ADRIANA BERTOLAMI MANFREDI

**Aterosclerose subclínica e marcadores de
inflamação, de resistência à insulina e genéticos em
portadores de hiperglicemia**

Tese apresentada ao Instituto Dante Pazzanese de
Cardiologia, Entidade Associada da Universidade de São
Paulo para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

São Paulo
2014

ADRIANA BERTOLAMI MANFREDI

**Aterosclerose subclínica e marcadores de
inflamação, de resistência à insulina e genéticos em
portadores de hiperglicemia**

Tese apresentada ao Instituto Dante Pazzanese de
Cardiologia, Entidade Associada da Universidade de São
Paulo para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Medicina, Tecnologia e
Intervenção em Cardiologia

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Chiara Bertolami

Coorientador: Prof. Dr. Mario Hiroyuki Hirata

São Paulo
2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Preparada pela Biblioteca do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia

©reprodução autorizada pelo autor

Manfredi, Adriana Bertolami

Aterosclerose subclínica e marcadores de inflamação, de resistência à insulina e genéticos em portadores de hiperglicemia/
Adriana Bertolami Manfredi.-- São Paulo, 2014.

Tese(doutorado)--Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia
Universidade de São Paulo

Área de Concentração: Medicina, Tecnologia e Intervenção em
Cardiologia

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Chiara Bertolami

Co-orientador: Prof. Mario Hirata

Descritores: 1 Aterosclerose. 2. Estado Pré-Diabético. 3.
Transtornos do Metabolismo de Glucose. 4. Ultrassonografia
Doppler. 5.Tomografia. 6. Teste de Esforço.

USP/IDPC/Biblioteca/042 /14

Dedicatória

*A meus pais, Ana Maria e Marcelo, que me ofereceram as ferramentas
para minha formação tanto pessoal como profissional, subsídios para
que eu me tornasse uma pessoa feliz e muito realizada.*

*A meu querido irmão, Alexandre, que sempre me apoiou de forma
incondicional em minha luta pelos meus ideais.*

*A meu amado marido, Marcus, que esteve a meu lado durante
toda essa caminhada, sempre compreensivo e bem-humorado,
e a quem devo minha família, meu bem mais precioso.*

*A minha pequena Giovanna, que diariamente
me mostra a alegria nas pequenas coisas e
me ensina o real valor e o sentido da vida.*

“Julgue seu sucesso pelas coisas que você
teve que renunciar para conseguir.”

Dalai Lama

Agradecimientos

Aos Pacientes, pela paciência e disponibilidade.

*A meu pai e orientador, que, com maestria, conseguiu conciliar
as duas funções, para que, com sua experiência, pudesse
me mostrar quais os caminhos a serem seguidos.*

*A meu coorientador, Mario Hirata, sempre disponível e paciente para
transmitir seus conhecimentos a respeito desse mundo tão
complexo que é a Biologia Molecular.*

*A meus colegas de turma de doutorado, pelos momentos de
alegria e ansiedade que passamos juntos.*

*A Carolina Gonzaga, amiga inseparável e profissional admirável,
pela ajuda e pelos ensinamentos durante toda essa jornada.*

*A Martha Sulzbach, companheira de ambulatório e amiga querida,
pelo apoio e incentivo nessa conquista.*

*A meu chefe, André Faludi, pelas ótimas discussões
e por todo seu suporte.*

*A meus colegas da Seção de Dislipidemias, pelo carinho,
compreensão e apoio nessa jornada.*

*A Yara Nakamura, companheira de seção, excelente profissional,
por sua eterna disponibilidade e boa vontade
para contribuir com este projeto.*

A Vera Lucia da Silva por todo carinho e dedicação.

*A Darci Julia de Mello e Valdir de Jesus Bastos
Ferreira pela disponibilidade.*

A Lúcia Maria Ramos de Souza pela colaboração.

*A Simone Sorkin, por todo o carinho, e à atual equipe do Laboratório
de Biologia Molecular, pela disponibilidade e
ajuda do início ao fim do projeto.*

*À Seção de Ecocardiografia, em especial a Ana Claudia Petisco, pela
disponibilidade para a realização dos exames e pelas maravilhosas
discussões, e a José Eduardo M. Barbosa, por todo seu trabalho.*

*Às Seções de Ergometria e Tomografia, pela liberdade de
realizar todos os exames em meio a agendas tão cheias.*

A Juliana Lourenço da Silva, pela dedicação e carinho.

*A Valquíria Dias e Janeide Alves, pela atenção e
companheirismo nessa jornada.*

*A Anna Simene Leite e à equipe da Biblioteca,
pela eficiência e pelo apoio.*

A Ricardo Silveira, pelo suporte semanal durante as aulas de inglês.

*A Neusa Costa, por me acompanhar de mãos dadas
pelos caminhos da vida.*

*Aos queridos amigos que dividiram angústias e
sempre compreenderam minha ausência.*

Ao PROAP e à FAPESP, pelo apoio financeiro.

Normatização adotada

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

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

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação.

Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria Fazanelli Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação – SBD/FMUSP; 2011.

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

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas	
Lista de Figuras	
Lista de Tabelas	
Lista de Gráficos	
Resumo	
Abstract	
1 INTRODUÇÃO	01
1.1 Métodos para detecção de aterosclerose subclínica	09
1.1.1 Escore de cálcio coronário	10
1.1.2 Ultrassonografia <i>Doppler</i> de carótidas	11
1.1.3 Teste ergométrico	12
1.1.4 Índice tornozelo-braquial	14
1.2 Biomarcadores de aterosclerose	14
1.3 Marcadores genéticos	17
2 HIPÓTESE	20
3 OBJETIVOS	22
3.1 Primário	23
3.2 Secundários	23
4 CASUÍSTICA	24
4.1 Delineamento do estudo e população	25
4.2 Critérios de inclusão	29
4.3 Critérios de exclusão	30
4.4 Critérios de interrupção do estudo	31
5 ASPECTOS ÉTICOS	32
6 MÉTODOS	34
6.1 Avaliação clínica	35
6.2 Amostras biológicas	37
6.2.1 Determinações laboratoriais	38
6.3 Exames para detecção de aterosclerose subclínica	40
6.3.1 Escore de cálcio coronário	42
6.3.2 Ultrassonografia <i>Doppler</i> de carótidas	43
6.3.3 Teste ergométrico	44
6.3.4 Índice tornozelo-braquial	45
6.4 Técnicas de biologia molecular	46
6.4.1 Extração do DNA genômico	46
6.4.2 Determinação de single nucleotide polymorphisms por pirosequenciamento	46
6.4.3 Procedimento de pirosequenciamento	47
6.4.4 Extração de RNA de sangue periférico	49
6.4.5 Análise de expressão gênica por proteína C-reativa em tempo real	49
7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	52
8 RESULTADOS	55
8.1 Características clínicas e laboratoriais dos grupos	56

8.2	Exames diagnósticos de aterosclerose subclínica nos grupos ---	66
8.3	Biomarcadores de aterosclerose nos grupos -----	73
8.4	Marcadores genéticos nos grupos -----	75
8.5	Marcadores relacionados à presença de aterosclerose subclínica -----	77
9	DISCUSSÃO -----	88
9.1	Escore de cálcio coronário -----	92
9.2	Ultrassonografia <i>Doppler</i> de carótidas -----	95
9.3	Teste ergométrico -----	101
9.4	Índice tornozelo-braquial -----	102
9.5	Biomarcadores de aterosclerose -----	108
9.6	Marcadores genéticos -----	110
9.7	Fatores associados à presença de aterosclerose subclínica -----	113
10	LIMITAÇÕES -----	116
11	IMPLICAÇÕES -----	118
12	CONCLUSÕES -----	120
13	ANEXOS -----	122
14	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS -----	133

Lista de Abreviaturas

ADA	<i>American Diabetes Association</i>
AVC	acidente vascular cerebral
CAC	escore de cálcio coronário
DM2	diabete melito tipo 2
EMI	<i>espessura médio-intimal carotídea</i>
HbA1c	hemoglobina glicada
HDL-colesterol	colesterol de lipoproteína de alta densidade
<i>HOMA</i>	<i>Homeostasis Model Assessment</i>
IC	intervalo de confiança
IL-6	interleucina 6
IMC	índice de massa corporal
ITB	índice tornozelo-braquial
LDL-colesterol	colesterol de lipoproteína de baixa densidade
Lp-PLA2	fosfolipase A2 associada a lipoproteína
OR	<i>odds ratio</i>
PCR-us	proteína C-reativa ultrasensível
PLA2G7	ene da Lp-PLA2
SNP	<i>single nucleotide polymorphism</i>
T4L	hormônio tiroxina livre
TE	teste ergométrico
TNF- α	fator de necrose tumoral alfa
TOTG	teste oral de tolerância a glicose
TSH	hormônio tireoestimulante
USG	ultrassonografia <i>Doppler</i> de carótidas

Lista de Figuras

Figura 1 -	Esquema representativo da hipótese do <i>ticking clock</i> -----	04
Figura 2 -	Processo aterosclerótico: fatores de risco, diagnóstico da fase subclínica e manifestações clínicas. A doença aterosclerótica é multifatorial e se desenvolve pela interação de fatores genéticos e ambientais, passando pela fase subclínica, que pode ser diagnosticada por diferentes métodos, até chegar à fase clínica, que se manifesta em diversos territórios arteriais-----	08
Figura 3 -	Fluxograma dos exames aos quais os pacientes foram submetidos -----	26
Figura 4 -	Fluxograma do estudo-----	27
Figura 5 -	Fluxograma de indivíduos submetidos a triagem e a cada um dos exames propostos -----	57

Lista de Tabelas

Tabela 1 -	Critérios diagnósticos de síndrome metabólica segundo o NCEP ATP III ¹⁵⁵ -----	37
Tabela 2 -	Critérios de positividade para os exames de detecção de aterosclerose subclínica ^{34, 53, 61, 159, 162, 164} -----	41
Tabela 3 -	Relação dos oligonucleotídeos sintetizados para a reação de pirosequenciamento -----	48
Tabela 4 -	Distribuição das características clínicas gerais dos pacientes, segundo o grupo -----	59
Tabela 5 -	Metodologia das análises laboratoriais -----	61
Tabela 6 -	Descrição dos exames relacionados ao metabolismo glicídico, segundo o grupo-----	62
Tabela 7 -	Medidas-resumo dos resultados dos exames laboratoriais dos pacientes, segundo o grupo-----	64
Tabela 8 -	Distribuição dos resultados dos exames para aterosclerose subclínica dos pacientes, segundo o grupo-----	68
Tabela 9 -	Medidas resumo dos resultados do escore de cálcio coronário, segundo o grupo -----	69
Tabela 10 -	Medidas-resumo dos resultados da ultrassonografia <i>Doppler</i> de carótidas, segundo o grupo -----	71
Tabela 11 -	Medidas resumo dos resultados do teste ergométrico dos pacientes, segundo o grupo-----	72
Tabela 12 -	Medidas resumo dos marcadores de atividade inflamatória e resistência insulínica dos pacientes, segundo o grupo-----	75
Tabela 13 -	Distribuição dos polimorfismos dos pacientes, segundo o grupo -----	76
Tabela 14 -	Distribuição das expressões gênicas dos pacientes, segundo o grupo -----	77
Tabela 15 -	Descrição das características clínicas segundo a presença de aterosclerose subclínica e resultados dos testes de associação-----	78
Tabela 16 -	Descrição das características quantitativas antropométricas segundo presença de aterosclerose e resultado dos testes comparativos -----	80
Tabela 17 -	Resultados dos exames laboratoriais segundo a presença de aterosclerose e resultado dos testes comparativos -----	81
Tabela 18 -	Descrição dos biomarcadores segundo a presença de aterosclerose e resultado dos testes comparativos -----	84

Tabela 19 - Descrição da presença de aterosclerose segundo mutações genéticas dos pacientes e resultado dos testes de associação-----	85
Tabela 20 - Descrição da presença de aterosclerose segundo Expressões gênicas dos pacientes e resultado dos testes de associação-----	86
Tabela 21 - Resultado do modelo de regressão logística múltipla para explicar a presença de aterosclerose segundo as características avaliadas em pacientes diabéticos ou com alteração nos exames glicêmicos -----	87
Tabela 22 - Características dos estudos-----	97

Lista de Gráficos

Gráfico 1 -	<i>Continuum</i> cardiovascular do diabetes -----	05
Gráfico 2 -	Perfil glicídico e presença de aterosclerose subclínica -----	09
Gráfico 3 -	Apresentação dos grupos por valores de glicemia de jejum e após teste oral de tolerância a glicose-----	28
Gráfico 4 -	Medicações em uso de acordo com os grupos -----	65
Gráfico 5 -	Frequência dos exames de aterosclerose subclínica positiva nos grupos -----	67
Gráfico 6 -	Distribuição do escore de cálcio coronário entre os grupos-	69
Gráfico 7 -	Porcentagem de resultados positivos de ultrassonografia <i>Doppler</i> de carótidas por aumento da espessura médio-intimal carotídea e pela presença de placa carotídea	70
Gráfico 8 -	Distribuição do risco calculado pelo escore de Duke, segundo o grupo -----	72
Gráfico 9 -	Número de sítios arteriais acometidos na aterosclerose subclínica -----	73
Gráfico 10 -	Medicações em uso em cada um dos grupos-----	83

RESUMO

Manfredi AB. **Aterosclerose subclínica e marcadores de inflamação, de resistência à insulina e genéticos em portadores de hiperglicemia** [tese]. São Paulo: Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia, Entidade Associada da Universidade de São Paulo; 2014. 170p.

A doença aterosclerótica macrovascular se inicia em fases precoces das alterações do metabolismo glicídico. Este estudo teve por objetivos: 1) avaliar a prevalência de aterosclerose subclínica diagnosticada por métodos não-invasivos em indivíduos com indicação de teste oral de tolerância a glicose; 2) avaliar a distribuição de biomarcadores e de marcadores genéticos nessa população; e 3) determinar os fatores de risco para aterosclerose subclínica em pacientes disglucêmicos. Indivíduos em prevenção primária foram inicialmente submetidos a teste oral de tolerância a glicose e classificados em grupos controle, glicemia de jejum alterada, intolerância à glicose e diabetes melito; posteriormente, foram submetidos a pesquisa de aterosclerose subclínica e de biomarcadores, e a avaliação de polimorfismos genéticos e expressão gênica. Foram incluídos 103 pacientes no grupo controle, 80 no grupo glicemia de jejum alterada, 98 no grupo tolerância diminuída à glicose e 59 no grupo diabetes melito, com média de idade de $59 \pm 7,4$ anos, sendo 62,4% mulheres. Não foram encontradas diferenças quanto às características clínicas e laboratoriais entre os grupos. Foi observada alta prevalência de aterosclerose subclínica na população (77,1%) e, apesar de não haver diferença entre os grupos, houve tendência a prevalência crescente de acordo com a piora do perfil glicídico. Dentre os biomarcadores, foi encontrada diferença entre os grupos na análise de microalbuminúria, resistina, fator de necrose tumoral alfa e fosfolipase A2 associada a lipoproteína. Não houve diferença com relação aos polimorfismos, mas o grupo glicemia de jejum alterada apresentou maior expressão de mRNA do gene da fosfolipase A2 associada a lipoproteína. Concluímos que indivíduos com indicação de teste oral de tolerância a glicose têm alta prevalência de aterosclerose subclínica, independentemente do perfil glicídico. Após análise multivariada, os fatores que determinaram aterosclerose subclínica foram idade, pressão arterial sistólica, colesterol ligado à lipoproteína de alta densidade, fator de necrose tumoral alfa e uso de estatinas.

Descritores: Aterosclerose. Estado Pré-Diabético. Transtornos do Metabolismo de Glucose. Ultrassonografia Doppler. Tomografia. Teste de Esforço

SUMMARY

Manfredi AB. **Subclinical atherosclerosis and inflammation, insulin resistance and genetic markers in hyperglycemic patients** [thesis]. São Paulo: "Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia, Affiliated to Universidade de São Paulo"; 2014. 170p.

Atherosclerotic macrovascular disease begins in early phases of glucose metabolism alterations. The objectives were: 1) To evaluate the prevalence of subclinical atherosclerosis diagnosed by non-invasive methods in patients with an indication for oral glucose tolerance test. 2) To evaluate the distribution of biomarkers and genetic markers in this population. 3) Determine the risk factors for subclinical atherosclerosis in dysglycemic patients. Individuals in primary prevention underwent oral glucose tolerance test and were classified as controls, impaired fasting glucose, decreased glucose tolerance and diabetics and submitted to subclinical atherosclerosis search, evaluation of biomarkers, genetic polymorphisms and gene expression. A group of 103 patients were included as controls, 80 as impaired fasting glucose, 98 as decreased glucose tolerance and 59 as diabetes with a mean age of 59 ± 7.4 years, 62.4% women. No differences were found between clinical and laboratory characteristics of the groups. High prevalence of subclinical atherosclerosis (77.1%) was observed, although there was no significant difference between groups, a tendency of higher prevalence according to worsening of glucose increasing profile was verified. Among the biomarkers difference between groups were found in the analysis of microalbuminuria, resistin, tumor necrosis factor alfa and phospholipase A2 associated with lipoprotein. There was no difference regarding the polymorphisms, but the impaired fasting glucose group had higher expression of PLA2G7. After multivariate analysis, the factors that determined subclinical atherosclerosis were age, systolic blood pressure, HDL-cholesterol, tumor necrosis factor alfa and statins. We concluded that individuals with indication of oral glucose tolerance test have a high prevalence of subclinical atherosclerosis regardless of glucose profile. The factors that determine the presence of subclinical atherosclerosis were age, systolic blood pressure, HDL-cholesterol, tumor necrosis factor alfa and statins.

Descriptors: Atherosclerosis. Pre diabetic state. Disorders of Glucose Metabolism. Doppler ultrasonography. Tomography. Exercise Testing.

As doenças cardiovasculares, por suas altas taxas de morbidade e mortalidade evidenciadas a partir da metade do século XX, foram designadas como “epidemia do século”¹. Apesar de todo o conhecimento acumulado desde então e dos esforços no combate a esse problema de saúde pública, elas se mantêm como maior causa de mortalidade no século atual, particularmente nos países ocidentais.

Nos Estados Unidos, as doenças cardiovasculares são responsáveis por 1 morte a cada 2,8 mortes², e no Brasil cerca de um terço das pessoas falece em consequência delas³. Os maiores responsáveis por isso são os hábitos de vida modernos, que incluem sedentarismo e dieta hipercalórica, rica em gorduras e particularmente carboidratos. Esse estilo de vida moderno tem acarretado o aumento da obesidade e das doenças a ela relacionadas, dentre as quais o diabetes melito tipo 2 (DM2)⁴.

O DM2 é atualmente considerado uma epidemia que atinge países desenvolvidos e em desenvolvimento. A prevalência de DM2 no mundo em 2011 era de aproximadamente 360 milhões de pessoas e a projeção é de que esse número cresça de forma considerável até 2030, atingindo 552 milhões de indivíduos. Paralelamente, estima-se que 300 milhões de indivíduos possuam fatores de risco para o desenvolvimento de DM2, como

glicemia de jejum alterada, tolerância diminuída à glicose, diabetes gestacional e resistência insulínica⁵.

Entre os fatores de risco para as doenças cardiovasculares, o DM2 tem sido evidenciado como um dos principais⁶. Em comparação com a população normal, os indivíduos com DM2 apresentam incidência de doença arterial coronária⁷, acidente vascular cerebral (AVC)⁸ e doença arterial periférica⁹ até 4 vezes maior e têm 2 a 4 vezes mais chance de eventos coronários agudos¹⁰.

Embora alguns estudos contestem essa afirmação, o risco para infarto agudo do miocárdio em pacientes com DM2 sem doença arterial coronária previamente conhecida é considerado o mesmo de pacientes sem DM2, mas com doença arterial coronária prévia^{11, 12}.

O DM2 é precedido por uma fase de hiperglicemia assintomática que pode ter duração variável, geralmente de anos. Em 2003 a *American Diabetes Association* (ADA) reconheceu a existência de um grupo intermediário de indivíduos com valores de glicemia acima do normal, mas que não apresentavam critérios para o diagnóstico de DM2¹³. Essa população foi classificada como portadora de pré-DM2 ou disglucemia. O pré-DM2 e o DM2 são considerados estados de hiperglicemia¹³.

Os estados de pré-DM2 incluem glicemia de jejum alterada e tolerância diminuída à glicose diagnosticada pelo teste oral de tolerância a glicose (TOTG), ambos com diferentes fisiopatologias. Enquanto na glicemia de jejum alterada ocorre predominantemente o aumento da resistência insulínica no fígado com sensibilidade muscular normal à insulina, na

tolerância diminuída à glicose ocorre redução discreta da sensibilidade à insulina no fígado e aumento da resistência insulínica muscular¹⁴. As duas situações podem ocorrer de forma isolada ou combinada, mas em qualquer um dos casos estima-se que a maioria (70%) evolui para DM2¹⁵⁻²¹.

Com base em estudo que avaliou pacientes com pré-DM2, incluindo aqueles com glicemia de jejum alterada e com tolerância diminuída à glicose, investigadores criaram a hipótese do *ticking clock*, na qual a doença cardiovascular se inicia muitos anos antes do diagnóstico de DM2²² (Figura 1).

FIGURA 1. Esquema representativo da hipótese do *ticking clock*. DAC = doença arterial coronária; DM2 = diabetes melito tipo 2. (Adaptado de Haffner et al²²)

Essa relação fisiopatológica foi apresentada nas diretrizes europeias de DM2, pré-DM2 e doenças cardiovasculares²³ como o *continuum*

cardiovascular do diabetes. O DM2 é caracterizado por longo período de resistência insulínica, compensada por hiperinsulinemia e glicemia plasmática elevada, que, quando associadas aos demais fatores de risco cardiovascular, levam ao desenvolvimento da doença aterosclerótica, principal complicação macrovascular, previamente ao diagnóstico de DM2. Esse estado prévio ao diagnóstico é o período de tolerância diminuída à glicose, caracterizado por progressivo declínio da sensibilidade à insulina e aumento da concentração plasmática de glicose, porém abaixo daqueles considerados para o diagnóstico de DM2²³. Esse processo está representado no Gráfico 1.

GRÁFICO 1. *Continuum* cardiovascular do diabetes. (Adaptado de Ryden et al²³)

Alguns estudos avaliaram a mortalidade cardiovascular relacionada aos estados pré-DM2, sendo o principal deles o DECODE. Nesse estudo foi

observado aumento de mortalidade em portadores de DM2 e tolerância diminuída à glicose identificada pelo TOTG, relação que não ocorreu naqueles com glicemia de jejum alterada²⁴⁻²⁶.

A população com DM2 é altamente heterogênea com relação ao risco cardiovascular, sendo este dependente de condições associadas, como dislipidemias, hipertensão arterial e tabagismo. Assim, alguns autores sugerem a individualização da estratificação de risco dos diabéticos por meio de escores de risco, como o UKPDS, que avalia não somente os fatores de risco tradicionais mas também variáveis específicas do DM2, tais como hemoglobina glicada (HbA1c) e duração do DM2²⁷. Vale ressaltar que para pacientes com DM2 recém-diagnosticado essas ferramentas de estratificação de risco apresentam poder de discriminação modesto e baixa calibração, não sendo capazes, muitas vezes, de promover estimativas de risco precisas²⁸. Com relação ao pré-DM2, existem divergências se deve ser interpretado como fator de risco independente para a doença aterosclerótica^{29, 30} ou como parte da síndrome metabólica, e, por isso, associado a maior risco cardiovascular^{6, 31-33}. As diretrizes brasileira³⁴ e americana³⁵ seguem essa linha e adotam o pré-DM2 como parte da síndrome metabólica e a glicemia de jejum como um dos critérios que compõem o diagnóstico dessa síndrome.

Uma das hipóteses para explicar o motivo pelo qual os portadores de DM2 apresentam piores desfechos clínicos quando comparados aos não-DM2 é a dificuldade não só na estratificação de risco mas também no diagnóstico precoce da aterosclerose nesses indivíduos. Especialmente

nessa população, a aterosclerose se desenvolve, em geral, de forma assintomática, caracterizando a aterosclerose subclínica, sendo descrita frequência de isquemia miocárdica silenciosa 3 vezes a 6 vezes maior em portadores de DM2 quando comparados aos não-DM2³⁶.

Diversos exames identificam o processo aterosclerótico em fase precoce e podem ser utilizados na detecção de aterosclerose subclínica (Figura 2), dentre os quais o escore de cálcio coronário (CAC), a ultrassonografia Doppler de carótidas (USG), o índice tornozelo-braquial (ITB) e o teste ergométrico (TE). Múltiplos estudos demonstram que o diagnóstico de aterosclerose subclínica, além de incrementar os escores de risco clínico³⁶, está associado a maior risco de eventos cardiovasculares, inclusive na população com pré-DM2. Essa questão foi abordada por Kuller et al³⁷, que, em estudo com 5.197 pacientes, mostraram que tanto as alterações do metabolismo glicídico como a presença de aterosclerose subclínica estão relacionadas a maior risco de eventos cardiovasculares e que a associação das duas alterações promove incremento ainda maior desse risco, como mostra o Gráfico 2.

FIGURA 2. Processo aterosclerótico: fatores de risco, diagnóstico da fase subclínica e manifestações clínicas. A doença aterosclerótica é multifatorial e se desenvolve pela interação de fatores genéticos e ambientais, passando pela fase subclínica, que pode ser diagnosticada por diferentes métodos, até chegar à fase clínica, que se manifesta em diversos territórios arteriais. AVC = acidente vascular cerebral; DAC = doença arterial coronária; DAP = doença arterial periférica; EMI = espessura médio-intimal carotídea. (Adaptado de Katakami et al³⁶)

GRÁFICO 2. *Perfil glicídico e presença de aterosclerose subclínica.*
 AS = aterosclerose subclínica. (Adaptado de Kuller et al³⁷)

Assim, a detecção precoce da doença arterial coronária assintomática, com possível subsequente intervenção terapêutica, pode contribuir para diminuir a mortalidade cardiovascular na população com pré-DM2 e DM2. Nesse contexto é que os exames para detecção de aterosclerose subclínica ganham espaço.

1.1 Métodos para detecção de aterosclerose subclínica

Diversos métodos estão disponíveis para a avaliação da presença de doença aterosclerótica. Cada um desses métodos apresenta suas peculiaridades com relação a disponibilidade, facilidade de execução, reprodutibilidade e valor preditivo no diagnóstico de doença aterosclerótica

em decorrência de variações intrínsecas e do sítio anatômico analisado. Essas características devem sempre ser avaliadas na indicação dos exames.

1.1.1 Escore de cálcio coronário

Estudos que compararam o CAC com dados anatomopatológicos evidenciaram ser este um marcador de aterosclerose³⁸. Posteriormente, o CAC foi avaliado em diversos estudos e considerado como ferramenta para incrementar o valor prognóstico dos escores clínicos de estratificação de risco em pacientes assintomáticos^{4, 39-42}.

O CAC pode ser detectado pela tomografia por emissão de elétrons e pela tomografia com múltiplos detectores, havendo boa concordância entre os dois métodos⁴³. A presença e a gravidade do CAC são quantificadas pelo escore desenvolvido por Agatston, podendo ser avaliado em número absoluto ou em percentil para idade e sexo^{44, 45}.

O processo aterosclerótico é dinâmico e o cálcio faz parte dessa fisiopatologia. Supõe-se que a calcificação coronária seja um mecanismo para estabilização da placa aterosclerótica em fase posterior a sua instabilização e ruptura⁴⁶. Entretanto, os pacientes que apresentam placas ateroscleróticas calcificadas estão mais sujeitos a possuir, também, placas não-calcificadas, conhecidas como moles ou instáveis, e, portanto, têm maior risco de desenvolver eventos coronários agudos. Dessa forma, reconhece-se que embora não seja capaz de localizar placas estenóticas ou

prestes a romper, o CAC pode definir o risco cardiovascular global do indivíduo, em decorrência de sua associação com a carga aterosclerótica coronária⁴⁷.

Diversos estudos mostraram existir relação linear entre o CAC e o risco de eventos cardiovasculares^{42, 48} e mais recentemente observou-se que essa relação é independente de outros fatores de risco^{4, 39}. Estudo populacional encontrou que o risco relativo da presença de CAC (CAC#0) quando comparado à ausência implicava aumento de aproximadamente 4 vezes o risco cardiovascular em 3 anos a 5 anos⁴⁹.

A relação entre o CAC e estados pré-DM2 também foi demonstrada em alguns estudos, sendo este, portanto, importante marcador de aterosclerose subclínica nessa população⁵⁰⁻⁵².

