001$; $r = 0,60$

4.4.1.3 ADAMTS 13

As concentrações de ADAMTS-13 foram semelhantes entre os grupos DC com atividade endoscópica, DC com remissão endoscópica e controles (0,87% vs. 0,72% vs. 0,68%, $p = 0,077$) (Figura 17). Quando observada a relação FVW/ADAMTS-13, há diferença estatística entre os grupos (191 vs. 219 vs. 138, $p = 0,003$) (Figura 18), caracterizando uma redução relativa da enzima em pacientes com DC. Essa relação já foi considerada como um fator pró-coagulante em estudos prévios^{42,64}.

Figura 17 - Comparação entre os valores de ADAMTS-13 entre os grupos de atividade endoscópica vs. remissão endoscópica vs. controles

Figura 18 – Comparação entre a relação FVW:Ag/ADAMTS-13 entre os grupos de atividade endoscópica vs. remissão endoscópica vs. controles

4.4.1.4 Avaliação da Trombomodulina

A (Figura 19) mostra os resultados da dosagem da trombomodulina sérica nos pacientes com DC com e sem atividade endoscópica, comparados com os controles. Como pode ser observado, pacientes com DC, independente da atividade inflamatória, apresentam concentração sérica significativamente maior que os controles (5,13 vs. 4,91 vs. 3,81 ng/mL, $p<0,001$). Esse aumento poderia ser um mecanismo compensatório, a um aumento dos fatores pró-coagulantes como o FT – por ser um dos principais anticoagulantes endógenos – ou uma compensação a uma eventual resistência à trombomodulina, presente nesses pacientes.

Figura 19 – Comparação entre os valores de Trombomodulina entre os grupos de atividade endoscópica vs. remissão endoscópica vs. controles

4.4.1.5 Avaliação da balança da hemostasia sob a ótica do potencial de geração de trombina

Não foi observada diferença estatística entre os grupos DC com atividade endoscópica, DC com remissão endoscópica e controles em relação ao ETP sem trombomodulina (1674 vs. 1680 vs. 1654, respectivamente, $p=0,378$) e com

trombomodulina (609 vs. 539 vs. 650, respectivamente, $p=0,15$) (Figuras 20 e 21). A relação do ETP com e sem trombomodulina (0,37 vs. 0,31 vs. 0,43, respectivamente, $p=0,052$) (Figura 22) também não apresentou diferença entre os grupos.

N.S., não significativo

Figura 20 – ETP sem TM nos grupos de atividade endoscópica vs. remissão endoscópica vs. Controles

N.S., não significativo

Figura 21 – ETP com TM nos grupos de atividade endoscópica vs. remissão endoscópica vs. controles

Figura 22 – Comparação entre os valores da relação do potencial de geração de trombina com e sem trombomodulina entre os grupos de atividade endoscópica vs. remissão endoscópica vs. controles

Em relação aos demais parâmetros do potencial de geração de trombina não foi observada diferença estatística entre os grupos DC com atividade endoscópica, DC com remissão endoscópica e controles em relação ao Lag Time sem trombomodulina (3,67 vs. 3,67 vs. 3,33, respectivamente, $p=0,073$) ou com trombomodulina (4,67 vs. 4,83 vs. 4,5, respectivamente, $p=0,124$) (Figuras 23 e 24). Quando observamos o pico sem trombomodulina houve diferença entre os pacientes com DC com e sem atividade endoscópica vs. controles (295 vs. 298 vs. 277, respectivamente, $p=0,001$), diferença não observada quando adicionada a trombomodulina (127 vs. 112 vs. 130, respectivamente, $p=0,54$) (Figuras 25 e 26). Este parâmetro, considerado como a máxima concentração de trombina em determinado tempo, já foi demonstrado como um possível fator de hipercoagulabilidade sugerindo risco aumentado para TEV recorrente⁶⁵.

A Figura 27 ilustra um resumo dos principais resultados desta tese.

Figura 23 - Lag Time sem TM nos grupos de atividade endoscópica vs. remissão endoscópica vs. controles

Figura 24 – Lag Time com TM nos grupos de atividade endoscópica vs. remissão endoscópica vs. controles

Figura 25 – Peak sem TM nos grupos de atividade endoscópica vs. remissão endoscópica vs. controles

Figura 26 – Peak com TM nos grupos de atividade endoscópica vs. remissão endoscópica vs. controles

Figura 27 – Resumo dos resultados da tese

4.5 Seguimento dos pacientes

Boa parte desses pacientes foi seguida a cada 3 meses por 1 ano, de modo a acompanhar a evolução de alguns parâmetros. Na Figura 30, observa-se a evolução do CDAI, que permaneceu estável durante o período estudado, com a grande maioria mantendo-se em remissão clínica. Em relação ao IBQQ, não houve grande variabilidade, tanto nos pacientes com atividade endoscópica como no grupo sem inflamação na colonoscopia inicial (Figuras 31 e 32). Apesar da análise laboratorial ter sido realizada apenas no início do estudo, os dados de seguimento não sugerem que esses dados se alterem a curto prazo, uma vez que houve pouca variabilidade entre o CDAI e o IBDQ, independente da atividade endoscópica.

Durante o curso do estudo, houve apenas 1 caso de trombose em veia cava inferior numa paciente que apresentava atividade endoscópica intensa (SES-CD de 23). Houve redução de apenas 19% no ETP após adição de TM (Figura 33). A Figura 34 ilustra o comportamento do ETP em controle saudável, com redução de mais de 45% no ETP.

Figura 28 – Comportamento do CDAI durante 1 ano entre os pacientes com atividade e remissão endoscópica

Figura 29 – Evolução do IBDQ no grupo de atividade endoscópica ao longo de 1 ano

Figura 30 – Evolução do IBDQ no grupo de remissão endoscópica ao longo de 1 ano

Figura 31 – Redução de apenas 19% no ETP após adição de TM em paciente com atividade endoscópica intensa que evoluiu com trombose venosa profunda. (ETP sem trombomodulina: 1723; ETP com trombomodulina: 1264)

Figura 32 – ETP sem e com trombomodulina em controle saudável; redução de 47% do ETP após adição de trombomodulina ao teste (1866-> 999)

4.6 Pacientes com trombose prévia

Na Tabela 9, encontram-se características clínicas e laboratoriais dos 10 pacientes que já tiveram trombose nesta casuística. A mediana da idade do diagnóstico e da duração da doença foi de 41 e 8 anos, respectivamente. Apresentavam comprometimento ileocolônico 40% e 30%, perfil estenosante. A TVP foi sintomática em 70% dos casos e a localização mais prevalente foi em MMII (5), seguida de tronco braquiocefálico (3) e TEP (1). A grande maioria apresentou outros fatores de risco para trombose, alguns com mais de 1 fator associado à trombose, como TVP na família (3), cateter central (1), uso prévio de corticoide (4), tabagismo (2), mutação do gene da protrombina (1) e anticardiolipina (1). Uma das dez pacientes evoluiu ao óbito, sendo este sem relação com a trombose. Apenas 2 desses 10 pacientes apresentam-se em atividade endoscópica na ocasião da coleta do sangue, não sendo possível inferir nenhuma conclusão sobre o perfil laboratorial desses pacientes.

Tabela 9 - Característica dos pacientes com episódio prévio de trombose nessa casuística

	Sexo	Montreal	IMC	TVP sintomática	Localização da trombose	FR	Tratamento atual	CDAI	IBDQ	Cir	SES-CD	Calpro	Rel	FVW	Tromb	FT
1	F	A3L2B1	24	Sim	Tronco braquiocefálico e VCI	TVP na família + cateter central + mutação do gene da protrombina	AZA+ADA	41	118		7	NA	0.84	260	15	130
2	M	A2L1B1	26	Sim	Jugular	Tabagismo prévio + TVP na família + Anticardiolipina	ADA	22	152		0	NA	0.18	NA	NA	NA
3	F	A3L2B1	30	Não	MMIII		0	-29	153		0	NA	0.38	NA	NA	NA
4	M	A2L3B3	19	Sim	MMIII		MTX+ADA	212	132	Sim	0	71	0.43	100	8	89
5	F	A2L1B1	27	Sim	MMIII		AZA	71	155		0	494	0.61	NA	NA	130
6	F	A3L2B2	24	Sim	Tronco braquiocefálico	TVP na família + uso prévio de corticóide + internação (usou profilaxia e fez TVP)	IFX	56	116	Sim	6	1161	NA	NA	NA	NA
7	F	A3L2B1	22		MMIII	uso prévio de corticóide	AZA	15	142		0	304	0.7	254	8	133
8	M	A3L3B2	24	Sim	TEP	uso prévio de corticóide + internação nos últimos 3 meses + atividade da doença	AZA	146	88	Sim	0	37	0.22	153	3	97
9	F	A3L3B3	30	Sim		TVP na família Tabagismo	MTX+IFX	63	153	Sim	4	111	NA	NA	NA	NA
10	M	A3L3B2	23	Sim	MMIII	prévio + uso prévio de corticóide	AZA	148	132		18	1800	0.46	186	9.6	28

ID: idade do diagnóstico (Montreal); Loc: localização da doença (Montreal); Comp: comportamento (Montreal); TVP: Trombose Venosa Profunda; FR: Fatores de risco para trombose; CDAI: escore de atividade clínica na DC; IBDQ: qualidade de vida; Cir: cirurgia prévia relacionada à DC; Calpro: calprotectina; Plaq: plaquetas; PCR: proteína C reativa; Rel: relação ETP com/sem trombotomodulina; Tromb: trombotomodulina; VCI: veia cava inferior; MMIII: membros inferiores; TEP: tromboembolismo pulmonar

5 DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

Apesar da importância atribuída ao processo inflamatório sobre a coagulação na DC, esse é o primeiro estudo a avaliar a interferência da atividade endoscópica na hemostasia dos pacientes com DC. Esse detalhe é de suma importância, pois existe uma fraca correlação ($r=0,32$) entre a atividade clínica e endoscópica, embora, ainda assim, o CDAI⁶⁶ é o parâmetro mais utilizado nos estudos clínicos para definição de atividade da doença, e, por esse motivo, passível de uma interpretação equivocada da real importância do processo inflamatório sobre a coagulação. Essa imprecisão que ocorre com o CDAI se dá por uma alta pontuação do escore atribuída a critérios subjetivos, que nem sempre correspondem à atividade inflamatória da doença. Desta forma, a utilização da atividade endoscópica como principal método classificatório e em um subgrupo específico de pacientes, em remissão clínica, torna nosso estudo mais homogêneo e único.

Nossos dados mostram que pacientes com DC em remissão clínica mantêm concentração sérica de FT superior aos controles, e, na presença do processo inflamatório no intestino, esse aumento foi ainda maior. Dados semelhantes, porém de forma indireta, já haviam sido sugeridos por Edwards *et al.*⁶⁷, em 1987, por meio da dosagem do fibrinopeptídeo A (peptídeo derivado do fibrinogênio, após clivagem pela trombina) e da atividade do FT em cultura celular de monócitos circulantes, advindos do plasma de 36 pacientes com DC. Eles verificaram que a concentração de fibrinopeptídeo A estava aumentada principalmente em pacientes com atividade clínica, porém grande parte dos pacientes com CDAI < 150 , mas não necessariamente em remissão endoscópica, também apresentava níveis aumentados. Havia uma forte correlação ($r=0,89$) entre fibrinopeptídeo A e o FT nos pacientes em remissão clínica. As concentrações desses marcadores diminuíram após tratamento com corticoide, sugerindo que estes pacientes considerados em remissão apresentavam processo inflamatório ativo. Foi um dos primeiros estudos em que os autores alertam para um estado pró-coagulante mesmo em pacientes com DC em remissão clínica, embora falte nesse trabalho uma avaliação mais objetiva do processo inflamatório.

Poucos anos depois, Carty *et al.*⁶⁸ avaliaram a atividade do FT em pacientes com câncer colorretal (CCR) (n=70), DII (n=19), artrite reumatoide com doença ativa (n=8), em pacientes submetidos à colonoscopia (n=50) e em controles (n=79), mas, ao contrário dos outros trabalhos, os autores utilizaram um método cromogênico na urina. Os autores observaram que a concentração do FT estava aumentada nos pacientes com CCR e DII comparados com controles. Na subpopulação dos pacientes que fizeram colonoscopia, 24% dos pacientes com exame normal *vs.* 88% dos pacientes com exame alterado (DII e CCR) apresentaram valores elevados de FT ($p<0,001$).

Complementando a importância do FT, Undas *et al.* mostraram que, em 80 pacientes com DII, a detecção do FT no sangue estava presente em 2/3 e 1/3 dos pacientes com DC e RCU, estando associado a uma maior ativação da coagulação, avaliada pela maior quantidade de complexos TAT. No entanto, o estudo não avaliou a relação dos achados com a presença de inflamação no intestino. Posteriormente, Palkovits *et al.*⁶⁹ observaram maiores concentrações de micropartículas de FT/plaquetas em pacientes com DII *comparado aos* controles, mas salientaram que 40% desses pacientes estavam em remissão clínica, sugerindo que mesmo pacientes em remissão podem apresentar processo inflamatório residual suficiente para a liberação do FT e ativação plaquetária. Estes dados foram semelhantes aos do nosso trabalho, porém a melhor estratificação realizada por nós permite melhor caracterizar que esse aumento do FT está relacionado à presença do processo inflamatório no intestino, independente das manifestações clínicas da doença.

Anthoni *et al.*⁷⁰ contribuíram para o melhor entendimento do papel do FT no binômio inflamação x coagulação ao avaliarem o FT em fragmentos de biópsias de cólon em murinos com colite experimental. Os autores observaram maiores concentrações do complexo trombina-antitrombina, além de microtrombos na microvasculatura de murinos com colite *vs.* controles, sendo atribuído a uma maior exposição do FT diante da ruptura endotelial. Em 2011, Palkovits *et al.*⁶⁹ observaram maiores concentrações de micropartículas de FT/plaquetas em pacientes com DII *vs.* controles e que, em até 40% desses pacientes, apresentavam-se em remissão clínica, sugerindo uma possível ativação plaquetária intestinal, mesmo sem doença clinicamente manifesta.

Sharma *et al.*⁷¹ avaliaram, também em estudo experimental, a expressão do FT. Eles observaram que, em murinos que não expressavam o domínio citoplasmático do FT, havia um desenvolvimento normal, sem ativação da coagulação. Quando expostos à LPS bacteriana, eles sobreviveram mais, produziram menos TNF, IL-1 β e IL-6, além de uma menor ativação do NF-K β (após avaliação de extratos nucleares) com menos migração celular (visualizada por microscopia intravital) quando comparados com murinos que expressavam adequadamente o domínio citoplasmático do FT.

Seguindo essa mesma linha de investigação, Nawroth *et al.*, estudando coelhos, mostraram que a IL-1 β estimulava a formação de FT mais de 10 vezes, além de diminuir a ativação da proteína C e do complexo C e S, tornando o ambiente mais hipercoagulável²⁹, reforçando a ligação do processo inflamatório com a hipercoagulabilidade. Dados semelhantes também já foram observados na DC, em que o alto grau de inflamação, demonstrado por uma maior quantidade de IL-1 β e o TNF- α , estimula tanto a formação de micropartículas de FT quanto a formação de complexos catalíticos da coagulação, via complexo TF/VIIa⁶⁹. Esses dados em conjunto corroboram com nosso achado de aumento da concentração do FT na DC, em especial, na presença de inflamação intestinal.

Com o desenvolvimento das técnicas de biologia molecular e a melhor compreensão das vias de ativação, os mecanismos envolvidos na interação da inflamação com a coagulação ficaram mais claros, sendo a via da ativação dos receptores de proteases (PAR) no endotélio uma das principais vias envolvidas. O FT exposto ativa, principalmente, o receptor de protease tipo 2 (PAR-2), já a trombina formada ativa, em especial, o receptor de protease tipo 1 (PAR-1). Ambos promoverão migração celular por meio da ativação de TNF, IL-6 e IL-8⁷²⁻⁷⁴, contribuindo para interação entre o binômio inflamação e coagulação.

No entanto, mesmo sem lesão tecidual e exposição do FT, o próprio processo inflamatório pode ativar as células endoteliais, favorecendo um estado pró-trombótico por meio da secreção de polímeros de FVW. O primeiro estudo a suscitar a associação do FVW e a disfunção endotelial na DII foi o estudo de Gaffney *et al.* publicado na *Gastroenterology* em 1995⁷⁵. Por meio de um inquérito com especialistas referenciados em hemofilia e Doença de von Willebrand, na Inglaterra, eles calcularam a prevalência de DII e compararam com a prevalência estimada nessa subpopulação.

Eles verificaram que, entre 6.433 casos de hemofilia e 3.129 casos de Doença de von Willebrand, havia apenas 4 casos de DC e 9 casos de RCU, com n esperado de 11.97-16.58 e 11.97-16.58, respectivamente, ambos com razão de morbidade protetora em torno de 20-40% com p significativo. Esses dados foram estimados por meio de prevalências de DII reportadas anteriormente na região⁷⁶.