1.1.2 Ultrassonografia *Doppler* de carótidas

A USG é um exame não-invasivo, sensível e reprodutível, que avalia a presença de aterosclerose por meio da espessura médio-intimal carotídea (EMI) e pela presença de placas ateroscleróticas⁵³ e pode auxiliar na estratificação de risco cardiovascular^{54, 55}.

A extensão da doença aterosclerótica em território de carótidas é relacionada ao processo aterosclerótico observado em coronárias. Estudos mostraram haver relação independente da EMI tanto com eventos cardiovasculares maiores⁵⁶⁻⁵⁹ como com AVC⁶⁰.

No estudo ARIC, a EMI acima do percentil 75 para idade, sexo e raça e a presença de placa aterosclerótica foram associadas a aumento do risco cardiovascular em indivíduos brancos e negros com idades entre 45 anos e 64 anos⁵⁷, enquanto no estudo de Bogalusa⁶¹ a associação da EMI com eventos foi analisada em indivíduos jovens e no estudo MESA⁵³, em populações chinesa e hispânica.

A USG também é um bom marcador de aterosclerose subclínica em pacientes com DM2^{37, 62-64} Henry et al⁶⁵ mostraram que o aumento da EMI já pode ser detectado em indivíduos com pré-DM2. Entretanto, os estudos sobre a presença de aterosclerose subclínica detectada pela USG em indivíduos pré-DM2 ainda são controversos^{62, 66, 67}.

1.1.3 Teste ergométrico

O TE é exame de simples execução usado no diagnóstico de doença arterial coronária e também para estratificação prognóstica quanto ao risco de eventos agudos em pacientes com doença arterial coronária não conhecida⁶⁸. A diretriz americana para predição de risco cardiovascular em adultos assintomáticos classifica o TE como indicação classe IIb e que deve ser considerado em indivíduos de risco intermediário, ressaltando que especial atenção deve ser dada a outras alterações além das observadas ao eletrocardiograma, principalmente a capacidade funcional⁶⁹.

Estudos com voluntários saudáveis mostraram que alterações eletrocardiográficas do segmento ST compatíveis com isquemia durante o

exercício ou a fase de recuperação no TE foram associadas a aumento de aproximadamente 3 vezes do risco relativo de eventos coronários futuros, independentemente de outros fatores de risco^{68, 70}. Quando o TE foi negativo para isquemia apresentou valor preditivo negativo de 97% para eventos coronários futuros⁷¹.

Apesar de numerosos estudos documentarem maiores chances de eventos coronários isquêmicos em pacientes que apresentaram depressão do segmento ST no TE, o valor preditivo dessa alteração é baixo^{72, 73}. Por outro lado, alterações específicas no TE, tais como baixa capacidade funcional e lentificação na recuperação da frequência cardíaca do exercício, foram associadas a mortalidade e eventos cardiovasculares subsequentes^{74, 75}.

O escore de Duke, que incorpora capacidade de exercício, alterações do segmento ST e angina induzida pelo exercício, é o escore de risco mais difundido para predição de risco cardiovascular^{76, 77}. Entretanto, o único elemento do escore de Duke associado ao aumento de risco cardiovascular em pacientes assintomáticos foi a capacidade funcional⁷⁶.

Portadores de DM2 apresentam 3 vezes a 6 vezes maiores chances que a população não-diabética assintomática de ter isquemia silenciosa, definida por resultados anormais de testes não-invasivos em indivíduos assintomáticos⁷¹. A isquemia silenciosa está associada a incremento de 3 vezes a 4 vezes da taxa de eventos coronários⁷⁸ e é muito comum em pacientes com DM2⁷⁹. O maior benefício de sua identificação nessa

população é a intensificação de medidas preventivas⁸⁰. O TE é um método que pode auxiliar na detecção de isquemia silenciosa.

Não está definido se em pré-DM2 o TE tem os mesmos valores preditivo negativo e prognóstico que apresenta para indivíduos com DM2.

1.1.4 Índice tornozelo-braquial

O ITB é um método diagnóstico simples, não-invasivo, e que tem papel bem estabelecido na detecção de doença arterial periférica assintomática, inclusive nos portadores de DM2^{81, 82}.

A prevalência de doença arterial periférica é 2 vezes maior nos portadores de DM2 que nos não-DM2^{83, 84}. Estudos populacionais indicam que a doença arterial periférica está associada a maior risco cardiovascular e análises de subgrupos sugerem que ela tem prognóstico particularmente pior no DM2⁸⁵⁻⁸⁷.

Em decorrência da maior calcificação e do menor índice de compressão das artérias em pacientes com DM2⁸⁸, o ITB passa a ser menos sensível, porém o ponto de corte para a relação de 0,9 apresenta o mesmo significado prognóstico quando comparado à população geral^{82, 89-91}.

1.2 Biomarcadores de aterosclerose

A doença aterosclerótica é considerada uma doença inflamatória arterial crônica, e sugere-se que a aterosclerose subclínica possa ser

identificada por aumento dos níveis circulantes de marcadores inflamatórios antes que o evento coronário ocorra⁹². Assim, os biomarcadores são considerados hoje uma proposta para auxílio na estratificação de risco cardiovascular.

Inflamação crônica também é uma característica do DM2⁹² e o aumento de citocinas inflamatórias já foi relatado em pacientes com pré-DM2⁹³.

Tanto a proteína C-reativa ultrassensível (PCR-us) como a fosfolipase A2 associada a lipoproteína (Lp-PLA2) e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) são marcadores inflamatórios, cujas concentrações aumentam após variados estímulos e lesões teciduais. São considerados participantes do processo aterosclerótico e, apesar de em diversos estudos esses marcadores terem sido considerados fatores de risco independentes para a predição de eventos coronários futuros, suas consequências clínicas são amplamente discutidas⁹⁴⁻⁹⁸.

A PCR-us também foi associada a aumento do risco de desenvolver outros fatores de risco tradicionais, incluindo DM2⁹⁹, além de ser aventada como auxiliar na reestratificação de risco cardiovascular. Alguns estudos mostraram que a PCR-us melhora a reclassificação de risco além dos modelos usando fatores de risco tradicionais^{100, 101}, enquanto metanálise mostrou que a capacidade da PCR-us em reclassificar o risco cardiovascular era inconsistente¹⁰².

A Lp-PLA2 é relacionada a diversos componentes da síndrome metabólica e à doença aterosclerótica^{103, 104} e diversos estudos mostraram

que o aumento do risco avaliado pela Lp-PLA2 se manteve após ajustes para a PCR-us juntamente com outros fatores de risco tradicionais¹⁰⁵⁻¹⁰⁷.

O tecido adiposo é um órgão endócrino e secreta grande variedade de peptídeos denominados adipoquinas, dentre as quais leptina, adiponectina e resistina, além de citocinas inflamatórias, como o TNF- α . As concentrações séricas de leptina e resistina aumentam de forma diretamente proporcional à resistência insulínica, ao índice de massa corporal (IMC) e à presença de obesidade¹⁰⁸⁻¹¹⁰, enquanto a concentração de adiponectina está significativamente diminuída em pacientes com obesidade¹¹¹.

A leptina foi associada a PCR-us como marcador de inflamação crônica e preditor de risco cardiovascular¹¹², além de ser considerada preditor de desenvolvimento de diabetes e obesidade^{113, 114}.

A resistina foi associada a disfunção endotelial, um dos principais mecanismos da aterosclerose¹¹⁵⁻¹¹⁷. Wang et al¹¹⁸ mostraram que pacientes com síndromes coronárias agudas apresentavam aumento de resistina sérica e que esse aumento estava relacionado ao incremento da PCR-us. O papel da adiponectina na doença coronária ainda é controverso.

A baixa concentração de adiponectina está relacionada à presença de doença arterial coronária¹¹⁹ e a maior risco de eventos coronários agudos, independentemente de outros fatores de risco tradicionais¹²⁰. Estão associados, também, à progressão de calcificação coronária avaliada pelo CAC¹²¹, além de serem preditores independentes da extensão da doença arterial coronária¹²² e de maior complexidade das lesões pela angiografia¹²³.

A microalbuminúria é definida pela relação albumina/creatinina excretadas em amostra isolada de urina matinal, sendo o valor de normalidade entre 30 mg/dl e 300 mg/dl¹²⁴. A microalbuminúria é considerada biomarcador de doença arterial coronária por sua associação com outros fatores de risco tradicionais^{125, 126}, como hipertensão, DM2, disfunção endotelial e inflamação¹²⁷⁻¹³⁰.

1.3 Marcadores genéticos

Tendo em vista que a condição genética contribui significativamente para o risco global de doença arterial coronária, muitos estudos têm focado suas hipóteses nas variações genéticas do sistema inflamatório.

Estudos de associação ampla do genoma identificaram *single nucleotide polymorphisms* (SNPs) em genes localizados no cromossomo 9p21, associados à doença arterial coronária¹³¹ e ao DM2¹³². O SNP rs10757278 foi o mais associado a risco de doença arterial coronária¹³³. Esse SNP está localizado em um sítio ativador (enhancer), que serve de ligação para fatores de transcrição envolvidos na resposta inflamatória¹³⁴. Estudo realizado por Zhang et al¹³⁵ verificou que tanto o rs10757278 como o rs10757274 estão associados a infarto do miocárdio na população chinesa. Além disso, ambos os polimorfismos, bem como o SNP rs2383206, também estão associados a aumento da suscetibilidade à aterosclerose¹³⁶.

O mRNA do gene da Lp-PLA2 é codificado pelo gene PLA2G7¹³⁷. A relação de seus polimorfismos e a atividade da Lp-PLA2 nas doenças

cardiovasculares foram estudadas por diversos grupos. Um grupo de japoneses identificou a mutação do rs16874954 como fator de risco independente para o desenvolvimento de doença arterial coronária em homens¹³⁸, entretanto, um estudo em coreanos sugeriu que esse genótipo está associado a menor risco para doenças cardiovasculares¹³⁹, tornando, assim, a relação desse polimorfismo com doenças cardiovasculares ainda inconsistente. Outro polimorfismo (rs1051931) foi associado a atividade enzimática sérica de Lp-PLA2 em população caucasiana^{140, 141}. Entretanto, o efeito genético desse polimorfismo na atividade enzimática sérica e no desenvolvimento da aterosclerose varia entre os estudos, alguns demonstrando que o alelo rs1051931 está associado a aumento da atividade enzimática sérica^{140, 142} enquanto outros indicam baixa atividade¹⁴¹.

Estudo realizado por Um et al¹⁴³ em relação ao polimorfismo -308G>A, localizado na região promotora do gene TNF- α , encontrou associação com índice cintura-quadril em mulheres coreanas, tendo sido implicado no desenvolvimento de resistência insulínica e obesidade. Yu et al¹⁴⁴, ao estudarem a associação entre polimorfismos do gene TNF- α e fatores de risco para obesidade na população coreana, verificaram que o alelo C do rs1799724 (C857T) atua como fator protetor, estando relacionado a maiores valores de colesterol de lipoproteína de alta densidade (HDL-colesterol) nessa população.

Poucos estudos avaliaram a relação de expressão de mRNA dos genes da leptina, receptor da leptina, Lp-PLA2 (PLA2G7) e TNF- α e aterosclerose.

O aumento da expressão de mRNA de PLA2G7 foi identificado em macrófagos de lesões ateroscleróticas em humanos¹⁴⁵. Recentemente, Kolodgie et al¹⁴⁶ encontraram baixa expressão de PLA2G7 na doença aterosclerótica precoce e maior expressão em lesões de placas com ruptura.

Existem dados limitados em relação à expressão gênica de marcadores pró-inflamatórios e DM2. Tsiotra et al¹⁴⁷ mostraram que a expressão de mRNA dos genes da interleucina 6 (IL-6) e TNF- α estava significativamente maior em mulheres com DM2 quando comparadas a mulheres saudáveis. Similarmente, outro estudo observou que o padrão de expressão dos genes IL-6 e TNF- α foi maior em indivíduos com tolerância diminuída à glicose e portadores de DM2¹⁴⁸.

Hipótese

O presente estudo baseia-se na hipótese de que a prevalência de aterosclerose subclínica avaliada por diferentes métodos depende da situação do perfil glicídico.

Objetivos

3.1 Primário

Determinar a prevalência de aterosclerose subclínica avaliada por meio de CAC, USG, TE e ITB em indivíduos normais, com glicemia de jejum alterada, tolerância diminuída à glicose e diabetes.

3.2 Secundários

- Avaliar variáveis lipídicas e biomarcadores de acordo com o perfil glicídico.
- Avaliar os polimorfismos dos genes relacionados a doença aterosclerótica e inflamação de acordo com o perfil glicídico.
- Avaliar a expressão dos genes relacionados a inflamação e resistência insulínica de acordo com o perfil glicídico.
- Pesquisar quais marcadores se associam a aterosclerose subclínica nos portadores de disglycemia.

4.1 Delineamento do estudo e população

Trata-se de estudo transversal, no qual os sujeitos de pesquisa foram triados e avaliados nos ambulatórios das Seções Médicas de Dislipidemias e de Hipertensão Arterial e Nefrologia do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia no período de fevereiro de 2010 a março de 2013.

O projeto foi dividido em três linhas de investigação: pesquisa de aterosclerose subclínica, avaliação de biomarcadores e, por fim, avaliação de marcadores genéticos, como mostrado na Figura 3.

FIGURA 3. Fluxograma dos exames aos quais os pacientes foram submetidos.

CAC = escore de cálcio coronário; ITB = índice tornozelo-braquial; Lp-PLA2 = fosfolipase A2 associada a lipoproteína; PCR-us = proteína C-reativa ultrasensível; TE = teste ergométrico; TNF- α = fator de necrose tumoral alfa; USG = ultrassonografia Doppler de carótidas.

Foram selecionados 355 indivíduos, de forma consecutiva, com indicação de TOTG segundo os critérios da ADA¹⁴⁹. Todos eram assintomáticos do ponto de vista cardiovascular e sem diagnóstico de DM2 estabelecido ou de doença aterosclerótica em qualquer território arterial. Após assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (ANEXO A), os sujeitos foram submetidos a exame clínico, TOTG e coleta de exames

laboratoriais e genéticos, além de pesquisa de aterosclerose subclínica por CAC, USG, TE e ITB, segundo fluxograma da Figura 4.

FIGURA 4. Fluxograma do estudo.

Apo = apolipoproteína; AC = escore de cálcio coronário; HbA1c = hemoglobina glicada; ITB = índice tornozelo-braquial; Lp-PLA2 = fosfolipase A2 associada a lipoproteína; PA = pressão arterial; PCR-us = proteína C-reativa ultrassensível; T4L = hormônio tiroxina livre; TCLE = termo de consentimento livre e esclarecido; TE = teste ergométrico; TSH = hormônio tireoestimulante; USG = ultrassonografia Doppler de carótidas.

Os valores da glicemia de jejum e de 2 horas após sobrecarga oral de glicose no TOTG foram considerados para a classificação dos indivíduos

entre os grupos. A Figura 5 apresenta os grupos controle, glicemia de jejum alterada, tolerância diminuída à glicose e diabetes. Para a inclusão nos grupos tolerância diminuída à glicose e diabetes foi considerada somente a glicemia de 2 horas, independentemente dos valores de jejum; assim, os portadores de glicemia de jejum alterada e tolerância diminuída à glicose ou diabetes com base na glicemia de 2 horas foram incluídos, respectivamente, nos grupos tolerância diminuída à glicose e diabetes.

GRÁFICO 3. Apresentação dos grupos por valores de glicemia de jejum e após teste oral de tolerância a glicose.
DM = diabete melito; GJA = glicemia de jejum alterada; IG = tolerância diminuída à glicose. (Adaptado de American Diabetes Association¹⁴⁹).

4.2 Critérios de inclusão

- Assinar o termo de consentimento livre e esclarecido.
 - Homens e mulheres assintomáticos para doenças cardiovasculares.
 - Indivíduos apresentando critérios da ADA¹⁴⁹ para realização de TOTG:
1. Adultos com sobrepeso ou obesidade ($\text{IMC} \geq 25 \text{ kg/m}^2$) e ao menos um dos seguintes fatores de risco:
 - sedentarismo;
 - diabetes em parente de primeiro grau;
 - hipertensão arterial ($\geq 140 \times 90 \text{ mmHg}$ ou tratamento para hipertensão arterial);
 - HDL-colesterol $< 35 \text{ mg/dl}$ e/ou triglicérides $> 250 \text{ mg/dl}$;
 - HbA1c $\geq 5,7\%$, glicemia de jejum alterada ou tolerância diminuída à glicose em exames prévios;
 - outras condições clínicas associadas à resistência à insulina (p. ex., acantosis nigricans).
 2. Na ausência dos critérios anteriores, TOTG pode ser realizado em sujeitos com mais de 45 anos de idade.

4.3 Critérios de exclusão

- Pacientes com diagnóstico clínico ou por exames subsidiários de doença aterosclerótica em qualquer território arterial, como doença arterial coronária, doença cerebrovascular ou doença arterial periférica.
- Pacientes com diagnóstico de diabetes melito estabelecido.
- Pacientes em uso de hipoglicemiante oral ou insulina.
- Pacientes em vigência ou suspeita de processo inflamatório sistêmico.
- Portadores de bloqueio de ramo esquerdo ao eletrocardiograma de repouso.
- Gravidez ou amamentação.
- Insuficiência cardíaca classe funcional III ou IV.
- Insuficiência hepática.
- Insuficiência renal estágios IV e V.
- Hipotireoidismo não-controlado.
- Pacientes com incapacidade para deambular em esteira.
- Neoplasias clinicamente não-controladas.
- Pacientes com sorologia positiva para HIV.
- Mulheres em uso de terapia de reposição hormonal.

4.4 Critérios de interrupção do estudo

- Indivíduos que não desejassem mais participar do estudo.

Aspectos Éticos

Todos os procedimentos propostos estão de acordo com recomendações e diretrizes das principais sociedades específicas da área no Brasil, tendo sido o projeto aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia em novembro de 2009 (processo nº 3852). Todos os pacientes que participaram do estudo assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa.

O material biológico (amostras de soro e amostras de ácidos nucleicos) foi armazenado no Laboratório de Biologia Molecular para estudos futuros, após aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa e com autorização do sujeito de pesquisa.

O suporte financeiro para a realização das análises genéticas e de biomarcadores foi proveniente da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, processo nº 2010/00201-8).

6.1 Avaliação clínica

As informações referentes a dados clínicos e medicamentos utilizados pelos pacientes foram obtidas quando do preenchimento da ficha de atendimento (ANEXO B). Os seguintes critérios foram adotados:

1. História familiar de doença coronária prematura – parente de primeiro grau com antecedente de doença coronária com idade < 55 anos para o sexo masculino e < 65 anos para o sexo feminino.
2. Tabagismo – considerado tabagista atual o indivíduo que fuma um ou mais cigarros ou qualquer quantidade ou tipo de tabaco há, pelo menos, um mês e ex-tabagista, o indivíduo que interrompeu o uso de cigarro ou tabaco há mais de um mês¹⁵⁰.
3. Etilismo – considerado etilismo atual a ingestão de no mínimo 30 g de etanol para homens e 15 g de etanol para mulheres ao menos 3 vezes na semana e ex-etilismo, o abandono do vício há pelo menos um ano¹⁵¹.
4. Atividade física – considerado regular qualquer exercício realizado por no mínimo 30 minutos, 3 vezes por semana.

5. Climatério pós-menopausa – ausência de ciclos menstruais há pelo menos um ano¹⁵².
6. Peso e altura – aferidos em balança antropométrica.
7. IMC – calculado pela relação entre o peso e o quadrado da altura, considerando-se: eutrofia, $IMC < 25 \text{ kg/m}^2$; sobrepeso, $IMC \geq 25 \text{ kg/m}^2$ e $< 30 \text{ kg/m}^2$; e obesidade, $IMC \geq 30 \text{ kg/m}^2$ ¹⁵³.
8. Circunferência abdominal – aferida com fita métrica inelástica na altura do ponto médio da distância entre a crista ilíaca ântero-superior e o rebordo inferior do último arco costal, com o paciente em pé e ao final da expiração.
9. Hipertensão arterial – pressão arterial aferida com esfigmomanômetro automático em posição sentada após 5 minutos de repouso, sendo considerados hipertensão o uso rotineiro de anti-hipertensivos ou a medida da pressão de consultório $> 140 \times 90 \text{ mmHg}$ ¹⁵⁴.
10. Dislipidemias – uso rotineiro de qualquer hipolipemiante ou dosagem de colesterol de lipoproteína de baixa densidade (LDL-colesterol) $> 160 \text{ mg/dl}$ e/ou triglicérides $> 150 \text{ mg/dl}$ e/ou HDL-colesterol $< 40 \text{ mg/dl}$ para homens ou $< 50 \text{ mg/dl}$ para mulheres³⁴.
11. Hipotireoidismo controlado – uso de levotiroxina com dosagens de hormônio tireoestimulante (TSH) e hormônio tiroxina livre (T4L) dentro da normalidade.

12. Síndrome metabólica – diagnóstico estabelecido pelas recomendações do NCEP ATP III modificado, no qual é necessária a presença de no mínimo 3 dos critérios apresentados na Tabela 1¹⁵⁵.

Tabela 1. Critérios diagnósticos de síndrome metabólica segundo o NCEP ATP III¹⁵⁵.

Critérios	Definição
Circunferência abdominal	
Homens	> 102 cm
Mulheres	> 88 cm
Triglicérides	≥ 150 mg/dl ou tratamento para hipertrigliceridemia
HDL-colesterol	
Homens	< 40 mg/dl
Mulheres	< 50 mg/dl
Pressão arterial	
Sistólica	≥ 130 mmHg ou tratamento anti-hipertensivo
Diastólica	≥ 85 mmHg ou tratamento anti-hipertensivo
Glicemia de jejum	≥ 100 mg/dl ou tratamento para diabetes melito

HDL-colesterol = colesterol de lipoproteína de alta densidade.

6.2 Amostras biológicas

Os exames laboratoriais foram coletados após jejum de 12 horas. As análises laboratoriais realizadas na primeira coleta avaliaram parâmetros relacionados ao metabolismo de glicídios e lipídeos: glicemia e insulina de jejum e após 2 horas de sobrecarga com 75 g de glicose, HbA1c, peptídeo C, colesterol total e frações, triglicérides, apolipoproteína A1 e apolipoproteína B. À inflamação e resistência insulínica: PCR-us,

adiponectina, leptina, resistina, Lp-PLA2 e TNF- α . E exames para descartar a presença de critérios de exclusão: TSH, T4L, ureia, creatinina, sódio, potássio, creatinofosfoquinase, aspartato transaminase e alanina transaminase. Na segunda coleta foram dosados PCR-us e microalbuminúria, além do material para estudos genéticos.

6.2.1 Determinações laboratoriais

As concentrações plasmáticas glicêmicas antes e após 2 horas de sobrecarga de 75 g de glicose foram determinadas pelo método enzimático colorimétrico, assim como as concentrações séricas de triglicérides, colesterol total, HDL-colesterol e creatinina. As concentrações séricas de LDL-colesterol foram calculadas segundo a fórmula de Friedewald et al¹⁵⁶ quando os triglicérides estavam abaixo de 400 mg/dl e pelo método enzimático colorimétrico quando estavam acima desse valor. As concentrações séricas de ureia, aspartato transaminase e alanina transaminase foram avaliadas pelo método cinético UV e apolipoproteína A1, apolipoproteína B e PCR-us, por nefelometria. As dosagens de creatinofosfoquinase foram realizadas pelo método de Szasz modificado. Para a determinação da HbA1c foi utilizado o método de cromatografia líquida de alta eficiência.

As determinações de TSH, T4L, peptídeo C e insulina foram realizadas por quimioluminescência.

Para determinação das concentrações de adiponectina foi utilizado imunoensaio enzimático do tipo “sanduíche”, utilizando o CHEMICON®s Adiponectin Sandwich ELISA Kit (Chemicon International, CA, Estados Unidos). Para determinação das concentrações de resistina, TNF- α e Lp-PLA2 foram realizadas dosagens por Luminex™ xMAP e para as dosagens de leptina foi utilizado radioimunoensaio.

Todas as determinações foram realizadas seguindo orientações dos respectivos fabricantes. As monitorizações de precisão, exatidão e controle de qualidade das determinações sérica, plasmática e de sangue total foram realizadas pela determinação concomitante de soros controles normal e patológico comerciais.

O *Homeostasis Model Assessment Beta* (HOMA B), que avalia a função das células beta pancreáticas, foi calculado por meio da seguinte fórmula^{157, 158}.

$$\text{HOMA B} = \frac{(20 \times \text{insulina de jejum})}{(\text{glicemia de jejum}/18) - 3,5}$$

tendo como valores de referência: $\leq 60\%$, secreção insuficiente de insulina pelas células beta; $\geq 250\%$, hipersecreção de insulina pelas células beta; e entre 60% e 250%, normais.

O *Homeostasis Model Assessment IR* (HOMA IR), que avalia a resistência insulínica, foi calculado por meio da seguinte fórmula^{157, 158}.

O *Homeostasis Model Assessment Beta* (HOMA B), que avalia a função das células beta pancreáticas, foi calculado por meio da seguinte fórmula^{157, 158}.

$$\text{HOMA R} = (\text{glicemia de jejum} \times \text{insulina de jejum})/405$$

tendo como valor de referência para normalidade < 2,71%.

6.3 Exames para detecção de aterosclerose subclínica

Todos os indivíduos foram submetidos aos seguintes exames para detecção de aterosclerose subclínica: CAC, USG, TE e ITB. Os exames foram categorizados como positivos ou negativos de acordo com critérios previamente estabelecidos e serão descritos individualmente nos próximos tópicos. Esses exames foram também avaliados de forma conjunta, sendo o diagnóstico de aterosclerose subclínica realizado quando ao menos um dos exames apresentava critério de positividade (Tabela 2).

Tabela 2. Critérios de positividade para os exames de detecção de aterosclerose subclínica^{34, 53, 61, 159, 162, 164}.

Método	Critérios de positividade	Referências bibliográficas
Escore de cálcio coronário	Diferente de zero	<ul style="list-style-type: none"> • Agatston AS et al., <i>Quantification of coronary artery calcium using ultrafast computed tomography</i>. J Am Coll Cardiol. 1990;15(4):827-32 • Stein JH et al. <i>Use of carotid ultrasound to identify subclinical vascular disease and evaluate cardiovascular disease risk: a consensus statement from the American Society of Echocardiography Carotid Intima-Media Thickness Task Force. Endorsed by the Society for Vascular Medicine</i>. J Am Soc Echocardiogr, 2008. 21(2): p. 93-111; quiz 189-90.
Ultrassonografia Doppler de carótidas	EMI $\geq$ percentil $\geq$ 75 para idade e sexo e/ou presença de placa aterosclerótica	<ul style="list-style-type: none"> • Tzou WS et al. <i>Distribution and predictors of carotid intima-media thickness in young adults</i>. Prev Cardiol, 2007. 10(4): p. 181-9. • Touboul PJ et al. <i>Mannheim carotid intima-media thickness and plaque consensus (2004-2006-2011). An update on behalf of the advisory board of the 3rd, 4th and 5th watching the risk symposia, at the 13th, 15th and 20th European Stroke Conferences, Mannheim, Germany, 2004, Brussels, Belgium, 2006, and Hamburg, Germany, 2011</i>. Cerebrovascular diseases. 2012;34(4):290-6.
Teste ergométrico	<ul style="list-style-type: none"> • Presença de infra desnívelamento do segmento ST $\geq$ 1 mm em derivações contíguas • Capacidade funcional baixa $<$ 5 METs • Sintomas de angina 	<ul style="list-style-type: none"> • Meneghelo RS et al. III Diretrizes da Sociedade Brasileira de Cardiologia sobre Teste Ergométrico. Arquivos brasileiros de cardiologia. 2010;95:1-26.
Índice tornozelo braquial	$<$ 0,9	<ul style="list-style-type: none"> • Xavier H et al. V Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose. Arquivos brasileiros de cardiologia. 2013;101(4).
Aterosclerose subclínica	Ao menos um dos exames acima com critérios de positividade	

6.3.1 Escore de cálcio coronário

A tomografia coronária com escore de cálcio consiste em exame sem contraste, com doses baixas de radiação, e serve para a quantificação de cálcio nas coronárias.

Os exames foram obtidos na Seção Médica de Tomografia do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia por meio do aparelho Aquilion (Toshiba Medical, Tochigi, Japão), com 64 fileiras de detectores, sendo a aquisição dos dados tomográficos representada por imagens de média espessura (3 mm) e baixa intensidade de radiação (50 mA, 120 kV) e acopladas ao eletrocardiograma.