Em 1999, Meucci *et al.*⁷⁷ avaliaram as concentrações do FVW por ELISA em 32 pacientes com RCU, – destes, 10 com atividade clínica e com proteínas de fase aguda (PFA) aumentadas, 6 com doença ativa e PFA normal e 16 em remissão clínica – 27 pacientes com DC – 10 com doença ativa e PFA aumentadas, 12 em remissão clínica e 5 em remissão clínica e PFA aumentados – e 31 controles saudáveis. Foi verificado que não havia diferença estatística entre as concentrações do FVW na DII quando comparado aos controles, mas, quando os pacientes foram estratificados pelas PFA, as concentrações de FVW eram maiores no grupo com PFA aumentadas, sugerindo a importância do processo inflamatório sistêmico na modulação do FVW, mas também que pode ter havido falha na avaliação da atividade inflamatória nos pacientes com DII. Esses dados divergem daqueles observados por nós, uma vez que o FVW estava aumentado nos pacientes com DC, independente da atividade endoscópica. Apenas 1 estudo comparou o FVW com atividade endoscópica na DII, mais precisamente, em pacientes com RCU, que também diverge dos nossos resultados.

Nesse estudo, Zezos *et al.*³⁵ observaram que as concentrações de FVW eram maiores na RCU em atividade (avaliada de forma clínica, laboratorial e endoscópica) vs. RCU inativa ou controles (143% vs. 100% vs. 98% com $p < 0,05$, respectivamente), mas sem diferença entre os produtos da geração de trombina entre os grupos de doença ativa e inativa. Os autores discutem que as concentrações elevadas de FVW poderiam estar relacionadas, principalmente, com a resposta inflamatória, semelhante às demais proteínas de fase aguda^{77,78}. Como adiantado no parágrafo anterior, a expressão e a atividade do FVW em pacientes com DC estavam aumentadas, independente da atividade endoscópica quando comparado ao grupo-controle. Uma clara diferença entre o nosso estudo e ambos apresentados anteriormente se dá pela própria diferença na população estudada (DC vs. RCU), uma vez que a repercussão inflamatória sistêmica, presente na DC, mesmo em remissão clínica, é superior à observada na RCU. Nossos dados são muito semelhantes aos encontrados por Cibor *et al.*, que

mostraram que as concentrações de FVW-Ag e de sua atividade estavam aumentadas tanto na DC quanto na RCU, independente da atividade, quando comparados aos controles.

Nesse mesmo estudo de Cibor *et al.*⁶⁴, as concentrações de ADAMTS-13 foram semelhantes na DC ativa e inativa, bem próximo aos resultados encontrados nesse estudo e no estudo de Feys *et al.*⁷⁹. No entanto, como os pacientes com DC apresentaram maiores níveis de FVW (atividade e antígeno), ao observarmos a relação FVW/ADAMTS-13, percebemos que existe diferença estatística dessa relação nos pacientes com DC quando comparados aos controles. Essa diferença na relação do FVW e a ADAMTS-13 também foi encontrado por Cibor *et al.*⁶⁴.

É possível que, durante a inflamação, essa alteração da relação entre FVW e ADAMTS-13 seja proporcional ao grau e à intensidade da inflamação e possa contribuir com o estado de hipercoagulabilidade nesses pacientes. Baixos níveis de ADAMTS-13 podem ser explicados tanto por consumo em excesso diante dos multímeros de FVW liberados pelo endotélio ativado quanto por uma maior clivagem por proteases liberadas por neutrófilos ativados, tornando a enzima inativa. Na doença com inflamação sistêmica mais grave há uma inibição da síntese de ADAMTS-13 por citocinas inflamatórias, principalmente TNF e a IL-6, não havendo, desta forma, quantidade suficiente da enzima para quebrar os multímeros de VW de alto peso molecular^{80,81}. Além disso, a IL-6 também tem a habilidade de degradar a ADAMTS-13⁴². Esses dados sugerem que o processo inflamatório ao mesmo tempo em que aumenta o FVW, bloqueia o aumento de ADAMTS-13, alterando a sua relação e favorecendo o estado de hipercoagulabilidade.

Déficits congênitos ou adquiridos de ADAMTS-13 podem cursar com trombose, como na Púrpura Trombocitopênica Trombótica, embora a relação FVW:Ag/ADAMTS-13 parece inferir com mais precisão o risco de trombose e coagulopatia nesses pacientes⁷⁹. Ainda traçando um paralelo com a sepse, Claus *et al.*⁴² avaliaram os níveis de FVW:Ag e ADAMTS-13 no plasma de pacientes no pós-operatório de cirurgia cardíaca, na sepse grave e em controles. Os autores encontraram maiores níveis de FVW:Ag e uma deficiência de ADAMTS-13 proporcional ao grau de inflamação. Os autores defendem que relação FVW:Ag/ADAMTS-13 seja utilizada como um índice, na estratificação do risco de trombose. No nosso estudo, observamos

uma redução relativa, mas não uma redução absoluta da concentração de ADAMTS-13, talvez por uma seleção de pacientes menos graves do ponto de vista inflamatório.

A TM também é uma das proteínas que interage diretamente com a inflamação e a coagulação na DII^{82,83}. Em 2004, Faioni *et al.*⁸³ demonstraram uma perda da expressão da TM e do EPCR em biópsias de intestino de pacientes com DII, mas não nos controles. Em contrapartida, as concentrações séricas a TM e do EPCR solúveis estavam aumentados nos pacientes com DII, comparados aos controles. Nossos dados corroboram esse achado. Os autores concluem que isso poderia resultar em uma resistência à ação da proteína C na microvasculatura da mucosa inflamada. No entanto, outra explicação possível seria que o processo inflamatório favoreceria um maior desligamento da TM do endotélio e consequente aumento da TM solúvel, resultando em uma menor ativação da via da proteína C. Essa hipótese é corroborada pelo estudo de Tanaka *et al.*⁸⁴. Eles mostraram que o fator de crescimento do fibroblasto-23 reduz a expressão da TM no endotélio, mas aumenta sua concentração no sobrenadante de cultura de células endoteliais provenientes de cordão umbilical humano. No entanto, Scaldaferri *et al.*³⁸ verificaram que, em cultura de células endoteliais (HIMECS), as citocinas inflamatórias, como o TNF e a IL-1B, suprimem diretamente a expressão do RNAm da TM e do EPCR com subsequente aumento do EPCR solúvel no sobrenadante, mas sem aumento da TM solúvel. Portanto, é possível que, na DC, ocorra tanto uma redução da expressão como uma mobilização da TM ligada ao endotélio.

Reichman-Waemusz *et al.*⁸⁵ avaliaram tanto o FT quanto o TFPI e a TM por meio de anticorpos específicos como o anti-FT, anti-TFPI e anti-TM, respectivamente, em espécimes de biópsias em 26 pacientes com DII, comparando com fragmentos de áreas peritumorais, utilizados como controles. Eles verificaram que havia uma maior expressão do FT na DII, principalmente em miofibroblastos ao redor das criptas intestinais e o inverso acontecia com o TFPI, apresentando uma menor expressão na microvasculatura dos pacientes com DII. Além disso, notaram que a expressão da trombomodulina nos pacientes com DII se dava, principalmente, na superfície das células inflamatórias (mononucleares) ao invés do endotélio como nos controles.

Em relação à geração de trombina, Bernhard *et al.*⁸⁶ avaliaram o potencial de geração de trombina em 22 pacientes pediátricos com DC ativa e inativa, e

compararam com 61 controles saudáveis, utilizando metodologia semelhante à utilizada por nós, entretanto, eles não utilizaram a trombomodulina. Os autores verificaram que as concentrações de ETP foram maiores na doença clinicamente ativa (2135.48 ± 550.72 nM x min) vs. doença inativa e controles (1555 ± 375.08 nM x min), não havendo diferença estatística entre doença inativa e controles. Esses dados não diferem dos nossos, uma vez que só estudamos pacientes em remissão clínica. É interessante notar que houve uma correlação interessante entre o PCDAI e o ETP ($r=0.662$), mas, apesar do PCDAI ser o equivalente ao CDAI em adultos, o índice pediátrico é muito menos subjetivo e apresenta uma melhor correlação com o SES-CD, apesar de ainda insatisfatória. Mesmo subdividindo o grupo remissão em atividade endoscópica e remissão endoscópica, nossos resultados sugerem que seja necessário um maior processo inflamatório sistêmico para ser observada uma diferença na geração de trombina.

Em adultos, Saibeni *et al.* avaliaram o ETP com e sem trombomodulina em 37 pacientes com RCU vs. 37 pacientes com DC vs. controles, através de uma metodologia semelhante ao nosso estudo, porém utilizando concentrações diferentes de fosfolípeos e FT, 1 pM/L e 1 μ mol/L, respectivamente (nós utilizamos 5 pM/L de FT e 4 μ mol/L de fosfolípeos). Eles observaram que a média do ETP foi maior no grupo DII vs. controles (1499 vs. 1261 nM x min), assim como a relação com/sem trombomodulina também foi maior (0.69 vs. 0.62 nM x min). O ETP esteve aumentado em até 35% nos pacientes com DII, principalmente naqueles com proteína C reativa (PCR) elevada quando comparado ao grupo com DC e PCR normal vs. grupo-controle sem DII, sugerindo uma relação com atividade da doença. Os autores descrevem que o ETP nos pacientes com DII se apresentava mais elevado mesmo após a adição de TM, condição que não acontecia no plasma dos controles saudáveis. Essa resistência à ação da TM poderia se traduzir num estado de hipercoagulabilidade. Porém, esse estudo não avaliou a TM sérica e, como a atividade da Proteína C não foi diferente entre DII e controles, eles suscitam a hipótese de que essa resistência advém de fatores pró-coagulantes mais elevados no grupo de DII em atividade clínica, como o FVIII mais aumentado. Nosso trabalho diverge em um ponto importante desse trabalho, que é a resposta à trombomodulina *in vitro*, atribuída a resistência à proteína C. A inclusão da dosagem da TM em nosso trabalho permite aventar uma hipótese mais coerente

com os dados da literatura^{38,83}, no qual o processo inflamatório reduziria a ativação da proteína C em decorrência de uma modulação da TM no endotélio e não especificamente por uma resistência primária da proteína C. Outra crítica ao trabalho de Saibeni *et al.* é o número de pacientes e a inclusão de pacientes com DC e RCU no mesmo grupo tornando o estudo heterogêneo, além da não utilização da avaliação endoscópica.

Apesar dos valores semelhantes do ETP entre os 3 grupos, o fato de termos encontrado maiores valores do pico de geração de trombina entre pacientes com DC vs. controles, este pode ser mais um parâmetro que indica uma certa hipercoagulabilidade nesse grupo de pacientes. Um dos estudos mais importantes sobre a avaliação específica desse parâmetro foi desenvolvido por Lutsey *et al.* Nesse estudo prospectivo, eles relacionaram o pico basal da geração de trombina com o risco de TEV numa amostra multicêntrica caso-controle (434 casos e 1004 controles)⁶⁵. Através do método de regressão logística ajustado por idade, sexo, raça, centro de estudo e IMC foi encontrado um OR para TEV de 1,74 (1,28-2,37) nos pacientes com valores acima da mediana do primeiro quartil do pico de geração de trombina, principalmente em relação aos pacientes com TEV idiopática.

Em se tratando do rastreamento de trombofilias já conhecidas, sejam elas adquiridas ou não, nosso estudo identificou prevalências consideráveis de deficiência de AT (10%), anticardiolipina IgM 10%, anticardiolipina IgG 6%, proteína C (3%), proteína S (3%), mutação do gene da protrombina em 6%, resistência à proteína C ativada de 5%, anticoagulante lúpico 4%, e o Fator V de Leiden mutado em apenas 1 paciente dos 8 testados (12,5%), sendo o único fator mais prevalente no grupo de AE vs RE, a presença do anticoagulante lúpico (8% vs 1%, $p=0,047$). Entretanto, não foi possível a comparação desses resultados com nosso grupo controle. Embora os estudos não evidenciem que haja uma maior prevalência de trombofilia nos pacientes com DII vs controles^{9,13}, nesta tese observamos uma alta prevalência principalmente de deficiência de antitrombina, anticardiolipina IgM e Proteínas C e S nos pacientes com DC, quando comparado com dados da literatura (Tabela 10), extraída do estudo de Saskia Middeldorp⁸⁷.

Tabela 10 - Tabela extraída do artigo de Saskia Middeldorp⁸⁷ com valores sobre a prevalência das principais trombofilias na população geral

	Antithrombin deficiency	Protein C deficiency	Protein S deficiency	Factor V Leiden	Prothrombin 20210A mutation	Lupus anticoagulant*	Anti- cardiolipin antibodies*	Anti-β2 GPI antibodies
Prevalence in the general population	0.02%	0.2%	0.03%-0.13%	3-7%	0.7%-4%	1%-8 %	5	3.4
Relative risk for a first venous thrombosis	5-10	4-6.5	1-10	3-5	2-3	3-10	0.7	2.4
Relative risk for recurrent venous thrombosis	1.9-2.6	1.4-1.8	1.0-1.4	1.4	1.4	2-6	1-6	
Relative risk for arterial thrombosis	No association	No consistent association	No consistent association	1.3	0.9	10	1.5-10	
Relative risk for pregnancy complications	1.3-3.6	1.3-3.6	1.3-3.6	1.0-2.6	0.9-1.3	No consistent data	No consistent data	

Estudos que avaliaram a coagulação na DII reportam que parte desses pacientes apresentam concentrações reduzidas de antitrombina sérica quando comparados a controles saudáveis^{88,89}, questionando a indicação de heparina como a principal droga para profilaxia de TEV nesses pacientes, uma vez que a heparina necessita da antitrombina para exercer seus efeitos anticoagulantes (inativação dos fatores II, IX e X). Em nosso estudo retrospectivo⁶, boa parte dos pacientes internados desenvolveram trombose mesmo com profilaxia com heparina.

Por outro lado, a deficiência de Proteína C e/ou S, além da resistência da proteína C ativada, podem sugerir certo grau de resistência à ação da trombomodulina nesses pacientes, e, esta pode ser uma explicação tanto para os maiores níveis da trombomodulina sérica, por mecanismo compensatório, quanto pelos maiores níveis de FVIII, pela inabilidade em bloquear sua atividade. Já a maior prevalência de anticorpos antifosfolípides pode ser explicada pela alta reatividade na DC com a formação de um grande número de autoanticorpos contra antígenos da microbiota intestinal. O mais relevante deles na DC é o ASCA (anti-Saccharomyces cerevisiae antibody). Estudos têm demonstrado que há reatividade cruzada entre epítomos do ASCA e de anticorpos antifosfolípides, e que isso perpetuaria processos inflamatórios microvasculares⁹⁰.

Outro ponto relevante é a avaliação da fibrinólise, abordado apenas indiretamente nesse ou em outros trabalhos da literatura. Zhang *et al.*⁴⁵ demonstraram que, em 108 pacientes com CD, as concentrações de D-dímero e fibrinogênio eram significativamente maiores que 108 controles saudáveis (335 vs. 140 mcg/L e 3,5 vs. 2,5 mg/dl, respectivamente), mas sem relação com a atividade clínica. Em nosso estudo, os dois marcadores estudados da fibrinólise, fibrinogênio e D-dímero, não foram diferentes entre os grupos de atividade vs. remissão, achados alinhados com o estudo supracitado, entretanto, não avaliamos as concentrações de fibrinogênio e D-dímero no grupo-controle.

O presente estudo apresenta como limitação a avaliação de forma transversal dos principais parâmetros da coagulação, sem permitir avaliar o impacto da resolução do processo inflamatório sobre esses fatores, em especial, o FT.

6 CONCLUSÃO

6 CONCLUSÃO

Esse é o primeiro estudo a avaliar a interferência da atividade endoscópica na hemostasia dos pacientes com DC, com o principal achado de que mesmo na DC subclínica, os pacientes esboçam um perfil mais hipercoagulável quando comparados a controles saudáveis, sendo que aqueles com atividade endoscópica podem ativar mais a cascata, por apresentar mais lesão endotelial e exposição do fator tecidual. Em geral, o balanço da coagulação, demonstrado pelo potencial de geração de trombina, parece não estar alterado na DC subclínica. A necessidade de recursos compensatórios pode limitar a capacidade de compensação durante um evento agudo e favorecer um episódio tromboembólico.

7 ANEXOS

7.1 Anexo A – Aprovação CAPPESP

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA USP - HCFMUSP
PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP		
DADOS DO PROJETO DE PESQUISA		
Título da Pesquisa: Correlação do potencial de geração de trombina e atividade endoscópica na doença de Crohn		
Pesquisador: André Zonetti de Arruda Leite		
Área Temática:		
Versão: 2		
CAAE: 43502715.2.0000.0068		
Instituição Proponente: HOSPITAL DAS CLINICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA U S P		
Patrocinador Principal: FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO		
DADOS DO PARECER		
Número do Parecer: 1.076.648		
Data da Relatoria: 20/05/2015		
Apresentação do Projeto:		
Correlação do potencial de geração de trombina e atividade endoscópica na doença de Crohn.		
Objetivo da Pesquisa:		
Trata-se de estudo prospectivo multicentrico cujo objetivo é comparar o potencial de geração de trombina em pacientes com doença de Crohn em remissão clínica, com ou sem atividade inflamatória intestinal.		
Avaliação dos Riscos e Benefícios:		
Os benefícios serão para os futuros pacientes que poderão ser identificação maior risco de trombose e que poderiam se beneficiar no futuro da profilaxia medicamentosa para TEV.		
Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:		
Nenhum.		
Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:		
Nenhum.		
Recomendações:		
Solicitado pelo pesquisador correção ortográfica do TCLE e suspensão do uso do índice completo de avaliação a atividade endoscópica (CDIES) além modificar o desenho do estudo (de transversal		
Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar Bairro: Cerqueira Cesar CEP: 05.403-010 UF: SP Município: SÃO PAULO Telefone: (11)2661-7585 Fax: (11)2661-7585 E-mail: cappesq.adm@hc.fm.usp.br		

7.2 Anexo B - Termo de Outorga - FAPESP

Para uso exclusivo da FAPESP
Processo: 2015/06196-0
Data impressão: 27/10/2015 16:28:22
Folha: _____
Volume: _____
Rubrica: _____

FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO

TERMO DE OUTORGA E ACEITAÇÃO DE AUXÍLIOS

PROCESSO 2015/06196-0

Pelo presente instrumento, a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, com sede na Rua Pio XI, nº 1.500, Alto da Lapa, São Paulo, Capital, inscrita no CNPJ/MF sob nº 43.828.151/0001-45, doravante denominada OUTORGANTE, por meio de seu Conselho Técnico-Administrativo, nos termos do Artigo 14, letra "b", da Lei Estadual nº 5.918, de 18 de outubro de 1960, concede ao OUTORGADO, a seguir qualificado, Auxílio para a realização do Projeto de Pesquisa a seguir especificado, nas instalações e com o apoio da INSTITUIÇÃO SEDE, de acordo com as especificações, cláusulas e condições descritas a seguir e nos Anexos, que passam a ser parte integrante deste Termo.