Os exames tiveram duração média de 10 minutos a 15 minutos, não utilizaram contraste, não necessitaram de jejum e requereram apenas uma pausa respiratória do paciente para a aquisição das imagens. O protocolo padrão do estudo incluiu:

- posicionamento do paciente em decúbito dorsal horizontal;
- colocação de eletrodos para o registro eletrocardiográfico durante a realização do exame;
- obtenção de imagem que permitia a identificação precisa da situação do coração no interior da caixa torácica;
- aquisição das imagens.

A medida do CAC foi realizada em estação de trabalho computadorizada com programa específico para esse fim e avaliada por médico treinado. O CAC foi considerado presente quando sua densidade na

artéria coronária era > 130 HU em ao menos 3 pixels contínuos ($> 1 \text{ mm}^2$) da mesma coronária⁴⁴. O CAC compreendia a soma dos escores individuais das artérias coronárias esquerda e direita.

Para o diagnóstico de aterosclerose subclínica foi considerado como positivo qualquer valor diferente de zero¹⁵⁹.

O CAC também foi analisado de acordo com categorias: 0 (ausência de cálcio nas artérias coronárias), 1-10, 11-100, 101-400 e > 400 ¹⁶⁰. Também foi avaliado de forma quantitativa e segundo os critérios do estudo MESA, considerando-se o percentil para idade, sexo e etnia¹⁶¹.

6.3.2 Ultrassonografia *Doppler* de carótidas

A USG foi realizada na Seção de Ecocardiografia do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia por meio de ultrassonografia de alta resolução Vivid 7 (GE, Estados Unidos) e transdutor de alta frequência tipo linear de 9 MHz com medida automatizada, por médico responsável, que não tinha acesso aos dados clínicos do paciente. Foram avaliadas a EMI da parede posterior das artérias carótidas comuns esquerda e direita, a presença de placas ateroscleróticas e o fluxo, para detecção de possíveis lesões estenosantes em carótidas comuns, internas e externas.

O exame foi considerado positivo para aterosclerose subclínica na presença de qualquer lesão estenosante (placa) e/ou EMI com percentil ≥ 75 para idade, sexo e raça, segundo os critérios do estudo MESA⁵³ (ANEXO C) para indivíduos de todas as raças com idade > 45 anos

e os critérios do estudo de Bogalusa⁶¹ (ANEXO D) para indivíduos com idade < 45 anos. A identificação de placas nas artérias carótidas foi feita segundo o Consenso de Mannheim¹⁶², assim como o grau de obstrução, cuja definição seguiu os preceitos do Consenso da Sociedade Americana de Radiologia¹⁶³.

A EMI foi avaliada também pela EMI máxima e por sua média composta, calculada pela média entre a EMI direita e a EMI esquerda.

6.3.3 Teste ergométrico

O TE foi realizado na Seção de Ergometria e Reabilitação do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia, em esteira, seguindo os protocolos de Bruce, Bruce Modificado ou Ellestad, com o objetivo de avaliar isquemia miocárdica induzida pelo esforço. Os exames foram realizados sob o uso rotineiro das medicações de cada paciente.

A interrupção do exame ocorreu após observação da frequência cardíaca máxima ou sintomas clínicos incluindo exaustão, com critérios de interrupção segundo diretrizes estabelecidas. O exame foi considerado alterado quando houve infradesnívelamento horizontal/descendente do segmento ST, medido no ponto J, ≥ 1 mm, dor sugestiva de doença arterial coronária, arritmias ventriculares complexas sustentadas, platô ou queda da pressão arterial sistólica no esforço ou capacidade funcional < 5 METs¹⁶⁴.

6.3.4 Índice tornozelo-braquial

Os exames de ITB foram executados na Seção Médica de Dislipidemias do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia. Com o paciente em posição supina, após repouso de 5 minutos, foi realizada palpação dos pulsos arteriais pedioso, tibial posterior, poplíteo e braquial bilateralmente. A seguir, foram medidas as pressões sistólicas em cada um dos membros, utilizando-se ultrassonografia de 5 MHz. Foi utilizada a relação entre as pressões sistólicas nos braços e nas pernas para o cálculo do ITB, considerado normal quando $\geq 0,9$ ⁵⁴. O exame foi considerado positivo com pelo menos uma das relações $< 0,9$.

O TE foi realizado na Seção de Ergometria e Reabilitação do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia, em esteira, seguindo os protocolos de Bruce, Bruce Modificado ou Ellestad, com o objetivo de avaliar isquemia miocárdica induzida pelo esforço. Os exames foram realizados sob o uso rotineiro das medicações de cada paciente.

O TE foi realizado na Seção de Ergometria e Reabilitação do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia, em esteira, seguindo os protocolos de Bruce, Bruce Modificado ou Ellestad, com o objetivo de avaliar isquemia miocárdica induzida pelo esforço. Os exames foram realizados sob o uso rotineiro das medicações de cada paciente.

6.4 Técnicas de biologia molecular

6.4.1 Extração do DNA genômico

O DNA genômico dos pacientes foi extraído em triplicata, partindo de 200 µl de sangue total, utilizando o conjunto de reagentes de extração de DNA QIAamp DNA Blood (Qiagen Inc., Valencia, Estados Unidos). As amostras de DNA extraídas foram quantificadas no sistema Quibit (Invitrogen, Life Technologies, NY, Estados Unidos) e diluídas para 10 ng/µl, no próprio tampão de eluição do reagente utilizado, e armazenadas em congelador a -30°C até seu processamento.

6.4.2 Determinação de *single nucleotide polymorphisms* por pirosequenciamento

A determinação de SNPs foi realizada por meio do sistema PyroMark Q24 (Qiagen Inc., Valencia, Estados Unidos). Esse sistema baseia-se no princípio de pirosequenciamento, sendo os iniciadores para a reação em cadeia da polimerase e para a reação de pirosequenciamento construídos pelos pesquisadores deste projeto utilizando o programa PyroMark Assay Design 2.0 (Qiagen, Inc., Valencia, Estados Unidos) e fornecidos pela Qiagen (Qiagen, Inc., Valencia, Estados Unidos).

Na reação em cadeia da polimerase, cujo produto foi utilizado para a genotipagem no pirosequenciamento, seguiu-se o seguinte protocolo para cada reação: 12,5 µl de Pyromark PCR Master Mix, 2,5 µl de Coralload, 0,5 µl de iniciadores sense e anti-sense de 0,01 nM e 10 ng/µl de DNA, totalizando volume final de 25 µl. Utilizaram-se os seguintes ciclos térmicos no termociclador: desnaturação inicial de 95°C por 15 minutos, seguida de 45 ciclos de amplificação (30 segundos a 94°C, 30 segundos na temperatura específica de cada gene analisado e 30 segundos a 72°C, finalizando por 10 minutos a 72°C).

6.4.3 Procedimento de pirosequenciamento

O protocolo para reação de pirosequenciamento consiste em preparo do produto da reação em cadeia da polimerase por meio de sistema de vácuo combinado com as etapas de fixação, desnaturação e lavagem. Na programação do aparelho Pyromark Q24 da Qiagen para genotipagem, utilizou-se programa de software fornecido pelo fabricante, em que é definida a sequência a ser analisada e a ordem de dispensação dos nucleotídeos. No aparelho os seguintes reagentes são carregados: mistura de enzimas, substrato e 4 desoxinucleotídeos (A, T, C e G). Durante o pirosequenciamento, os desoxinucleotídeos são adicionados à cadeia de DNA presente no produto da reação em cadeia da polimerase. A adição desses nucleotídeos na sequência de DNA gera um pico de luz que é

registrado em gráfico e posteriormente traduzido para o fenótipo do indivíduo.

Foram selecionados 6 SNPs (PLA2G7 rs1051931 e rs16874954, cromossomo 9p21 rs2383206, rs10757274, rs10757278 e gene de TNF- α rs1799724). Para cada SNP analisado foram construídos dois iniciadores, sendo um deles obrigatoriamente marcado com biotina e uma sonda, totalizando 18 oligonucleotídeos ou iniciadores (Tabela 3).

Após as etapas de otimização da reação em cadeia da polimerase para os SNPs avaliados foi possível prosseguir com a realização das reações de pirosequenciamento para a determinação dos genótipos referentes a esses SNPs específicos, utilizando-se o método descrito de pirosequenciamento.

Tabela 3. Relação dos oligonucleotídeos sintetizados para a reação de pirosequenciamento.

Nome do oligonucleotídeo	Sequência
F1-TNF α rs1799724	5'biotina-CAgggCTATggAAgTCgAgTA-3'
R1-TNF α rs1799724	5' - TTTCATTCTgACCCggAgAC -3'
S1- TNF α rs1799724	5' - TCTACATggCCCTgTC -3'
F1- rs10757278	5' TggAAAgTgACAAAgAggACAgTT -3'
R1- rs10757278	5' biotina - CCAggACTACCTCTAgTTCCACAT -3'
S1- rs10757278	5' - TgTggTCATTCCggT-3'
F1- rs2383206	5' CCCgATgATTTTCAgTTAACCA 3'
R1- rs2383206	5' - biotina- AggATTCAggCCATCTTgCA -3'
S1- rs2383206	5' - TTCCTTAgAAATgTTATTgT -3'
F1- rs10757274	5' - ACATggTgATgggAggTACTg -3'
R1- rs10757274	5 biotina - CCTCTgATTAgAATTCCCTACCC-3'
S1- rs10757274	5' - AAATCTAAgCTgAgTgTTg -3'
F1- PLA2G7 rs1051931	5' - biotina gCTAATgAAgCTTTgTTgCTAAgA -3'
R1- PLA2G7 rs1051931	5' - CATgCTCAAATTAAGggAgACA -3'
S1- PLA2G7 rs1051931	5' - gggAgACATAgATTCAAATg -3'
F1- PLA2G7 rs16874954	5' biotina - ATgggggCAAAAgAATAgCCTTAT-3'
R1- PLA2G7 rs16874954	5' - CCATCCCCATgAAATgAACAAT-3'
R1- PLA2G7 rs16874954	5' - TTTggTggAgCAACg-3'

6.4.4 Extração de RNA de sangue periférico

O RNA total foi extraído utilizando-se o *Qiaamp RNA Blood Minikit* (Qiagen, Alemanha). Todos os procedimentos foram realizados seguindo-se o protocolo descrito pelo fabricante.

6.4.5 Análise de expressão gênica por proteína C-reativa em tempo real

A quantificação da expressão de mRNA dos genes leptina, TNF- α , receptor da leptina e Lp-PLA2 em leucócitos totais do sangue periférico foi realizada por transcrição reversa seguida de reação em cadeia pela polimerase em tempo real utilizando-se o sistema de amplificação TaqMan RT-qPCR, que contém sondas marcadas com fluoróforos de sinal (*reporter*) e bloqueador (*quencher*) do tipo MGB (Applied Biosystems, Foster City, Estados Unidos). O DNA complementar foi sintetizado utilizando-se 400 ng de RNA, 200 ng de oligonucleotídeos aleatórios (*random primers*) (Invitrogen Corporation, Carlsbad, Estados Unidos), dithiothreitol 20 mmol/l (Invitrogen Corporation, Carlsbad, Estados Unidos), dNTPs 200 mol/l (GE Healthcare do Brasil, Brasil), enzima SuperScript® II RT RNase H- 100-200 U e tampão RT (Tris-HCl 50 mM, KCl 75 mM, MgCl₂ 3 mM) (Invitrogen Corporation, Carlsbad, Estados Unidos), em volume final de 20 μ l por reação, contendo água esterilizada e tratada com dietilpirocarbonato. O ensaio de transcrição reversa foi realizado em aparelho Mastercycler Personal (Eppendorf,

Hamburgo, Alemanha) com as seguintes etapas: 25°C por 10 minutos, 42°C por 50 minutos, e 70°C por 15 minutos. O DNA complementar obtido foi armazenado a -20°C até a realização da reação em cadeia pela polimerase em tempo real. Os demais reagentes foram fornecidos em solução denominada Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, Estados Unidos), contendo MgCl₂ 25 mM, dNTPs 10 mM, enzima AmpEraseR UNG 30 U, enzima AmpliTaq Gold 150 U e tampão de reação (TaqMan® Universal PCR Master Mix, Life Technologies, NY, Estados Unidos), em volume final de 25 µl por reação.

A amplificação pela reação em cadeia pela polimerase em tempo real foi realizada de acordo com as seguintes etapas: (1) um ciclo de 2 minutos a 50°C (ativação da enzima UNG); (2) um ciclo de 10 minutos a 95°C (inativação da enzima UNG); (3) 40 ciclos de 15 segundos a 95°C (desnaturação) e 1 minuto a 60°C (hibridização e extensão). Os sinais de fluorescência emitidos pelos fluoróforos das sondas TaqMan foram detectados pelo equipamento ABI Prism 7500 Fast (Applied Biosystems, Foster City, Estados Unidos). Os dados foram analisados utilizando-se o programa Sequence Detection Software v1.2.3 (Applied Biosystems, Foster City, Estados Unidos), que gera curvas semilogarítmicas dos sinais de amplificação.

A quantificação relativa da expressão gênica foi realizada utilizando-se um controle endógeno, o qual foi selecionado com base na avaliação de 6 diferentes genes (GAPD, HRPT1, SDHS, HMBS, B2M e UBC) em 10 anos de cDNAs provenientes de pacientes dos 3 grupos. Após a reação de

transcrição reversa seguida de reação em cadeia pela polimerase em tempo real, os dados foram analisados no programa geNorm (PrimerDesign Ltd., Southampton, Reino Unido). O gene com menor variação entre as amostras foi escolhido como controle endógeno.

As eficiências das reações dos genes em estudo e controle endógeno foram determinadas utilizando-se como parâmetro o ciclo *threshold*¹⁶⁵. Os resultados de expressão gênica por reação em cadeia pela polimerase em tempo real foram comparados entre os grupos utilizando-se a equação descrita por Livak & Schmittgen¹⁶⁶.

Para o cálculo do tamanho amostral, considerou-se o CAC como marcador de aterosclerose subclínica e a hipótese geral de diferença entre as prevalências de aterosclerose nos grupos de pacientes normais, glicemia de jejum alterada, tolerância diminuída à glicose e diabetes. Segundo dados do estudo de Meigs et al⁵¹, a prevalência de aterosclerose subclínica diagnosticada pelo CAC foi de 19,2% entre normais, de 38,5% entre os pacientes pré-DM2 e de 46,4% entre os portadores de DM2 recém-diagnosticado. Com base nesses dados, com poder do teste estatístico de 80% e nível de significância de 5%, estimou-se serem necessários 285 pacientes (95 em cada grupo).

As características pessoais e clínicas dos pacientes foram descritas segundo o grupo com o uso de frequências absolutas e relativas para as características qualitativas e medidas resumo (média, desvio padrão, mediana, mínimo e máximo) para as características quantitativas. Foram verificadas as associações entre as características qualitativas e os grupos com o uso dos testes qui-quadrado, exato de Fisher¹⁶⁷ ou da razão de verossimilhanças¹⁶⁸ e comparadas as características quantitativas entre os grupos com o uso dos testes Kruskal-Wallis ou ANOVA¹⁶⁹ seguidos de comparações múltiplas de Dunn e Bonferroni¹⁶⁹, respectivamente.

Os diagnósticos de aterosclerose foram descritos segundo as características avaliadas, sendo verificada a existência de associação com o uso de testes qui-quadrado, exato de Fisher ou de razão de verossimilhança e comparadas as características quantitativas segundo a presença de aterosclerose com o uso dos testes t de *Student* ou Mann-Whitney¹⁶⁸.

Foi estimado o modelo de regressão logística múltipla¹⁷⁰ para diagnóstico de aterosclerose, selecionando-se as variáveis que nos testes bivariados apresentaram níveis descritivos significantes ($P < 0,05$), em decorrência do baixo número de pacientes sem o diagnóstico de aterosclerose, mantendo-se nos modelos finais apenas as variáveis com nível de significância $< 0,05$ ($P < 0,05$) conjuntamente.

Para o cálculo da frequência de haplótipos e desequilíbrio de ligação foi utilizado o programa para análise de dados em genética populacional Arlequin[®] versão 2.0, e para a análise das frequências de genótipos e alelos foi utilizada a lei de Hardy-Weinberg.

Em todas as conclusões obtidas por meio das análises inferenciais foi utilizado o nível de significância $\alpha = 5\%$.

Os dados foram digitados em planilhas do Excel 2010 para Windows para o adequado armazenamento das informações. As análises estatísticas foram realizadas com o programa estatístico R versão 2.15.2 e IBM[®] SPSS[®] versão 19.

Resultados

8.1 Características clínicas e laboratoriais dos grupos

A amostra foi composta por 340 pacientes, sendo 103 (30,3%) do grupo controle, 80 (23,5%) do grupo glicemia de jejum alterada, 98 (28,8%) do grupo tolerância diminuída à glicose e 59 (17,4%) do grupo diabetes. O fluxograma da Figura 5 mostra a triagem de pacientes e quantos deles foram submetidos a cada um dos exames.

FIGURA 5. Fluxograma de indivíduos submetidos a triagem e a cada um dos exames propostos.

AS = aterosclerose subclínica; C = controle; CAC = escore de cálcio coronário; DM = diabetes melito; GJA = glicemia de jejum alterada; IG = tolerância diminuída à glicose; ITB = índice tornozelo-braquial; LEP = mRNA do gene da leptina; LEPRE = mRNA do gene do receptor da leptina; Lp-PLA2 = fosfolipase A2 associada a lipoproteína; PCR = proteína C-reativa; TE = teste ergométrico; TNF- α = fator de necrose tumoral alfa; TOTG = teste oral de tolerância a glicose; USG = ultrassonografia *Doppler* de carótidas.

Conforme pode ser observado na Tabela 4, a maioria dos pacientes dos quatro grupos investigados era do gênero feminino (62,4%), 89,62% das quais com diagnóstico de menopausa. A maior parte da população era da raça branca, apresentava hipertensão arterial e dislipidemias, nunca havia fumado e não tinha o hábito de consumir bebidas alcoólicas.

Os grupos controle e glicemia de jejum alterada apresentaram, respectivamente, 45,1% e 47,5% de pacientes com IMC entre 25 g/m² e 29 kg/m², enquanto os grupos tolerância diminuída à glicose e diabetes apresentaram, respectivamente, 35,7% e 37,3% de pacientes com IMC nessa mesma faixa.

Os resultados inferenciais confirmaram as suspeitas descritas na Tabela 4, em que os grupos apresentam o mesmo perfil quanto à maioria das características clínicas gerais, à exceção de síndrome metabólica ($P < 0,001$) e atividade física ($P = 0,010$), em que:

- o grupo controle apresentou menor porcentagem de síndrome metabólica (43,7%) quando comparado aos outros três grupos (78,5%);
- o grupo glicemia de jejum alterada apresentou maior porcentagem de praticantes de atividade física (57,7%) quando comparado aos outros três grupos (40,2%).

Considerando outras características clínicas e antropométricas apresentadas nas Tabelas 4 e 5, não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos.

Tabela 4. Distribuição das características clínicas gerais dos pacientes, segundo o grupo.

Variável	Grupos				Total	P
	C	GJA	IG	DM		
Gênero, n (%)						
feminino	65 (63,1)	46 (57,5)	67 (68,4)	34 (57,6)	212 (62,4)	0,407*
masculino	38 (36,9)	34 (42,5)	31 (31,6)	25 (42,4)	128 (37,6)	
Total	103 (100)	80 (100)	98 (100)	59 (100)	340 (100)	
Raça, n (%)						
branco	73 (70,9)	53 (66,3)	58 (59,2)	38 (64,4)	222 (65,3)	0,651†
pardo	16 (15,5)	14 (17,5)	26 (26,5)	11 (18,6)	67 (19,7)	
negro	11 (10,7)	12 (15)	10 (10,2)	8 (13,6)	41 (12,1)	
amarelo	3 (2,9)	1 (1,3)	4 (4,1)	2 (3,4)	10 (2,9)	
Total	103 (100)	80 (100)	98 (100)	59 (100)	340 (100)	
AF+DAC, n (%)						
não	77 (74,8)	56 (70)	62 (63,3)	48 (81,4)	243 (71,5)	0,082*
sim	26 (25,2)	24 (30)	36 (36,7)	11 (18,6)	97 (28,5)	
Total	103 (100)	80 (100)	98 (100)	59 (100)	340 (100)	
HAS, n (%)						
não	36 (35)	25 (31,3)	22 (22,4)	16 (27,1)	99 (29,1)	0,251*
sim	67 (65)	55 (68,8)	76 (77,6)	43 (72,9)	241 (70,9)	
Total	103 (100)	80 (100)	98 (100)	59 (100)	340 (100)	
DLP, n (%)						
não	23 (22,3)	19 (23,8)	17 (17,3)	18 (30,5)	77 (22,6)	0,294*
sim	80 (77,7)	61 (76,3)	81 (82,7)	41 (69,5)	263 (77,4)	
Total	103 (100)	80 (100)	98 (100)	59 (100)	340 (100)	
SM, n (%)						
não	58 (56,3)	12 (15)	24 (24,5)	15 (25,4)	109 (32,1)	<0,001*
sim	45 (43,7)	68 (85)	74 (75,5)	44 (74,6)	231 (67,9)	
Total	103 (100)	80 (100)	98 (100)	59 (100)	340 (100)	
Tabagismo, n (%)						
nunca fumou	62 (60,2)	42 (52,5)	54 (55,1)	31 (52,5)	189 (55,6)	0,513*
ex tabagista	26 (25,2)	23 (28,8)	34 (34,7)	21 (35,6)	104 (30,6)	
tabagismo atual	15 (14,6)	15 (18,8)	10 (10,2)	7 (11,9)	47 (13,8)	
Total	103 (100)	80 (100)	98 (100)	59 (100)	340 (100)	
Atividade física, n (%)						
não	53 (52,5)	33 (42,3)	60 (62,5)	40 (67,8)	186 (55,7)	0,010*
sim	48 (47,5)	45 (57,7)	36 (37,5)	19 (32,2)	148 944,3)	
Total	101 (100)	78 (100)	96 (100)	59 (100)	334 (100)	

Continuar

Continuação

Variável	Grupos					Total	P
	C	GJA	IG	DM			
Etilismo n (%)							
não	83 (80,6)	63 (79,7)	77 (79,4)	46 (78)	269 (79,6)	0,983*	
sim	20 (19,4)	16 (20,3)	20 (20,6)	13 (22)	69 (20,4)		
Total	103 (100)	79 (100)	97 (100)	59 (100)	338 (100)		
Hipotireodismo n (%)							
não	93 (90,3)	78 (97,5)	93 (94,9)	57 (96,6)	321 (94,4)	0,192†	
sim	10 (9,7)	2 (2,5)	5 (5,1)	2 (3,4)	19 (5,6)		
Total	103 (100)	80 (100)	98 (100)	59 (100)	340 (100)		
IMC (Kg/m²) n (%)							
até 24	22 (21,6)	15 (18,8)	15 (15,3)	11 (18,6)	63 (18,6)	0,298*	
25 a 29	46 (45,1)	38 (47,5)	35 (35,7)	22 (37,3)	141 (41,6)		
30 ou mais	34 (33,3)	27 (33,8)	48 (49)	26 (44,1)	135 (39,8)		
Total	102 (100)	80 (100)	98 (100)	59 (100)	339 (100)		

* Qui-quadrado de Pearson. † Exato de Fisher ou sua extensão.

AF+DAC = antecedente familiar positivo para doença arterial coronária; C = controle; DLP = dislipidemias; DM = diabetes melito; GJA = glicemia de jejum alterada; HAS = hipertensão arterial sistêmica; IG = tolerância diminuída à glicose; IMC = índice de massa corporal; SM = síndrome metabólica

Tabela 5. Metodologia das análises laboratoriais.

Tabela 3: Características clínicas e dados demográficos dos grupos laboratoriais						
Variável	Grupos					P
	C n=103	GJA n=80	IG n=98	DM n=59	Total n=340	
Idade (anos)						
média (DP)	58,5 (7,5)	58,6 (6,8)	60,1 (7,9)	58,7 (7,3)	59,0 (7,4)	0,349*
mediana						
(mín;max)	58 (43;72)	58 (46;72)	61,5 (29;75)	58 (43;74)	59 (29;75)	
Anos de acompanhamento						
média (DP)	4,4 (3,5)	4,6 (3,5)	4,3 (3,4)	3,4 (3,7)	4,3 (3,5)	0,211*
mediana						
(mín;max)	4 (0;10)	5 (0;10)	4 (0;10)	2 (0;10)	4 (0;10)	
Peso (Kg)						
média (DP)	75,5 (17,5)	76,6 (14,8)	77,7 (15,9)	76,6 (17,5)	76,6 (16,4)	0,582*
mediana						
(mín;max)	70,8 (44;146)	77 (47;125)	77,5 (48;128)	75 (41,7;137)	75 (41,7;146)	
Altura (m)						
média (DP)	1,6 (0,1)	1,6 (0,1)	1,6 (0,1)	1,6 (0,1)	1,6 (0,1)	0,276*
mediana						
(mín;max)	1,6 (1,5;1,9)	1,6 (1,5;1,9)	1,6 (1,4;1,8)	1,6 (1,4;2)	1,6 (1,4;2)	
IMC (Kg/m²)						
média (DP)	28,7 (5)	28,8 (4,7)	30,2 (4,9)	29,3 (5,2)	29,3 (5)	0,068*
mediana	27,7	27,8	29,6	29,3	28,6	
(mín;max)	(19;44,1)	(20,9;43,3)	(21,3;43,8)	(17,4;43)	(17,4;44,1)	
PAS (mm/Hg)						
média (DP)	130,9 (18,3)	132,5 (21,1)	131,9 (21)	136,6 (19,1)	132,5 (19,9)	0,339*
mediana	130	130		140		
(mín;max)	(100;180)	(90;180)	130 (90;200)	(100;200)	130 (90;200)	
PAD (mmHg)						
média (DP)	81,7 (11,5)	81,8 (11,4)	81,7 (11,5)	84,6 (10,7)	82,2 (11,5)	0,291*
mediana						
(mín;max)	80 (60;110)	80 (60;120)	80 (60;110)	80 (70;120)	80 (60;122)	
CA (cm)						
média (DP)	98,1 (13)	99,6 (10,7)	102,6 (11,9)	100,0 (12,4)	100,1 (12,1)	0,068†
mediana						
(mín;max)	97 (64;144)	99 (74;129)	102 (74;139)	98 (71;140)	99 (64;144)	

* Kruskal-Wallis. † ANOVA.

C = controle; CA = circunferência abdominal; DM = diabetes melito; DP = desvio padrão; GJA = glicemia de jejum alterada; IG = tolerância diminuída à glicose; IMC = índice de massa corporal; máx = máximo; mín = mínimo; PAD = pressão arterial diastólica; PAS = pressão arterial sistólica

As análises dos exames relacionados ao metabolismo glicídico estão apresentadas na Tabela 6. Houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos para todas as variáveis estudadas.

Tabela 6. Descrição dos exames relacionados ao metabolismo glicídico, segundo o grupo.

	Grupos					
	C	GJA	IG	DM	Total	P
Variável	n=103	n=80	n=98	n=59	n=340	
Glicemia de jejum (mg/dl)						
média (DP)	91,5 (5,7)	108,8 (6,5)	105,9 (12,7)	132,7 (43,7)	106,9 (24,1)	0,000
mediana (mín;max)	93 (63;99)	108 (100;129)	106 (63;139)	121 (87;314)	104 (63;314)	
Glicemia 2h (mg/dl)						
média (DP)	106,3 (16,9)	111,4 (18,5)	162,2 (15,7)	264,0 (71,0)	151,0 (65,8)	0,000*
mediana (mín;max)	106 (63;137)	111 (59;139)	159,5 (140;199)	239 (200;539)	133,5 (59;539)	
HbA1c (%)						
média (DP)	5,8 (0,4)	5,9 (0,4)	6 (0,4)	6,9 (1,6)	6,1 (0,8)	0,000*
mediana (mín;max)	5,8 (4,6;7)	5,9 (5;6,9)	6 (5,2;7,3)	6,4 (5,2;12,6)	5,9 (4,6;12,6)	
Insulina de jejum (uIU/mL)						
média (DP)	9,9 (7,7)	13,5 (11,4)	16,3 (27,3)	12,9 (7,9)	13,1 (16,7)	0,000*
mediana (mín;max)	8,1 (2;6)	10,9 (4;77)	11,7 (4;267)	12,5 (2;53)	10,5 (2;267)	
Insulina 2 horas (uIU/mL)						
média (DP)	68,3 (45)	72,3 (50,3)	127,3 (73,8)	103,7 (75,4)	92,4 (66,1)	0,000*
mediana (mín;max)	65 (6;233)	56,4 (6;256)	112,7 (30;335)	85,3 (8;291)	76,7 (6;335)	
Peptídeo C (ng/mL)						
média (DP)	2,6 (1,2)	3 (1,3)	3,4 (1,8)	3,1 (1,5)	3,5 (1,5)	0,000*
mediana (mín;max)	2,5 (1;8,2)	2,7 (1,2;7,8)	3,1 (1,4;16,6)	2,8 (0,6;16,6)	3,4 (0,6;7,5)	
Homa IR (%)						
média (DP)	2,2 (1,7)	3,7 (3,4)	4,3 (7,4)	4,5 (3)	3,5 (4,7)	0,000*
mediana (mín;max)	1,9 (0,4;11,1)	2,8 (0,9;24,5)	2,9 (0,9;71,8)	3,7 (0,5;21)	2,7 (0,4;71,8)	
Homa B (%)						
média (DP)	129,3 (135,4)	104,8 (78,0)	140,4 (214,8)	80,5 (49,1)	118,2 (144,8)	0,001*
mediana (mín;max)	94,1 (30,1194,4)	88,8 (28,7;526,7)	101,9 (28,7;2088)	71,4 (7,2;197,4)	91,9 (30;2088)	

* Kruskal-Wallis.

C = controle; DM = diabetes melito; DP = desvio padrão; GJA = glicemia de jejum alterada; IG = tolerância diminuída à glicose; máx = máximo; mín = mínimo.

Os resultados dos exames laboratoriais, resumidos na Tabela 7, em sua maioria, não evidenciaram diferenças entre os grupos, com exceção do HDL-colesterol ($P = 0,021$) e da microalbuminúria ($P = 0,016$), em que o grupo diabetes melito apresentou menor HDL-colesterol e maior microalbuminúria quando comparado aos outros três grupos. Vale também ressaltar que os grupos controle, glicemia de jejum alterada e tolerância diminuída à glicose apresentaram níveis estatisticamente iguais de HDL-colesterol e microalbuminúria.

Tabela 7. Medidas-resumo dos resultados dos exames laboratoriais dos pacientes, segundo o grupo.

Grupos Variável	Grupos				Total	P
	C	GJA	IG	DM		
CT (mg/dl)	n=103	n=79	n=98	n=59	n=339	
média (DP)	201,4 (39,2)	202,5 (49,5)	197 (42)	194,8 (41,5)	199,2 (42,9)	0,730*
mediana (mín;max)	200 (133;397)	198 (106;346)	192 (116;327)	196 (114;304)	196 (106;397)	
TG (mg/dl)	n=103	n=79	n=98	n=59	n=339	
média (DP)	170,6 (120,9)	170,6 (120,9)	172,9 (77,6)	193,1 (121,2)	174,6 (108,6)	0,293*
mediana (mín;max)	143 (43;994)	143 (43;994)	156,5 (55;383)	141 (33;662)	147 (33;994)	
HDL-c (mg/dl)	n=103	n=79	n=98	n=59	n=339	
média (DP)	49,4 (12,9)	49,4 (12,9)	47,7 (13,5)	43,6 (10,5)	47,7 (12,8)	0,021*
mediana (mín;max)	48 (27;92)	48 (27;92)	46 (25;103)	41 (27;82)	46 (25;103)	
LDL-c (mg/dl)	n=102	n=75	n=98	n=59	n=334	
média (DP)	118,4 (34,4)	118,4 (34,4)	114,3 (38,5)	11,7 (32,7)	116,9 (38,2)	0,504*
mediana (mín;max)	119 (60;295)	119 (60;295)	107,5 (53;229)	107 (33;174)	115 (33;295)	
Não HDL (mg/dl)	n=103	n=79	n=98	n=59	n=339	
média (DP)	152 (39,7)	152 (39,7)	148,9 (40,9)	151,2 (40,7)	151,4 (41,9)	0,948*
mediana (mín;max)	151 (92;353)	151 (92;353)	146,5 (67;267)	144 (76;274)	149 (60;353)	
Apo B/Apo A1	n=96	n=77	n=94	n=59	n=326	
média (DP)	0,7 (0,6)	0,7 (0,6)	0,7 (0,3)	0,8 (0,8)	1,1 (5,8)	0,602*
mediana (mín;max)	0,7 (0,3;6,2)	0,7 (0,3;6,2)	0,7 (0,3;2,6)	0,7 (0,4;6,2)	0,7 (0,2;104,3)	
CICr (ml/min)	n=102	n=80	n=98	n=59	n=339	
média (DP)	91,3 (29,3)	91,3 (29,3)	86,7 (26,8)	92,5 (27,2)	89,7 (28,2)	0,344*
mediana (mín;max)	(46,8;228,1)	86,9 (46,8; 228,1)	80,4 (45,7;179,5)	92,4 (41,4;171,4)	86,4 (36,3;228,1)	

* Kruskal-Wallis.

Apo = apolipoproteína; C = controle; CICr = *clearance* de creatinina; CT = colesterol total; DM = diabetes melito; DP = desvio padrão; GJA = glicemia de jejum alterada, IG = tolerância diminuída à glicose; HDL-colesterol = colesterol de lipoproteína de alta densidade; LDL-colesterol = colesterol de lipoproteína de baixa densidade; máx = máximo; mín = mínimo; não-HDL-colesterol = colesterol não-HDL; TG = triglicérides.

O Gráfico 4 traz a frequência do uso de algumas medicações utilizadas pelos pacientes. Como se pode notar, as estatinas eram utilizadas por grande parte dos pacientes (66,5%). A maioria das medicações apresentadas foi igualmente utilizada, à exceção dos bloqueadores dos canais de cálcio ($P = 0,021$) e dos fibratos ($P = 0,011$), em que:

- os grupos tolerância diminuída à glicose e diabetes utilizavam mais bloqueadores dos canais de cálcio (36,9%) quando

comparados aos grupos controle e glicemia de jejum alterada (21,9%);

- o grupo diabetes utilizava mais fibratos (10,2%) quando comparado aos demais grupos (2,1%).

GRÁFICO 4. Medicamentos em uso de acordo com os grupos.

AAS = ácido acetilsalicílico; BCC = bloqueadores dos canais de cálcio; BRA = bloqueadores dos receptores de angiotensinogênio; C = controle; DM = diabetes melito; Diuréticos = tiazídicos (hidroclorotiazida e clortalidona); GJA = glicemia de jejum alterada; IECA = inibidores da enzima de conversão da angiotensina; IG = tolerância diminuída à glicose.

* P = 0,011; ** P = 0,021.

8.2 Exames diagnósticos de aterosclerose subclínica nos grupos

A presença de aterosclerose subclínica foi avaliada por vários métodos diagnósticos (Gráfico 5; Tabela 8). Os resultados desses métodos não evidenciaram diferenças significantes entre os grupos investigados. Entretanto, a aterosclerose subclínica foi prevalente (77,1%) em todos os grupos, principalmente no grupo diabetes melito, o qual, apesar da diferença estatisticamente não-significante, apresentou maior frequência de positividade em todos os métodos avaliados. A maior prevalência de aterosclerose subclínica foi encontrada na avaliação realizada pela USG (63,1%), seguida pela aterosclerose coronária avaliada pelo CAC (50%). Aterosclerose em membros inferiores diagnosticada pelo ITB foi infrequente, sendo observada somente em um paciente do grupo controle e um do grupo diabetes melito.

GRÁFICO 5. Frequência dos exames de aterosclerose subclínica positiva nos grupos.

AS = aterosclerose subclínica; C = controle; CAC = escore de cálcio coronário; DM = diabete melito; GJA = glicemia de jejum alterada; IG = tolerância diminuída à glicose; ITB = índice tornozelo-braquial; TE = teste ergométrico; USG = ultrassonografia Doppler de carótidas.

Tabela 8. Distribuição dos resultados dos exames para aterosclerose subclínica dos pacientes, segundo o grupo.

Variável	Grupos				Total	P
	C	GJA	IG	DM		
Aterosclerose, n (%)						
Positiva	76 (73,8)	62 (77,5)	76 (77,6)	48 (81,4)	262 (77,1)	0,738*
Negativa	27 (26,2)	18 (22,5)	22 (22,4)	11 (18,6)	78 (22,9)	
Total	103 (100)	80 (100)	98 (100)	59 (100)	340 (100)	
CAC, n (%)						
Positivo	47 (47,5)	40 (51,3)	46 (50,0)	31 (52,5)	164 (50)	0,928*
Negativo	52 (52,5)	38 (48,7)	46 (50,0)	28 (47,5)	164 (50)	
Total	99 (100)	78 (100)	92 (100)	59 (100)	328 (100)	
ITB, n (%)						
Positivo	1 (1,1)	-	-	1 (2,0)	2 (0,6)	0,432†
Negativo	91 (98,9)	79 (100)	93 (100)	48 (98)	311 (99,4)	
Total	92 (100)	79 (100)	93 (100)	49 (100)	313 (100)	
TE, n (%)						
Positivo	22 (22)	13 (16,3)	20 (21,1)	13 (22,4)	68 (20,4)	0,759*
Negativo	78 (78)	67 (83,8)	75 (78,9)	45 (77,6)	265 (79,6)	
Total	100 (100)	80 (100)	95 (100)	58 (100)	333 (100)	
USG, n (%)						
Positivo	57 (62,7)	45 (58,2)	59 (63,5)	34 (69,5)	195 (63,1)	0,603*
Negativo	35 (37,3)	33 (41,8)	34 (36,5)	15 (30,5)	117 (36,9)	
Total	92 (100)	78 (100)	93 (100)	49 (100)	312 (100)	

C = controle; CAC = escore de cálcio coronário; DM = diabetes melito; GJA = glicemia de jejum alterada; IG = tolerância diminuída à glicose; ITB = índice tornozelo-braquial; TE = teste ergométrico; USG = ultrassonografia Doppler de carótidas.

* Qui-quadrado de Pearson. † Exato de Fisher ou sua extensão.

No Gráfico 6 observa-se a distribuição da gravidade do CAC nos grupos de acordo com a classificação de Rumberger et al¹⁶⁰: ausente em 164 pacientes, 1-10 unidades Agatston em 36 pacientes, 11-100 unidades Agatston em 64 pacientes, 101-400 unidades Agatston em 43 pacientes, e ≥ 400 unidades Agatston em 21 pacientes. Na Tabela 9 estão descritas as medidas do CAC para cada um dos grupos.

GRÁFICO 6. Distribuição do escore de cálcio coronário entre os grupos.
(Adaptado de Rumberger et al¹⁶⁰)
C = controle; DM = diabetes; GJA = glicemia de jejum alterada;
IG = tolerância diminuída à glicose.

Tabela 9. Medidas resumo dos resultados do escore de cálcio coronário, segundo o grupo.

	Grupos				Total n=336	P
	C n=99	GJA n=78	IG n=92	DM n=59		
CAC						
média (DP)	82,8 (245,2)	87,6 (173,1)	67,2 (133,8)	127,0 (351,1)	87,5 (229)	0,861†
mediana (mín;máx)	0 (0;1919)	1 (0;824)	0,5 (0;740)	1 (0;1990)	0,5 (0;1990)	
Mesa*						
média (DP)	33,0 (38)	37,2 (39,4)	35,3 (39,2)	35,4 (38,5)	35,1 (38,6)	0,901†
mediana (mín;máx)	0 (0;99)	21 (0;99)	7,5 (0;152)	28,0 (0;99)	3 (0;152)	

C = controle; CAC = escore de cálcio coronário; DM = diabete melito; DP = desvio padrão; GJA = glicemia de jejum alterada; IG = tolerância diminuída à glicose; máx = máximo; mín = mínimo.

* Percentil 75 para idade, sexo e raça. † Kruskal-Wallis

No Gráfico 7 está representada a frequência de diagnóstico de aterosclerose subclínica pela USG ao serem consideradas a EMI e a presença de placas carotídeas. Na Tabela 10 estão descritas as medidas da EMI bilateral, o valor máximo e a média composta pela USG. Nenhum desses parâmetros diferiu entre os grupos.

GRÁFICO 7. Porcentagem de resultados positivos de ultrassonografia Doppler de carótidas por aumento da espessura médio-intimal carotídea e pela presença de placa carotídea. C = controle, DM = diabetes melito; EMI = espessura médio-intimal carotídea; GJA = glicemia de jejum alterada; IG = tolerância diminuída à glicose; USG = ultrassonografia Doppler de carótidas.

Tabela 10. Medidas-resumo dos resultados da ultrassonografia Doppler de carótidas, segundo o grupo.

	Grupos				Total n=336	P
	C n=102	GJA n=96	IG n=79	DM n=59		
EMI esquerda						
média (DP)	0,7 (0,2)	0,8 (0,2)	0,8 (0,2)	0,8 (0,3)	0,8 (0,2)	0,32 ^c
mediana (mín;máx)	0,7 (0,5;1,3)	0,7 (0,4;1,4)	0,7 (0,5;1,6)	0,8 (0,5;2)	0,7 (0,4;2)	
EMI direita						
média (DP)	0,7 (0,2)	0,8 (0,3)	0,8 (0,2)	0,8 (0,2)	0,8 (0,2)	0,55 ^c
mediana (mín;máx)	0,7 (0,5;1,3)	0,7 (0,4;2)	0,7 (0,5;1,6)	0,7 (0,5;1,4)	0,7 (0,4;2)	
EMI composto						
média (DP)	0,7 (0,2)	0,8 (0,2)	0,8 (0,2)	0,8 (0,2)	0,8 (0,2)	0,41 ^c
mediana (mín;máx)	0,7 (0,5;1,2)	0,7 (0,5;1,6)	0,7 (0,5;1,6)	0,8 (0,5;1,4)	0,7 (0,5;1,6)	
EMI máximo						
média (DP)	0,8 (0,2)	0,8 (0,3)	0,8 (0,2)	0,9 (0,3)	0,8 (0,2)	0,39 ^c
mediana (mín;máx)	0,7 (0,5;1,3)	0,8 (0,5;2)	0,8 (0,5;1,6)	0,8 (0,5;2)	0,8 (0,5;2)	
EMI n (%)						
média (DP)	64 (62,7)	46 (58,2)	61 (63,5)	41 (69,5)	212 (63,1)	0,603 ^a
mediana (mín;máx)	38 (37,3)	33 (41,8)	35 (36,5)	18 (30,5)	124 (36,9)	
Placa n (%)						
média (DP)	43 (42,2)	32 (40,5)	38 (39,6)	24 (40,7)	137 (40,8)	0,99 ^a
mediana (mín;máx)	59 (57,8)	47 (59,5)	58 (60,4)	35 (59,3)	199 (59,2)	

C = controle; DM = diabetes melito; DP = desvio padrão; EMI = espessura médio-intimal carotídea; GJA = glicemia de jejum alterada; IG = tolerância diminuída à glicose; máx = máximo; mín = mínimo.

* Kruskal-Wallis. † Qui-quadrado de Pearson.

A capacidade funcional, avaliada em METs, foi semelhante em todos os grupos, bem como o escore de Duke (Gráfico 8). Na Tabela 11 estão apresentado os dados do TE.

GRÁFICO 8. Distribuição do risco calculado pelo escore de Duke, segundo o grupo.

C = controle, DM = diabetes melito; EMI = espessura médio-intimal carotídea; GJA = glicemia de jejum alterada; IG = tolerância diminuída à glicose; USG = ultrassonografia Doppler de carótidas.

Tabela 11. Medidas resumo dos resultados do teste ergométrico dos pacientes, segundo o grupo.

	Grupos				Total n=331	P
	C n=100	GJA n=79	IG n=94	DM n=58		
Escore de Duke						
média (DP)	8,2 (4,9)	8,0 (5,1)	8,0 (4,3)	7,2 (6,1)	7,9 (5,0)	0,792 ^c
mediana (mín;máx)	9,3 (-8;17)	9,0 (-14,4;15,3)	9,0 (-12,9;16,3)	9,3 (-17,6;14,2)	9,2 (-17,6;17)	
Capacidade funcional						
média (DP)	9,8 (2,7)	9,7 (2,6)	9,07 (2,4)	9,07 (2,3)	9,5 (2,5)	0,220 ^c
mediana (mín;máx)	(4,6;21,3)	(4,6;15,5)	(4,6;15,0)	(4,6;16,0)	(4,6;21,3)	

C = controle; DM = diabetes melito; DP = desvio padrão; GJA = glicemia de jejum alterada; IG = tolerância diminuída à glicose; máx = máximo; mín = mínimo.

* Kruskal-Wallis

Com relação aos sítios arteriais estudados (coronárias – CAC e TE; carótidas – USG; e artérias de membros inferiores – ITB), o acometimento por aterosclerose subclínica se deu como se segue: um sítio

em 116 pacientes (34,1%), dois sítios em 144 pacientes (42,4%) e três sítios em somente 2 pacientes (0,6%), e 78 pacientes (22,9%) não apresentaram alteração em nenhum leito arterial avaliado (Gráfico 9).

GRÁFICO 9. Número de sítios arteriais acometidos na aterosclerose subclínica.

C = controle, DM = diabetes melito; GJA = glicemia de jejum alterada; IG = tolerância diminuída à glicose.

8.3 Biomarcadores de aterosclerose nos grupos

Para os marcadores PCR-us 1ª ($P = 0,886$) e 2ª ($P = 0,645$) medidas, leptina ($P = 0,353$) e adiponectina ($P = 0,070$) não foram observadas diferenças significantes entre os grupos. O mesmo não ocorreu para resistina ($P < 0,001$), TNF- α ($P = 0,003$) e Lp-PLA2 ($P = 0,003$). De maneira resumida, temos que:

- o grupo controle apresentou menor resistina quando comparado aos grupos glicemia de jejum alterada e tolerância diminuída à glicose;
- o grupo diabetes melito apresentou menor resistina quando comparado aos grupos glicemia de jejum alterada e tolerância diminuída à glicose;
- o grupo controle apresentou menor TNF- α quando comparado aos grupos glicemia de jejum alterada e tolerância diminuída à glicose;
- o grupo controle apresentou maior Lp-PLA2 quando comparado aos grupos glicemia de jejum alterada e tolerância diminuída à glicose;
- o grupo diabetes melito apresentou maior Lp-PLA2 quando comparado ao grupo glicemia de jejum alterada;
- o grupo diabetes melito apresentou maior microalbuminúria quando comparado aos outros três grupos.

Os resultados dos exames de atividade inflamatória e resistência insulínica estão apresentados na Tabela 12.

Tabela 12. Medidas resumo dos marcadores de atividade inflamatória e resistência insulínica dos pacientes, segundo o grupo.

	Grupos				Total	P
	C	GJA	IG	DM		
PCR-us 1ª (mg/dl)	n=103	n=80	n=98	n=59	n=340	
média (DP)	3,9 (3,8)	6,0 (22,8)	5,6 (13,3)	4,1 (4,7)	4,9 (13,5)	0,886 ^c
mediana (mín;máx)	2,6 (0,1;23)	2,1 (0,1;205)	2,1 (0,1;122)	2,4 (0,2;26,2)	2,2 (0,1;205)	
PCR-us 2ª (mg/dl)	n=102	n=79	n=97	n=58	n=336	
média (DP)	3,5 (3,9)	3,6 (4,1)	4,1 (5,4)	5,6 (14,5)	4,1 (7,3)	0,645*
mediana (mín;máx)	0,7 (0,5;1,3)	0,7 (0,4;2)	0,7 (0,5;1,6)	0,7 (0,5;1,4)	0,7 (0,4;2)	
Leptina (ng/ml)	n=101	n=73	n=91	n=56	n=321	
média (DP)	20,1 (16,7)	20 (16,8)	24 (19,9)	20,6 (19,1)	21,6 (18,1)	0,353*
mediana (mín;máx)	16,4 (0,6;87,8)	15,3 (1,6;76,5)	19,1 (3,1;98,4)	14,9 (0,6;93,1)	16,1 (0,6;98,4)	
Adiponectina ((µg/ml)	n=103	n=80	n=93	n=59	n=335	
média (DP)	32,5 (26,0)	32,7 (32,8)	27,1 (25,8)	24,6 (22,1)	29,6 (27,2)	0,070*
mediana (mín;máx)	27,2 (4;175,1)	20,4 (2,1;181,3)	19,4 (1,0;112,4)	18,0 (2,6;105)	20,7 (10;181,3)	
Resistina (ng/ml)	n=103	n=80	n=93	n=59	n=335	
média (DP)	5,3 (3,9)	12,8 (11,8)	13,5 (10,2)	7,4 (6,5)	9,6 (9,3)	<0,001*
mediana (mín;máx)	3,8 (0,5;20)	8,9 (0,9;62,2)	11,1 (0,9;43,2)	5,7 (1,2;30,4)	6,8 (0,5;62,2)	
TNF-α (pg/ml)	n=103	n=80	n=93	n=59	n=335	
média (DP)	4,9 (2,6)	5,8 (2,5)	5,8 (2,7)	5,2 (2,2)	5,4 (2,6)	0,003*
mediana (mín;máx)	4,6 (1,5;18)	5,7 (2; 16,9)	5,4 (0,9;21,7)	5 (0,8;9)	5,4 (2,6)	
PLAC (ng/ml)	n=103	n=80	n=93	n=59	n=335	
média (DP)	153,3 (54,1)	127,6 (45,1)	139,6 (64,5)	148,2 (55,7)	142,45 (56,21)	0,003*
mediana (mín;máx)	142,7 (85,6;339,5)	122,3 (34,5;267,5)	126,2 (61,3;524,5)	133,0 (37,5;315,3)	128,6 (34,5;524,5)	
Microalb (mg/g)	n=97	n=80	n=96	n=58	n=331	
média (DP)	19,2 (32,7)	56,8 (252,1)	18,1 (32,4)	38,6 (112,2)	38,6 (112,2)	0,016*
mediana (mín;máx)	8,6 (1,1;269)	8,5 (0,7;2200)	9,7 (0,7;196,9)	14,3 (0,2;806,3)	9,9 (0,2;2200)	

C = controle; DM = diabetes melito; DP = desvio padrão; GJA = glicemia de jejum alterada, IG = tolerância diminuída à glicose; Lp-PLA2 = fosfolipase A2 associada a lipoproteína; máx = máximo; Microalb = microalbuminúria; mín = mínimo; PCR-us = proteína C-reativa ultrasensível; TNF-α = fator de necrose tumoral alfa.

* Kruskal-Wallis.

8.4 Marcadores genéticos nos grupos

Na avaliação dos polimorfismos dos pacientes, não foi possível evidenciar diferenças significantes entre os grupos (Tabela 13).

Tabela 13. Distribuição dos polimorfismos dos pacientes, segundo o grupo.

Variável	Grupos				Total	P
	C	GJA	IG	DM		
rs2383206, n (%)						
A/A	19 (19)	12 (15,2)	20 (21,1)	12 (20,7)	63 (19)	0,562*
A/G	47 (47)	45 (57)	39 (41,1)	25 (43,1)	156 (47)	
G/G	34 (34)	22 (27,8)	36 (37,9)	21 (36,2)	113 (34)	
Total	100 (100)	79(100)	95 (100)	58 (100)	332 (100)	
rs10757274, n (%)						
A/A	27 (27)	21 (26,6)	30 (31,6)	14 (24,1)	92 (27,7)	0,723*
A/G	42 (42)	41 (51,9)	40 (42,1)	28 (48,3)	151 (45,5)	
G/G	31 (31)	17 (21,5)	25 (26,3)	16 (27,6)	89 (26,8)	
Total	100 (100)	79 (100)	95 (100)	58 (100)	332 (100)	
rs10757278, n (%)						
A/A	32 (32)	29 (36,7)	37 (39,4)	21 (36,2)	119 (36)	0,825*
A/G	37 (37)	33 (41,8)	33 (35,1)	21 (36,2)	124 (37,5)	
G/G	31 (31)	17 (21,5)	24 (25,5)	16 (27,6)	88 (26,6)	
Total	100 (100)	79 (100)	94 (100)	58 (100)	331 (100)	
PLA2G7 rs1051931, n (%)						
C/C	5 (5)	3 (3,8)	3 (3,2)	-	11 (3,3)	0,293†
C/T	32 (32)	34 (43)	37 (38,9)	17 (29,3)	120 (36,1)	
T/T	63 (63)	42 (53,2)	55 (57,9)	41 (70,7)	201 (60,5)	
Total	100 (100)	79 (100)	95 (100)	58 (100)	332 (100)	
PLA2G7 rs16874954, n (%)						
G/G	99 (99)	77 (97,5)	94 (98,9)	57 (98,3)	327 (98,5)	0,818†
G/T	1 (1)	2 (2,5)	1 (1,1)	1 (1,7)	5 (1,5)	
T/T	-	-	-	-	-	
Total	100 (100)	79 (100)	95 (100)	58 (100)	332 (100)	
TNFα rs1799724, n (%)						
C/C	3 (3)	2 (2,5)	1 (1,1)	1 (1,7)	7 (2,1)	0,929†
C/T	15 (15)	15 (19)	16 (17)	12 (20,7)	58 (17,5)	
T/T	82 (82)	62 (78,5)	77 (81,9)	45 (77,6)	266 (80,4)	
Total	100 (100)	79 (100)	94 (100)	58 (100)	331 (100)	

C = controle; DM = diabetes melito; GJA = glicemia de jejum alterada; IG = tolerância diminuída à glicose; PLA2G7 = mRNA do gene da Lp-PLA2; TNF- α = fator de necrose tumoral alfa.

* Qui-quadrado de Pearson. † Exato de Fisher ou sua extensão.

Considerando a análise das expressões gênicas, resumida na Tabela 14, observa-se diferença entre os grupos apenas para PLA2G7 (2- Δ CT) (P = 0,012), em que o grupo glicemia de jejum alterada apresentou maior PLA2G7 (2- Δ CT), quando comparado aos grupos controle e diabetes.

Tabela 14. Distribuição das expressões gênicas dos pacientes, segundo o grupo.

Variável	Grupos				Total	P
	C	GJA	IG	DM		
PLA2G7 (2-ΔCT)	n=89	n=73	n=87	n=51	n=300	0,012*
média (DP)	0,0116 (0,0119)	0,0176 (0,0146)	0,014 (0,013)	0,0127 (0,0132)	0,0139 (0,0133)	
mediana	0,008	0,0126	0,0107	0,0088	0,01	
(mín;max)	(0,0012;0,0753)	(0,0012;0,0642)	(0,0015;0,073)	(0,001;0,0132)	(0,001;0,0753)	
TNF-α (2-ΔCT)	n=89	n=73	n=87	n=53	n=302	0,154*
média (DP)	0,0202 (0,0311)	0,0143 (0,0179)	0,0131 (0,0132)	0,0166 (0,0196)	0,0161 (0,022)	
mediana	0,0118	0,0096	0,0104	0,0103	0,0105	
(mín;max)	(0,0035;0,1993)	(0,0034;0,1379)	(0,003;0,0994)	(0,0027;0,1146)	(0,0027;0,1993)	
LEP (2-ΔCT)	n=85	n=71	n=84	n=48	n=288	0,890*
média (DP)	0,0001 (0,0001)	0,0001 (0,0002)	0,0002 (0,0002)	0,0001 (0,0001)	0,0001 (0,0002)	
mediana	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	
(mín;max)	(0;0,0008)	(0;0,0009)	(0;0,0015)	(0,0,0003)	(0,0001;0,5067)	
LEPR (2-ΔCT)	n=89	n=73	n=87	n= 53	n=302	0,063*
média (DP)	0,0108 (0,0449)	0,0136 (0,0608)	0,0154 (0,0518)	0,0118 (0,0445)	0,013 (0,0508)	
mediana	0,0037	0,0027	0,0033	0,0026	0,0032	
(mín;max)	(0,0001;0,4217)	(0,0001;0,5067)	(0,0001;0,3957)	(0,0002;0,3157)	(0,0001;0,5067)	

C = controle; DM = diabetes melito; DP = desvio padrão; GJA = glicemia de jejum alterada, IG = tolerância diminuída à glicose; máx = máximo; mín = mínimo; PLA2G7 = mRNA do gene da Lp-PLA2; TNF- α = fator de necrose tumoral alfa.

* Kruskal-Wallis.