1.OUTORGADO:	André Zonetti de Arruda Leite CPF: 797.036.829-87 RG: 8893715-SSP/SP
2.Correspondência:	Rua Alves Guimarães, 689 - Apto 162, Pinheiros, São Paulo/SP, CEP 05410-001 azaleite@gmail.com
3.Instituição Sede:	Hospital das Clínicas de São Paulo/HC Secretaria Estadual da Saúde de São Paulo/SSSP
4.Projeto de Pesquisa:	Correlação do potencial de geração de trombina e atividade endoscópica na doença de Crohn
5.Linha de Fomento:	Programas Regulares / Auxílios a Pesquisa / Projeto de Pesquisa / Projeto de Pesquisa - Regular
6.Área/Subárea:	Medicina Clínica Médica
7.Coordenação:	Saúde I
8.Período da Vigência:	01/11/2015 a 31/10/2017
9.Relatórios Científicos:	30/10/2016, 30/11/2017
10.Prestações de Contas:	30/10/2016, 30/11/2017

7.3 Anexo C – Critérios de Elegibilidade

Confidential

Trombose na doença de Crohn
Page 1 of 3

Critérios de Inclusão e Exclusão

Study ID

Tem diagnóstico de Crohn comprometendo o íleo terminal e/ou o cólon confirmado?

☐ Yes
☐ No

O tratamento foi alterado nos últimos 3 meses?

☐ Yes
☐ No

O paciente tem mais de 18 anos?

☐ Yes
☐ No

Pergunte ao paciente qual é a impressão dele sobre a atividade da sua doença nesse momento

Remissão Clínica Atividade Clínica

(Place a mark on the scale above)

Qual a sua impressão em relação a atividade da doença?

Remissão Clínica Atividade Clínica

(Place a mark on the scale above)

O paciente tem evidência de colite infecciosa (CMV, TB, clostridium), colite isquêmica, colite actínica ou faz uso de AINE?

☐ Yes
☐ No

Faz uso atual de drogas que interferiram na coagulação (Anticoagulantes orais, AAS, clopidogrel, heparina, anti-fibrinolítico, eritropoetina) ?

☐ Yes
☐ No

Tem desordem hepática descompensada ou insuficiência renal ?

☐ Yes
☐ No

Está gestante ou amamentando ?

☐ Yes
☐ No

Tem ou teve câncer há menos de 5 anos ?

☐ Yes
☐ No

Recebeu transfusão de hemocomponentes nos últimos 10 dias ?

☐ Yes
☐ No

O paciente realizou cirurgia de médio e grande porte nas últimas 4 semanas ou alguma ressecção intestinal há menos de 6 meses ?

☐ Yes
☐ No

Confidential

Page 2 of 3

O paciente já realizou colectomia total ou tem estomia ?

☐ Yes
☐ No

O paciente tem comprometimento da doença em local não acessível a colonoscopia (ex.: jejuno)?

☐ Yes
☐ No

O paciente preenche os critérios para participar do estudo?
1 = Sim
2 = Não

O paciente concorda em ser contactado por telefone para orientações sobre o protocolo e agendamento de uma visita inicial?

☐ Yes
☐ No

Nome (completo)

Centro participante

☐ HC-FMUSP
☐ Outro

RG-HC

(Apenas para pacientes HC)

Identificação local

(Apenas para pacientes de outros centros)

Telefone de contato do paciente

(Incluir código de área (DD))

Telefone residencial (paciente)

(Incluir código de área (DD))

Telefone comercial (paciente)

(Incluir código de área (DD))

Celular (paciente)

(Incluir código de área (DD))

O paciente já tem colonoscopia agendada?

☐ Yes
☐ No

Data que a colonoscopia está agendada

Informações adicionais

Imprimir e orientar o paciente para preencher em casa na semana anterior a realização da colonoscopia e trazer no dia do exame.

OBS.: O preenchimento do diário deve terminar antes do início do preparo da colonoscopia!

[Attachment: "Arquivos para impressão.pdf"]

Pedido de colonoscopia

[Attachment: "Colonoscopia.pdf"]

Orientação para coleta da calprotectina

[Attachment: "CALEX.pdf"]

Confidential

Page 3 of 3

O termo de consentimento, qualidade de vida e o diário foram impressos e entregues ao paciente? Foi solicitado a colonoscopia?

☐ Yes
☐ No

Médico responsável pelo preenchimento

7.4 Anexo D – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME:
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº: C PF: :
SEXO : .Masculino ☐ Feminino ☐ DATA NASCIMENTO:/...../.....
ENDEREÇO
Nº APTO: BAIRRO:
CIDADE CEP:.....
TELEFONE: DDD (.....)

DADOS SOBRE A PESQUISA

TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA :
Correlação do potencial de geração de trombina e atividade endoscópica na doença de Crohn
PESQUISADOR : **André Zonetti de Arruda Leite**
CARGO/FUNÇÃO: **Médico** INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº **77910**
UNIDADE DO HCFMUSP: **Gastroenterologia**

2. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO	☒	RISCO MÉDIO	☐
RISCO BAIXO	☐	RISCO MAIOR	☐

3. DURAÇÃO DA PESQUISA : **2 anos**

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

Proposta

Você está sendo convidado a participar de um estudo clínico com objetivo de avaliar a coagulação do sangue em pacientes com doença de Crohn. A participação desse estudo é voluntária, não remunerada e você terá total liberdade de deixar de participar do estudo a qualquer momento, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição.

Este estudo avaliará a relação da atividade inflamatória na colonoscopia com as alterações na coagulação do sangue. Os avanços na área de saúde ocorrem através de estudos como este, por isso sua participação e consentimento são muito importantes. Este documento faz parte do processo de consentimento livre e esclarecido e tem como objetivo informar-lhe sobre o estudo e o que pode acontecer se você decidir participar dele.

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

Procedimentos previstos

Se você decidir participar do estudo, no momento da colonoscopia solicitada pelo seu médico devido a sua própria doença, você terá que preencher um diário com as informações necessárias para o cálculo do índice de atividade clínica da doença de Crohn (CDAI), que consiste basicamente em anotar o número de evacuações líquidas, a presença de dor abdominal e a sensação de bem estar geral durante uma semana antes da realização da colonoscopia. Você também receberá um questionário com 32 perguntas para avaliar a qualidade de vida, específico para portadores de doença inflamatória intestinal. No dia do exame será coletado uma amostra extra de 20 ml de sangue. Durante o exame de colonoscopia o médico responsável pelo exame preencherá o índice simplificado de atividade endoscópica para doença de Crohn, sem qualquer interferência na realização do exame e sem coleta de material adicional para o estudo. Você será seguido por 1 ano com consultas a cada 3 meses para verificar a ocorrência de algum evento trombótico, avaliação da atividade inflamatória através da calprotectina fecal e coleta de nova amostra de sangue para a dosagem do potencial de geração de trombina e D-dímero.

Riscos esperados dos procedimentos rotineiros e experimentais

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

O exame de colonoscopia pode ocasionar perfuração ou sangramento no intestino, geralmente associado a realização de procedimentos endoscópicos como a retirada de polipos ou dilatações. A sedação para a realização do exame também pode, raramente, estar associada a reações adversas como confusão mental reversível, queda da pressão arterial, falta de ar e/ou depressão respiratória. Essas complicações ocorrem **raramente** e estão relacionadas à própria realização do exame de colonoscopia. É importante salientar que a sua colonoscopia foi solicitada pelo seu médico para o seguimento da sua doença e não para você participar do estudo.

Benefícios

Não há benefício direto para você. O estudo poderá identificar pacientes com maior risco de trombose que poderiam se beneficiar de medicações que evitam a ocorrência de trombose venosa profunda.

Armazenamento de amostras em biorrepositório

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

Garantia de acesso:

Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é o **Dr André Zonetti de Arruda Leite**, que pode ser encontrado no endereço **Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 255, ICHC. 9º andar, sala 9159; CEP 05403-000 - São Paulo / SP; Telefone(s) 2661-6447**. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires

de Campos, 225 – 5º andar – tel: 3069-6442 ramais 16, 17, 18 ou 20, FAX: 3069-6442 ramal 26 – E-mail: cappelq@hcnet.usp.br.

Garantida a liberdade da retirada de consentimento

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

Direito de confidencialidade

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

Direito de ser mantido atualizado

Os resultados dos exames serão lançados no sistema de laudos do laboratório central e o resultado da pesquisa será divulgado a você conforme o seu interesse. No entanto, é importante salientar que o sangue inicialmente será armazenado e o teste só será realizado após a coleta de todos os pacientes que participarão do estudo, o que pode prolongar a divulgação dos resultados.

Despesas e compensações

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

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

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, sobre o estudo "Correlação do potencial de geração de trombina e atividade endoscópica na doença de Crohn".

Eu discuti com o Dr. **André Zonetti de Arruda Leite** sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficou claro para mim quais os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, a garantia de confidencialidade e de esclarecimento permanente. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades, prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Assinatura do paciente

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 ____ / ____ / ____

7.5 Anexo E – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (grupo-controle)

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

I. NOME:
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : CPF:
SEXO : ☐ Masculino ☐ Feminino ☐ DATA NASCIMENTO:/...../.....
TELEFONE: DDD (.....)

DADOS SOBRE A PESQUISA

TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA :

Correlação do Potencial de Geração de Trombina e Atividade Endoscópica na Doença de Crohn Grupo Controle

PESQUISADORES : André Zonetti de Arruda Leite (CRM 77910); Adriana Ribas Andrade (CRM/BA 22787)

Proposta

Você está sendo convidado a participar do grupo controle de um estudo clínico com objetivo de avaliar o risco de trombose na Doença de Crohn. Entenda-se por grupo controle, um grupo de indivíduos saudáveis, que terá o sangue coletado, analisado e comparado com os indivíduos com Doença de Crohn. Para participar é imprescindível que você tenha menos que 65 anos, nunca tenha tido trombose, não use anticoncepcional, não esteja gestante ou amamentando, não tenha histórico de tabagismo, não use antiplaquetário ou anticoagulante, e não tenha doença renal, hepática, câncer ativo ou nenhuma doença que predisponha a formação de trombose (trombofilias). A participação desse estudo é voluntária, não remunerada e você terá total liberdade de deixar de participar do estudo a qualquer momento, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição.

Procedimentos previstos

Se você decidir participar do estudo, serão coletadas amostras de sangue (ao todo, 8 tubos) e preenchimento de formulário específico.

Riscos esperados dos procedimentos rotineiros e experimentais

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

Benefícios

Este estudo apesar de não trazer nenhum benefício para você, há um benefício global para os pacientes com Doença de Crohn na medida em que o resultado de suas amostras sanguíneas contribuirão para um resultado sobre o risco de trombose nesses pacientes.

Garantida a liberdade da retirada de consentimento

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

Direito de confidencialidade

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

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo **"Correlação do Potencial de Geração de Trombina e Atividade Endoscópica na Doença de Crohn - Grupo Controle."**

Eu discuti com a Dra. **Adriana Ribas Andrade** sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, o procedimento a ser realizado e seus desconfortos e riscos. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Assinatura do paciente

Data ____ / ____ / ____

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

Data ____ / ____ / ____

7.6 Anexo F – Formulário de avaliação da atividade clínica pelo CDAI e HB

Nome: _____

Diário do pacientes para preenchimento do CDAI

Dia da semanas								Dia do início do preparo para a colonoscopia / /
Nº total de evacuações								
Nº de evacuações líquidas								
Dor Abdominal 0→Ausente 1→Leve 2→Moderada 3→Intensa								
Bem estar 0→Ótimo 1→Bom 2→Regular 3→Ruim 4→Péssimo								

Instrução:

1. Completar essa ficha ao deitar-se todas as noites por 1 semanas antes do início do preparo para a colonoscopia
2. Responder baseado nos sintomas das últimas 24h
3. Responder conforme a coluna da esquerda

7.7 Anexo G – Características laboratoriais dos pacientes incluídos no estudo, incluindo grupo controle

Variável	Atividade endoscópica N=75	Remissão endoscópica N=89	Controles N=50	P Valor
Hemoglobina	14 ± 1,49	14,5 ± 1,56		0,047
Leuco	6.950 [5.810-8.125]	6.160 [5.190-7.982]		0,157
Plaquetas	276 [231-326]	242 [210-304]		0,012
Dímero	350 [236-565]	340 [193-487]		0,222
Fibrinogênio	339 [289-401]	305 [231-360]		0,012
Proteína C	119 [100-128]	118 [103-128]		0,911
Proteína S	95 [81-105]	92 [80-109]		0,768
Fator VIII (%)	150 [118-181]*	144 [114-189]+	90 [66-101]*+	0,001
FVW (%)	160 [119-198]*	168 [137-209]+	110 [95-140]*+	0,001
Atividade FVW (cofator de ristocetina) (%)	150 [125-190]*	145 [117-183]+	108 [90-136]*+	0,001
ADAMTS-13 (%)	0,87 [0,74-0,95]	0,72 [0,63-0,96]	0,68 [0,54-1,25]	0,077
Relação FVW/ADAMTS-13	191 [127-254]	219 [156-291]	138 [81-232]	0,003
Trombomodulina (ng/mL)	5,13 [3,87-7,51]*	4,91 [3,4-6,53]+	3,81 [2,62-4,43]*+	0,001
Fator tecidual (pM)	127 [101-165]*	103 [77-137]*	84 [71-98]*	0,001
ETP sem trombo (nM x minuto)	1674 [1412-1913]	1680 [1450-1823]	1654 [1407-1858]	0,378
ETP com trombo (nM x minuto)	609 [367-870]	539 [319-820]	650 [459-924]	0,150
Relação com/sem	0,37 [0,23-0,46]	0,31 [0,19-0,51]*	0,43 [0,28-0,59]*	0,052

*/+ p<0,001 é considerado significativo

8 REFERÊNCIAS

8 REFERÊNCIAS

1. Gomollón F, Dignass V, Annese V, Tilg H, Assche GV, Lindsay JO, Peyrin-Biroulet L, Cullen GJ, Daperno M, Kucharzik T. 3rd European Evidence-based Consensus on the Diagnosis and Management of Crohn's Disease 2016: Part 1: Diagnosis and Medical Management. *J Crohns Colitis*. 2017 Jan;11(1):3–25.
2. Molodecky NA, Soon IS, Rabi DM, Ferris M, Chernoff G, Benchimol EI, Panaccione R, Ghosh S, Barkema HW, Kaplan GG. Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review. *Gastroenterology*. 2012 Jan;142(1):46–54.e42;quiz e30.
3. Murthy SK, Nguyen GC. Venous thromboembolism in inflammatory bowel disease: an epidemiological review. *Am J Gastroenterol*. 2011;106:713–8.
4. Fumery M, Xiaocang C, Dauchet L, Gower-Rousseau C, Peyrin-Biroulet L, Colombel JF. Thromboembolic events and cardiovascular mortality in inflammatory bowel diseases: a meta-analysis of observational studies. *J Crohns Colitis*. 2014;8:469–79.
5. Nguyen GC, Sam J. Rising Prevalence of Venous Thromboembolism and Its Impact on Mortality Among Hospitalized Inflammatory Bowel Disease Patients. *Am J Gastroenterol*. 2008;103:2272–80.
6. Andrade AR, Barros LL, Azevedo MFC, Carlos AS, Damião AOMC, Sipahi AM, Leite AZA. Risk of thrombosis and mortality in inflammatory bowel disease. *Clin Transl Gastroenterol*. 2018 Apr 3;9(4):142.
7. Søgaaard KK, Schmidt M, Pedersen L, Horváth-Puhó E, Sørensen HT. 30-year mortality after venous thromboembolism: a population-based cohort study. *Circulation*. 2014;130:829–36.
8. Novacek G, Weltermann A, Sobala A, Tilg H, Petritsch W, Reinisch W, Mayer A, Haas T, Kaser A, Feichtenschlager T, Fuchssteiner H, Knoflach P, Vogelsang H, Miehsler W, Platzer R, Tillinger W, Jaritz B, Schmid A, Blaha B, Dejaco C, Eichinger S. Inflammatory Bowel Disease Is a Risk Factor for Recurrent Venous Thromboembolism. *Gastroenterology*. 2010;139:779–87.e1.
9. Harbord M, Annese V, Vavricka SR, Allez M, Barreiro-de Acosta M, Boberg KM, Burisch J, De Vos M, De Vries AM, Dick AD, Juillerat P, Karlsen TH, Koutroubakis I, Lakatos PL, Orchard T, Papay P, Raine T, Reinshagen M, Thaci D, Tilg H, Carbonnel F. The First European Evidence-based Consensus on Extra-intestinal Manifestations in Inflammatory Bowel Disease. *J Crohns Colitis*. 2016;10:239–54.