8.5 Marcadores relacionados à presença de aterosclerose subclínica

Foram avaliados os fatores relacionados à presença de aterosclerose subclínica nos portadores de disglícemia. Para essa análise foram excluídos

os pacientes do grupo controle e os demais pacientes foram incluídos no grupo aterosclerose subclínica positiva caso ao menos um dos exames fosse positivo, considerando CAC, USG, TE e ITB, e no grupo aterosclerose subclínica negativa se todos os exames fossem negativos. Foram incluídos 186 pacientes no grupo aterosclerose subclínica positiva e 51 no grupo aterosclerose subclínica negativa.

Na Tabela 15 estão apresentados os dados dos pacientes com hipertensão arterial sistêmica e dislipidemia que apresentaram estatisticamente maior frequência de aterosclerose ($P = 0,021$ e $P < 0,001$, respectivamente).

Tabela 15. Descrição das características clínicas segundo a presença de aterosclerose subclínica e resultados dos testes de associação.

	Aterosclerose subclínica		Total	P
	Não	Sim		
Gênero, n (%)				
feminino	32 (21,8)	115 (78,2)	147	0,905*
masculino	19 (21,1)	71 (78,9)	90	
Total	51 (21,5)	186 (78,5)	237	
Raça, n (%)				
branca	29 (19,5)	120 (80,5)	149	0,156†
parda	14 (27,5)	37 (72,5)	51	
negra	8 (26,7)	22 (73,3)	30	
amarela	0	7 (100)	7	
Total	51 (21,5)	186 (78,5)	237	
AF+DAC, n (%)				
não	36 (21,7)	130 (78,3)	166	0,923*
sim	15 (21,1)	56 (78,9)	71	
Total	51 (21,5)	186 (78,5)	237	
HAS, n (%)				
não	20 (31,7)	43 (68,3)	63	0,021*
sim	31 (17,8)	143 (82,2)	174	
Total	51 (21,5)	186 (78,5)	237	

Continua

Continuação

		Aterosclerose subclínica		Total	P
		não	sim		
DLP, n (%)					
	não	23 (42,6)	31 (57,4)	54	<0,001*
	sim	28 (15,3)	155 (84,7)	183	
	Total	51 (21,5)	186 (78,5)	237	
SM, n (%)					
	não	16 (31,4)	35 (68,6)	51	0,053*
	sim	35 (18,8)	151 (81,2)	186	
	Total	51 (21,5)	186 (78,5)	237	
Tabagismo, n (%)					
	nunca fumou	29 (22,8)	98 (77,2)	127	0,851*
	ex-tabagista	16 (20,5)	62 (79,5)	78	
	tabagismo atual	6 (18,8)	26 (81,3)	32	
	Total	51 (21,5)	186 (78,5)	237	
Etilismo, n (%)					
	não	36 (19,4)	150 (80,6)	186	0,161*
	sim	14 (28,6)	35 (71,4)	49	
	Total	50 (21,3)	185 (78,7)	235	
Hipotireoidismo, n (%)					
	não	49 (21,5)	179 (78,5)	228	> 0,999‡
	sim	2 (22,2)	7 (77,8)	9	
	Total	51 (21,5)	186 (78,5)	237	
IMC (Kg/m²), n (%)					
	até 24	10 (24,4)	31 (75,6)	41	0,538*
	25 a 29	17 (17,9)	78 (82,1)	95	
	30 ou mais	24 (23,8)	77 (76,2)	101	
	Total	51 (21,5)	186 (78,5)	237	

AF+DAC = antecedente familiar positivo para doença arterial coronária; DLP = dislipidemia; HAS = hipertensão arterial sistêmica; IMC = índice de massa corporal; SM = síndrome metabólica.

* Teste qui-quadrado de Pearson. † Razão de verossimilhança. ‡ Teste exato de Fischer ou sua extensão.

Os pacientes com aterosclerose subclínica apresentaram estatisticamente maior média de idade e pressão arterial sistólica mais elevada (Tabela 16).

Tabela 16. Descrição das características quantitativas antropométricas segundo presença de aterosclerose e resultado dos testes comparativos.

Variável	Aterosclerose subclínica		P
	Não n=51	Sim n=186	
Idade (anos)			<0,001*
média (DP)	55,4 (7,4)	60,3 (7,1))	
mediana (mín;max)	56 (29;69)	60 (43;75)	
Anos de acompanhamento			0,255†
média (DP)	3,7 (3,4)	4,3 (3,5)	
mediana (mín;max)	3 (0;10)	4 (0;10)	
Peso (Kg)			0,724*
média (DP)	77,8 (15,3)	76,9 (16,1)	
mediana (mín;max)	76,9 (47;125)	76,3 (41,7;137)	
Altura (m)			0,794*
média (DP)	1,6 (0,1))	1,6 (0,1)	
mediana (mín;max)	1,6 (1,5;1,8)	1,6 (1,4;2)	
IMC (Kg/M²)			0,922*
média (DP)	29,6 (4,9)	29,5 (5)	
mediana (mín;max)	29,2 (20,6;40,3)	28,8 (17,4;43,8)	
PAS (mm/Hg)			0,018*
média (DP)	127,3 (19,1)	134,9 (20,7)	
mediana (mín;max)	120 (90;200)	130,5 (90;200)	
PAD (mmHg)			0,477*
média (DP)	81,4 (10,7)	82,7 (11,7)	
mediana (mín;max)	80 (60;120)	80 (60;122)	
CA (cm)			0,978*
média (DP)	100,9 (10,6)	100,9 (12)	
mediana (mín;max)	102 (74;122)	99,5 (71;140)	

CA = circunferência abdominal; DP = desvio padrão; IMC = índice de massa corporal; máx = máximo; mín = mínimo; PAD = pressão arterial diastólica; PAS = pressão arterial sistólica.

* Teste *t* de Student. †Teste de Mann-Whitney.

Na Tabela 17 estão demonstrados os resultados dos exames laboratoriais, observando-se que o grupo com aterosclerose subclínica apresentou estatisticamente maior valor de triglicérides e menores valores de HDL-colesterol, LDL-colesterol e *clearance* de creatinina.

Tabela 17. Resultados dos exames laboratoriais segundo a presença de aterosclerose e resultado dos testes comparativos.

Variável	Aterosclerose subclínica		P
	Não n=51	Sim n=185	
CT (mg/dl)			
média (DP)	208,7 (45,3)	195,4 (43,9)	0,058*
mediana (mín;max)	207 (120;327)	192 (106;346)	
TG (mg/dl)			
média (DP)	150 (99,2)	183,7 (103,1)	0,014†
mediana (mín;max)	127 (33;662)	155 (56;745)	
HDL-c (mg/dl)			
média (DP)	51,4 (15,1)	45,8 (11,8)	0,006*
mediana (mín;max)	50,0 (28;103)	44 (25;95)	
LDL-c (mg/dl)			
média (DP)	128 (41,8)	113 (38,7)	0,017*
mediana (mín;max)	129 (60;229)	107 (33;273)	
não HDL (mg/dl)			
média (DP)	139,3 (2,6)	139,8 (2,7)	0,310†
mediana (mín;max)	139 (133;145)	140 (132;146)	
Apo B/Apo A1			
média (DP)	0,7 (0,4)	1,3 (7,7)	0,150†
mediana (mín;max)	0,6 (0,4;2,6)	0,7 (0,2;104,3)	
Ác urico (mg/dl)			
média (DP)	5,3 (1,3)	5,5 (1,4)	0,339*
mediana (mín;max)	5 (3,2;10,2)	5,4 (2,7;11,5)	
ClCr (mL/min)			
média (DP)	98,3 (25,1)	86,4 (28)	0,006*
mediana (mín;max)	97,5 (52,6;155,8)	84,1 (36,3;179,5)	
Glicemia de jejum (mg/dL)			
média (DP)	114 (29,1)	113,4 (25,1)	0,880*
mediana (mín;max)	109 (88;293)	109 (63;314)	
Glicemia 2h (mg/dL)			
média (DP)	168,7 (71,3)	170,9 (69,4)	0,847*
mediana (mín;max)	153 (82;539)	155,5 (59;476)	
HbA1c (%)			
média (DP)	6,4 (1,1)	6,2 (0,9)	0,394*
mediana (mín;max)	6 (5,2;12,1)	6 (5;12,6)	

Continua

Continuação

Variável	Aterosclerose subclínica		P
	Não N=51	Sim N=185	
Insulina de jejum (uIU/mL)			
média (DP)	12,2 (6,2)	15,1 (21,3)	0,340*
mediana (mín;max)	11,1 (4;27)	11,6 (2;267)	
Insulina 2 horas (uIU/mL)			
média (DP)	93,4 (55,3)	105,5 (74,7)	0,290*
mediana (mín;max)	79,9 (22;239)	87 (6;335)	
Peptídeo C (ng/mL)			
média (DP)	3,1 (1,2)	3,3 (1,7)	0,332†
mediana (mín;max)	2,8 (1,4;5,6)	3 (0,6;16,6)	
Homa IR (%)			
média (DP)	95,6 (51,7)	121,5 (171,1)	0,473†
mediana (mín;max)	87,2 (16,5;229,2)	94 (7,3;2088)	
Homa B (%)			
média (DP)	3,4 (1,9)	4,2 (6)	0,580*
mediana (mín;max)	3,2 (1;7,8)	3 (0,5;71,8)	

Apo = apolipoproteína; CICr = *clearance* de creatinina; CT = colesterol total; DP = desvio padrão; HbA1c = hemoglobina glicada; HDL-c = colesterol de lipoproteína de alta densidade; HOMA = *Homeostasis Model Assessment*; LDL-c = colesterol de lipoproteína de baixa densidade; máx = máximo; mín = mínimo; não-HDL = colesterol não-HDL; TG = triglicérides.

* Teste *t* de Student. † Teste de Mann-Whitney.

No Gráfico 10 está representado o uso de medicamentos segundo a presença de aterosclerose subclínica. Os pacientes que faziam uso de estatina e bloqueadores dos canais de cálcio apresentaram estatisticamente maior presença de aterosclerose subclínica ($P < 0,001$ e $P = 0,043$, respectivamente).

GRÁFICO 10. Medicamentos em uso em cada um dos grupos.
 AAS = ácido acetilsalicílico; AS = aterosclerose subclínica;
 BCC = bloqueadores dos canais de cálcio; BRA =
 bloqueadores dos receptores de angiotensinogênio; Diuréticos
 = tiazídicos (hidroclorotiazida e clortalidona); IECA = inibidores
 da enzima de conversão da angiotensina.
 * $P < 0,001$ (teste qui-quadrado de Pearson). ** $P = 0,043$
 (teste qui-quadrado de Pearson).

Com relação aos biomarcadores, foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre os grupos para o TNF- α e para a microalbuminúria, como mostrado na Tabela 18.

Tabela 18. Descrição dos biomarcadores segundo a presença de aterosclerose e resultado dos testes comparativos.

	Aterosclerose subclínica		P
	Não	Sim	
PCR-us 1^a (mg/dl)	n=51	n=186	0,469*
média (DP)	4,7 (4,9)	5,6 (17,8)	
mediana (mín;max)	2 (0,2;18,2)	2,2 (0,1;205)	
PCR-us 2^a (mg/dl)	n=51	n=183	0,762*
média (DP)	3,7 (3,9)	4,6 (9,2)	
mediana (mín;max)	2 (0;15,5)	2,2 (0,07;110,2)	
Leptina (ng/ml)	n=46	n=174	0,898†
média (DP)	22,2 (17,3)	21,8 (19,1)	
mediana (mín;max)	16,6 (2,4;84,2)	15,5 (0,6;98,4)	
Adiponectina ((µg/ml)	n=51	n=181	0,537†
média (DP)	30,5 (30,6)	27,8 (26,9)	
mediana (mín;max)	17,8 (1;112,4)	19,8 (2,1;181,3)	
Resistina (ng/ml)	n=51	n=181	0,648*
média (DP)	11,1 (8,5)	11,7 (10,7)	
mediana (mín;max)	8,7 (1,4;43,2)	8,7 (0,9;62,2)	
TNF-α (pg/ml)	n=51	n=181	0,007†
média (DP)	4,8 (2,2)	5,9 (2,6)	
mediana (mín;max)	4,8 (0,8;10,3)	5,7 (1,6;21,7)	
LP-PLA2 (ng/ml)	n=51	n=181	0,955†
média (DP)	137,2 (57,7)	137,8 (56,4)	
mediana (mín;max)	128,6 (61,9;347,2)	125,2 (34,5;524,5)	
Microalb (mg/g)	n=50	n=184	0,025*
média (DP)	81,9 (318,4)	24 (66,4)	
mediana (mín;max)	13 (2,2;2200)	9,9 (0,2;806,3)	

DP = desvio padrão; Lp-PLA2 = fosfolipase A2 associada a lipoproteína; máx = máximo; Microalb = microalbuminúria; mín = mínimo; PCR-us = proteína C-reativa ultrasensível; TNF-α = fator de necrose tumoral alfa.

* Teste de Mann-Whitney. † Teste *t* de Student.

Pelas Tabelas 19 e 20 tem-se, respectivamente, que os polimorfismos e as expressões gênicas estudadas não apresentaram associação estatisticamente significativa com a presença de aterosclerose subclínica.

Tabela 19. Descrição da presença de aterosclerose segundo mutações genéticas dos pacientes e resultado dos testes de associação.

Aterosclerose subclínica				
	Não	Sim	Total	P
rs2383206, n (%)				
A/A	9 (17,6)	35 (19,3)	44 (18,9)	0,413*
A/G	28 (55,0)	81 (44,7)	109 (46,9)	
G/G	14 (27,4)	65 (36)	79 (34,1)	
Total	51 (100)	181 (100)	232 (100)	
rs10757274, n (%)				
A/A	10 (19,5)	55 (30,4)	65 (28,1)	0,216*
A/G	29 (57)	80 (44,2)	109 (46,9)	
G/G	12 (23,5)	46 (25,4)	58 (25)	
Total	51 (100)	181 (100)	232 (100)	
rs10757278, n (%)				
A/A	20 (40)	67 (37)	87 (37,6)	0,257*
A/G	22 (44)	65 (36)	87 (37,6)	
G/G	8 (16)	49 (27)	57 (24,7)	
Total	50 (100)	181 (100)	231 (100)	
PLA2G7 rs1051931, n (%)				
C/C	1 (2)	5 (2,8)	6 (2,6)	0,936†
C/T	19 (37)	69 (38,1)	88 (37,9)	
T/T	31 (61)	107 (59,1)	138 (59,4)	
Total	51 (100)	181 (100,0)	232 (100,0)	
PLA2G7 rs16874954, n (%)				
G/G	51 (100)	177 (98)	228 (98,3)	0,579‡
G/T	0 (0)	4 (2)	4 (1,7)	
T/T	51 (100)	181 (100)	232 (100)	
Total				
TNFα rs1799724, n (%)				
C/C	41 (82)	143 (79)	184 (79,7)	0,855†
C/T	8 (16)	35 (19,3)	43 (18,6)	
T/T	1 (2)	3 (1,7)	4 (1,7)	
Total	50 (100)	181 (100)	231 (100)	

PLA2G7 = mRNA do gene da Lp-PLA2; TNF-α = fator de necrose tumoral alfa.

* Teste qui-quadrado. † Teste exato de Fischer. ‡ Teste da razão de verossimilhanças.

Tabela 20. Descrição da presença de aterosclerose segundo expressões gênicas dos pacientes e resultado dos testes de associação.

	Aterosclerose subclínica		P
	Sim	Não	
PLA2G7 (2-ΔCT)	n=47	n=164	
média (DP)	0,014 (0,014)	0,015 (0,014)	0,644*
mediana (mín;máx)	0,008 (0,001;0,064)	0,011 (0,001;0,073)	
TNF (2-ΔCT)	n=47	n=166	
média (DP)	0,011 (0,006)	0,015 (0,018)	0,110*
mediana (mín;máx)	0,001 (0,003;0,028)	0,010 (0,003;0,138)	
LEP (2-ΔCT)	n=44	n=159	
média (DP)	0 (0)	0 (0)	0,743*
mediana (mín;máx)	0 (0;0,001)	0 (0;0,001)	
LEPR (2-ΔCT)	n=47	n=166	
média (DP)	0,009 (0,020)	0,015 (0,059)	0,455*
mediana (mín;máx)	0,003 (0;0,107)	0,003 (0;0,507)	

DP = desvio padrão; LEP = mRNA do gene da leptina; LEPR = mRNA do gene do receptor da leptina; máx = máximo; mín = mínimo; PLA2G7 = mRNA do gene da Lp-PLA2; TNF- α = fator de necrose tumoral alfa.

* Teste *t* de Student.

Os resultados da Tabela 21 demonstram que, após controle das variáveis que influenciaram a presença de aterosclerose subclínica, o grupo, no que se refere à situação de disglícemia, não teve influência estatisticamente significativa ($P = 0,554$). Pacientes mais velhos apresentaram maior chance de aterosclerose subclínica, e a cada ano de aumento da idade há aumento da chance de aterosclerose de 10%; aumento de 1 mg/dl de HDL-colesterol acarretou redução de 3% na chance de aterosclerose; aumento de 1 pg/ml de TNF- α acarretou aumento de 26% na chance de aterosclerose; e pacientes que fazem uso de estatina apresentaram chance de aterosclerose 3,81 vezes maior que aqueles que

não fazem uso de estatina, independentemente das demais características avaliadas nos pacientes.

Tabela 21. Resultado do modelo de regressão logística múltipla para explicar a presença de aterosclerose segundo as características avaliadas em pacientes diabéticos ou com alteração nos exames glicêmicos.

Variável	OR	IC (95%)		P
		Inferior	Superior	
Idade (anos)	1,10	1,04	1,15	< 0,001
HDL-c (mg/dl)	0,97	0,94	0,99	0,006
TNF- α (pg/ml)	1,21	1,01	1,46	0,041
Estatina	3,81	1,88	7,72	< 0,001

HDL-colesterol = colesterol de lipoproteína de alta densidade; IC = intervalo de confiança; OD = *odds ratio*; TNF- α = fator de necrose tumoral alfa.

Discussão

O presente estudo analisou indivíduos com indicação de TOTG, assintomáticos e sem doença aterosclerótica conhecida e demonstrou que a prevalência de aterosclerose subclínica avaliada por diferentes métodos foi de 77,1%. Apesar de ter havido tendência a maior prevalência de aterosclerose subclínica conforme a situação do perfil glicídico (73,8% no grupo controle, 77,5% no grupo glicemia de jejum alterada, 77,6% no grupo tolerância diminuída à glicose e 81,4% no grupo diabetes melito), a diferença entre os grupos não foi significativa. Vale ressaltar que este é o primeiro estudo que considera aterosclerose subclínica avaliada em conjunto por CAC, USG, TE e ITB, exames com moderada a alta sensibilidade para o diagnóstico de doença aterosclerótica em pacientes assintomáticos, o que pode aumentar a detecção de aterosclerose subclínica na população, em associação com o fato de que foram contemplados simultaneamente os territórios arteriais de carótidas, coronárias e de membros inferiores.

O CHS^{37, 66} também avaliou a presença de aterosclerose subclínica pelo conjunto de diferentes métodos. Nesse estudo foi considerada presença de aterosclerose subclínica se ao menos um dos critérios de positividade fosse encontrado para os seguintes exames: ITB $\leq 0,9$; EMI interna ou de carótida comum $>$ percentil 80; estenose carotídea $> 25\%$; anormalidades no eletrocardiograma pelos critérios de Minnesota¹⁷¹; e questionário de Rose

positivo para claudicação intermitente ou angina do peito^{66, 172}. No total, 5.197 indivíduos foram categorizados como normais, intolerantes à glicose (diagnosticados pelo TOTG com 75 g de dextrosol) ou diabéticos e foi encontrada prevalência de aterosclerose subclínica de 40,4%, 41,9% e 43,8%, respectivamente, com diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($P < 0,001$). A prevalência de aterosclerose subclínica total da população estudada foi de 37,2%³⁷, portanto bastante inferior à observada neste estudo.

A discordância entre os achados do presente estudo e do CHS provavelmente se deve, entre outras razões, à alta prevalência de diferentes fatores de risco associados em todos os grupos deste estudo. Apesar de o grupo controle ter apresentado menor prevalência estatisticamente significativa de síndrome metabólica, a frequência dos outros fatores de risco, quando analisados isoladamente, não se mostrou diferente entre os grupos; entretanto, a prevalência dessas comorbidades foi elevada, caracterizando, dessa forma, quadro metabólico de mais alto risco. Essa distribuição não ocorreu na população do CHS, no qual somente o grupo de diabetes melito tipo 2 apresentava maior frequência de fatores de risco. Como exemplo, pode-se citar a prevalência de hipertensão arterial. No CHS houve diferença na comparação entre os grupos ($P < 0,001$), sendo a frequência de hipertensão arterial entre os grupos normal, tolerância diminuída à glicose e diabetes melito de 54,3%, 66,6% e 78,9%, respectivamente, enquanto no presente estudo não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos, sendo a frequência de hipertensão arterial encontrada de 65% no

grupo controle, 68,8% no grupo glicemia de jejum alterada, 77,6% no grupo tolerância diminuída à glicose e 72,9% no grupo diabetes melito.

Assim, uma das hipóteses para que não se observe diferença estatisticamente significativa entre os grupos é a de que as alterações iniciais do perfil glicídico contribuem de forma menos significativa que os demais fatores de risco cardiovascular para o desenvolvimento do processo aterosclerótico. Em metanálise recente foram incluídos 20.840 indivíduos com acompanhamento médio de 9,9 anos para a avaliação da incidência de eventos cardiovasculares fatais ou não-fatais, e a conclusão foi de que a adição da HbA1c a modelos clínicos de estratificação de risco promoveu pequeno benefício na predição do risco cardiovascular¹⁷³.

O tempo de evolução entre os estados pré-DM2 e DM2 recém-diagnosticado é variável, mas pode ser curto, diferentemente do processo aterosclerótico, que é insidioso. Essa diferença com relação ao delta de tempo evolutivo pode ter dificultado a observação de qualquer diferença com relação à prevalência de aterosclerose subclínica entre os grupos.

Vale ressaltar, também, que na análise geral de aterosclerose subclínica no CHS, diferentemente do presente estudo, foram incluídos pacientes diabéticos de longa data e diabéticos recém-diagnosticados pelo TOTG. Em subanálise da população diabética do CHS, considerando-se o tempo de diagnóstico, observou-se que pacientes com DM2 prévio apresentavam maior prevalência de doença cardiovascular manifesta que os pacientes com DM2 recém-diagnosticado, com significância estatística. Entretanto, a prevalência de aterosclerose subclínica entre os grupos era

semelhante (74% no grupo DM2 prévio e 73% no grupo DM2 recém-diagnosticado). Interessante foi o achado de que a incidência de doença cardiovascular manifesta aumentava nos pacientes com DM2 prévio, independentemente da presença de aterosclerose subclínica, enquanto nos pacientes com DM2 recém-diagnosticado essa incidência aumentava em paralelo à presença de aterosclerose subclínica [*odds ratio* (OR) 2; intervalo de confiança (IC) 1,4-2,9]³⁷.

Visto que diversos estudos na literatura se basearam somente em um dos métodos diagnósticos de aterosclerose subclínica, cada um dos exames utilizados no presente estudo será discutido de forma isolada.

9.1 Escore de cálcio coronário

Foram três os principais estudos que avaliaram o CAC na população com DM2 prévio.

Meigs et al⁵¹, em subestudo do *The Framingham Offspring Study*, no qual foram incluídos 325 indivíduos, mostraram que os portadores de DM2 prévio, em comparação aos controles, apresentavam maior tendência (OR 1,79; IC 0,81-3,98) à presença de aterosclerose subclínica pelo CAC. Quanto aos portadores de diabetes manifesta, apresentavam ainda mais calcificação coronária (OR 3,04; IC 1,41-6,57). Entretanto, esse achado só foi significativo para os pacientes com DM2 prévio (OR 6,01; IC 1,43-25,2), e não para os pacientes com DM2 recém-diagnosticado (OR 2,07; IC 0,77-5,51). O achado de que a aterosclerose subclínica não foi diferente no grupo

diabete melito recém-diagnosticado, em comparação aos controles, foi semelhante ao deste estudo.

Diferentemente do observado neste estudo, Moebus et al⁵⁰ mostraram, em 2.184 indivíduos, maior prevalência de CAC > 0 (75%) em portadores de glicemia de jejum alterada (glicemia de jejum $\geq$ 108 mg/dl, mas < 126 mg/dl) quando comparados a indivíduos normais (glicemia de jejum < 108 mg/dl), que foi de 60%. Nesse estudo, a relação deixou de ser estatisticamente significativa após ajuste para outros fatores de risco em mulheres (OR 1,26; IC 0,93-1,70), mas se manteve estatisticamente significativa para os homens (OR 1,63; IC 1,12-2,36).

Também discordante deste estudo, o estudo de Nasir et al⁵², realizado em população brasileira composta por 458 homens assintomáticos encaminhados para exame cardiológico de rotina, mostrou que a prevalência de CAC > 0 era menor nos indivíduos com glicemia de jejum normal (66-93 mg/dl) em comparação aos indivíduos com níveis mais altos de glicemia (94-125 mg/dl) (35% vs. 62%; $P < 0,0001$). Essa associação se manteve estatisticamente significativa após ajuste para outros fatores de risco (OR 1,78; IC 1,05-3; $P = 0,03$).

Neste estudo, a frequência de aterosclerose subclínica pelo CAC encontrada na população total de exames considerados positivos ou diferentes de zero foi de 50%. O grupo controle apresentou prevalência de CAC positivo de 47,5%, inferior à encontrada por Moebus et al⁵⁰, que foi de 60%. Também no estudo de Meigs et al⁵¹, 70% dos pacientes sem alterações da glicemia apresentaram CAC acima do primeiro quartil

(CAC > 0,8). O grupo glicemia de jejum alterada neste estudo apresentou prevalência de CAC positivo de 51,3%, enquanto o grupo tolerância diminuída à glicose apresentou 50%. Essas prevalências são bastante inferiores às encontradas no estudo de Moebus et al⁵⁰, que apresentou CAC positivo em 75% dos portadores de glicemia de jejum alterada, e no estudo de Meigs et al⁵¹, no qual portadores de glicemia de jejum alterada e tolerância diminuída à glicose foram avaliados em conjunto e apresentaram 89,7% de CAC acima do primeiro quartil (CAC > 0,8). Entretanto, no estudo realizado por Nasir et al⁵² foi encontrada prevalência de CAC diferente de zero de 35,5% no grupo com glicemia de jejum na faixa normal e de 62% nos portadores de glicemia de jejum alterada (neste caso considerada glicemia de jejum entre 94 mg/dl e 125 mg/dl). O grupo diabetes melito apresentou CAC positivo em 52,5% dos casos. Essa população de diabéticos diagnosticados pelo TOTG foi avaliada somente no estudo de Meigs et al⁵¹, que encontrou 96,4% dos indivíduos acima do primeiro quartil de CAC.

Assim, concluímos que, em geral, as prevalências de aterosclerose subclínica diagnosticadas pelo CAC encontradas neste estudo foram inferiores às observadas na literatura, com exceção do grupo controle do estudo brasileiro, no qual a população era mais jovem e tinha menor frequência de outros fatores de risco cardiovascular que a população avaliada neste estudo. A população do presente estudo apresentou alta prevalência de outros fatores de risco cardiovascular, tais como dislipidemias (77,4%) e hipertensão arterial (70,9%), e recebeu tratamento

medicamentoso e acompanhamento em hospital terciário especializado em cardiologia para o controle desses fatores de risco durante, em média, 4,3 anos, para todos os grupos, o que pode ter contribuído para o menor desenvolvimento de calcificações coronárias nessa população. A frequência de uso de hipolipemiantes e anti-hipertensivos na população do presente estudo foi de 68,2% e 72,6%, respectivamente, enquanto no estudo de Moebus et al⁵⁰ somente 27% dos pacientes utilizavam anti-hipertensivos e 7,37%, hipolipemiantes.

9.2 Ultrassonografia *Doppler* de carótidas

Com relação ao Doppler de carótidas, no presente estudo a EMI e a presença de placas carotídeas foram avaliadas de forma categórica, considerando-se o percentil 75 para idade e sexo com o intuito de compor a variável aterosclerose subclínica. A EMI foi também avaliada de forma numérica, incluindo as medidas individuais de cada um dos lados, a média composta dessas medidas e também a medida máxima encontrada entre os dois lados, para possibilitar comparações com outros estudos. Em nenhuma das análises realizadas houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

Na amostra estudada, a USG foi o exame mais sensível para a detecção de aterosclerose subclínica, sendo a EMI responsável por grande parte dos diagnósticos de aterosclerose subclínica carotídea (63,1%);

entretanto, a frequência de placas ateroscleróticas não-oclusivas também foi alta (40,8%).

A USG foi avaliada em diversos estudos como marcador de risco para eventos cardiovasculares, inclusive em portadores de diabetes^{174, 175}.

Em estudo transversal incluindo 1.257 homens, Salonen et al¹⁷⁶ mostraram que a cada 0,1 mm de aumento da EMI de carótida comum o risco de infarto agudo do miocárdio aumentou em 11%.

Alguns estudos com Doppler de carótidas mostraram que a EMI é maior em indivíduos com tolerância diminuída à glicose que em normais, sugerindo que a aterosclerose já esteja progredindo nessa população^{177,178}. Folsom et al⁶² mostraram que há incremento da EMI de acordo com a situação do perfil glicídico. Assim, indivíduos com intolerância à glicose possuem, em média, EMI 0,02 mm maior que indivíduos normais, e portadores de diabetes melito têm EMI em média 0,07 mm acima daqueles com intolerância à glicose⁶². Em metanálise conduzida por Brohall et al¹⁷⁹ foram avaliados 24.111 indivíduos, incluindo 4.019 diabéticos e 1.110 com intolerância à glicose, em que se observou que, comparativamente ao grupo controle, o grupo DM2 apresentou EMI aumentada em 0,13 mm (0,12-0,14 mm) e o grupo com intolerância à glicose, em 0,04 mm (0,014-0,071 mm). Na sequência são apresentados alguns dos estudos incluídos nessa metanálise. Alguns estudos mais recentes (Tabela 22) serão analisados e os dados serão confrontados com os deste estudo.

Tabela 22. Características dos estudos.

Referência	Sujeitos (n)	Grupos	Média composta EMI	Conclusão do estudo
Wagenknecht et al ¹⁷⁸	1625	Tolerância normal à glicose Tolerância diminuída a glicose Diabete Melito recém diagnosticado Diabete Melito prévio	0,777 ± 0,188 0,827 ± 0,205 0,858 ± 0,210 0,890 ± 0,274	Diferença estatisticamente significativa da média composta do EMI somente entre os grupos Diabete Melito recém diagnosticado e Diabete Melito prévio.
Bonora et al ⁶³	114	Normais Diabéticos	1,19 ± 0,15 1,44 ± 0,15	A média composta da espessura médio intimal de carótidas foi maior nos diabéticos que nos normais (p < 0,001).
Temelkova-Kurktschiev et al ¹⁸²	142	Normais Diabéticos	0,85 ± 0,02 0,98 ± 0,03	Maiores medidas no grupo Diabete Melito (p < 0,001).
Pankow et al ¹⁸⁰	6888	Normais Glicemia de jejum alterada Tolerância diminuída a glicose Glicemia de jejum alterada e Tolerância diminuída a glicose	0,76 ± 0,005 0,781 ± 0,007 0,779 ± 0,008 0,802 ± 0,008	Não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos (p = 0,85).
Referência	Sujeitos (n)	Grupos	EMI máximo	Conclusão do estudo
Haffner et al ⁶⁴	1421	Normais Diabéticos	0,806 ± 0,006 0,859 ± 0,009	A EMI máxima foi maior no grupo diabetes com significância estatística (p < 0,001).
Theodora et al ¹⁸²	142	Normais Diabéticos	0,99 ± 0,03 1,10 ± 0,03	Maiores medidas no grupo Diabete Melito (p < 0,015).
Parildar et al ¹⁸¹	186	Normais Pré-diabéticos (GJA e IG)	0,62 ± 0,16 0,75 ± 0,19	Os valores para a EMI direita, esquerda e máxima foram maiores no grupo pré diabetes (p < 0,001).
Referência	Sujeitos (n)	Grupos	EMI à esquerda	Conclusão do estudo
Parildar et al ¹⁸¹	186	Normais Pré-diabéticos (GJA e IG)	0,62 ± 0,16 0,78 ± 0,23	Os valores para a EMI direita, esquerda e máxima foram maiores no grupo pré diabetes (p < 0,001).
Referência	Sujeitos (n)	Grupos	EMI à direita	Conclusão do estudo
Parildar et al ¹⁸¹	186	Normais Pré-diabéticos (GJA e IG)	0,63 ± 0,14 0,73 ± 0,18	Os valores para a EMI direita, esquerda e máxima foram maiores no grupo pré diabetes (p < 0,001).

Continuar

Continuação				
Referência	Sujeitos (n)	Grupos	% placa carotídea	Conclusão do estudo
Pankow et al ¹⁸⁰	6.888	Normais	35,4	Não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos (p = 0,40).
		Glicemia de jejum alterada	39,2	
		Tolerância diminuída a glicose	37	
		Glicemia de jejum alterada e Tolerância diminuída a glicose	35,9	

EMI = espessura médio-intimal carotídea.

Apenas dois dos estudos apresentados não encontraram diferença estatisticamente significativa entre a EMI dos grupos normais em comparação à dos que apresentavam alguma alteração do perfil glicídico, semelhante aos resultados deste estudo. Nesses dois estudos os valores das médias compostas da EMI foram bastante aproximados às medidas encontradas neste estudo, assim como a frequência de placas carotídeas observadas no estudo ARIC¹⁸⁰. Pankow et al¹⁸⁰, no estudo ARIC, não encontraram diferença estatisticamente significativa tanto na EMI como na frequência de placas carotídeas de acordo com as alterações do perfil glicídico. Nesse mesmo estudo foram avaliadas a mortalidade por todas as causas e a incidência de doença arterial coronária em período de 6,3 anos, e esses parâmetros também não diferiram entre os grupos. No IRAS, Wagenknecht et al¹⁷⁸ observaram tendência de piora dos fatores de risco cardiovascular pelo espectro das alterações de glicemia, acompanhada por discreto aumento da EMI. Foi observada diferença estatisticamente significativa da média composta da EMI somente entre os grupos DM2 recém-diagnosticado e DM2 prévio, existindo entre os demais grupos

tendência que foi atenuada na análise, quando foram excluídos os fatores de confusão.

No presente estudo, a média composta encontrada para os grupos controle e diabetes melito foi, respectivamente, de $0,73 \pm 0,15$ mm e $0,79 \pm 0,19$ mm e para EMI máxima, de $0,78 \pm 0,18$ mm e $0,85 \pm 0,27$ mm. Somente no estudo de Parildar et al¹⁸¹ os valores encontrados para as EMIs direita, esquerda e máxima foram menores que os do presente estudo. No estudo de Parildar houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos controle e os estados pré-diabéticos ($P < 0,001$)¹⁸¹, diferentemente do observado neste estudo. Na comparação da frequência de fatores de risco e medicações utilizadas, observa-se que o presente estudo incluiu indivíduos mais dislipidêmicos e hipertensos que o estudo de Parildar et al¹⁸¹, o que pode justificar os maiores valores de EMI encontrados no presente estudo. Paralelamente, observa-se que no estudo de Parildar et al¹⁸¹ o grupo pré-DM2 apresentou com maior frequência, com significância estatística, diagnósticos de dislipidemias e hipertensão arterial e maior necessidade de uso de estatinas e anti-hipertensivos quando comparado aos normais, o que pode justificar a diferença encontrada nos valores de EMI¹⁸¹. Esse cenário é divergente do encontrado no presente estudo, no qual todos os grupos apresentavam alta frequência de fatores de risco e uso de medicações preventivas.

Nos demais estudos foram encontrados valores de EMI pelas duas análises, média composta e valor máximo, superiores aos deste estudo (Tabela 22). Em nenhum desses estudos as características clínicas dos

pacientes e as medicações utilizadas são descritas de forma clara para que sejam comparadas às dos pacientes deste estudo, o que torna difícil a discussão dessas discordâncias. Entretanto, com relação aos estudos de Bonora et al⁶³ e Haffner et al⁶⁴, pode-se sugerir que a diferença na EMI pode ser decorrente do tempo de exposição ao diabetes, enquanto no estudo de Temelkova-Kurktschiev et al¹⁸² pequena parcela de pacientes (10 em cada grupo) já havia apresentado doença aterosclerótica manifesta, caracterizando indivíduos de maior risco cardiovascular, o que pode ter superestimado as medidas.

Fator que deve ser citado é a alta frequência de uso de estatinas associada a longo tempo de tratamento (média de 4,3 anos) encontrado neste estudo, o que pode ter acarretado EMIs inferiores às encontradas na literatura se os achados de estudos com essas medicações forem extrapolados: *LIPID Atherosclerosis Substudy*, no qual o uso de pravastatina foi associado à diminuição da progressão da doença carotídea em pacientes com antecedentes de doença coronária prévia no período de 4 anos¹⁸³; *METEOR*, no qual o uso de rosuvastatina comparado ao placebo, no período de 2 anos, acarretou regressão da EMI máxima em indivíduos com escore de risco de Framingham < 10%¹⁸⁴; e *ASAP*, no qual também foi observada regressão da EMI em portadores de hipercolesterolemia familiar submetidos a tratamento com doses altas de atorvastatina no período de dois anos¹⁸⁵.

9.3 Teste ergométrico

Na avaliação do TE não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos quanto à frequência de exames positivos, sendo o TE capaz de detectar aterosclerose subclínica em somente 20,4% da população. Dentre os parâmetros do TE analisados, o mais importante é a capacidade funcional, considerada marcador prognóstico de risco independente para doença cardiovascular e mortalidade por todas as causas em pacientes assintomáticos¹⁸⁶. Em estudo de Pierre-Louis et al¹⁸⁷ foi avaliada a relação entre capacidade funcional, calculada pela relação entre os METs atingidos e os METs preditos para idade e sexo, e eventos cardiovasculares maiores em amostra composta por 490 indivíduos não-diabéticos e 404 diabéticos sem doença aterosclerótica conhecida. Foi demonstrado que a baixa capacidade funcional (METs atingidos < 85% do predito) estava associada a maior risco de infarto agudo do miocárdio, AVC e morte nos dois grupos. Ponto interessante desse estudo foi que os indivíduos não-diabéticos com baixa capacidade funcional apresentaram o mesmo risco de eventos cardiovasculares maiores que os indivíduos diabéticos com capacidade funcional normal. Hage et al¹⁸⁸ mostraram que pacientes diabéticos apresentaram prevalência de isquemia silenciosa avaliada pelo TE semelhante à de indivíduos normais, além de apresentarem menor capacidade funcional ($8 \pm 3,1$ METs vs. $8,9 \pm 2,7$ METs; $P < 0,001$).

Neste estudo foram observados resultados concordantes, visto que também não houve diferença entre os grupos com relação à isquemia e à capacidade funcional encontradas para os grupos controle e diabetes melito, respectivamente de $8,2 \pm 4,9$ METs e $7,2 \pm 5$ METs, bastante próximos aos encontrados no estudo de Hage et al¹⁸⁸.

Outro parâmetro do TE avaliado neste estudo foi o escore de Duke, validado como importante preditor de mortalidade cardiovascular¹⁸⁹. Em estudo que incluiu 100 diabéticos e 202 controles, Lakkireddy et al¹⁹⁰ mostraram que o escore de Duke foi capaz de prever o risco de eventos cardiovasculares maiores igualmente nos controles e diabéticos. Nesse estudo, o escore de Duke encontrado para os controles foi de $3,82 \pm 6,44$ e para diabéticos, de $-0,42 \pm 8,02$, com diferença estatística entre os grupos ($P < 0,001$). Neste estudo, os valores encontrados, apesar de semelhantes entre os grupos, são mais altos, indicando população de menor risco cardiovascular. Esse fato provavelmente está relacionado à forma de seleção dos pacientes, visto que, no estudo de Lakkireddy et al¹⁹⁰, 76% dos diabéticos e 70,8% dos normais tiveram o sintoma de dor torácica como indicação para o TE, diferentemente de nossa população, em que todos os indivíduos eram assintomáticos.

9.4 Índice tornozelo-braquial

A sensibilidade e a especificidade do ITB foram avaliadas em revisão conduzida por Dachun et al¹⁹¹, na qual foram encontrados valores de 83,3%

e 99% e de 72,1% e 89,2%, respectivamente, para o ITB $\leq 0,9$ em detectar lesões estenóticas $\geq 50\%$. Entretanto, a sensibilidade entre os estudos foi bastante variável, tendo sido descritos valores de 15% a 79%¹⁹¹. Particularmente em diabéticos esses valores foram baixos, o que pode ser explicado pela possível presença de calcificação arterial, acarretando maior rigidez arterial e, conseqüentemente, maior ITB. Parameswaran et al¹⁹² encontraram sensibilidade de 63% e especificidade de 97%, entretanto grande parte dos pacientes já tinha diagnóstico de doença aterosclerótica em outros territórios, sendo considerados de alto risco cardiovascular. Takahashi et al¹⁹³ avaliaram 119 pacientes internados em hospital geral por causas variadas e encontraram 18,5% de prevalência de ITB $\leq 0,9$. No CHS, 16,15% dos indivíduos em prevenção primária avaliados para presença de aterosclerose subclínica apresentaram ITB $\leq 0,9$ ⁶⁶. Apesar de esses valores serem superiores aos encontrados neste estudo, no qual somente 0,6% dos pacientes apresentou ITB $\leq 0,9$, pode-se concluir que a sensibilidade do ITB é bastante variável de acordo com a população analisada e que seu valor como diagnóstico de aterosclerose subclínica é questionável.

A indicação de pesquisar aterosclerose subclínica e isquemia em indivíduos assintomáticos é bastante controversa em diabéticos e não-diabéticos. A ADA não recomenda o *screening* para doenças cardiovasculares em diabéticos assintomáticos, pois uma vez que os fatores de risco cardiovascular estejam adequadamente controlados a detecção de aterosclerose subclínica não auxilia na prevenção de desfechos cardiovasculares maiores¹⁴⁹. Em 2006, Naghavi et al¹⁹⁴ publicaram o estudo

SHAPE, baseado no fato de que a maior parte dos infartos agudos do miocárdio e dos AVCs ocorre em indivíduos classificados como de risco baixo ou intermediário pelos escores que envolvem os fatores de risco tradicionais, como o escore de Framingham¹⁹⁵. Nesse documento, a pesquisa de aterosclerose subclínica por meio de CAC e USG é indicada a todos os homens com > 45 anos de idade e todas as mulheres com > 55 anos de idade que não sejam classificados como de baixo risco ou tenham > 75 anos de idade. Em 2010, a *American Heart Association* publicou diretrizes para a avaliação do risco cardiovascular em indivíduos assintomáticos. Nessa publicação, a indicação de realização de USG, CAC e ITB foi considerada razoável em indivíduos de risco intermediário pelo escore de *Framingham* (Classe IIa), enquanto a indicação de CAC para indivíduos de risco baixo a intermediário (6-10%) e TE para indivíduos de risco intermediário foi considerada possivelmente razoável (Classe IIb). Para indivíduos diabéticos com > 40 anos de idade a avaliação do CAC foi considerada razoável (Classe IIa)⁶⁹.

Diante da falta de consenso sobre a indicação da pesquisa de aterosclerose subclínica, podemos trazer essa discussão para os achados deste estudo. É indicada a pesquisa de aterosclerose subclínica em todos os indivíduos com indicação para realização de TOTG? Seguem abaixo alguns pontos a serem considerados.

Aproximadamente 40-60% dos eventos cardiovasculares maiores ocorrem como primeira manifestação da doença aterosclerótica¹⁹⁶. Sabe-se que os escores de risco têm acurácia questionável na identificação dos

indivíduos com maior risco cardiovascular. Por exemplo, o escore de risco de *Framingham* classifica 60% a 70% dos indivíduos que sofrem um evento cardiovascular previamente ao evento como de riscos baixo e médio¹⁹⁵. Assim, o incremento desses escores de risco pela detecção de aterosclerose subclínica pode ser interessante.

A recomendação da ADA de não pesquisar doenças cardiovasculares em diabéticos assintomáticos passa a ser questionada. Shah¹⁹⁷ aponta algumas vantagens na detecção de aterosclerose subclínica que podem ser extrapoladas para a população deste estudo, a saber:

- Nos escores de risco são medidos fatores de risco que têm relação modesta com a presença de placas ateroscleróticas, enquanto na pesquisa de aterosclerose subclínica a doença em si é detectada.
- O tratamento com estatinas reduz entre 30% e 50% o risco cardiovascular, restando razoável risco residual.
- A ausência de aterosclerose subclínica detectada pelo CAC indica ausência de aterosclerose significativa, mas principalmente sinaliza indivíduos de risco cardiovascular extremamente baixo em 5 anos a 10 anos com taxas de eventos que variam de 0 a 0,6% ao ano¹⁹⁸. Esse dado é reprodutível também nos indivíduos com DM2, nos quais a sobrevida após 5 anos associada a CAC = 0 foi de 98,8%, semelhante à de indivíduos não-diabéticos, que foi de 99,4%¹⁹⁹. Essa população de baixo risco corresponde a 40-50% de coortes de indivíduos assintomáticos²⁰⁰, que provavelmente

não se beneficiariam de tratamento medicamentoso agressivo e poderiam ser mantidos somente com medidas adequadas de estilo de vida.

- Tanto a adequação do estilo de vida mais saudável quanto o uso crônico de medicamentos são desafios. A identificação da doença em si pode auxiliar na adesão inicial e na manutenção do tratamento não-medicamentoso e medicamentoso a longo prazo. Estudos demonstram que a identificação de cálcio coronário é associada a importantes medidas para a redução do risco cardiovascular a curto e longo prazos^{201, 202}.

Outro ponto a favor da pesquisa de aterosclerose subclínica é que esta pode identificar a presença de alta carga aterosclerótica, o que pode indicar a necessidade de exames como a cintilografia ou a cineangiografia coronária ou de carótidas, que definirão a eventual necessidade de tratamento *in situ*.

Alguns argumentos contra a pesquisa de aterosclerose subclínica são a disponibilidade dos métodos, a radiação do CAC e o alto custo da indicação de um ou mais métodos. A USG passa a ser uma melhor opção, considerando que é de fácil realização e acesso e não utiliza radiação. Com relação ao custo, não é possível no momento avaliar qual o impacto econômico de indicar ou não a pesquisa de aterosclerose subclínica nessa população com indicação de TOTG e nem o melhor método, visto que, para isso, deveríamos realizar análise de eventos dessa população após um tempo razoável da inclusão, como 5 anos, e posteriormente estudo

farmacoeconômico deveria ser conduzido, visto que o impacto econômico de medidas preventivas não pode ser avaliado em estudo transversal.

Outro ponto a ser discutido é com relação à sequência dos métodos de diagnóstico de aterosclerose subclínica. Newman et al²⁰³ descreveram que a USG e o CAC predizem o risco de doenças cardiovasculares de forma similar, entretanto a USG foi melhor para avaliar o risco de AVC²⁰³. Por outro lado, Folsom et al²⁰⁴, no estudo MESA, mostraram que o CAC foi melhor preditor de eventos cardiovasculares que a USG. Shah¹⁹⁷ concluiu que, apesar de o CAC ser uma ferramenta diagnóstica relativamente melhor que a USG, é razoável a indicação desta última como exame inicial para pesquisa de aterosclerose subclínica em decorrência da segurança e da ausência de radiação do método. Se a EMI estiver aumentada ou se existirem placas ateroscleróticas, nenhuma investigação de aterosclerose subclínica a mais se faz necessária; mas, se o exame for normal o CAC é indicado, visto que alguns pacientes podem ter somente aterosclerose coronária¹⁹⁷.

Segundo dados deste estudo, a USG mostrou-se como o método mais sensível para o início da pesquisa de aterosclerose subclínica. Uma sugestão para esse achado é que provavelmente a USG detecta doença aterosclerótica em fase de formação, ou seja, mais precocemente que o CAC, que indica a ocorrência de processo de cicatrização.

9.5 Biomarcadores de aterosclerose

Diversos estudos relacionaram biomarcadores e risco cardiovascular tanto em indivíduos saudáveis como naqueles com doença arterial coronária. Dentre os biomarcadores, os de inflamação receberam especial atenção, particularmente a PCR-us, a Lp-PLA2 e o TNF- α .

A PCR-us, em diversos estudos, foi associada à incidência de infarto agudo do miocárdio, AVC e morte cardiovascular, mesmo após ajuste para os fatores de risco tradicionais¹⁰⁰. Foi associada também ao aumento do risco de desenvolvimento de outros fatores de risco tradicionais, tais como diabetes, obesidade e hipertensão^{99, 205, 206}. A Lp-PLA2 também foi associada à doença cardiovascular (OR 1,6; IC 1,36-1,89)⁹⁶. Diversos estudos avaliaram se a Lp-PLA2 melhora a estratificação de risco além dos fatores de risco tradicionais. Tanto no ARIC²⁰⁷ como no *Rancho Bernardo Study*⁹⁶ a Lp-PLA2 foi associada a incremento estatisticamente significativa da área sob a curva, embora esse incremento tenha sido modesto (de 0,774 para 0,780 no ARIC e de 0,595 para 0,617 no *Rancho Bernardo Study*). Não foram encontrados estudos que relacionassem a Lp-PLA2 ao DM2. Neste estudo não houve diferença estatisticamente significativa com relação à presença de aterosclerose subclínica para ambos os marcadores; entretanto, com relação ao perfil glicídico a PCR-us foi semelhante entre os grupos: o grupo controle apresentou maior Lp-PLA2 quando comparado aos grupos glicemia de jejum alterada e tolerância diminuída à glicose, e o grupo

diabete melito apresentou maior Lp-PLA2 quando comparado ao grupo glicemia de jejum alterada.

O TNF- α é uma citocina com participação no processo inflamatório que faz parte do desenvolvimento da aterosclerose²⁰⁸, além de estar implicada no desenvolvimento de desordens metabólicas, tais como obesidade e resistência insulínica²⁰⁹. Neste estudo, o grupo controle apresentou menor TNF- α quando comparado aos grupos glicemia de jejum alterada e tolerância diminuída à glicose, e o grupo aterosclerose subclínica positiva apresentou maiores valores de TNF- α , ambos os dados em concordância com a literatura.

Van Dielen et al²¹⁰ mostraram forte correlação entre aumento de leptina e risco de obesidade, DM2, resistência insulínica, síndrome metabólica e inflamação. Estudos epidemiológicos evidenciaram que a adiponectina está reduzida em indivíduos com doença cardiovascular e DM2²¹¹, e que baixas concentrações estão fortemente associadas à resistência insulínica²¹². Neste estudo não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos pelo perfil glicídico e pela presença de aterosclerose subclínica para os dois parâmetros, diferentemente do exposto na literatura.

A resistina participa da regulação de energia, glicose e homeostase lipídica²¹³ e, em alguns estudos, seu aumento foi associado a maior chance de resistência insulínica, DM2 e doenças cardiovasculares²¹⁴. Neste estudo os grupos controle e diabete melito apresentaram menor resistina quando

comparados aos grupos glicemia de jejum alterada e tolerância diminuída a glicose.

Metanálise que incluiu 26 estudos e 169.949 indivíduos, após ajuste para fatores de risco tradicionais, encontrou que a presença de microalbuminúria estava associada a incremento de quase 50% do risco cardiovascular (OR 1,47; IC 1,3-1,66). Esse incremento do risco cardiovascular foi observado tanto em portadores de DM2 como em normais²¹⁵. Neste estudo, na análise univariada, o grupo diabetes melito apresentou maiores valores de microalbuminúria com relação aos demais grupos, em concordância com os dados da literatura. Os portadores de aterosclerose subclínica apresentaram menores valores em comparação aos indivíduos sem aterosclerose subclínica, o que discorda dos dados disponíveis.

Assim, é importante a elucidação do papel exato dos biomarcadores na resistência insulínica e sua associação com a doença cardiovascular para que esses biomarcadores sejam alternativas diagnósticas para o manejo de pacientes diabéticos na prática clínica.

9.6 Marcadores genéticos

Os estudos de associação ampla do genoma identificaram SNPs em genes localizados no 9p21, que estão associados a doença arterial coronária e a DM2¹³¹. Os alelos rs10757274 e rs2383206 foram avaliados em diversas coortes e em todas se associaram a maior risco de doença arterial coronária,

independentemente de fatores de confusão que incluíram idade, gênero, perfil lipídico, hipertensão arterial, DM2 e PCR-us, sugerindo que os efeitos desses alelos não são mediados por fatores de risco tradicionais^{216, 217}. Os mecanismos sugeridos para o maior risco de doença arterial coronária são desenvolvimento de placas ateroscleróticas, trombogênese ou maior tendência a ruptura da placa¹³¹. Dentre os 9.877 pacientes avaliados no estudo ARIC, as frequências encontradas para o alelo rs10757274 foram de 26,5% para AA, 49,6% para AA e 23,9% para GG. Em 17,4 anos de acompanhamento as razões de chance para eventos cardiovasculares maiores foram, respectivamente, de 1, 1,2 (IC 1,07-1,36) e 1,34 (IC 1,16-1,53)²¹⁸. O estudo ADVANCE²¹⁹ incluiu 3.496 pacientes de diferentes etnias e mostrou existir forte correlação em brancos/europeus entre os SNPs rs10757274, rs10757278 e rs2383206 e que esses se associaram à presença de aterosclerose subclínica, avaliada pelo CAC, e doença arterial coronária manifesta, sendo o G o alelo de maior risco. A interação entre esses SNPs e o metabolismo glicídico foi demonstrada no estudo de Doria et al²²⁰, no qual foi observado em indivíduos homozigóticos para o alelo GG OR de 1,99 (IC 1,17-3,41) para o desenvolvimento de doença arterial coronária em indivíduos com glicemia controlada e de 4,27 (IC 2,26-8,01) para os não-controlados. Neste estudo não foi encontrada associação entre os SNPs nem com as alterações do metabolismo glicídico nem com a presença de aterosclerose subclínica, provavelmente pelo baixo número de pacientes analisados.

Muitos estudos mostraram a relação de polimorfismos no gene PLA2G7 e a atividade da Lp-PLA2 em doenças cardiovasculares. Entretanto, os resultados desses estudos só serviram para ilustrar a complexidade genética do PLA2G7. Shah et al¹⁰² avaliaram, em metanálise, a relação entre 7 SNPs do PLA2G7 e níveis séricos de Lp-PLA2 atividade e doença cardiovascular e encontraram que o SNP rs1051931 foi o que apresentou associação mais forte com a Lp-PLA2 atividade, e que os portadores dos alelos VV apresentaram 7,2% mais atividade que os AA, entretanto o genótipo não foi fator de risco para doença arterial coronária (OR 1,03; IC 0,8-1,32) e eventos cardiovasculares (OR 0,98; IC 0,82-1,17). Em metanálise, Hou et al¹³⁷ analisaram os 3 SNPs do PLA2G7 em 14 estudos que incluíram 13.936 pacientes e concluíram que os SNPs rs1051931 e rs16874954 não se associaram a maior risco de doenças cardiovasculares (OR 0,99; IC 0,85-1,15 e OR 1,09; IC 0,88-1,35, respectivamente). Entretanto, sugeriram que novas análises dessa relação fossem feitas visto o baixo número de estudos disponíveis e seus potenciais vieses. Neste estudo também não foi encontrada relação entre esses polimorfismos e a presença de aterosclerose subclínica.

A inflamação faz parte da fisiopatologia da aterosclerose e a compreensão dos mecanismos genéticos envolvidos passa a ser importante com o intuito de estratificação de risco e programação de estratégias terapêuticas. Diversos genes foram associados ao processo inflamatório, entre eles o do TNF- α ²²¹. Polimorfismos do gene TNF- α foram associados a

doença cardiovascular^{222, 223} e a diabetes²²⁴, mas essas associações não foram observadas neste estudo.

A expressão do gene do TNF- α foi maior em pacientes pós-infarto agudo do miocárdio que em controles no estudo de Kempf et al²²⁵.

Com relação à expressão gênica, pouco se sabe da relação entre as expressões dos genes TNF- α , leptina, receptor da leptina e PLA2G7 e aterosclerose subclínica ou DM2. Neste estudo não foi observada diferença entre os grupos e com relação à presença de aterosclerose subclínica, entretanto foi observada diferença estatisticamente significativa com relação aos grupos de glicemia para a expressão do gene PLA2G7 (2- Δ CT) ($P = 0,012$), em que o grupo glicemia de jejum alterada apresentou maior PLA2G7 (2- Δ CT) quando comparado aos grupos controle e diabetes.

9.7 Fatores associados à presença de aterosclerose subclínica

Neste estudo alguns marcadores se associaram à presença de aterosclerose subclínica. Seria de se esperar que os portadores de aterosclerose subclínica possuísem mais fatores de risco que os não-ateroscleróticos; no entanto, apesar de os pacientes com aterosclerose subclínica apresentarem maior prevalência de hipertensão arterial e dislipidemias, esses fatores não se relacionaram de forma independente à aterosclerose subclínica. Na análise multivariada dos fatores que determinaram a presença de aterosclerose nessa população, somente a idade, o HDL-colesterol baixo, o aumento do TNF- α e o uso de estatinas

apresentaram diferença estatisticamente significativa após exclusão de fatores de confusão.