10. Miehsler W, Reinisch W, Valic E, Osterode W, Tillinger W, Feichtenschlager T, Grisar J, Machold K, Scholz S, Vogelsang H, Novacek G. Is inflammatory bowel disease an independent and disease specific risk factor for thromboembolism? *Gut*. 2004;53:542–8.
11. Klok FA, van Kralingen KW, van Dijk AP, Heyning FH, Vliegen HW, Kaptein AA, Huisman MV. Quality of life in long-term survivors of acute pulmonary embolism. *Chest*. 2010;138:1432–40.
12. Kahn SR, Shbaklo H, Lamping DL, Holcroft CA, Shrier I, Miron MJ, Roussin A, Desmarais S, Joyal F, Kassis J, Solymoss S, Desjardins L, Johri M, Ginsberg JS. Determinants of health-related quality of life during the 2 years following deep vein thrombosis. *J Thromb Haemost*. 2008;1105–12.
13. Nguyen GC, Bernstein CN, Bitton A, Chan AK, Griffiths AM, Leontiadis GI, Geerts W, Bressler B, Butzner JD, Carrier M, Chande N, Marshall JK, Williams C, Kearon C. Consensus Statements on the Risk, Prevention, and Treatment of Venous Thromboembolism in Inflammatory Bowel Disease: Canadian Association of Gastroenterology. *Gastroenterology*. 2014;146:835–48.e6.
14. Nguyen GC, Sharma S. Feasibility of Venous Thromboembolism Prophylaxis During Inflammatory Bowel Disease Flares in the Outpatient Setting: A Decision Analysis. *Inflamm. Bowel Dis*. 2013;19:2182–9.
15. Peyrin-Biroulet L, Reinisch W, Colombel JF, Mantzaris GJ, Kornbluth A, Diamond R, Rutgeerts P, Tang LK, Cornillie FJ, Sandborn WJ. Clinical disease activity, C-reactive protein normalisation and mucosal healing in Crohn's disease in the SONIC trial. *Gut*. 2014;63:88–95.
16. Macfarlane RG. An enzyme cascade in the blood clotting mechanism, and its function as a biochemical amplifier. *Nature*. 1964;202:498–9.
17. Geddings JE, Mackman N. New players in haemostasis and thrombosis. *Thromb Haemost*. 2014;111:570–4.
18. Gailani D, Broze GJ. Factor XI activation by thrombin and factor XIa. *Semin. Thromb Hemost*. 1993;19:396–404.
19. Oliver JA, Monroe DM, Roberts HR, Hoffman M. Thrombin activates factor XI on activated platelets in the absence of factor XII. *Arterioscler. Thromb Vasc Biol*. 1999;19:170–7.
20. Clínica Médica. Vol. 3 - 2ª Ed. 2015. *Default Store View* [cited 2018 May 20]. Available from: <https://www.saraiva.com.br/clinica-medica-vol-3-2-ed-2015-9254975.html>.
21. Monroe DM, Hoffman M. What does it take to make the perfect clot? *Arterioscler. Thromb Vasc Biol*. 2006;26:41–8.

22. Hoffman M, Monroe DM. A cell-based model of hemostasis. *Thromb Haemost.* 2001;85:958–65.
23. Turpie AGG, Esmon C. Venous and arterial thrombosis--pathogenesis and the rationale for anticoagulation. *Thromb Haemost.* 2011;105:586–96.
24. Cibor D. Endothelial dysfunction in inflammatory bowel diseases: pathogenesis, assessment and implications. *World J Gastroenterol.* 2016;22:1067.
25. Roifman I, Sun YC, Fedwick JP, Panaccione R, Buret AG, Liu H, Rostom A, Anderson TJ, Beck PL. Evidence of Endothelial Dysfunction in Patients With Inflammatory Bowel Disease. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2009;7:175–82,
26. Senchenkova E, Seifert H, Granger D. Hypercoagulability and platelet abnormalities in inflammatory bowel disease. *Semin Thromb Hemost.* 2015;41:582–9.
27. Steyers C, Miller F. Endothelial Dysfunction in Chronic Inflammatory Diseases. *Int J Mol Sci.* 2014;15:11324–49.
28. Joseph L, Fink LM, Hauer-Jensen M. Cytokines in coagulation and thrombosis: a preclinical and clinical review. *Blood Coagul Fibrinolysis Int J. Haemost. Thromb.* 2002;13:105–16.
29. Nawroth PP, Handley DA, Esmon CT, Stern DM. Interleukin 1 induces endothelial cell procoagulant while suppressing cell-surface anticoagulant activity. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 1986;83:3460–4.
30. Coenraad Hemker H, Dieri RA, De Smedt E, Béguin S. Thrombin generation, a function test of the haemostatic/thrombotic system. *Thromb Haemost.* 2006.
31. Hemker HC, Giesen P, Al Dieri R, Regnault V, de Smedt E, Wagenvoort R, Lecompte T, Béguin S. Calibrated automated thrombin generation measurement in clotting plasma. *Pathophysiol Haemost Thromb.* 2003;33:4–15.
32. Tripodi A. Thrombin Generation Assay and Its Application in the Clinical Laboratory. *Clin Chem.* 2016;62:699–707.
33. Tripodi A, Primignani M, Chantarangkul V, Dell'Era A, Clerici M, de Franchis R, Colombo M, Mannucci PM. An Imbalance of Pro- vs Anti-Coagulation Factors in Plasma From Patients With Cirrhosis. *Gastroenterology.* 2009;137:2105–11.
34. Tripodi A, Mannucci PM. The coagulopathy of chronic liver disease. *N Engl J Med.* 2011;365:147–56.
35. Zazos P, Papaioannou G, Nikolaidis N, Vasiliadis T, Giouleme O, Evgenidis N. Elevated plasma von Willebrand factor levels in patients with active ulcerative colitis reflect endothelial perturbation due to systemic inflammation. *World J Gastroenterol.* 2005;11:7639–45.

36. van der Poll T, van Deventer SJ, Pasterkamp G, van Mourik JA, Büller HR, ten Cate JW. Tumor necrosis factor induces von Willebrand factor release in healthy humans. *Thromb Haemost.* 1992;67:623–6.
37. Paleolog EM, Crossman DC, McVey JH, Pearson JD. Differential regulation by cytokines of constitutive and stimulated secretion of von Willebrand factor from endothelial cells. *Blood.* 1990;75:688–95.
38. Scaldaferri F, Sans M, Vetrano S, Graziani C, De Cristofaro R, Gerlitz B, Repici A, Arena V, Malesci A, Panes J, Grinnell BW, Danese S. Crucial role of the protein C pathway in governing microvascular inflammation in inflammatory bowel disease. *J Clin Invest.* 2007;117:1951–60.
39. Gilbert GE, Novakovic VA, Shi J, Rasmussen J, Pipe SW. Platelet binding sites for factor VIII in relation to fibrin and phosphatidylserine. *Blood.* 2015;126:1237–44.
40. Spronk HMH, ten Cate H, van der Meijden PEJ. Differential roles of tissue factor and phosphatidylserine in activation of coagulation. *Thromb Res.* 2014;133(1):S54-6.
41. Zheng XL. ADAMTS13 and von Willebrand Factor in Thrombotic Thrombocytopenic Purpura. *Annu Rev Med.* 2015;66:211–25.
42. Claus RA, Bockmeyer CL, Budde U, Kentouche K, Sossdorf M, Hilberg T, Schneppenheim R, Reinhart K, Bauer M, Brunkhorst FM, Lösche W. Variations in the ratio between von Willebrand factor and its cleaving protease during systemic inflammation and association with severity and prognosis of organ failure. *Thromb Haemost.* 2009;101:239–47.
43. Skipwith CG, Cao W, Zheng XL. Factor VIII and platelets synergistically accelerate cleavage of von Willebrand factor by ADAMTS13 under fluid shear stress. *J Biol Chem.* 2010;285:28596–603.
44. Cesarman-Maus G, Hajjar KA. Molecular mechanisms of fibrinolysis. *Br J Haematol.* 2005;129:307–21.
45. Zhang J, Guo Z, Yang W, Zhu Z, Kong W, Zheng S, Jiang L, Fei X, Chen Y, Liu J. D-Dimer levels are correlated with disease activity in Crohn's patients. *Oncotarget.* 2017;8:63971–7.
46. Heeb MJ, Koenen RR, Fernández JA, Hackeng T. M. Direct anticoagulant activity of protein S-C4b binding protein complex in Heerlen heterozygotes and normals. *J Thromb Haemost.* 2004;1766–73.
47. Aadland E, Odegaard OR, Røseth A, Try K. Free protein S deficiency in patients with chronic inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol.* 1992;27:957–60.

48. Vetrano S, Ploplis VA, Sala E, Sandoval-Cooper M, Donahue DL, Correale C, Arena V, Spinelli A, Repici A, Malesci A, Castellino FJ, Danese S. Unexpected role of anticoagulant protein C in controlling epithelial barrier integrity and intestinal inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Dec 6;108(49):9830–5.
49. Yoshida H, Russell J, Granger DN. Thrombin mediates the extraintestinal thrombosis associated with experimental colitis. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol*. 2008;295:G904–8.
50. Gómez-Puerta JA, Cervera R. Diagnosis and classification of the antiphospholipid syndrome. *J Autoimmun*. 2014 Feb-Mar;48-49:20–5.
51. Citing REDCap. [cited 2017 Aug 17]. Available from: <https://redcapinfo.ucdenver.edu/citing-redcap.html>.
52. Saibeni S, Saladino V, Chantarangkul V, Villa F, Bruno S, Vecchi M, de Franchis R, Sei C, Tripodi A. Increased thrombin generation in inflammatory bowel diseases. *Thromb Res*. 2010;125:278–82.
53. Gasche C, Scholmerich J, Brynskov J, D'Haens G, Hanauer SB, Irvine EJ, Jewell DP, Rachmilewitz D, Sachar DB, Sandborn WJ, Sutherland LR. A simple classification of Crohn's disease: report of the Working Party for the World Congresses of Gastroenterology, Vienna 1998. *Inflamm Bowel Dis*. 2000;6:8–15.
54. Peyrin-Biroulet L, Panés J, Sandborn WJ, Vermeire S, Danese S, Feagan BG, Colombel JF, Hanauer SB, Rycroft B. Defining Disease Severity in Inflammatory Bowel Diseases: Current and Future Directions. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2016;14:348–54.
55. Daperno M, D'Haens G, Van Assche G, Baert F, Bulois P, Maunoury V, Sostegni R, Rocca R, Pera A, Gevers A, Mary JY, Colombel JF, Rutgeerts P. Development and validation of a new, simplified endoscopic activity score for Crohn's disease: the SES-CD. *Gastrointest Endosc*. 2004;60:505–12.
56. Rutgeerts P, Geboes K, Vantrappen G, Beyls J, Kerremans R, Hiele M. Predictability of the postoperative course of Crohn's disease. *Gastroenterology*. 1990;99:956–63.
57. Bayart P, Duveau N, Nachury M, Zerbib P, Gerard R, Branche J, Maunoury V, Wils P, Boruchowicz A, Boualit M, Laberenne JE, Manolache O, Desreumaux P, de Chambrun GP, Pariente B. Ileal or Anastomotic Location of Lesions Does Not Impact Rate of Postoperative Recurrence in Crohn's Disease Patients Classified i2 on the Rutgeerts Score. *Dig Dis Sci*. 2016 Oct;61(10):2986–92.
58. Guyatt G, Mitchell A, Irvine EJ, Singer J, Williams N, Goodacre R, Tompkins C. A new measure of health status for clinical trials in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 1989;96:804–10.

59. Pontes RMA, Miszputen SJ, Ferreira-Filho OF, Miranda C, Ferraz MB. Qualidade de vida em pacientes portadores de doença inflamatória intestinal: tradução para o português e validação do questionário 'Inflammatory Bowel Disease Questionnaire' (IBDQ). *Arq Gastroenterol.* 2004;41:137–43.
60. Huamán JW, Casellas F, Borruel N, Peláez A, Torrejón A, Castells I, Masachs M, Varela E, Guarner F. Cutoff values of the Inflammatory Bowel Disease Questionnaire to predict a normal health related quality of life. *J Crohns Colitis.* 2010 Dec;4(6): 637–41.
61. Tursi A, Elisei W, Picchio M, Giorgetti G, Brandimarte G. Accuracy of Rapid Fecal Calprotectin Test in Monitoring Inflammatory Bowel Diseases Under Treatment with TNF α Antagonists. *Dig Dis Sci.* 2015;60:1406–13.
62. Naismith GD, Smith LA, Barry SJ, Munro JJ, Laird S, Rankin K, Morris AJ, Winter JW, Gaya DR. A prospective evaluation of the predictive value of faecal calprotectin in quiescent Crohn's disease. *J Crohns Colitis.* 2014 Sep;8(9):1022–9.
63. Louis E. Fecal calprotectin: towards a standardized use for inflammatory bowel disease management in routine practice. *J Crohns Colitis.* 2015;9:1–3.
64. Cibor D, Owczarek D, Butenas S, Salapa K, Mach T, Undas A. Levels and activities of von Willebrand factor and metalloproteinase with thrombospondin type-1 motif, number 13 in inflammatory bowel diseases. *World J Gastroenterol.* 2017 Jul 14;23(26):4796-4805.
65. Lutsey PL, Folsom AR, Heckbert SR, Cushman M. Peak thrombin generation and subsequent venous thromboembolism: the Longitudinal Investigation of Thromboembolism Etiology (LITE) study. *J Thromb Haemost.* 2009 Oct;7(10):1639–48.
66. Cellier C, Sahmoud T, Froguel E, Adenis A, Belaiche J, Bretagne JF, Florent C, Bouvry M, Mary JY, Modigliani R. Correlations between clinical activity, endoscopic severity, and biological parameters in colonic or ileocolonic Crohn's disease. A prospective multicentre study of 121 cases. The Groupe d'Etudes Thérapeutiques des Affections Inflammatoires Digestives. *Gut.* 1994 Feb;35(2):231–5.
67. Edwards RL, Levine JB, Green R, Duffy M, Mathews E, Brande W, Rickles FR. Activation of blood coagulation in Crohn's disease. Increased plasma fibrinopeptide A levels and enhanced generation of monocyte tissue factor activity. *Gastroenterology.* 1987;92:329–37.
68. Carty N, Taylor I, Roath OS, Ei-Baruni K, Francis JL. Urinary tissue factor activity in colorectal disease. *Br J Surg.* 1990;77:1091–4.

69. Palkovits J, Novacek G, Kollars M, Hron G, Osterode W, Quehenberger P, Kyrle PA, Vogelsang H, Reinisch W, Papay P, Weltermann A. Tissue factor exposing microparticles in inflammatory bowel disease. *J Crohns Colitis*. 2013 Apr;7(3):222–9.
70. Anthoni C, Russell J, Wood KC, Stokes KY, Vowinkel T, Kirchhofer D, Granger DN. Tissue factor: a mediator of inflammatory cell recruitment, tissue injury, and thrombus formation in experimental colitis. *J Exp Med*. 2007 Jul 9;204(7):1595–1601.
71. Sharma L, Melis E, Hickey MJ, Clyne CD, Erlich J, Khachigian LM, Davenport P, Morand E, Carmeliet P, Tipping PG. The Cytoplasmic Domain of Tissue Factor Contributes to Leukocyte Recruitment and Death in Endotoxemia. *Am J Pathol*. 2004 Jul;165(1):331–40.
72. Fan Y, Zhang W, Mulholland M. Thrombin and PAR-1-AP increase proinflammatory cytokine expression in C6 cells. *J Surg Res*. 2005;129:196–201.
73. Ghouzali I, Azhar S, Bôle-Feysot C, Ducrotté P, Déchelotte P, Coëffier M. Proteasome inhibitors exacerbate interleukin-8 production induced by protease-activated receptor 2 in intestinal epithelial cells. *Cytokine*. 2016 Oct;86:41–6.
74. Coughlin SR. Protease-activated receptors in hemostasis, thrombosis and vascular biology. *J Thromb Haemost*. 2005 Aug;3(8):1800–14.
75. Gaffney PR, Doyle CT, Gaffney A, Hogan J, Hayes DP, Annis P. Paradoxical response to heparin in 10 patients with ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol*. 1995 Feb;90(2):220–3.
76. Thompson NP, Wakefield AJ, Pounder RE. Inherited disorders of coagulation appear to protect against inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 1995;108:1011–5.
77. Meucci G, Pareti F, Vecchi M, Saibeni S, Bressi C, de Franchis R. Serum von Willebrand factor levels in patients with inflammatory bowel disease are related to systemic inflammation. *Scand J Gastroenterol*. 1999 Mar;34(3):287–90.
78. Stevens TR, James JP, Simmonds NJ, McCarthy DA, Laurenson IF, Maddison PJ, Rampton DS. Circulating von Willebrand factor in inflammatory bowel disease. *Gut*. 1992 Apr;33(4):502–6.
79. Feys HB, Canciani MT, Peyvandi F, Deckmyn H, Vanhoorelbeke K, Mannucci PM. ADAMTS13 activity to antigen ratio in physiological and pathological conditions associated with an increased risk of thrombosis. *Br J Haematol*. 2007 Aug;138(4):534–40.
80. Crawley JT, Lam JK, Rance JB, Mollica LR, O'Donnell JS, Lane DA. Proteolytic inactivation of ADAMTS13 by thrombin and plasmin. *Blood*. 2005 Feb 1;105(3):1085–93.

81. Mannucci PM, Capoferri C, Canciani MT. Plasma levels of von Willebrand factor regulate ADAMTS-13, its major cleaving protease. *Br J Haematol*. 2004;126:213–8.
82. Danese S, Papa A, Saibeni S, Repici A, Malesci A, Vecchi M. Inflammation and coagulation in inflammatory bowel disease: The clot thickens. *Am J Gastroenterol*. 2007;102:174–86.
83. Faioni EM, Ferrero S, Fontana G, Gianelli U, Ciulla MM, Vecchi M, Saibeni S, Biguzzi E, Cordani N, Franchi F, Bosari S, Cattaneo M. Expression of endothelial protein C receptor and thrombomodulin in the intestinal tissue of patients with inflammatory bowel disease. *Crit Care Med*. 2004 May;32(5):S266–70.
84. Tanaka K, Salunya T, Motomiya Y, Motomiya Y, Oyama Y, Yamakuchi M, Maruyama I. Decreased Expression of Thrombomodulin in Endothelial Cells by Fibroblast Growth Factor-23/ α -Klotho. *Ther Apher Dial*. 2017 Aug;21(4):395–404.
85. Reichman-Warmusz E, Kurek J, Gabriel A, Brzozowa M, Bula G, Helewski K, Domal-Kwiatkowska D, Gawwrychowski J, Wojnicz R. Tissue hemostasis and chronic inflammation in colon biopsies of patients with inflammatory bowel disease. *Pathol Res Pract*. 2012;208:553–6.
86. Bernhard H, Deutschmann A, Leschnik B, Schweintzger S, Novak M, Hauer A, Muntean W. Thrombin generation in pediatric patients with Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2011;17:2333–9.
87. Middeldorp S. Is Thrombophilia Testing Useful? *ASH Educ. Program Book*. 2011;150–5.
88. Heneghan MA, Cleary B, Murray M, O'Gorman TA, McCarthy CF. Activated protein C resistance, thrombophilia, and inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci*. 1998;43:1356–61.
89. Stadnicki A, Kloczko J, Nowak A, Sierka E, Sliwiński Z. Factor XIII subunits in relation to some other hemostatic parameters in ulcerative colitis. *Am. J. Gastroenterol*. 1991;86:690–3.
90. Sipeki N, Laszlo D, Palyu E, Altorjay I, Harsfalvi J, Szalmas PA, Szabo Z, Veres G, Shums Z, Norman GL, Lakatos PL, Papp M. Prevalence, significance and predictive value of antiphospholipid antibodies in Crohn's disease. *World J Gastroenterol*. 2015;21(22):6952–64.

9 APÊNDICES

9 APÊNDICES

9.1 Apêndice A – Artigo publicado.

Andrade et al. *Clinical and Translational Gastroenterology* (2018)9:142
DOI 10.1038/s41424-018-0013-8

Clinical and Translational Gastroenterology

ARTICLE

Open Access

Risk of thrombosis and mortality in inflammatory bowel disease

Adriana R. Andrade, MD¹, Luísa L. Barros, MD¹, Matheus F. C. Azevedo, MD¹, Alexandre S. Carlos, MD¹, Aderson O. M. C. Damião, MD¹, Aytan M. Sipahi, MD¹ and André Z. A. Leite, MD¹

Abstract

Objectives: Patients with inflammatory bowel disease have a higher risk of thrombosis, which is associated with a higher morbidity and mortality. Most data about VTE are related to hospitalized patients with active disease, but several cases happen in the outpatient setting, and are not covered by current prophylaxis recommendation. As the knowledge of VTE in outpatients is still poor, the aim of this study is to evaluate the risk, clinical data and mortality of thrombosis in patients followed in our center, comparing our findings with the current prophylaxis recommendation.

Methods: The medical electronic chart of 1093 inflammatory bowel disease patients and their image exams were actively searched for words related to thrombosis, followed by charts reviewed to collect information about the event and data regarding clinical settings and thrombosis profile.

Results: Overall, 654 Crohn's and 439 Colitis patients were included. Thrombosis prevalence was 5.1%, and mortality rate was higher in patients who had suffered thrombosis (10.71% vs. 1.45%, OR 8.0). Half of them developed thrombosis in the outpatient setting, 52% of these had disease activity, 17% had recent hospitalization, and 10% had previous thrombosis. In 27% of cases, diagnosis was done by routine image exams, with no clinical symptoms or previous history of thrombosis. None of them had used thromboprophylaxis. However, a great majority of patients who had thrombosis during hospitalization used heparin prophylaxis.

Conclusion: Inflammatory bowel disease patients who develop thrombosis have an increased mortality risk. A significant proportion of the events happened in patients without a clear thromboprophylaxis recommendation or in those receiving heparin prophylaxis.

Introduction

Thrombosis is associated with a high mortality rate and directly impacts the quality of life of individuals¹. The literature shows that patients with Crohn's disease (CD) and ulcerative colitis (UC) have an increased risk of thrombosis, three to four folds higher than subjects without inflammatory bowel disease (IBD)². More than 500,000 inpatients per year in the United States are diagnosed with deep venous thrombosis (DVT)^{3,4}. Mortality rate is about 3% for

DVT and more than 15% during the first 3 months after pulmonary thromboembolism (PTE)⁵⁻⁷. Risk factors for venous thromboembolism (VTE) include surgery, prolonged immobilization, malignancy, obesity, use of oral contraceptives, smoking, corticosteroids, pregnancy, heart failure, chronic obstructive pulmonary disease¹, and also inflammatory bowel disease (IBD)⁸. In IBD patients, thrombosis risk increases with the extension of mucosal damage and disease activity.

The Canadian Consensus⁹ recommends thromboprophylaxis with heparin for hospitalized patients due to IBD flares without active bleeding or with non-severe bleeding. For outpatients, thromboprophylaxis is recommended

Correspondence: André Z. A. Leite (azaleite@gmail.com)

¹Laboratório de Investigação Médica (LIM-07), Hospital das Clínicas HCFMUSP, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

© The Author(s) 2018

Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International License, which permits any non-commercial use, sharing, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, and provide a link to the Creative Commons license. You do not have permission under this license to share adapted material derived from this article or parts of it. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>.

during moderate to severe IBD flares, with a previous VTE event without a clear etiology.

Most data about VTE in IBD refer to hospitalized patients with clinical active disease. Nevertheless, literature suggests that a great proportion of thrombosis cases occur in the outpatient setting¹⁰. Thus, the aims of this study are to better characterize those events, evaluating the risk, clinical data and mortality due to thrombosis in IBD patients followed in a tertiary hospital of Sao Paulo and compare these findings with current prophylaxis recommendations.

Materials and methods

The medical electronic chart of 1093 IBD patients followed at the (Hospital das Clinicas HCFMUSP, Faculdade de Medicina, Universidade de Sao Paulo, Sao Paulo, SP, BR) and their image exams (ultrasound, tomography or magnetic resonance) performed between January 2010 and May 2015 were actively searched for words related to VTE. Patients selected in this first search had their charts reviewed by a GI physician in order to collect information about clinical settings and thrombosis profile. If the medical report was incomplete, patients or a family member were contacted by phone to complete any missing information. IBD patients without thrombosis who had been to hospital after June/2015 were considered alive. Those who missed their follow-up appointment for any reason, had their individual's tax registry number crossed with the national register of deceased (NGOs with data on deaths obtained from cemeteries, funeral homes and hospitals).

All patients had the IBD diagnosis confirmed by endoscopic, radiological, and/or histological findings for more than 6 months before inclusion. Data were collected regarding age, sex, smoking status, risk factors for thrombosis, disease duration, extension, behavior, location and activity, pharmacological treatment, surgeries and hospitalization at the time of the event, previous or familial history of thrombosis, oral contraceptive use, and the association with central venous catheter. IBD activity was defined by the medical impression and CRP values at the time of VTE. Infliximab treatment was considered optimized if the dose of infliximab was increased to 10 mg/kg, or the interval was reduced to 6 or 4 weeks, and for adalimumab if the interval was reduced to 1 week.

For comparison purposes only, laboratory data from CD patients with thrombosis were compared with CD patients without thrombosis, whose data were extracted from a prospective study initiated in 2015. This sample is considered representative once it is obtained from the baseline population of this study. Considering a 0.05 significance and a thrombosis prevalence of 5.7%, the power of the sample size was 80.2%.

Institutional review board approval was obtained, and the requirement for informed written consent was waived.

Statistical analysis

All statistical analysis were performed with the web base statistical program SAS® Studio On Demand for Academics or R Statistics. Data distribution was analyzed using Normal-QQ-plots, histogram plots, and Shapiro test. Categorical data are summarized as the percentage of the total group. Fisher's exact test (two-sided) was used to explore associations of parametric categorical data between the two groups. The Mann-Whitney *U* test (Wilcoxon rank sum test) was used to explore non-parametric data between two unpaired groups. A *p* value of <0.05 was considered statistically significant.

Stepwise multiple logistic regression modeling was performed in order to evaluate the association between potential risk factors and VTE. The variables tested as potential risk factors were: gender, age at time of IBD diagnosis, disease location, duration and behavior, treatment, body mass index (BMI), IBD family history, smoking status, use of oral contraception in females, steroid use, hemoglobin, platelet count, C-reactive protein (CRP), fibrinogen and factor VIII (FVIII) levels, anti-thrombin (AT), C and S deficiency. In a first step, each potential risk factor was tested separately. In a second step, all risk factors with a *p* value < 0.2 were entered together into the multivariate logistic regression model.

The backward stepwise method multiple logistic regression modeling was performed in order to evaluate the association between potential risk factors and VTE. The variables tested as potential risk factors were: gender, age at time of IBD diagnosis, disease location, duration and behavior, treatment, body mass index (BMI), IBD family history, smoking status, use of oral contraception in females, steroid use, hemoglobin, platelet count, C-reactive protein (CRP), fibrinogen and factor VIII (FVIII) levels, anti-thrombin (AT), C and S deficiency. In a first step, each potential risk factor was tested separately. In a second step, all risk factors with a *p* value < 0.2 were entered together into the multivariate logistic regression model.

Results

As shown in Table 1, 1093 IBD patients were included in this retrospective study, 654 (60%) with CD and 439 (40%) with UC. There were more females (54%) than males (46%), and age at clinical onset was 31.5 ± 14.3 years old, and the mean disease duration was 12.8 ± 7.4 years. Disease location of 640 CD patients was as follows: ileal in 214 (33.4%), colonic in 115 (18.0%), and ileocolonic in 311 (48.6%). Forty-eight CD patients (7.3%) had upper GI involvement, whereas 11 of them had the disease

Table 1 Demographic data of IBD cohort

	CD (n = 654)	UC (n = 439)
Sex	n (%)	n (%)
Female	354 (54.05)	273 (62.19)
Male	301 (45.95)	166 (37.81)
Deaths	16 (2.44)	5 (1.14)
Location		
Colonic	116 (18.1)	Left colitis 87 (19.8)
Ileal	214 (33.4)	Distal 60 (13.7)
Ileocolonic	311 (48.5)	Pancolitis 249 (56.7)
Unknown	14 (2)	Unknown 43 (9.8)
Upper GI tract	48 (7.3)	
Unknown	17 (2.6)	
Behavior		
Strictureing	192 (29.3)	
Inflammatory	181 (27.6)	
Penetrating	265 (40.5)	
Perianal	97 (14.9)	
VTE	37 (5.7)	19 (4.3)

VTE venous thromboembolism

restricted to the upper GI. Disease behaviors ($n = 637$) were non-stricturing, non-penetrating in 181 (28.4%) patients, stricturing in 192 (30.1%) patients and penetrating in 264 (41.4%) patients. Of the penetrating phenotype, 96 (36.4%) patients had perianal disease. Among the 396 UC patients, 249 had pancolitis (62.9%), followed by left-sided disease in 87 (22.0%) and proctitis in 60 (15.2%).

The vast majority of CD patients had already taken immunomodulators (72%) and/or biologic therapy (57%), whereas UC patients had preferentially been treated with salicylate agents (76%), almost 40% with immunomodulators and a small proportion of them (20%) had received biologic therapy (Table 2). A significant higher number of CD patients had already undergone previous major abdominal surgery compared with ulcerative colitis (22.5% vs. 7.3%, $p < 0.0001$).

Thrombosis was diagnosed in 56 patients with an overall prevalence of 5.1% (5.7% among patients with CD and 4.3% in those with UC), conferring a significantly higher mortality rate in the thrombosis group (6/56, 10.71 vs. 15/1037, 1.45%, odds ratio 8.0). On the other hand, there was no significant difference regarding sex, age, age at clinical onset, duration of disease or treatment between IBD with and without VTE. Patients with VTE were more likely to have undergone an abdominal surgery (28.6% vs.

Table 2 Medication history of IBD cohort

	Crohn n (%)	RCU n (%)	Total n (%)
Salicylates	210 (32.1)	332 (75.6)	620 (56.6)
Immunosuppressors	469 (71.6)	164 (37.4)	633 (57.9)
Azathioprine	450 (68.7)	161 (36.7)	712 (65)
Methotrexate	81 (12.4)	11 (2.5)	101 (9.2)
Anti-TNF	374 (57.1)	88 (20)	462 (42.2)
Infliximab	303 (46.3)	69 (15.7)	426 (38.9)
Optimized	58 (19.1)	13 (18.8)	71 (16.7)
Adalimumab	187 (28.5)	39 (8.9)	251 (22.9)
Optimized	70 (37.4)	16 (41)	86 (34.3)

15.8%, $p = 0.016$, OR: 2.14, 1.17–3.91) Nevertheless, after stratification, this association was observed for CD patients (37.8% vs. 21.6%, $p = 0.03$), but not for UC (10.5% vs. 7.2%, $p = 0.64$). Patients with or without VTE had the same age at clinical onset and similar disease duration at the time of VTE.

Thrombophilia screening, including AT, protein C and S, FVIII and fibrinogen, was performed in one-third of the patients who had suffered thrombosis. Results showed that the tested patients had deficiency of protein C (5/19, 26%), S (5/20, 25%) and AT (4/16, 37%). Factor VIII and fibrinogen was increased in 4 of 10 (40%) and 3 of 14 patients (21%), respectively.

Patients with VTE and CD (Table 3) had a significantly different proportion of bowel segment involved ($p = 0.005$), which means they had more colonic disease (37.8% vs. 16.8%), but less ileocolonic disease (37.8% vs. 49.3%) and ileal disease (24.3% vs. 34.0%), compared to CD without VTE. Nonetheless, they had the same proportion of perianal disease and behavior: stricturing (32.4% vs. 30.0%), non-stricturing, non-penetrating (27.0% vs. 28.5%), and penetrating (40.5% vs. 41.5%) ($p = 0.95$). Findings of bowel involvement for patients with UC were similar: pancolonic (73.7% vs. 62.3%), left colon (26.3% vs. 21.8%), and colon distal (0% vs. 16.0%) ($p = 0.16$).

When the patients with thrombosis were analyzed by type of IBD (Table 3), there was no difference between CD and UC considering previous history of surgery (40.5% vs. 26.3%, $p = 0.2$), previous VTE (11.8% vs. 9.1%, $p = 1.0$) or hospitalization (86.5% vs. 94.7%, $p = 0.7$). Moreover, data analysis related to the VTE period showed no difference in VTE associated with surgery (21.6% vs. 15.8%, $p = 1.0$), hospitalization (51.4% vs. 47.4%, $p = 1.0$), use of central venous access (18.9% vs. 16%, $p = 1.0$), VTE prophylaxis (78% vs. 86%, $p = 1.0$), immobilization (56.7% vs. 63.1%, $p = 0.8$), and corticosteroid use (35.1% vs. 52.6%, $p = 0.3$). Nevertheless, VTE occurred more often during

Table 3 Clinical characteristics and risk factors of IBD patients with thrombosis

	CD (n = 37)	UC (n = 19)	p value
Sex			
Male	19 (51.4)	5 (26.3)	0.09
Female	18 (48.6)	14 (73.7)	
Oral contraceptive	3/14 (21.4)	0/15 (0)	
Previous pregnancy	12/17 (70.6)	10/14 (71.4)	
Abortion	4/12 (33.3)	1/10 (10)	
VTE			
Inpatient	18 (48.6)	10 (50)	0.92
Prophylaxis	14/18 (77.8)	6/7 (85.7)	
Outpatient	16/37 (45.7)	12/19 (63)	
Previous VTE	3/16 (18.7)	0	
Clinical disease activity	8/16 (50)	8/14 (57.1)	
Recent hospitalization	10/36 (27.7)	6/18 (33.3)	
Symptoms during VTE	26/35 (74.3)	13/19 (68.4)	
No	15 (40.5)	1(5)	
Prophylaxis	14/18 (77.8)	6/7 (85.7)	0.78
Immobilization	21/37 (56.7)	12/19 (63.1)	
Corticosteroid	13/37 (35.1)	10/19 (52.6)	0.26
Smoking history	11 (19.7)	5 (8.9)	0.1
Never	22 (59.5)	11 (57.9)	
Previous	9 (24.3)	4 (21.1)	
Active	1 (2.7)	1 (5.2)	
Unknown	5 (13.5)	3 (15.8)	
IBD surgery related			
Last 3 months	10/36 (27.8)	6/18 (33.3)	0.76
At the same period of VTE	8/37(19)	3/19(16)	0.29
Catheter related	7/37(19)	3/19(16)	1.0
Familial VTE	5 (8.9)	3 (5.4)	0.47
Previous neoplasia	2 (3.6)	2 (3.6)	0.12
At the same time of VTE	2/35 (5.7)	0	
Previous	1/35 (2.8)	1/19 (5.3)	

active UC (94.7%) than in CD (62.2%), reaching statistical significance ($p = 0.01$).