A idade como fator de risco foi avaliada em coorte com mais de 3,6 milhões de indivíduos, e após ajuste para fatores de risco tradicionais foi observado que cada década de vida foi associada a aproximadamente o dobro do risco de doenças cardiovasculares (OR por década de vida de 2,14, 1,8 e 2,33 para doença arterial periférica, estenose carotídea e aneurisma de aorta abdominal, respectivamente)²²⁶. Neste estudo, o aumento da idade também foi proporcional à prevalência de aterosclerose subclínica, e a cada ano de aumento da idade houve aumento da chance de aterosclerose de 10%.

Com relação ao HDL-colesterol, seus níveis séricos estão inversamente relacionados ao risco de doença arterial coronária. Young et al²²⁷ mostraram que a cada incremento de 1 mg/dl no HDL-colesterol ocorre diminuição de 2% a 3% do risco de eventos cardiovasculares. Esses dados concordam com os encontrados neste estudo, em que o aumento de 1 mg/dl de HDL-colesterol acarretou redução de 3% na chance de aterosclerose subclínica.

A relação entre aumento do TNF- α e risco cardiovascular já foi discutida em sessão anterior. Neste estudo observou-se que o aumento de 1 pg/ml de TNF- α acarretou aumento de 26% do risco de aterosclerose subclínica, em concordância com a literatura.

O uso de estatinas mostrou-se benéfico na prevenção do risco cardiovascular em diversos estudos de populações variadas²²⁸. Assim,

sugere-se que o incremento do risco de aterosclerose subclínica associado ao uso de estatinas, neste estudo, decorra, provavelmente, da indicação de terapia hipolipemiante a indivíduos de maior risco cardiovascular, com adição de outros fatores de risco, que, apesar de não apresentarem relação estatística independente significativa, atuam no processo aterosclerótico como um todo.

Neste estudo, os grupos classificados de acordo com o perfil glicídico e as variáveis metabólicas associadas ao metabolismo glicídico não impactaram no processo aterosclerótico. A hipótese de que as alterações do perfil glicídico contribuem de forma menos significativa que os demais fatores de risco cardiovascular para o desenvolvimento do processo aterosclerótico foi avaliada em recente metanálise. Nesse estudo foram incluídos 20.840 indivíduos com acompanhamento médio de 9,9 anos para a avaliação da incidência de eventos cardiovasculares fatais ou não-fatais, e a conclusão foi de que a adição da HbA1c a modelos clínicos de estratificação de risco promoveu somente pequeno benefício na predição do risco cardiovascular¹⁷³. Assim, podemos sugerir que o risco de aterosclerose subclínica associado a alterações do metabolismo glicídico é relacionado à presença dos fatores de risco tradicionais, como hipertensão arterial e dislipidemias.

Limitações

Este estudo apresenta algumas limitações importantes, por ser transversal e com amostra relativamente pequena.

Os pacientes incluídos tinham indicação de realização de TOTG, o que acarretou alta prevalência de outros fatores de risco cardiovascular e, conseqüentemente, do uso de medicações como estatinas e anti-hipertensivos. Tais medicamentos, além de possuírem efeitos pleiotrópicos e anti-inflamatórios com possível ação no processo aterosclerótico, impossibilitaram o cálculo de escores para estratificação de risco na maior parte dos indivíduos. Outra consequência da inclusão pela indicação do TOTG foi a não avaliação de diabéticos de longa data, grupo no qual a alteração da glicemia poderia ter maior efeito no desenvolvimento da aterosclerose subclínica.

Outro ponto a ser considerado é a opção pela avaliação da tolerância diminuída à glicose pelo TOTG realizado uma única vez, ao invés do *clamp* euglicêmico, opção essa condicionada à disponibilidade do método.

Implicações

A indicação de TOTG seleciona pacientes com maior risco cardiovascular e que, independentemente da presença de disglícemia, apresentam alta prevalência de aterosclerose subclínica diagnosticada por métodos associados. Assim, as alterações do metabolismo glicídico não influenciam de forma significativa o desenvolvimento da aterosclerose na presença dos demais fatores de risco cardiovascular; entretanto, estão associadas a perfil clínico de maior risco cardiovascular. Portanto, pacientes com indicação de TOTG podem ter também indicação de pesquisa de aterosclerose subclínica, com o principal intuito de adequação terapêutica para prevenção de doenças micro e macrovascular e de eventos cardiovasculares maiores.

Conclusões

Neste estudo, a prevalência de aterosclerose subclínica avaliada por meio de CAC, USG, TE e ITB em indivíduos normais e com glicemia de jejum alterada, tolerância diminuída à glicose e diabetes não foi significativamente diferente.

As condições do perfil glicídico não mostraram diferenças nas variáveis lipídicas, mas os grupos controle e diabetes melito apresentaram diferenças com relação a alguns biomarcadores na comparação com os demais grupos.

Os diversos polimorfismos dos genes relacionados na literatura à doença aterosclerótica e à inflamação não se mostraram diferentes de acordo com o perfil glicídico.

A expressão dos genes relacionados na literatura à inflamação e à resistência insulínica variou de acordo com o perfil glicídico apenas para PLA2G7 (2- Δ CT).

Neste estudo, houve associação entre idade, pressão arterial sistólica, taxas séricas de HDL-colesterol e de TNF- α , e uso de estatinas com a presença de aterosclerose subclínica nos portadores de disglucemia.

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

Projeto de pesquisa: "Aterosclerose subclínica e marcadores de inflamação, de resistência à insulina e genéticos em portadores de hiperglicemia".

Dados de Identificação do sujeito da pesquisa

NOME DO PACIENTE _____

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº _____ SEXO M ☐ F ☐

DATA DE NASCIMENTO ____/____/____

ENDEREÇO _____ Nº _____ APTO _____

BAIRRO _____ CIDADE _____

CEP _____ TELEFONE _____

OBJETIVO

Atualmente os estudos mostram que o aumento do açúcar no sangue em jejum aumenta a chance de problemas cardíacos, mesmo antes do aparecimento de diabetes. Assim, esta avaliação a que você está sendo convidado quer descobrir se você está com risco de diabetes e também se você já tem algum sinal de doença das artérias do coração que ainda não trouxe sintomas. O achado de cálcio nas artérias pela tomografia de coração, de alterações nos exames de ultra-som de carótidas, da avaliação do índice de pressão entre o tornozelo e o braço e a função endotelial, podem indicar que você já tem problemas nos vasos e que precisará de maior investigação e talvez algum tratamento para prevenir o aparecimento de doenças cardíacas.

As informações abaixo descrevem o protocolo do qual você irá participar como paciente, se concordar, assinando o termo de consentimento. Leia com atenção e faça qualquer pergunta que desejar. Uma via deste documento ficará em sua posse.

Continua

ANEXO A *continuação*

Este protocolo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia.

PROCEDIMENTOS DO ESTUDO

Após ler todo o presente termo de consentimento, e tirar dúvidas, o(a) senhor(a) caso queira participar deste estudo assinará o termo em duas vias, e levará uma cópia para casa.

Durante a primeira consulta, na visita 1, será perguntado a respeito de seus dados pessoais e referentes às doenças do coração que você possa ter, será feito exame físico, medida de peso e altura e da circunferência do abdome. Serão colhidos exames de sangue no jejum e 2 horas após ingestão de um líquido açucarado e será colhido material para estudo dos genes relacionados a doenças do coração..

Na visita 2, quinze dias após a visita 1, serão realizados os seguintes exames: tomografia computadorizada para calcular a quantidade de cálcio nas artérias coronárias, teste de esforço na esteira, nova coleta de sangue e medida da pressão nas pernas e nos braços para cálculo do índice tornozelo-braço.

Durante a visita 3 será realizado o ultra-som das carótidas que são as artérias do pescoço.

Na Visita 4, 15 dias após a visita 3, você será informado dos resultados e será encaminhado a ambulatório especializado para continuar seu tratamento.

Um pouco do sangue coletado durante o estudo será conservado e guardado, sendo utilizado para analisar os genes relacionados a diabetes e doenças do coração. Se o(a) senhor(a) concordar, seu sangue ficará guardado no laboratório, por, no máximo, 5 anos.

O(a) senhor(a) concorda que seu sangue seja guardado?

Sim, eu concordo () Não, eu não concordo () – mesmo que o(a) senhor(a) não concorde que parte do seu sangue seja armazenado, o(a) senhor(a) poderá participar do estudo.

RISCOS E DESCONFORTOS

Os riscos ou desconfortos envolvidos são: coleta de sangue podendo causar dor, hematoma (acúmulo de sangue embaixo da pele) ou raramente infecção na pele. Você poderá também sentir enjôo, sensação de desmaio quando você tomar o líquido açucarado.

continua

ANEXO A *continuação*

Os riscos da tomografia cardíaca são aqueles causados pela radiação. Os efeitos da radiação em longo prazo ainda estão em pesquisa, mas é muito usado para fazer os exames. A radiação durante o exame é pequena e dentro dos limites aceitos por órgãos internacionais. Não será necessário o uso de contraste.

O ultra-som doppler de carótidas e o cálculo do índice tomoeleito-braço não apresentarão nenhum risco a sua saúde.

O teste ergométrico é um exame em esteira rolante para avaliação de exercício físico. Para que se possa ter uma boa qualidade da monitorização pelo eletrocardiograma, a pele do peito onde serão colocados os eletrodos será preparada através de uma limpeza com gaze, álcool e uma lixa muito fina. Por este motivo você não deve tomar sol no peito durante cinco dias após o exame, para evitar queimaduras na pele. Você poderá sentir dor no peito, palpitação, falta de ar e cansaço, porém você terá acompanhamento por um médico durante todo o exame.

BENEFÍCIOS POTENCIAIS

O benefício do estudo poderá ser o melhor entendimento dos mecanismos que controlam o diabetes e, além disso, as informações encontradas durante o estudo poderão beneficiar outros pacientes com risco de diabetes.

ALTERNATIVAS À PARTICIPAÇÃO

Caso o(a) senhor(a) não queira participar deste estudo, receberá atendimento normal neste hospital não implicando em prejuízo do seu tratamento.

CONFIDENCIALIDADE

Se o(a) senhor(a) aceitar participar deste estudo, todos os seus registros médicos serão verificados pela equipe de pesquisa em busca de dados para o estudo. Assinando o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido o(a) senhor(a) está dando permissão para que isso seja feito. Sua identidade será mantida em segredo quando os resultados do estudo forem publicados, pois, o(a) senhor(a) está autorizando o seu dados a serem publicados em revistas, artigos e serem tema de debates e aulas. As informações encontradas durante o estudo serão armazenadas em um computador, mas seu nome não. Seu médico será informado de sua participação neste estudo.

continua

ANEXO A *continuação***NOVOS ACHADOS**

Você será informado sobre quaisquer novas informações importantes que se tornarem disponíveis durante o estudo que possam interferir no seu desejo de continuar participando.

PARTICIPAÇÃO VOLUNTÁRIA E CONSENTIMENTO

Sua participação neste estudo é voluntária. O(a) senhor(a) pode se recusar a participar ou pode desistir, a qualquer momento durante o estudo, sem ter que dar explicações. Isso não mudará a qualidade de atendimento que você estará recebendo muito menos em qualquer tipo de penalidade.

Os membros da equipe de pesquisa podem encerrar sua participação no programa de pesquisa após análise das razões pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Instituição. O motivo será explicado a você e pode ser devido a alguma alteração médica que pode colocá-lo em risco de outros problemas se continuar a participar, cancelamento do estudo pela coordenação do estudo, por você não cumprir as orientações dadas pela equipe de pesquisa ou outras questões administrativas. Caso isso venha a acontecer seu tratamento continuará sendo feito pelo seu médico.

TRATAMENTO MÉDICO/INDENIZAÇÃO

O seu tratamento regular no Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia será mantido normalmente e os custos não serão arcados pelo setor de Dislipidemias e de Biologia Molecular ou pelo Centro de Pesquisa. Os problemas relacionados a este estudo clínico são os de um tratamento comum, visto que os exames realizados são os mesmos que os pacientes diabéticos fazem normalmente no hospital.

Em caso de dúvida a respeito de danos relacionados à pesquisa durante o estudo entre em contato imediatamente com Dra Adriana Bertolami, telefone 5085-6047. O serviço de pronto-socorro do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia estará pronto a recebê-lo e tratá-lo em caso de intercorrências, também entrando em contato com o médico responsável pelo estudo caso necessário.

continua

ANEXO A *continuação*

Ao assinar este termo você não abre mão de nenhum direito legal.

SOLICITAÇÃO DE INFORMAÇÕES ADICIONAIS

A Investigadora, Dra Adriana Bertolami, tel 5085-6047 irá responder todas as dúvidas que o(a) senhor(a) possa ter sobre sua participação neste estudo. Em caso de dúvidas ou preocupações quanto aos seus direitos como participante deste estudo, o(a) senhor(a) pode entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia no tel 5085-6040. Uma cópia deste termo será entregue para você.

Li e compreendi este termo de consentimento e todas as minhas dúvidas foram resolvidas. Recebi explicações sobre o objetivo da pesquisa, os procedimentos de estudo a que serei submetido e os possíveis riscos e desconfortos e os benefícios que posso apresentar. As alternativas à minha participação neste estudo também foram discutidas. Portanto, concordo voluntariamente em fornecer meu consentimento para participar deste estudo clínico.

Nome do voluntário

Assinatura do voluntário

Data

Testemunha (se necessário)

Assinatura da testemunha

Data

Nome da pessoa que conduziu discussão do consentimento / Assinatura

Data

Uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido será fornecida para você pelo médico do estudo.

ANEXO B Fichas de Atendimentos

Ficha de atendimento – Protocolo: 3852

Aterosclerose subclínica e marcadores de inflamação, de resistência à insulina e genéticos em portadores de hiperglicemia

Visita nº 1

Nome: _____ Paciente nº _____

Data: ____/____/____ Registro _____

Data de nascimento: ____/____/____ Idade _____

Sexo: M () F () Menopausa: Pré-1 () Pós-2 ()

Cor: Branca () Parda () Negra () Amarela ()

Hábito de fumar: Nunca fumou () Parou de fumar () há qto tempo? _____

Fuma () Nº de cigarros/dia _____

Consome bebida alcoólica? Sim () Não () Ex ()

Até 7 doses/sem. () Mais de 7 doses/sem ()

Profissão: _____ Há exigência de esforço físico? Sim () Não ()

Exercício físico () Qual _____ x/semana _____

Antecedentes Pessoais:

DM () HAS () DLP () Hipotireoidismo () Obesidade ()

IAM/angina () AVC/AIT () AneuAo () IAPC ()

Antecedentes familiares:

DM () Obesidade () HAS () DAC () DLP ()

Medicações:

Fatores agravantes:

PCR () HVE () IRC () AF + DAC () SM ()

CAC () ITM () ITB () albuminúria ()

PA mmHg		Peso Kg	
CA cm		Altura m	
		IMC Kg/m2	

Assinatura / Carimbo

continua

ANEXO B *continuação*Visita nº 1 – Laboratório

Nome: _____ Paciente nº _____

Data: ____/____/____ Registro _____

Data lab		Referência			Referência
CT			TSH		
TG			T4L		
HDL			GJ		
LDL			Glicemia 2h		
Não HDL			HbA1c		
Apo A1			Insulina jejum		
Apo B			Insulina 2h		
A1/B			Peptídeo C		
HIV			Adiponectina		
AC úrico			LP-PLA2		
TGO			microalbumi		
TGP			PCR-us		
CPK					

Estudo genético – sim () não ()

Eletrocardiograma: ritmo - _____, FC _____ bpm,

alterações ST _____, Arritmias _____

Observação _____

Assinatura / Carimbo

continua

ANEXO B *continuação*Visita nº 2 / 3

Nome: _____ Paciente nº _____

Data: ____/____/____

Registro _____

Laboratório	Data	
	PCR-us	
CAC	Data	
	Total	
	MESA	
Doppler de carótidas	Data	
	EMI	
ITB	Data	
	PA tomazelo/braço	
	ITB	
Função endotelial	Data	
	Delta	

Teste ergométrico - data: _____

Protocolo: Bruce () Bruce modificado () Número de estágios _____

Frequência cardíaca: Max _____ sub _____ atingida _____

Capacidade funcional: meta _____

Arritmias: _____

Alteração de

ST: _____

Comportamento PA: normal () platô ou queda PAS () hipertensão ()

Sintomas: _____

Resultado: positivo () sugestivo de isquemia () negativo ()

Assinatura / Carimbo

ANEXO C Normograma para avaliação da espessura médio-intimal carotídea pelo estudo MESA⁵³

Mean far wall-right																
Age, y/percentile	White male				White female				Black male				Black female			
	45-54	55-64	65-74	75-84	45-54	55-64	65-74	75-84	45-54	55-64	65-74	75-84	45-54	55-64	65-74	75-84
25th	0.52	0.57	0.65	0.72	0.51	0.55	0.65	0.72	0.58	0.61	0.71	0.74	0.55	0.60	0.65	0.71
50th	0.62	0.68	0.77	0.83	0.58	0.65	0.75	0.83	0.67	0.74	0.85	0.85	0.64	0.71	0.76	0.83
75th	0.71	0.81	0.92	0.97	0.67	0.76	0.87	0.93	0.80	0.92	0.99	1.02	0.74	0.81	0.92	0.96
Age, y/percentile	Chinese male				Chinese female				Hispanic male				Hispanic female			
	45-54	55-64	65-74	75-84	45-54	55-64	65-74	75-84	45-54	55-64	65-74	75-84	45-54	55-64	65-74	75-84
25th	0.54	0.56	0.62	0.66	0.55	0.54	0.59	0.67	0.53	0.60	0.65	0.71	0.51	0.57	0.65	0.63
50th	0.64	0.70	0.73	0.79	0.60	0.63	0.71	0.77	0.62	0.67	0.78	0.81	0.58	0.69	0.76	0.78
75th	0.73	0.83	0.92	0.98	0.70	0.77	0.84	0.96	0.73	0.82	0.90	0.92	0.67	0.77	0.87	0.92
Mean far wall-left																
Age, y/percentile	Chinese male				Chinese female				Hispanic male				Hispanic female			
	45-54	55-64	65-74	75-84	45-54	55-64	65-74	75-84	45-54	55-64	65-74	75-84	45-54	55-64	65-74	75-84
25th	0.55	0.57	0.62	0.69	0.49	0.52	0.58	0.64	0.55	0.61	0.68	0.72	0.51	0.58	0.62	0.68
50th	0.63	0.70	0.72	0.84	0.58	0.63	0.71	0.76	0.64	0.72	0.80	0.86	0.58	0.68	0.72	0.77
75th	0.73	0.84	0.86	0.97	0.67	0.72	0.87	0.94	0.75	0.85	0.98	0.97	0.68	0.79	0.86	0.91
Age, y/percentile	White male				White female				Black male				Black female			
	45-54	55-64	65-74	75-84	45-54	55-64	65-74	75-84	45-54	55-64	65-74	75-84	45-54	55-64	65-74	75-84
25th	0.54	0.57	0.67	0.71	0.50	0.55	0.63	0.70	0.56	0.63	0.69	0.72	0.54	0.59	0.63	0.68
50th	0.63	0.69	0.81	0.85	0.58	0.64	0.73	0.80	0.69	0.75	0.82	0.85	0.63	0.67	0.76	0.78
75th	0.78	0.82	0.95	1.00	0.67	0.75	0.85	0.94	0.81	0.92	0.99	1.02	0.73	0.80	0.90	0.91

ANEXO D Normograma para avaliação de espessura médio-intimal carotídea pelo Estudo Bogalusa⁶¹

Right																
Age, y/percentile	White male				White female				Black male				Black female			
	25	30	35	40	25	30	35	40	25	30	35	40	25	30	35	40
25th	0.611	0.636	0.662	0.687	0.562	0.586	0.611	0.635	0.637	0.675	0.712	0.750	0.616	0.650	0.685	0.719
50th	0.663	0.702	0.740	0.779	0.633	0.654	0.676	0.697	0.719	0.756	0.793	0.830	0.682	0.718	0.754	0.790
75th	0.768	0.807	0.845	0.884	0.717	0.735	0.754	0.772	0.839	0.884	0.929	0.974	0.750	0.793	0.837	0.880

Left																
Age, y/percentile	White male				White female				Black male				Black female			
	25	30	35	40	25	30	35	40	25	30	35	40	25	30	35	40
25th	0.577	0.617	0.658	0.698	0.554	0.586	0.618	0.650	0.640	0.676	0.713	0.749	0.587	0.629	0.670	0.712
50th	0.655	0.707	0.760	0.812	0.621	0.657	0.693	0.729	0.736	0.774	0.812	0.850	0.646	0.691	0.736	0.781
75th	0.763	0.814	0.864	0.915	0.660	0.713	0.766	0.819	0.794	0.844	0.894	0.944	0.714	0.768	0.822	0.876

Referências Bibliográficas

- 1 Stamler J. Causes of the epidemic of coronary heart disease. *Brux Med.* 1973;53(9):473-502.
- 2 Lloyd-Jones D, Adams R, Carnethon M, De Simone G, Ferguson TB, Flegal K, et al. Heart disease and stroke statistics--2009 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. *Circulation.* 2009;119(3):e21-181.
- 3 DATASUS - Departamento de Informática do SUS
<http://www2.datasus.gov.br/DATASUS2008>.
- 4 Arad Y, Goodman KJ, Roth M, Newstein D, Guerci AD. Coronary calcification, coronary disease risk factors, C-reactive protein, and atherosclerotic cardiovascular disease events: the St. Francis Heart Study. *J Am Coll Cardiol.* 2005;46(1):158-65.
- 5 International Diabetes Federation 2011. Global Burden: Prevalence and Projections, 2011 and 2030.
<http://www.diabetesatlas.org/content/diabetes-and-impairedglucose-tolerance>.
- 6 Laakso M, Lehto S. Epidemiology of risk factors for cardiovascular disease in diabetes and impaired glucose tolerance. *Atherosclerosis.* 1998;137 Suppl:S65-73.

- 7 Kannel WB, McGee DL. Diabetes and cardiovascular disease. The Framingham Study. *JAMA*. 1979;241(19):2035-8.
- 8 Kissela B, Air E. Diabetes: impact on stroke risk and poststroke recovery. *Sem Neurol*. 2006;26(1):100-7.
- 9 Beckman JA, Creager MA, Libby P. Diabetes and atherosclerosis: epidemiology, pathophysiology, and management. *JAMA*. 2002;287(19):2570-81.
- 10 Aktas MK, Ozduran V, Pothier CE, Lang R, Lauer MS. Global risk scores and exercise testing for predicting all-cause mortality in a preventive medicine program. *JAMA*. 2004;292(12):1462-8.
- 11 Haffner SM, Lehto S, Ronnema T, Pyorala K, Laakso M. Mortality from coronary heart disease in subjects with type 2 diabetes and in nondiabetic subjects with and without prior myocardial infarction. *N Engl J Med*. 1998;339(4):229-34.
- 12 Bulugahapitiya U, Siyambalapitiya S, Sithole J, Idris I. Is diabetes a coronary risk equivalent? Systematic review and meta-analysis. *Diabet Med*. 2009;26(2):142-8.
- 13 American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 2012;35 Suppl 1:S64-71.
- 14 Nathan DM, Davidson MB, DeFronzo RA, Heine RJ, Henry RR, Pratley R, et al. Impaired fasting glucose and impaired glucose tolerance: implications for care. *Diabetes Care*. 2007;30(3):753-9.

- 15 Lindstrom J, Louheranta A, Mannelin M, Rastas M, Salminen V, Eriksson J, et al. The Finnish Diabetes Prevention Study (DPS): Lifestyle intervention and 3-year results on diet and physical activity. *Diabetes Care*. 2003;26(12):3230-6.
- 16 Knowler WC, Barrett-Connor E, Fowler SE, Hamman RF, Lachin JM, Walker EA, et al. Reduction in the incidence of type 2 diabetes with lifestyle intervention or metformin. *N Engl J Med*. 2002;346(6):393-403.
- 17 Vendrame F, Gottlieb PA. Prediabetes: prediction and prevention trials. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2004;33(1):75-92, ix.
- 18 Larsson H, Lindgarde F, Berglund G, Ahren B. Prediction of diabetes using ADA or WHO criteria in post-menopausal women: a 10-year follow-up study. *Diabetologia*. 2000;43(10):1224-8.
- 19 Santaguida PL, Balion C, Hunt D, Morrison K, Gerstein H, Raina P, et al. Diagnosis, prognosis, and treatment of impaired glucose tolerance and impaired fasting glucose. *Evident Rep Technol Assess*. 2005(128):1-11.
- 20 Shaw JE, Zimmet PZ, de Courten M, Dowse GK, Chitson P, Gareeboo H, et al. Impaired fasting glucose or impaired glucose tolerance. What best predicts future diabetes in Mauritius? *Diabetes Care*. 1999;22(3):399-402.
- 21 de Vegt F, Dekker JM, Jager A, Hienkens E, Kostense PJ, Stehouwer CD, et al. Relation of impaired fasting and postload glucose with incident type 2 diabetes in a Dutch population: The Hoorn Study. *JAMA*. 2001;285(16):2109-13.

- 22 Haffner SM, Stern MP, Hazuda HP, Mitchell BD, Patterson JK. Cardiovascular risk factors in confirmed prediabetic individuals. Does the clock for coronary heart disease start ticking before the onset of clinical diabetes? *JAMA*. 1990;263(21):2893-8.
- 23 Authors/Task Force Members, Ryden L, Grant PJ, Anker SD, Berne C, Cosentino F, et al. ESC Guidelines on diabetes, pre-diabetes, and cardiovascular diseases developed in collaboration with the EASD: the Task Force on diabetes, pre-diabetes, and cardiovascular diseases of the European Society of Cardiology (ESC) and developed in collaboration with the European Association for the Study of Diabetes (EASD). *Eur Heart J*. 2013;34(39):3035-87.
- 24 Glucose tolerance and mortality: comparison of WHO and American Diabetes Association diagnostic criteria. The DECODE study group. European Diabetes Epidemiology Group. Diabetes Epidemiology: Collaborative analysis Of Diagnostic criteria in Europe. *Lancet*. 1999;354(9179):617-21.
- 25 Decode Study Group; EDEG. Is the current definition for diabetes relevant to mortality risk from all causes and cardiovascular and noncardiovascular diseases? *Diabetes Care*. 2003;26(3):688-96.
- 26 Ning F, Tuomilehto J, Pyorala K, Onat A, Soderberg S, Qiao Q, et al. Cardiovascular disease mortality in Europeans in relation to fasting and 2-h plasma glucose levels within a normoglycemic range. *Diabetes Care*. 2010;33(10):2211-6.

- 27 Stevens RJ, Kothari V, Adler AI, Stratton IM, United Kingdom Prospective Diabetes Study Group. The UKPDS risk engine: a model for the risk of coronary heart disease in Type II diabetes (UKPDS 56). *Clin Sci*. 2001;101(6):671-9.
- 28 Guzder RN, Gatling W, Mullee MA, Mehta RL, Byrne CD. Prognostic value of the Framingham cardiovascular risk equation and the UKPDS risk engine for coronary heart disease in newly diagnosed Type 2 diabetes: results from a United Kingdom study. *Diab Med*. 2005;22(5):554-62.
- 29 Meigs JB, Nathan DM, Wilson PW, Cupples LA, Singer DE. Metabolic risk factors worsen continuously across the spectrum of nondiabetic glucose tolerance. The Framingham Offspring Study. *Ann Intern Med*. 1998;128(7):524-33.
- 30 Meigs JB, Mittleman MA, Nathan DM, Tofler GH, Singer DE, Murphy-Sheehy PM, et al. Hyperinsulinemia, hyperglycemia, and impaired hemostasis: the Framingham Offspring Study. *JAMA*. 2000;283(2):221-8.
- 31 ontbonne AM, Eschwege EM. Insulin and cardiovascular disease. Paris Prospective Study. *Diabetes Care*. 1991;14(6):461-9.
- 32 Haffner SM. Impaired glucose tolerance--is it relevant for cardiovascular disease? *Diabetologia*. 1997;40 Suppl 2:S138-40.
- 33 Gerstein HC, Pais P, Pogue J, Yusuf S. Relationship of glucose and insulin levels to the risk of myocardial infarction: a case-control study. *J Am Coll Cardiol*. 1999;33(3):612-9.