The most common site of thrombosis (Table 4) was in the lower limbs ($n = 24$, 33%), followed by pulmonary embolism ($n = 13$, 18%), mesenteric vein ($n = 6$, 8%), portal vein ($n = 5$, 7%), brachiocephalic trunk ($n = 4$, 6%), inferior cava vein ($n = 4$, 6%), upper limbs ($n = 3$, 4%), and others. Further, nine patients (16%) had more than one site stricken by thrombosis, and they were treated with

Table 4 Location of VTE events

VTE location	Frequency	Percent
Lower limbs	24	33.33
Pulmonary embolism	13	18.05
Mesenteric vein	6	8.32
Portal vein	5	6.94
Lower cava vein	4	5.55
Brachiocephalic trunk	4	5.55
Upper limbs	3	4.16
Other	13	18.05
Total	72	100

warfarin 17/29 (59%) and/or 14/29 (48%) with low-weight heparin.

Forty-three percent and 63% of CD and UC patients, respectively, developed an outpatient VTE event. Fifty-three percent of them had disease activity, 29.6% had recent hospitalization, and 10.3% had previous thrombosis. In 27% of the cases, the diagnosis was made by routine image exams, with no clinical symptoms of thrombosis or previous VTE history.

In CD patients, logistic regression modeling found no significant association between VTE and the following factors: sex, age at diagnosis, BMI, disease duration, location and behavior, treatment, IBD family history, and oral contraception. CD patients who did not develop thrombosis had no C Protein deficiency, therefore we could not include in the model. S protein deficiency was withdrawn of the modeling as the interaction with steroid use ($p < 0.03$) compromised the convergence of the modeling. Thus, it was considered an independent variable related to VTE (OR: 13.3; IC: 2.16–79.7; $p < 0.001$). Smoking (OR 7.4; IC: 1.73–3.15; $p = 0.006$) and steroid use (OR 403; IC: 42–3870; $p < 0.001$) were associated with a higher risk of VTE. Regarding the treatment with steroids, the OR was high because only one patient using steroid did not develop thrombosis (Table 5).

The patients with CD and VTE who died were younger at disease diagnosis (median 25 vs. 34 years old, $p = 0.001$), had more stricturing disease ($p = 0.04$), previous smoking history ($p = 0.02$) and were using more steroids ($p = 0.048$). The mean disease duration was 16 years. Death was associated with VTE in 3 out of 5 patients: 2 died of adenocarcinoma associated with a long-term and refractory disease, 1 died due to a rupture of aortic abdominal aneurysm not related to the disease or to VTE. Other causes of deaths were 1 died of digestive hemorrhage secondary to esophagus varices associated with a non cirrhotic portal thrombosis, 1 died of

Table 5 Logistic regression modeling in order to identify factors associated with VTE complications in patients with CD

	Univariate logistic regression			Multivariate logistic regression		
	OR	95% CI	p value	OR	95% CI	p value
Sex						
Male	1.80	0.87–3.72	0.11			
Age at diagnosis						
<40 years old	0.32	1.15–0.70	0.004			
Disease duration	1.05	1.01–1.10	0.01			
Disease location						
Colonic	22.5	2.8–180.9	0.003			
Ileocolonic	17.8	2.33–136.5	0.005			
Behavior						
Strictureing	2.3	0.55–3.52	0.48			
Fistulizing	2.3	0.91–5.81	0.07			
Perianal	1.19	0.49–2.88	0.69			
Treatment						
Immunosuppressors	1.58	0.61–4.11				
Biologic	2.65	1.14–6.19	0.05			
Corticosteroid	427	51.9–3518.3	0.001	403	42–3870	< 0.001
BMI	0.93	0.86–1.02	0.13			
Smoking	7.02	3.01–16.4	0.001	7.4	1.73–3.15	0.006
IBD family history	2.97	0.92–9.57	0.06			
Oral contraceptive	1.53	0.38–6.2	0.54			
Hemoglobin	0.48	0.38–0.63	0.001			
Platelets	1.004	1.0006–1.007	0.02			
CRP	1.004	0.99–1.01	0.16			
Fibrinogen (>400)	0.35	0.04–2.95	0.33			
FVIII (>150)	0.85	0.18–3.97	0.84			
AT deficiency (<79)	2.24	0.43–11.7	0.34			
C protein deficiency (<64)	*	*	*			
S protein deficiency (<55)	13.9	3.05–63.7	0.001			

5-ASA aminosalicilates, BMI body mass index, IBD inflammatory bowel disease, CRP C-reactive protein, AT anti-thrombin, * = not include in the model

pulmonary embolism and 1 of multiple organ failure in a refractory Crohn's disease after a long period of hospitalization. The latter patient was receiving infliximab and azathioprine. In addition, two of them had thrombophilia—protein S deficiency and factor V mutation—and the majority had three or more thrombosis risk factors, as illustrated in Table 6. The other IBD deaths were mainly related to cancer complications: 2 patients with diffuse large B-cell non-Hodgkin's lymphoma, 2 with metastatic colorectal cancer, 1 with metastatic cholangiocarcinoma associated with primary sclerosing cholangitis, 1 with low differentiated carcinoma

infiltrating lung tissue. Four patients died from septic shock

(2 were taking azathioprine and 2, infliximab), 2 of myocardial infarction, 1 of disseminated tuberculosis (taking infliximab and methotrexate). In 2 patients, we could not determine the cause of the death.

Discussion

The prevalence of thrombosis in our center is in line with other studies, affecting 5.1% of patients with IBD enrolled in this cohort. Thirty patients (53.6%) had VTE as an outpatient complication, half of them had no

Table 6 Clinical characteristics of CD patients who died

Patient	Montréal	Comorbidities	VTE localization	Disease activity	Hospitalization	Immobilization	Surgery	Steroid	Central Catheter	Thrombophilia	Causes of deaths	Death related to VTE
1	A3 + L2 + B2		PTE								Aortic aneurism rupture	
2	A2 + L2 + B1	Colorectal cancer	BCT / VCI								Colorectal cancer complications	
3	A2 + L3 + B3/p	Metastatic colorectal cancer	PTE								PTE	
4	A2 + B2 + L3	Protein enterol loss	PTE / LL / ICV / Mesenteric							Protein S Deficiency	PTE	
5	A2 + B2 + L3	Hepatic cirrhosis	Portal / Mesenteric								Esofageal bleeding	
6	A2 + B2 + L3	Gangrenous Pioderma	BCT / ICV / LL							Factor V Mutation	Septic thrombophlebitis	

PTE: Pulmonary thromboembolism; BCT: Brachiocephalic trunk; LL: Lower limbs; ICV: inferior cava vein; VTE: venous thromboembolism

PTE pulmonary thromboembolism, BCT brachiocephalic trunk, LL lower limbs, ICV inferior cava vein, VTE venous thromboembolism

evidence of clinical disease activity, whereas one-third of them had no clinical symptoms of thrombosis, and the diagnosis was made by routine exams.

The Third European Evidence-based Consensus¹¹ advocates that VTE prophylaxis should be considered for all patients with Crohn's disease, both hospitalized and outpatients with severe disease. For UC, they recommended it for all patients admitted to the hospital, but they also considered it following hospital discharge or surgery, and for outpatients with active disease, but without a clear statement to whom it may be indicated. The Canadian Consensus¹² recommends thromboprophylaxis with heparin for all patients hospitalized due to IBD flares without active bleeding or with non-severe bleeding and for outpatients, during moderate to severe IBD flares, with a previous VTE related to exacerbation of the disease itself. Nevertheless, there is significant variation in reported practices for VTE prophylaxis in IBD patients among gastroenterologists¹³.

In this study, 10.3% of patients had previous thrombosis, and half of outpatients had clinical activity, demonstrated by medical impression and CRP values. Thus, a significant proportion of patients would not be suitable for the actual outpatient VTE prophylaxis recommendation. Likewise, VTE prophylaxis, besides its proven efficacy, could not be enough to prevent all VTE in hospitalized patients with active disease because most of these events happened while they were receiving heparin thromboprophylaxis. One possible explanation could be the evidence in the literature reporting that IBD patients may develop some degree of anti-thrombin deficiency¹⁴, which might impact

the heparin response. The measurement of anti-thrombin was available only in 16 patients, and it was deficient in four of them (37%).

The associated factors related to thrombosis were smoking (with an adjusted OR of 7.4), S protein deficiency (with an adjusted OR of 13.3) and steroid use (with an adjusted OR of 403). To date, the physiopathology of thrombosis in IBD has not been fully elucidated. Previous studies suggest that the hypercoagulable state in IBD patients is explained by elevated levels of pro-coagulant factors and reduced levels of endogenous anticoagulants (e.g., C and S protein, anti-thrombin, among others). According to the laboratory profile in our study, VTE patients showed S, C protein and anti-thrombin deficiency besides higher platelet and CRP levels. Therefore, we can infer that CD patients with thrombosis might have a higher inflammation status, confirmed by higher use of steroids in this subgroup. Smoking status is a well-known VTE risk factor.

In our patients, a significantly higher proportion of deaths occurred in patients with Crohn's disease who had suffered VTE (15.8% vs. 1.4%, $p = 0.001$), which is in agreement with the high mortality rate among IBD patients following an acute VTE¹⁵⁻¹⁷. After regression modeling, the factors associated to death were age at diagnosis (with an adjusted OR 0.34), use of biologics (with an adjusted OR of 0.2) and VTE episodes (with an adjusted OR of 11.4). The early age could be related with a more aggressive disease, and the protective factor of biologic drugs could be associated with a better control of the systemic inflammation. Of note, studies on long-term

mortality following VTE are sparse. This information reinforces the importance of being aware of the individual risk factors to make it possible to better stratify the patients to introduce an adequate VTE prophylaxis even in case of outpatients.

As all retrospective studies, the study has limitations regarding data collection. We cannot infer causality from the results and, as it was performed in a tertiary hospital, it might have suffered selection bias. Furthermore, because it was a retrospective study, we did not evaluate the endoscopic activity, which may be a subgroup of increased risk regarding outpatients.

Conclusion

This study shows that IBD patients have a higher risk of thrombosis, which was associated with a higher mortality risk. A significant proportion of these events occurred in patients without a clear recommendation for thromboprophylaxis by most guidelines or in those receiving heparin prophylaxis. Taken together, these data suggest that new approaches are needed to reduce the risk of VTE, thus diminishing morbidity and mortality rates in this specific population.

Study Highlights

What is current knowledge

- Inflammatory bowel disease (IBD) patients have an increased risk of venous thromboembolism (VTE).
- VTE is associated with high morbidity and mortality.
- Prophylaxis is required for hospitalized IBD patients.

What is new here

- VTE occurred in patients without prophylaxis recommendation.
- Current prophylaxis is insufficient to avoid VTE.
- Patients may develop VTE despite the use of heparin prophylaxis.

Competing interests

Guarantor of the article: André Zonetti de Arruda Leite.

Specific author contributions: ARA: contributed to the study design, implemented the study protocol, collected and interpreted the data, wrote the first draft of the manuscript, contributed to subsequent revisions, and contributed to its intellectual content; LLB: oversaw the implementation of the study protocol and contributed to its intellectual content; M.F.C.A., A.S.C., A.Q.M.C.D., A.M.S.: contributed to the implementation of the study protocol and collected the data; A.Z.A.L.: conceived and designed the study, oversaw the study implementation and data collection, interpreted the data, contributed to

the writing of the first draft of the manuscript and its subsequent revisions and contributed to its intellectual content. ARA and A.Z.A.L. are the guarantors of this work and, as such, had full access to all data in the study and take full responsibility for the integrity of data and the accuracy of data analysis. The final draft submitted has been approved by each author of this study.

Financial support: Grant #2015/06196-0, São Paulo Research Foundation (FAPESP).

Potential competing interests: None.

Received: 30 August 2017 Revised: 12 January 2018 Accepted: 28 January 2018

Published online: 03 April 2018

References

1. Heit, J. A. The epidemiology of venous thromboembolism in the community: implications for prevention and management. *J. Thromb. Thrombolysis* **21**, 23–29 (2006).
2. Scoville, E. A. et al. Venous thromboembolism in patients with inflammatory bowel diseases: a case-control study of risk factors. *Inflamm. Bowel Dis.* **20**, 631–636 (2014).
3. LaMori, J. C., Shoheiber, O., Mody, S. H. & Bookhart, B. K. Inpatient resource use and cost burden of deep vein thrombosis and pulmonary embolism in the United States. *Clin. Ther.* **37**, 62–70 (2015).
4. Yusuf, H. R., Tsai, J., Atrash, H. K., Boulet, S. & Grosse, S. D. Venous thromboembolism in adult hospitalizations—United States, 2007–2009. *MMWR* **22**, 401–4 (2012).
5. Irving, P. M., Pasi, K. J. & Rampton, D. S. Thrombosis and inflammatory bowel disease. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* **3**, 617–628 (2005).
6. Kohoutova, D., Moravkova, P., Kruzak, P. & Bures, J. Thromboembolic complications in inflammatory bowel disease. *J. Thromb. Thrombolysis* **39**, 489–498 (2015).
7. Fabio, F., Lykoudis, P. & Gordon, P. Thromboembolism in inflammatory bowel disease: an insidious association requiring a high degree of vigilance. *Semin. Thromb. Hemost.* **37**, 220–225 (2011).
8. Novacek, G. et al. Inflammatory bowel disease is a risk factor for recurrent venous thromboembolism. *Gastroenterology* **139**, 779–787.e1 (2010).
9. Nguyen, G. C. et al. Consensus statements on the risk, prevention, and treatment of venous thromboembolism in inflammatory bowel disease: Canadian Association of Gastroenterology. *Gastroenterology* **146**, 835–848.e6 (2014).
10. Grainge, M. J., West, J. & Card, T. R. Venous thromboembolism during active disease and remission in inflammatory bowel disease: a cohort study. *Lancet* **375**, 657–663 (2010).
11. Gionchetti, P. et al. Third European evidence-based consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease 2016: part 2: surgical management and special situations. *J. Crohn's Colitis* **11**, 135–149 (2017).
12. Nguyen, G. C. et al. Consensus statements on the risk, prevention, and treatment of venous thromboembolism in inflammatory bowel disease: Canadian Association of Gastroenterology. *Gastroenterology* **146**, 835–848 (2014).
13. Sam, J. J., Bernstein, C. N., Razik, R., Thanabalan, R. & Nguyen, G. C. Physicians' perceptions of risks and practices in venous thromboembolism prophylaxis in inflammatory bowel disease. *Dig. Dis. Sci.* **58**, 46–52 (2013).
14. Higaki, S. et al. Clinical significance of measuring blood coagulation factor XIIIa regularly and continuously in patients with Crohn's disease. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **21**, 1407–1411 (2006).
15. Furney, M. et al. Thromboembolic events and cardiovascular mortality in inflammatory bowel diseases: a meta-analysis of observational studies. *J. Crohn's Colitis* **8**, 469–479 (2014).
16. Nguyen, G. C. & Sam, J. Rising prevalence of venous thromboembolism and its impact on mortality among hospitalized inflammatory bowel disease patients. *Am. J. Gastroenterol.* **103**, 2272–2280 (2008).
17. Bollen, L. et al. Thromboembolism as an important complication of inflammatory bowel disease. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* **28**, 1–7 (2016).

9.1 Apêndice B – Paper enviado para publicação.

Title page

Title: The role of endoscopic disease activity on the coagulation parameters in subclinical Crohn's disease patients

Short title: Endoscopic activity on CD coagulation profile

Authors: Adriana Ribas Andrade, Tania Rubia Flores da Rocha, Carmen Lucia Ortiz-Agostinho, Iêda Nishitokukado, Alexandre Sousa Carlos, Matheus Freitas Cardoso de Azevedo, Claudio Lioshi Hashimoto, Aderson Omar Moura Cintra Damião, Aytan Miranda Sipahi, Elbio D'Amico, André Zonetti de Arruda Leite

Institution: All authors are from Hospital das Clínicas HCFMUSP, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil.

Correspondence to: André Zonetti de Arruda Leite, Laboratorio de Investigações Médicas (LIM) 07, Hospital das Clínicas HCFMUSP, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil, Av. Dr. Arnaldo, 455, sala 4384, Cerqueira César - São Paulo - SP - 05403-010, Brazil. azaleite@gmail.com Telephone: +55-11-30617279

Financial support: Grant #2015/06196-0, São Paulo Research Foundation (FAPESP).

Potential competing interests: All authors have nothing to disclose

Specific author contributions: ARA: contributed to the study design, implemented the study protocol, collected and interpreted the data, wrote the first draft of the manuscript, contributed to subsequent revisions, and contributed to its intellectual content; MFCA, AOMC, AMS, PV, ED: oversaw the implementation of the study protocol and contributed to its intellectual content; ARA and ASC: contributed to the implementation of the study protocol and collected the data; TRFR, CLOA and IN contributed to the reading of the results. AZAL: conceived and designed the study, oversaw the study implementation and collection of data, interpreted the data, contributed to the writing of the first draft of the manuscript and its subsequent revisions and contributed to its intellectual content. ARA and AZAL are the guarantors of this work and, as such, had full access to all the data in the study

Abstract

BACKGROUND & AIM: Crohn's disease (CD) is associated with a high risk of thromboembolic events (TE). The significance of the sub-clinical inflammation in this process is still in debate. Thus, the aim of this study is to evaluate the effect of the endoscopic activity in the coagulation profile of CD patients in clinical remission.

METHODS: 164 patients in clinical remission (CDAI < 150) were included, 75 in the endoscopic activity (EA) group (SES-CD ≥ 7) and 89 in the endoscopic remission (ER) group (SES-CD ≤ 2). Specific hemostatic tests were compared with plasma from 50 healthy controls. We also collected data regarding risk factors for TE and disease profile.

RESULTS: EA group showed more stricturing disease, had higher Rutgeerts scores as well as higher levels of CRP and calprotectin. CD had a higher tissue factor activity in EA vs. ER vs. controls (127 vs. 103 vs. 84, $p=0.001$), showing a procoagulant state in this group. Although CD showed higher VWF:Ag and VWF:RCo WF/ADAMTS-13, Factor VIII and thrombomodulin levels than controls, they were not different between EA and ER groups. Endogenous thrombin potential (ETP) with and without thrombomodulin (TM) was the same in the three groups.

CONCLUSION: there is an inherent endothelial dysfunction in CD, but the presence of endothelial damage increased this procoagulating state, which seemed to be compensated by other factors, as the amount of thrombin generated was the same among groups. Nevertheless, this permanent compensatory state could minimize the capacity of these individuals to keep the balance during an acute event, increasing the risk of thrombosis.

Keywords: Crohn's disease, thrombosis, tissue factor, endoscopic activity, thrombin generation

Introduction

Crohn's Disease (CD) is a chronic inflammatory disorder that is associated with a two to three folds higher risk of thromboembolic (TE) events in CD patients than subjects without CD, and is often associated with high morbidity and mortality (1–3). In our population, we observed a prevalence of 5.7% of thrombosis in CD, which was linked to a significantly high mortality (1.45% vs. 10.71%, with an 8.0 OR). TE episodes are associated with hospitalization, disease activity and extension. Nonetheless, the importance of the subclinical inflammation in the coagulation process is still unknown. This information is very important as, despite all advances in the treatment of inflammatory bowel diseases (IBD) with new drugs, about 50% of the patients in clinical remission still maintain endoscopic activity (4) with blood vessel damage.

Tissue factor activity (TF) in physiologic conditions is not in contact with circulating coagulation factors. If the endothelial is disrupted, it will activate the coagulation cascade, with the formation of the TF/FVII complex (5). The balance between pro- and anticoagulant proteins will determine the final thrombin generation (6). Besides the damage, the inflammation by itself increases some acute

phase proteins that can interfere with the coagulation cascade. The von Willebrand Factor (VWF), which is a multimeric protein, normally stimulates adhesion and platelet aggregation, carries FVIII (factor VIII) – preventing its degradation – and functions as an endothelial acute phase protein, similar as Fibrinogen and FVIII by the liver (7,8). In physiological conditions, it is cleaved by a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 13 (ADAMTS-13) in order to control thrombus formation; nevertheless, this enzyme might be reduced during an inflammatory process (9). Thrombomodulin is also an endothelial protein which regulates the excess of thrombin formation by the activation of the Protein C and its receptor.

Thus, the aim of this study is to evaluate the impact of the endoscopic disease activity in the coagulation process of subclinical CD patients, searching for a subgroup of patients with a higher risk to develop thrombosis.

Materials and Methods

Between May 2015 and February 2017, 662 CD patients were attended at the Outpatient Clinic of Hospital das Clínicas of the University of São Paulo. Disease was

diagnosed based on classic histological, endoscopic, and radiological criteria. Patients in probable clinical remission, and who had an indication to undergo a colonoscopy (in order to check endoscopic activity, response to treatment, colon cancer screening among other indications) were asked to participate in the study.

Patients received the symptom diary (in order to record the Crohn's Disease Activity Index or CDAI parameters) and the quality of life questionnaire (IBDQ) to be filled out ten days before the colonoscopy. Blood was collected just before the beginning of colonoscopy preparation. Immediately after collection, part of the blood was centrifuged at 3000g for 20 minutes at room temperature. The samples, poor in platelets, were stored at 80°C until further examination. This plasma was used for the measurement of thrombin generation (with and without thrombomodulin), tissue factor activity (TF), von Willebrand factor antigen (VWF:Ag) and ristocetin cofactor (VWF:RCo), ADAMTS-13, factor VIII (FVIII) and thrombomodulin. Values were compared with the plasma of 50 healthy subjects with no risk factors for thrombosis. Another part of the blood was used to measure fibrinogen, D-dimer, protein C and S, anti-thrombin, protein C resistance, blood cell count, hematocrit, blood

platelets, C-reactive protein (CRP), prothrombin and Leiden mutation. A stool sample was collected on the day before the colonoscopy to measure fecal calprotectin.

Additionally, we also collected data regarding smoking status and other risk factors for TE, disease duration, extension, behavior, location, clinical and endoscopic disease activity, pharmacological treatment, quality of life and recent hospitalization along with anthropometric information.

The simplified endoscopic score for CD (SES-CD) was used to evaluate endoscopic activity. Only patients in clinical remission (CDAI < 150) were included. Patients with SES-CD ≤ 2 were included in the endoscopic remission group and patients with SES-CD ≥ 7 were included in the endoscopic activity group. Patients with SES-CD between 3-6 were excluded. Other exclusion criteria were disease location not accessed by colonoscopy, use of drugs interfering with coagulation, hepatic disorders, pregnancy, active cancer, recent surgery and changes in the treatment during the last 3 months.

The sample size was calculated for 75 patients in each group, assuming a difference of 25% in the ETP, to reach a 0.9 power and a 0.05 alpha error.

This study was approved by the local ethics committee and all patients filled

out the informed consent. The data was entered into a RedCap (Research Electronic Data Capture) database.

Continuous Automated Thrombin Generation (CAT)

The thrombin generation test was measured using a continuous automated method, from Thrombinoscope BV, Maastricht, Netherlands. For the fluorogenic assay, imidazole buffer solution was obtained from 5pM of tissue factor (TF) mixed with 4μM phospholipids (PLs) and added to polypropylene 96-well microtiter plates (Immulon 2HB, Thermo Labsystems, Helsinque, Finland). Plasma was then added, with PPP reagent, calibrator and rabbit thrombomodulin (derived from Sekisui Diagnosis). Thrombin generation was triggered by the Thrombinoscope™ software resulting in the formation of the thrombogram. The parameters derived from the thrombograms were lagtime, peak and area under the curve, referred as the endogenous thrombin potential (ETP). The thrombomodulin concentration utilized was that able to reduce ETP by 50% in normal individuals.

Tissue Factor Activity

Tissue Factor activity (TF) was measured using a commercial Chromogenic Activity Assay Kit from Abcam. It evaluates the ability of the TF / FVIIa complex to activate FX in FXa, measured by the amount of FXa produced by a chromogenic reaction, read in an absorbance range of 405 nm. The change in absorbance at 405 nm was directly proportional to the concentration of TF. After preparation of the reagents, we pipetted 70 μl of Mix, followed by 10 μl of TF and sample plasmas in each well, followed by incubation at 37 ° C for 30 minutes in duplicate. An amount of 20 μl of substrate was added to FXa in each well. Absorbances were read in the range of 405 nm every 5 minutes for 25 minutes. The OD variation of each sample in relation to the standard curve was divided by the minutes of observation (ΔOD/min). A graph was constructed with the TF concentration in pM in the x-axis and the OD405 in nm in the y-axis and a 4-point curve.

Determination of VWF antigen (VWF:Ag) and VWF activity (Ristocetin Cofactor or VWF:RCO)

Both the VWF:Ag and the VWF:RCO (in the presence of Ristocetin, which promotes platelet aggregation) were determined by means of an automated turbidimetric reading system (HemosIL)

whose latex particles were sensitized with specific antibodies against VWF and Platelet Glycoprotein GPIIa/IIIb, respectively. The decrease in transmitted light after agglutination particles is directly proportional to the VWF:Ag and the VWF:RCo concentration.

Determination of ADAMTS-13 activity

The ADAMTS-13 activity was measured by the chromogenic ELISA method (Technoclone). The Elisa plate, coated by the Anti-GST antibody (VWF73 ligand), upon incubation with the substrate, retains the VWF73 bound to the plate. The patient's serum with ADAMTS-13 added to the plate cleaves the VWF73 and emits visible light that can be read in the optical density range of 450 nm and interpolated with the standard five-point curve.

Determination of thrombomodulin

The serum thrombomodulin (CD 141) was measured using a commercial ELISA kit (Abcam kit ab46508) following the manufacturer's specifications. Briefly, the plate, coated with anti-thrombomodulin specific monoclonal antibody, received the appropriate amounts of samples, standards and controls. The intensity of the reaction, through the formed color, was measured in

the OD range of 450nm and interpolated with the standard five-point curve.

Determination of FVIII activity

FVIII activity was determined by the functional coagulometric method (Hemosil-IL) based on the activated partial thromboplastin time (aPTT). The same volume of diluted test plasma was added to a FVIII deficient plasma. Correction of the prolonged coagulation time was proportional to the FVIII concentration (expressed in % of activity).

Statistical analysis

All statistical examinations were performed with R Statistics. Data distribution was analyzed by Shapiro test and histogram analysis. Results of quantitative data were presented as median and interquartile range for data that were not normally distributed. Categorical data was summarized as the percentage of the total group. Differences of quantitative data with normally distribution were assessed by the Student t test for data and for not normally data, by the Wilcoxon rank sum test. Differences in frequencies for categorical data were assessed with the Fisher's exact test. Multiple comparisons were done by the nonparametric Kruskal

Wallis test with Bonferroni/Dunn test. Associations between the variables with normal distribution were assessed using the Pearson correlation test.

Statement

All authors had access to the study data, reviewed and approved the final manuscript.

Results

Baseline Demographic Data

In all, 229 colonoscopies were performed resulting in the inclusion of 164 patients in clinical remission, 75 in the endoscopic activity (EA) group ($\text{SES-CD} \geq 7$) and 89 in the endoscopic remission (ER) group ($\text{SES-CD} \leq 2$).

There were more females (59.2%), the median age was 44 years [35-57], age at clinical onset was 29 years [22-41] and disease duration 11 years [7-17]. Total IBDQ was 134 [114-147], and body mass index (BMI) was 24 [22-27]. Disease location was as follows: ileocolonic in 99 (44%), ileal 82 (36%) and colonic in 46 patients (20%). Disease behavior was 88 (39%) fistulizing, 80 (35%) inflammatory and 59 (26%) structuring. Of the

penetrating phenotype, 40 (45%) had perianal involvement.

The vast majority of CD patients was taking immunomodulators (67%) and/or biological therapy (47%). A significant number of CD patients had already undergone previous major abdominal surgery (90 patients, 38%). Regarding TE risk factors, 9% were active smokers, 10% used oral contraceptives, 8% had a previous familial deep vein thrombosis (DVT), 4% had previous thrombosis, and 13% had a previous spontaneous abortion.

Considering the prevalence of thrombophilias in the baseline population, anti-thrombin deficiency was present in 10% (21/206), protein C deficiency in 3% (7/206), protein S deficiency in 3% (8/214), protein C resistance in 5% (4/81), lupus anticoagulant in 4% (7/191), anticardiolipin IgM in 10% (11/109), anticardiolipin IgG in 6% (7/109), mutation of the prothrombin gene in 6% (4/67) and for the Factor V Leiden, of the 8 patients tested, 1 had the mutation.

Included Patients

Groups were similar regarding age, gender, BMI, age at diagnosis, disease duration, disease location and IBDQ. The

EA group showed more stricturing disease (43% vs. 18%; $p=0.001$) and higher Rutgeerts scores (91% were i0 in the ER group, while 53% were i2, 3% i3, and 37% i4 in the EA group). Levels of CRP and calprotectin above 5mg/L and 200 mcg/g, respectively, were also higher in the EA group (59% vs. 40%; $p=0.001$, and 59% vs. 41%; $p=0.03$, respectively). Groups were quite similar regarding the treatment except for the fact that EA group was using more biologic drugs (54% vs. 46%; $p=0.041$).

Regarding TE-associated conditions, groups were very similar: active smoking (11% vs. 8%, $p=0.364$) previous (1% vs. 6%, $p=0.149$) or familial (4% vs. 9%, $p=0.209$) TE, oral contraceptives (5% vs. 4%, $p=0.663$) and steroid use (1% in each group). In relation to thrombophilias, the only difference between the two groups was the prevalence of positive lupus anticoagulant (tested in 141 patients), higher in the group with endoscopic activity (8% vs. 1%, $p=0.047$); however, two of the five patients with lupus anticoagulant did not perform a second confirmatory test. No statistical difference was observed regarding antithrombin deficiency ($n=148$; 12% vs. 11%, $p=0.781$), protein C deficiency ($n=148$; 4% vs. 2%, $p=0.272$), protein S deficiency ($n=154$; 4% vs. 2%, $p=0.468$), protein C resistance ($n=50$; 10% vs. 0.3%, $p=0.333$), anti-cardiolipin IgM

($n=70$, 11% vs. 9%, $p=0.997$), anti-cardiolipin IgG ($n=71$, 11% vs. 9%, $p=0.651$), prothrombin mutation ($n=46$; 6% vs. 7%, $p=0.831$) and for the factor V Leiden mutation, of the 6 patients tested, only one had the mutation.

TISSUE FACTOR

CD had higher serum tissue factor levels than controls, which was significantly higher in patients with EA (127 vs. 103 vs. 84, $p=0.001$) (Figure 1). In addition, 82% in the activity group and 55% in the remission group had TF values above the 3rd quartile of the control group. These data show that even patients with CD in endoscopic remission are not in deep remission and maintain some degree of endothelial lesion, which results in increased tissue factor levels, triggering the coagulation cascade.

Figure 1 Tissue Factor levels between Endoscopic Activity, Endoscopic Remission and Control group

VWF:Ag, VWF:RCo, FVIII AND
VWF/ADAMTS-13

Although CD had higher VWF:Ag (160 vs. 168 vs. 110; $p=0.001$) (Figure 2), VWF:RCo (150 vs. 144 vs. 90, $p=0.001$) and factor VIII (150 vs. 144 vs. 90, $p=0.001$) (Figure 3) levels than controls, there were no differences between EA and ER groups. It is noteworthy that the correlation between the VWF:Ag and VWF: RCo was excellent ($r=0.92$, $p<0.001$), suggesting the disease itself is associated with an endothelial dysfunction. ADAMTS-13 showed no difference between EA, ER and controls (0.87 vs. 0.72 vs. 0.68, $p=0.07$). Nevertheless, the ratio VWF/ADAMTS-13 was higher in CD (191 vs. 219 vs. 138, $p=0.003$) (Figure 4), demonstrating a relative reduction of this enzyme in CD patients.

Figure 2 VWF:Ag levels between Endoscopic Activity, Endoscopic Remission and Control group

Figure 3. FVIII levels between Endoscopic Activity, Endoscopic Remission and Control group

Figure 4 VWF/ADAMTS-13 levels between Endoscopic Activity, Endoscopic

Remission and Control group

*p<0.001

THROMBOMODULIN

Figure 5 shows the results of serum thrombomodulin in patients with CD with and without endoscopic activity, compared to controls. CD patients, regardless of inflammatory activity, presented with significantly higher levels than controls (5.13 vs. 4.91 vs. 3.81 ng / mL, $p < 0.001$) (Figure 5). This increase could be a compensatory mechanism of the increasing procoagulant factors, or it could represent a mobilization of endothelium-bound TM to the blood.

Figure 5 Thrombomodulin levels between Endoscopic Activity, Endoscopic

Remission and Control group

*p<0.001

THROMBIN GENERATION

No statistically significant difference was observed between the CD groups and controls with regard to the ETP without thrombomodulin (1674 vs. 1680 vs. 1654, respectively, $p = 0.378$) (Figure 6) and with thrombomodulin (609 vs. 539 vs. 650, respectively, $p = 0.15$). The ratio of ETP with and without thrombomodulin (0.37 vs. 0.31 vs. 0.43, respectively, $p = 0.052$) (Figure 22) also showed no difference between the groups.

In relation to the other parameters of thrombin generation, no statistical difference was observed between the CD groups and controls regarding Lag Time without thrombomodulin (3.67 vs. 3.67 vs. 3.33, respectively, $p = 0.073$) or with thrombomodulin (4.67 vs. 4.83 vs. 4.5,

respectively, $p = 0.124$). When we observed the peak without thrombomodulin, there was a statistical difference between CD and controls (295 vs. 298 vs. 277, respectively, $p = 0.001$) (Figure 7), although this difference was not maintained when thrombomodulin was added (127 vs. 112 vs. 130, respectively, $p = 0.54$). This parameter, considered as the maximum concentration of thrombin in a given time, is not accepted by all authors, but has already been shown as a possible hypercoagulability factor, indicating an increased risk for recurrent venous thromboembolism (VTE) (10).

Figure 6 ETP levels between Endoscopic Activity, Endoscopic Remission and Control group

Figure 7 Peak levels between Endoscopic Activity, Endoscopic Remission and Control group

Discussion

To the best of our knowledge, this is the first study analyzing the influence of endoscopic activity in CD patients in clinical remission. There is a weak correlation between endoscopic and clinical activity (4,11), but most recommendations for thromboprophylaxis are based on clinical symptoms and during hospitalization, with little attention given to patients in clinical remission, but still with inflammation. Therefore, we conducted a study focusing on outpatients with subclinical disease searching for a subgroup at high risk of thrombosis.

Our results show that subclinical CD patients with endoscopic activity have higher exposure to TF. Edwards et al. (12) had already shown an increase in fibrinogen A (peptide derived from fibrinogen after cleavage by thrombin) and TF activity in monocyte cell culture of 36 patients with CD. They found that the concentration of fibrinopeptide A was increased mainly in

patients with clinical activity, but a large proportion of patients with CDAI <150 also had increased levels. This was one of the first studies in which the authors warned against a pro-coagulant state even in CD patients in clinical remission, although this work fails to conduct a more objective evaluation of the inflammatory process.

A few years later, Carty et al. (13) measured TF in the urine of hospitalized controls without inflammatory or neoplastic disease (n = 79), in patients with rheumatoid arthritis (n = 8), inflammatory bowel disease (n = 19), colorectal cancer (CRC) (n = 70) and in patients undergoing colonoscopy (n = 50), reporting that concentrations were increased in patients with CRC and IBD compared to controls. In the sub-population of patients submitted to a colonoscopy, 24% of patients with normal examination vs. 88% of patients with altered examination (IBD or CCR) presented with high TF values (p <0.001).

Undas et al. (14) also showed, in 80 patients with IBD, that the detection of TF in the blood was present in 2/3 and 1/3 of the patients with CD and ulcerative colitis (UC), respectively and was associated with a greater activation of coagulation, evaluated by the greater amount of Thrombin-antithrombin complexes. Later, Palkovits et al. (15) observed higher concentrations of TF-platelet

microparticles in patients with IBD compared to controls. However, they pointed out that 40% of these patients were in clinical remission, suggesting that even in subclinical disease there is a residual inflammatory process shown by TF release and platelet activation.

Taken together, these studies corroborate our findings. Nevertheless, they were either performed without an adequate endoscopic evaluation or assessed by an indirect measurement. The inclusion of the endoscopic evaluation in this study allows us to better characterize the increase in TF with the presence of the inflammatory process in the intestine, regardless of the clinical manifestations of the disease and reinforces the connection of the inflammatory process with hypercoagulability in CD.

Yet, the inflammatory process by itself can activate the endothelial cells, favoring a prothrombotic state through the secretion of polymers of VWF and modulating the TM expression. The first study to elicit the association of VWF and endothelial dysfunction in IBD was conducted by Gaffney et al. (19). Through a survey with experts in hemophilia and von Willebrand disease in England, they calculated the prevalence of IBD and compared it with the estimated prevalence in this population. They found that among 6433 cases of hemophilia and 3129 cases of

von Willebrand, there were only 4 cases of CD and 9 cases of UC, with an expected n of 11.97-16.58 and 11.97-16.58, respectively, both with protective morbidity ratio around 20-40%, with statistical significance.

We found higher levels of VWF (antigen and cofactor), VWF/ADAMTS-13 and FVIII in CD patients vs. controls. Similar data was reported by Meucci (20), Zazos (21) and Cibor (22) et al., although the only study which considered the endoscopic activity in the evaluation was that by Zazos et al. in UC patients.

Cibor et al. studied the ADAMTS-13 concentrations and found similar results as ours, pointing to a relative reduction of ADAMTS-13 in CD patients vs. controls, when analyzed by the ratio VWF/ADAMTS-13. Low levels of ADAMTS-13 can be explained either by an excess consumption by VWF multimers, released by the activated endothelium, or by a greater cleavage by proteases released by activated neutrophils, with progressive enzyme inactivation. Besides that, in a more severe disease with systemic inflammation there is an inhibition of the ADAMTS-13 by inflammatory cytokines, mainly TNF and IL-6 (23,24). In addition, IL-6 also has the ability to degrade ADAMTS-13 (9). These data suggest that the inflammatory process, which increases VWF, blocks the increase of ADAMTS-13,

altering their relationship and favoring the state of hypercoagulability. In fact, FVIII was increased in IBD patients as well, compared to controls indicating a more pro-coagulant state.

TM is also one of the proteins that interacts directly with inflammation and coagulation in IBD (25,26). Faioni et al. (26) showed a loss of expression of TM and the C-endothelial receptor protein (EPCR) in intestinal biopsies of patients with IBD but not controls. In contrast, serum concentrations of soluble TM and soluble EPCR were increased in patients with IBD, compared to controls. The authors concluded that this could happen as a resistance to the action of protein C in the microvasculature of the inflamed mucosa. However, our findings suggest another possible explanation that would be the action of the inflammation on the endothelial cell, releasing the TM bound to the endothelium and consequently a lower activation of the protein C pathway and an increase in soluble TM.

Thrombin generation has already been studied in IBD by Saibeni et al. (27) who evaluated the ETP with and without thrombomodulin in 37 patients with UC vs. 37 patients with CD vs. controls. The authors used a similar methodology, but with different concentrations of phospholipids and TF, 1 pM/L and 1 μ mol/L, respectively (we used 5 pM/L TF

and 4 $\mu\text{mol/L}$ phospholipids). They observed that the mean ETP was higher in the IBD group vs. controls (1499 vs. 1261 nM x min), as well the ratio with/without thrombomodulin (0.69 vs. 0.62 nM x min). ETP was increased by up to 35% in patients with IBD, especially in those with high CRP when compared to normal and control group without IBD, suggesting an association with disease activity. The higher ETP, even after the addition of TM, which did not occur in the plasma of healthy controls, led the authors to consider a resistance of TM action. Nonetheless, the measurement of TM in our work allows us to propose a hypothesis more in line with literature data suggesting that the resistance of protein C happens secondarily to the modulation of the TM in the endothelium. Another criticism related to Saibeni's work is its heterogeneity, with the inclusion of CD and UC patients, and the absence of a colonoscopic evaluation.

Our results suggest that a greater systemic inflammatory process might be required to show a difference in the thrombin generation. However, despite the similar values of ETP, measured with and without thrombomodulin, between CD and control group, the highest peak of thrombin generation among patients with CD versus controls might be relevant. Lutsey et al. (10) reported that in a multicentric database (434 cases and 1004 controls), patients with

a higher peak of thrombin generation had a higher risk to develop a DVT event, with an 1.74 (1.28-2.37) OR.

The present study provides an overall assessment of coagulation parameters in patients with sub-clinical disease, by means of an accurate evaluation of the inflammatory activity, thus allowing a better understanding of this relationship.

Conclusion

This is the first study evaluating the role of endoscopic activity in hemostasis of CD patients. We found that even in subclinical CD, patients show a more hypercoagulable profile when compared to healthy controls, and those with endoscopic activity may activate more the coagulation process, due to endothelial lesions and tissue factor exposure. In general, coagulation balance, demonstrated by the potential for thrombin generation, appears to be compensated by other mechanisms in subclinical CD that can limit the compensatory capacity during an acute event, favoring a thromboembolic episode.

References

1. Harbord M, Annese V, Vavricka SR, Allez M, Barreiro-de Acosta M, Boberg KM, et al. The First European Evidence-based Consensus on Extra-intestinal Manifestations in Inflammatory Bowel Disease. *J Crohns Colitis*. 2016 Mar;10(3):239–54.
2. Nguyen GC, Sam J. Rising Prevalence of Venous Thromboembolism and Its Impact on Mortality Among Hospitalized Inflammatory Bowel Disease Patients. *Am J Gastroenterol*. 2008 Sep;103(9):2272–80.
3. Andrade AR, Barros LL, Azevedo MFC, Carlos AS, Damião AOMC, Sipahi AM, et al. Risk of thrombosis and mortality in inflammatory bowel disease. *Clin Transl Gastroenterol*. 2018 Apr 3;9(4):142.
4. Peyrin-Biroulet L, Reinisch W, Colombel J-F, Mantzaris GJ, Kornbluth A, Diamond R, et al. Clinical disease activity, C-reactive protein normalisation and mucosal healing in Crohn's disease in the SONIC trial. *Gut*. 2014 Jan;63(1):88–95.
5. Geddings JE, Mackman N. New players in haemostasis and thrombosis. *Thromb Haemost*. 2014 Apr 1;111(4):570–4.
6. Coenraad Hemker H, Dieri RA, De Smedt E, Béguin S. Thrombin generation, a function test of the haemostatic/thrombotic system. *Thromb Haemost* [Internet]. 2006 Oct 16 [cited 2017 Sep 15]; Available from: <http://www.schattauer.de/index.php?id=1214&doi=10.1160/TH06-07-0408>
7. Paleolog EM, Crossman DC, McVey JH, Pearson JD. Differential regulation by cytokines of constitutive and stimulated secretion of von Willebrand factor from endothelial cells. *Blood*. 1990 Feb 1;75(3):688–95.
8. van der Poll T, van Deventer SJ, Pasterkamp G, van Mourik JA, Büller HR, ten Cate JW. Tumor necrosis factor induces von Willebrand factor release in healthy humans. *Thromb Haemost*. 1992 Jun 1;67(6):623–6.
9. Claus RA, Bockmeyer CL, Budde U, Kentouche K, Sossdorf M, Hilberg T, et al. Variations in the ratio between von Willebrand factor and its cleaving protease during systemic inflammation and association with severity and prognosis of organ failure. *Thromb Haemost*. 2009 Feb;101(2):239–47.
10. Lutsey PL, Folsom AR, Heckbert SR, Cushman M. Peak thrombin generation and subsequent venous thromboembolism: the Longitudinal Investigation of Thromboembolism Etiology (LITE) study. *J Thromb Haemost JTH*. 2009 Oct;7(10):1639–48.
11. Cellier C, Sahmoud T, Froguel E, Adenis A, Belaiche J, Bretagne JF, et al. Correlations between clinical activity, endoscopic severity, and biological parameters in colonic or ileocolonic Crohn's disease. A prospective multicentre study of 121 cases. The Groupe d'Etudes Thérapeutiques des Affections Inflammatoires Digestives. *Gut*. 1994;35(2):231–235.
12. Edwards RL, Levine JB, Green R, Duffy M, Mathews E, Brande W, et al. Activation of blood coagulation in Crohn's disease. Increased plasma fibrinopeptide A levels and enhanced generation of monocyte tissue factor activity. *Gastroenterology*. 1987 Feb;92(2):329–37.
13. Carty N, Taylor I, Roath OS, Eibaruni K, Francis JL. Urinary tissue factor activity in colorectal disease. *Br J Surg*. 1990 Oct 1;77(10):1091–4.
14. Undas A, Owczarek D, Gissel M, Salapa K, Mann KG, Butenas S. Activated

factor XI and tissue factor in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2010 Sep;16(9):1447.

15. Palkovits J, Novacek G, Kollars M, Hron G, Osterode W, Quehenberger P, et al. Tissue factor exposing microparticles in inflammatory bowel disease. *J Crohns Colitis*. 2013 Apr;7(3):222–9.

16. Anthoni C, Russell J, Wood KC, Stokes KY, Vowinkel T, Kirchhofer D, et al. Tissue factor: a mediator of inflammatory cell recruitment, tissue injury, and thrombus formation in experimental colitis. *J Exp Med*. 2007 Jul 9;204(7):1595–601.

17. Sharma L, Melis E, Hickey MJ, Clyne CD, Erlich J, Khachigian LM, et al. The Cytoplasmic Domain of Tissue Factor Contributes to Leukocyte Recruitment and Death in Endotoxemia. *Am J Pathol*. 2004 Jul;165(1):331–40.

18. Nawroth PP, Handley DA, Esmon CT, Stern DM. Interleukin 1 induces endothelial cell procoagulant while suppressing cell-surface anticoagulant activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1986 May;83(10):3460–4.

19. Gaffney PR, Doyle CT, Gaffney A, Hogan J, Hayes DP, Annis P. Paradoxical response to heparin in 10 patients with ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol*. 1995 Feb;90(2):220–3.

20. Meucci G, Pareti F, Vecchi M, Saibeni S, Bressi C, de Franchis R. Serum von Willebrand factor levels in patients with inflammatory bowel disease are related to systemic inflammation. *Scand J Gastroenterol*. 1999 Mar;34(3):287–90.

21. Zazos P, Papaioannou G, Nikolaidis N, Vasiliadis T, Gioulema O, Evgenidis N. Elevated plasma von Willebrand factor

levels in patients with active ulcerative colitis reflect endothelial perturbation due to systemic inflammation. *World J Gastroenterol*. 2005 Dec 28;11(48):7639–45.

22. Cibor D, Owczarek D, Butenas S, Salapa K, Mach T, Undas A. Levels and activities of von Willebrand factor and metalloproteinase with thrombospondin type-1 motif, number 13 in inflammatory bowel diseases. *World J Gastroenterol*. 2017;23(26):4796.

23. Crawley JTB, Lam JK, Rance JB, Mollica LR, O'Donnell JS, Lane DA. Proteolytic inactivation of ADAMTS13 by thrombin and plasmin. *Blood*. 2005 Feb 1;105(3):1085–93.

24. Mannucci PM, Capoferri C, Canciani MT. Plasma levels of von Willebrand factor regulate ADAMTS-13, its major cleaving protease. *Br J Haematol*. 2004 Jul;126(2):213–8.

25. Danese S, Papa A, Saibeni S, Repici A, Malesci A, Vecchi M. Inflammation and coagulation in inflammatory bowel disease: The clot thickens. *Am J Gastroenterol*. 2007 Jan;102(1):174–86.

26. Faioni EM, Ferrero S, Fontana G, Gianelli U, Ciulla MM, Vecchi M, et al. Expression of endothelial protein C receptor and thrombomodulin in the intestinal tissue of patients with inflammatory bowel disease. *Crit Care Med*. 2004 May;32(5 Suppl):S266–270.

27. Saibeni S, Saladino V, Chantarangkul V, Villa F, Bruno S, Vecchi M, et al. Increased thrombin generation in inflammatory bowel diseases. *Thromb Res*. 2010 Mar;125(3):278–82.

14. Undas A, Owczarek D, Gissel M, Salapa K, Mann KG, Butenas S. Activated factor XI and tissue factor in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2010 Sep;16(9):1447.
15. Palkovits J, Novacek G, Kollars M, Hron G, Osterode W, Quehenberger P, et al. Tissue factor exposing microparticles in inflammatory bowel disease. *J Crohns Colitis*. 2013 Apr;7(3):222–9.
16. Anthoni C, Russell J, Wood KC, Stokes KY, Vowinkel T, Kirchhofer D, et al. Tissue factor: a mediator of inflammatory cell recruitment, tissue injury, and thrombus formation in experimental colitis. *J Exp Med*. 2007 Jul 9;204(7):1595–601.
17. Sharma L, Melis E, Hickey MJ, Clyne CD, Erlich J, Khachigian LM, et al. The Cytoplasmic Domain of Tissue Factor Contributes to Leukocyte Recruitment and Death in Endotoxemia. *Am J Pathol*. 2004 Jul;165(1):331–40.
18. Nawroth PP, Handley DA, Esmen CT, Stern DM. Interleukin 1 induces endothelial cell procoagulant while suppressing cell-surface anticoagulant activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1986 May;83(10):3460–4.
19. Gaffney PR, Doyle CT, Gaffney A, Hogan J, Hayes DP, Annis P. Paradoxical response to heparin in 10 patients with ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol*. 1995 Feb;90(2):220–3.
20. Meucci G, Pareti F, Vecchi M, Saibeni S, Bressi C, de Franchis R. Serum von Willebrand factor levels in patients with inflammatory bowel disease are related to systemic inflammation. *Scand J Gastroenterol*. 1999 Mar;34(3):287–90.
21. Zezos P, Papaioannou G, Nikolaidis N, Vasiliadis T, Giouleme O, Evgenidis N. Elevated plasma von Willebrand factor levels in patients with active ulcerative colitis reflect endothelial perturbation due to systemic inflammation. *World J Gastroenterol*. 2005 Dec 28;11(48):7639–45.
22. Cibor D, Owczarek D, Butenas S, Salapa K, Mach T, Undas A. Levels and activities of von Willebrand factor and metalloproteinase with thrombospondin type-1 motif, number 13 in inflammatory bowel diseases. *World J Gastroenterol*. 2017;23(26):4796.
23. Crawley JTB, Lam JK, Rance JB, Mollica LR, O'Donnell JS, Lane DA. Proteolytic inactivation of ADAMTS13 by thrombin and plasmin. *Blood*. 2005 Feb 1;105(3):1085–93.
24. Mannucci PM, Capoferri C, Canciani MT. Plasma levels of von Willebrand factor regulate ADAMTS-13, its major cleaving protease. *Br J Haematol*. 2004 Jul;126(2):213–8.
25. Danese S, Papa A, Saibeni S, Repici A, Malesci A, Vecchi M. Inflammation and coagulation in inflammatory bowel disease: The clot thickens. *Am J Gastroenterol*. 2007 Jan;102(1):174–86.
26. Faioni EM, Ferrero S, Fontana G, Gianelli U, Ciulla MM, Vecchi M, et al. Expression of endothelial protein C receptor and thrombomodulin in the intestinal tissue of patients with inflammatory bowel disease. *Crit Care Med*. 2004 May;32(5 Suppl):S266–270.
27. Saibeni S, Saladino V, Chantarangkul V, Villa F, Bruno S, Vecchi M, et al. Increased thrombin generation in inflammatory bowel diseases. *Thromb Res*. 2010 Mar;125(3):278–82.