- 34 Xavier HT, Izar MC, Faria Neto JR, Assad MH, Rocha VZ, Sposito AC, et al. Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose. *Arq Bras Cardiol.* 2013;101(4 Suppl 1):1-20.
- 35 Stone NJ, Robinson JG, Lichtenstein AH, Bairey Merz CN, Blum CB, Eckel RH, et al. 2013 ACC/AHA Guideline on the Treatment of Blood Cholesterol to Reduce Atherosclerotic Cardiovascular Risk in Adults: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *Circulation.* 2014;129(25 Suppl 2):S1-S45.
- 36 Katakami N, Kaneto H, Shimomura I. Carotid ultrasonography: A potent tool for better clinical practice in diagnosis of atherosclerosis in diabetic patients. *J Diabetes Investig.* 2014;5(1):3-13.
- 37 Kuller LH, Velentgas P, Barzilay J, Beauchamp NJ, O'Leary DH, Savage PJ. Diabetes mellitus: subclinical cardiovascular disease and risk of incident cardiovascular disease and all-cause mortality. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000;20(3):823-9.
- 38 Lieber A, Jorgens J. Cinefluorography of coronary artery calcification. Correlation with clinical arteriosclerotic heart disease and autopsy findings. *Am J Roentgenol Radium Ther Nucl Med.* 1961;86:1063-72.
- 39 Taylor AJ, Bindeman J, Feuerstein I, Cao F, Brazaitis M, O'Malley PG. Coronary calcium independently predicts incident premature coronary heart disease over measured cardiovascular risk factors: mean three-year outcomes in the Prospective Army Coronary Calcium (PACC) project. *J Am Coll Cardiol.* 2005;46(5):807-14.

- 40 Greenland P, LaBree L, Azen SP, Doherty TM, Detrano RC. Coronary artery calcium score combined with Framingham score for risk prediction in asymptomatic individuals. *JAMA*. 2004;291(2):210-5.
- 41 Kondos GT, Hoff JA, Sevrukov A, Daviglius ML, Garside DB, Devries SS, et al. Electron-beam tomography coronary artery calcium and cardiac events: a 37-month follow-up of 5635 initially asymptomatic low-to intermediate-risk adults. *Circulation*. 2003;107(20):2571-6.
- 42 Vliegenthart R, Oudkerk M, Hofman A, Oei HH, van Dijck W, van Rooij FJ, et al. Coronary calcification improves cardiovascular risk prediction in the elderly. *Circulation*. 2005;112(4):572-7.
- 43 Stanford W, Thompson BH, Burns TL, Heery SD, Burr MC. Coronary artery calcium quantification at multi-detector row helical CT versus electron-beam CT. *Radiology*. 2004;230(2):397-402.
- 44 Budoff MJ, Achenbach S, Blumenthal RS, Carr JJ, Goldin JG, Greenland P, et al. Assessment of coronary artery disease by cardiac computed tomography: a scientific statement from the American Heart Association Committee on Cardiovascular Imaging and Intervention, Council on Cardiovascular Radiology and Intervention, and Committee on Cardiac Imaging, Council on Clinical Cardiology. *Circulation*. 2006;114(16):1761-91.
- 45 Budoff MJ, Nasir K, McClelland RL, Detrano R, Wong N, Blumenthal RS, et al. Coronary calcium predicts events better with absolute calcium scores than age-sex-race/ethnicity percentiles: MESA (Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis). *J Am Coll Cardiol*. 2009;53(4):345-52.

- 46 Falk E, Shah PK, Fuster V. Coronary plaque disruption. *Circulation*. 1995;92(3):657-71.
- 47 Rumberger JA, Simons DB, Fitzpatrick LA, Sheedy PF, Schwartz RS. Coronary artery calcium area by electron-beam computed tomography and coronary atherosclerotic plaque area. A histopathologic correlative study. *Circulation*. 1995;92(8):2157-62.
- 48 Pletcher MJ, Tice JA, Pignone M, Browner WS. Using the coronary artery calcium score to predict coronary heart disease events: a systematic review and meta-analysis. *Arch Intern Med*. 2004;164(12):1285-92.
- 49 LaMonte MJ, FitzGerald SJ, Church TS, Barlow CE, Radford NB, Levine BD, et al. Coronary artery calcium score and coronary heart disease events in a large cohort of asymptomatic men and women. *Am J Epidemiol*. 2005;162(5):421-9.
- 50 Moebus S, Stang A, Mohlenkamp S, Dragano N, Schmermund A, Slomiany U, et al. Association of impaired fasting glucose and coronary artery calcification as a marker of subclinical atherosclerosis in a population-based cohort--results of the Heinz Nixdorf Recall Study. *Diabetologia*. 2009;52(1):81-9.
- 51 Meigs JB, Larson MG, D'Agostino RB, Levy D, Clouse ME, Nathan DM, et al. Coronary artery calcification in type 2 diabetes and insulin resistance: the framingham offspring study. *Diabetes Care*. 2002;25(8):1313-9.

- 52 Nasir K, Santos RD, Tufail K, Rivera J, Carvalho JA, Meneghello R, et al. High-normal fasting blood glucose in non-diabetic range is associated with increased coronary artery calcium burden in asymptomatic men. *Atherosclerosis*. 2007;195(2):e155-60.
- 53 Stein JH, Korcarz CE, Hurst RT, Lonn E, Kendall CB, Mohler ER, et al. Use of carotid ultrasound to identify subclinical vascular disease and evaluate cardiovascular disease risk: a consensus statement from the American Society of Echocardiography Carotid Intima-Media Thickness Task Force. Endorsed by the Society for Vascular Medicine. *J Am Soc Echocardiogr*. 2008;21(2):93-111; quiz 89-90.
- 54 Sposito AC, Caramelli B, Fonseca FA, Bertolami MC, Afiune Neto A, Souza AD, et al. [IV Brazilian Guideline for Dyslipidemia and Atherosclerosis prevention: Department of Atherosclerosis of Brazilian Society of Cardiology]. *Arq Bras Cardiol*. 2007;88 Suppl 1:2-19.
- 55 Expert Panel on Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults. Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA*. 2001;285(19):2486-97.
- 56 Greenland P, Abrams J, Aurigemma GP, Bond MG, Clark LT, Criqui MH, et al. Prevention Conference V: Beyond secondary prevention: identifying the high-risk patient for primary prevention: noninvasive tests of atherosclerotic burden: Writing Group III. *Circulation*. 2000;101(1):E16-22.

- 57 Chambless LE, Heiss G, Folsom AR, Rosamond W, Szklo M, Sharrett AR, et al. Association of coronary heart disease incidence with carotid arterial wall thickness and major risk factors: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study, 1987-1993. *Am J Epidemiol.* 1997;146(6):483-94.
- 58 Hodis HN, Mack WJ, LaBree L, Selzer RH, Liu CR, Liu CH, et al. The role of carotid arterial intima-media thickness in predicting clinical coronary events. *Ann Inter Med.* 1998;128(4):262-9.
- 59 O'Leary DH, Polak JF, Kronmal RA, Manolio TA, Burke GL, Wolfson SK Jr. Carotid-artery intima and media thickness as a risk factor for myocardial infarction and stroke in older adults. Cardiovascular Health Study Collaborative Research Group. *N Engl J Med.* 1999;340(1):14-22.
- 60 Polak JF, Pencina MJ, O'Leary DH, D'Agostino RB. Common carotid artery intima-media thickness progression as a predictor of stroke in multi-ethnic study of atherosclerosis. *Stroke.* 2011;42(11):3017-21.
- 61 Tzou WS, Douglas PS, Srinivasan SR, Bond MG, Tang R, Li S, et al. Distribution and predictors of carotid intima-media thickness in young adults. *Prev Cardiol.* 2007;10(4):181-9.
- 62 Folsom AR, Eckfeldt JH, Weitzman S, Ma J, Chambless LE, Barnes RW, et al. Relation of carotid artery wall thickness to diabetes mellitus, fasting glucose and insulin, body size, and physical activity. Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study Investigators. *Stroke.* 1994;25(1):66-73.

- 63 Bonora E, Tessari R, Micciolo R, Zenere M, Targher G, Padovani R, et al. Intimal-medial thickness of the carotid artery in nondiabetic and NIDDM patients. Relationship with insulin resistance. *Diabetes Care*. 1997;20(4):627-31.
- 64 Haffner SM, Agostino RD Jr, Saad MF, O'Leary DH, Savage PJ, Rewers M, et al. Carotid artery atherosclerosis in type-2 diabetic and nondiabetic subjects with and without symptomatic coronary artery disease (The Insulin Resistance Atherosclerosis Study). *Am J Cardiol*. 2000;85(12):1395-400.
- 65 Henry RM, Kostense PJ, Spijkerman AM, Dekker JM, Nijpels G, Heine RJ, et al. Arterial stiffness increases with deteriorating glucose tolerance status: the Hoorn Study. *Circulation*. 2003;107(16):2089-95.
- 66 Kuller L, Borhani N, Furberg C, Gardin J, Manolio T, O'Leary D, et al. Prevalence of subclinical atherosclerosis and cardiovascular disease and association with risk factors in the Cardiovascular Health Study. *Am J Epidemiol*. 1994;139(12):1164-79.
- 67 Bonora E, Kiechl S, Willeit J, Oberhollenzer F, Egger G, Bonadonna R, et al. Plasma glucose within the normal range is not associated with carotid atherosclerosis: prospective results in subjects with normal glucose tolerance from the Bruneck Study. *Diabetes Care*. 1999;22(8):1339-46.

- 68 Rywik TM, Zink RC, Gittings NS, Khan AA, Wright JG, O'Connor FC, et al. Independent prognostic significance of ischemic ST-segment response limited to recovery from treadmill exercise in asymptomatic subjects. *Circulation*. 1998;97(21):2117-22.
- 69 Greenland P, Alpert JS, Beller GA, Benjamin EJ, Budoff MJ, Fayad ZA, et al. 2010 ACCF/AHA guideline for assessment of cardiovascular risk in asymptomatic adults: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *J Am Coll Cardiol*. 2010;56(25):e50-103.
- 70 Josephson RA, Shefrin E, Lakatta EG, Brant LJ, Fleg JL. Can serial exercise testing improve the prediction of coronary events in asymptomatic individuals? *Circulation*. 1990;81(1):20-4.
- 71 Cosson E, Paycha F, Paries J, Cattan S, Ramadan A, Meddah D, et al. Detecting silent coronary stenoses and stratifying cardiac risk in patients with diabetes: ECG stress test or exercise myocardial scintigraphy? *Diabet Med*. 2004;21(4):342-8.
- 72 McHenry PL, O'Donnell J, Morris SN, Jordan JJ. The abnormal exercise electrocardiogram in apparently healthy men: a predictor of angina pectoris as an initial coronary event during long-term follow-up. *Circulation*. 1984;70(4):547-51.
- 73 Giagnoni E, Secchi MB, Wu SC, Morabito A, Oltrona L, Mancarella S, et al. Prognostic value of exercise EKG testing in asymptomatic normotensive subjects. A prospective matched study. *N Engl J Med*. 1983;309(18):1085-9.

- 74 Adabag AS, Grandits GA, Prineas RJ, Crow RS, Bloomfield HE, Neaton JD, et al. Relation of heart rate parameters during exercise test to sudden death and all-cause mortality in asymptomatic men. *Am J Cardiol.* 2008;101(10):1437-43.
- 75 Kodama S, Saito K, Tanaka S, Maki M, Yachi Y, Asumi M, et al. Cardiorespiratory fitness as a quantitative predictor of all-cause mortality and cardiovascular events in healthy men and women: a meta-analysis. *JAMA.* 2009;301(19):2024-35.
- 76 Nishime EO, Cole CR, Blackstone EH, Pashkow FJ, Lauer MS. Heart rate recovery and treadmill exercise score as predictors of mortality in patients referred for exercise ECG. *JAMA.* 2000;284(11):1392-8.
- 77 Kwok JM, Miller TD, Christian TF, Hodge DO, Gibbons RJ. Prognostic value of a treadmill exercise score in symptomatic patients with nonspecific ST-T abnormalities on resting ECG. *JAMA.* 1999;282(11):1047-53.
- 78 Vanzetto G, Halimi S, Hammoud T, Fagret D, Benhamou PY, Cordonnier D, et al. Prediction of cardiovascular events in clinically selected high-risk NIDDM patients. Prognostic value of exercise stress test and thallium-201 single-photon emission computed tomography. *Diabetes Care.* 1999;22(1):19-26.
- 79 Koistinen MJ. Prevalence of asymptomatic myocardial ischaemia in diabetic subjects. *BMJ.* 1990;301(6743):92-5.

- 80 Barthelemy O, Le Feuvre C, Timsit J. Silent myocardial ischemia screening in patients with diabetes mellitus. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2007;51(2):285-93.
- 81 Leng GC, Fowkes FG, Lee AJ, Dunbar J, Housley E, Ruckley CV. Use of ankle brachial pressure index to predict cardiovascular events and death: a cohort study. *BMJ.* 1996;313(7070):1440-4.
- 82 Walters DP, Gatling W, Mullee MA, Hill RD. The prevalence, detection, and epidemiological correlates of peripheral vascular disease: a comparison of diabetic and non-diabetic subjects in an English community. *Diabet Med.* 1992;9(8):710-5.
- 83 Selvin E, Erlinger TP. Prevalence of and risk factors for peripheral arterial disease in the United States: results from the National Health and Nutrition Examination Survey, 1999-2000. *Circulation.* 2004;110(6):738-43.
- 84 Fowkes FG, Housley E, Riemersma RA, Macintyre CC, Cawood EH, Prescott RJ, et al. Smoking, lipids, glucose intolerance, and blood pressure as risk factors for peripheral atherosclerosis compared with ischemic heart disease in the Edinburgh Artery Study. *Am J Epidemiol.* 1992;135(4):331-40.
- 85 Abbott RD, Brand FN, Kannel WB. Epidemiology of some peripheral arterial findings in diabetic men and women: experiences from the Framingham Study. *Am J Med.* 1990;88(4):376-81.

- 86 Newman AB, Shemanski L, Manolio TA, Cushman M, Mittelmark M, Polak JF, et al. Ankle-arm index as a predictor of cardiovascular disease and mortality in the Cardiovascular Health Study. The Cardiovascular Health Study Group. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999;19(3):538-45.
- 87 Ogren M, Hedblad B, Engstrom G, Janzon L. Prevalence and prognostic significance of asymptomatic peripheral arterial disease in 68-year-old men with diabetes. Results from the population study 'Men born in 1914' from Malmö, Sweden. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2005;29(2):182-9.
- 88 Emanuele MA, Buchanan BJ, Abaira C. Elevated leg systolic pressures and arterial calcification in diabetic occlusive vascular disease. *Diabetes Care.* 1981;4(2):289-92.
- 89 MacGregor AS, Price JF, Hau CM, Lee AJ, Carson MN, Fowkes FG. Role of systolic blood pressure and plasma triglycerides in diabetic peripheral arterial disease. The Edinburgh Artery Study. *Diabetes Care.* 1999;22(3):453-8.
- 90 Forrest KY, Becker DJ, Kuller LH, Wolfson SK, Orchard TJ. Are predictors of coronary heart disease and lower-extremity arterial disease in type 1 diabetes the same? A prospective study. *Atherosclerosis.* 2000;148(1):159-69.

- 91 Thomas GN, Critchley JA, Tomlinson B, Cockram CS, Chan JC. Peripheral vascular disease in Type 2 diabetic Chinese patients: associations with metabolic indices, concomitant vascular disease and genetic factors. *Diabet Med*. 2003;20(12):988-95.
- 92 Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med*. 1999;340(2):115-26.
- 93 Caballero AE. Metabolic and vascular abnormalities in subjects at risk for type 2 diabetes: the early start of a dangerous situation. *Arch Med Res*. 2005;36(3):241-9.
- 94 Sanchis J, Bodi V, Llacer A, Facila L, Martinez-Brotons A, Insa L, et al. [Relationship of C-reactive protein levels with angiographic findings and markers of necrosis in non-ST-segment elevation acute coronary syndrome]. *Rev Esp Cardiol*. 2004;57(5):382-7.
- 95 Nilsson J. CRP--marker or maker of cardiovascular disease? *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25(8):1527-8.
- 96 Garza CA, Montori VM, McConnell JP, Somers VK, Kullo IJ, Lopez-Jimenez F. Association between lipoprotein-associated phospholipase A2 and cardiovascular disease: a systematic review. *Mayo Clin Proc*. 2007;82(2):159-65.
- 97 Gotsman I, Stabholz A, Planer D, Pugatsch T, Lapidus L, Novikov Y, et al. Serum cytokine tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 associated with the severity of coronary artery disease: indicators of an active inflammatory burden? *IMAJ*. 2008;10(7):494-8.

- 98 Sukhija R, Fahdi I, Garza L, Fink L, Scott M, Aude W, et al. Inflammatory markers, angiographic severity of coronary artery disease, and patient outcome. *Am J Cardiol.* 2007;99(7):879-84.
- 99 Pradhan AD, Manson JE, Rifai N, Buring JE, Ridker PM. C-reactive protein, interleukin 6, and risk of developing type 2 diabetes mellitus. *JAMA.* 2001;286(3):327-34.
- 100 Ridker PM, Paynter NP, Rifai N, Gaziano JM, Cook NR. C-reactive protein and parental history improve global cardiovascular risk prediction: the Reynolds Risk Score for men. *Circulation.* 2008;118(22):2243-51, 4p following 2251.
- 101 Wilson PW, Nam BH, Pencina M, D'Agostino RB Sr, Benjamin EJ, O'Donnell CJ. C-reactive protein and risk of cardiovascular disease in men and women from the Framingham Heart Study. *Arch Intern Med.* 2005;165(21):2473-8.
- 102 Shah T, Casas JP, Cooper JA, Tzoulaki I, Sofat R, McCormack V, et al. Critical appraisal of CRP measurement for the prediction of coronary heart disease events: new data and systematic review of 31 prospective cohorts. *Int J Epidemiol.* 2009;38(1):217-31.
- 103 Persson M, Nilsson JA, Nelson JJ, Hedblad B, Berglund G. The epidemiology of Lp-PLA(2): distribution and correlation with cardiovascular risk factors in a population-based cohort. *Atherosclerosis.* 2007;190(2):388-96.

- 104 Packard CJ, O'Reilly DS, Caslake MJ, McMahon AD, Ford I, Cooney J, et al. Lipoprotein-associated phospholipase A2 as an independent predictor of coronary heart disease. West of Scotland Coronary Prevention Study Group. *N Engl J Med*. 2000;343(16):1148-55.
- 105 Lp-PLA2 Studies Collaboration, Ballantyne C, Cushman M, Psaty B, Furberg C, Khaw KT, Sandhu M, et al. Collaborative meta-analysis of individual participant data from observational studies of Lp-PLA2 and cardiovascular diseases. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil*. 2007;14(1):3-11.
- 106 Daniels LB, Laughlin GA, Sarno MJ, Bettencourt R, Wolfert RL, Barrett-Connor E. Lipoprotein-associated phospholipase A2 is an independent predictor of incident coronary heart disease in an apparently healthy older population: the Rancho Bernardo Study. *J Am Coll Cardiol*. 2008;51(9):913-9.
- 107 Koenig W, Khuseyinova N, Lowel H, Trischler G, Meisinger C. Lipoprotein-associated phospholipase A2 adds to risk prediction of incident coronary events by C-reactive protein in apparently healthy middle-aged men from the general population: results from the 14-year follow-up of a large cohort from southern Germany. *Circulation*. 2004;110(14):1903-8.
- 108 Mohamed-Ali V, Pinkney JH, Coppack SW. Adipose tissue as an endocrine and paracrine organ. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 1998;22(12):1145-58.

- 109 Harwood HJ Jr. The adipocyte as an endocrine organ in the regulation of metabolic homeostasis. *Neuropharmacology*. 2012;63(1):57-75.
- 110 Segal KR, Landt M, Klein S. Relationship between insulin sensitivity and plasma leptin concentration in lean and obese men. *Diabetes*. 1996;45(7):988-91.
- 111 Sattar N, Wannamethee G, Sarwar N, Tchernova J, Cherry L, Wallace AM, et al. Adiponectin and coronary heart disease: a prospective study and meta-analysis. *Circulation*. 2006;114(7):623-9.
- 112 Cleland SJ, Sattar N, Petrie JR, Forouhi NG, Elliott HL, Connell JM. Endothelial dysfunction as a possible link between C-reactive protein levels and cardiovascular disease. *Clin Sci (Lond)*. 2000;98(5):531-5.
- 113 Chessler SD, Fujimoto WY, Shofer JB, Boyko EJ, Weigle DS. Increased plasma leptin levels are associated with fat accumulation in Japanese Americans. *Diabetes*. 1998;47(2):239-43.
- 114 McNeely MJ, Boyko EJ, Weigle DS, Shofer JB, Chessler SD, Leonnetti DL, et al. Association between baseline plasma leptin levels and subsequent development of diabetes in Japanese Americans. *Diabetes Care*. 1999;22(1):65-70.
- 115 Gómez-Ambrosi J, Frühbeck G. Evidence for the involvement of resistin in inflammation and cardiovascular disease. *Curr Diabetes Rev*. 2005;1(3):227-34.

- 116 Gómez-Guzmán M, Jiménez R, Sánchez M, Zarzuelo MJ, Galindo P, Quintela AM, et al. Epicatechin lowers blood pressure, restores endothelial function, and decreases oxidative stress and endothelin-1 and NADPH oxidase activity in DOCA-salt hypertension. *Free Radic Biol Med*. 2012;52(1):70-9.
- 117 Rajpathak SN, Kaplan RC, Wassertheil-Smoller S, Cushman M, Rohan TE, McGinn AP, et al. Resistin, but not adiponectin and leptin, is associated with the risk of ischemic stroke among postmenopausal women: results from the Women's Health Initiative. *Stroke*. 2011;42(7):1813-20.
- 118 Wang H, Chen DY, Cao J, He ZY, Zhu BP, Long M. High serum resistin level may be an indicator of the severity of coronary disease in acute coronary syndrome. *Chin Med Sci J*. 2009;24(3):161-6.
- 119 Kumada M, Kihara S, Sumitsuji S, Kawamoto T, Matsumoto S, Ouchi N, et al. Association of hypoadiponectinemia with coronary artery disease in men. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003;23(1):85-9.
- 120 Wolk R, Berger P, Lennon RJ, Brilakis ES, Davison DE, Somers VK. Association between plasma adiponectin levels and unstable coronary syndromes. *Eur Heart J*. 2007;28(3):292-8.
- 121 Maahs DM, Ogden LG, Kinney GL, Wadwa P, Snell-Bergeon JK, Dabelea D, et al. Low plasma adiponectin levels predict progression of coronary artery calcification. *Circulation*. 2005;111(6):747-53.

- 122 von Eynatten M, Schneider JG, Humpert PM, Kreuzer J, Kuecherer H, Katus HA, et al. Serum adiponectin levels are an independent predictor of the extent of coronary artery disease in men. *J Am Coll Cardiol*. 2006;47(10):2124-6.
- 123 Otsuka F, Sugiyama S, Kojima S, Maruyoshi H, Funahashi T, Matsui K, et al. Plasma adiponectin levels are associated with coronary lesion complexity in men with coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol*. 2006;48(6):1155-62.
- 124 Levey AS, Eckardt KU, Tsukamoto Y, Levin A, Coresh J, Rossert J, et al. Definition and classification of chronic kidney disease: a position statement from Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO). *Kidney Int*. 2005;67(6):2089-100.
- 125 Cirillo M, Senigalliesi L, Laurenzi M, Alfieri R, Stamler J, Stamler R, et al. Microalbuminuria in nondiabetic adults: relation of blood pressure, body mass index, plasma cholesterol levels, and smoking: The Gubbio Population Study. *Arch Intern Med*. 1998;158(17):1933-9.
- 126 Cao JJ, Biggs ML, Barzilay J, Konen J, Psaty BM, Kuller L, et al. Cardiovascular and mortality risk prediction and stratification using urinary albumin excretion in older adults ages 68-102: the Cardiovascular Health Study. *Atherosclerosis*. 2008;197(2):806-13.
- 127 Halimi JM, Bonnet F, Lange C, Balkau B, Tichet J, Marre M, et al. Urinary albumin excretion is a risk factor for diabetes mellitus in men, independently of initial metabolic profile and development of insulin resistance. The DESIR Study. *J Hypertens*. 2008;26(11):2198-206.

- 128 Wang TJ, Evans JC, Meigs JB, Rifai N, Fox CS, D'Agostino RB, et al. Low-grade albuminuria and the risks of hypertension and blood pressure progression. *Circulation*. 2005;111(11):1370-6.
- 129 Papaioannou GI, Seip RL, Grey NJ, Katten D, Taylor A, Inzucchi SE, et al. Brachial artery reactivity in asymptomatic patients with type 2 diabetes mellitus and microalbuminuria (from the Detection of Ischemia in Asymptomatic Diabetics-brachial artery reactivity study). *Am J Cardiol*. 2004;94(3):294-9.
- 130 Kshirsagar AV, Bomback AS, Bang H, Gerber LM, Vupputuri S, Shoham DA, et al. Association of C-reactive protein and microalbuminuria (from the National Health and Nutrition Examination Surveys, 1999 to 2004). *Am J Cardiol*. 2008;101(3):401-6.
- 131 McPherson R, Pertsemlidis A, Kavaslar N, Stewart A, Roberts R, Cox DR, et al. A common allele on chromosome 9 associated with coronary heart disease. *Science*. 2007;316(5830):1488-91.
- 132 Scott LJ, Mohlke KL, Bonnycastle LL, Willer CJ, Li Y, Duren WL, et al. A genome-wide association study of type 2 diabetes in Finns detects multiple susceptibility variants. *Science*. 2007;316(5829):1341-5.
- 133 Tousoulis D, Briasoulis A, Papageorgiou N, Antoniadis C, Stefanadis C. Candidate gene polymorphisms and the 9p21 locus in acute coronary syndromes. *Trends Mol Med*. 2008;14(10):441-9.
- 134 Harismendy O, Notani D, Song X, Rahim NG, Tanasa B, Heintzman N, et al. 9p21 DNA variants associated with coronary artery disease impair interferon-gamma signalling response. *Nature*. 2011;470(7333):264-8.

- 135 Zhang Q, Wang XF, Cheng SS, Wan XH, Cao FF, Li L, et al. Three SNPs on chromosome 9p21 confer increased risk of myocardial infarction in Chinese subjects. *Atherosclerosis*. 2009;207(1):26-8.
- 136 Xie F, Chu X, Wu H, Sun W, Shen M, Yang L, et al. Replication of putative susceptibility loci from genome-wide association studies associated with coronary atherosclerosis in Chinese Han population. *PloS One*. 2011;6(6):e20833.
- 137 Hou L, Chen S, Yu H, Lu X, Chen J, Wang L, et al. Associations of PLA2G7 gene polymorphisms with plasma lipoprotein-associated phospholipase A2 activity and coronary heart disease in a Chinese Han population: the Beijing atherosclerosis study. *Hum Genet*. 2009;125(1):11-20.
- 138 Unno N, Sakaguchi T, Nakamura T, Yamamoto N, Sugatani J, Miwa M, et al. A single nucleotide polymorphism in the plasma PAF acetylhydrolase gene and risk of atherosclerosis in Japanese patients with peripheral artery occlusive disease. *J Surg Res*. 2006;134(1):36-43.
- 139 Jang Y, Kim OY, Koh SJ, Chae JS, Ko YG, Kim JY, et al. The Val279Phe variant of the lipoprotein-associated phospholipase A2 gene is associated with catalytic activities and cardiovascular disease in Korean men. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006;91(9):3521-7.

- 140 Ninio E, Tregouet D, Carrier JL, Stengel D, Bickel C, Perret C, et al. Platelet-activating factor-acetylhydrolase and PAF-receptor gene haplotypes in relation to future cardiovascular event in patients with coronary artery disease. *Hum Mol Genet.* 2004;13(13):1341-51.
- 141 Liu PY, Li YH, Wu HL, Chao TH, Tsai LM, Lin LJ, et al. Platelet-activating factor-acetylhydrolase A379V (exon 11) gene polymorphism is an independent and functional risk factor for premature myocardial infarction. *J Thromb Haemost.* 2006;4(5):1023-8.
- 142 Wootton PT, Stephens JW, Hurel SJ, Durand H, Cooper J, Ninio E, et al. Lp-PLA2 activity and PLA2G7 A379V genotype in patients with diabetes mellitus. *Atherosclerosis.* 2006;189(1):149-56.
- 143 Um JY, Park JH, Kim HM. Gene polymorphisms in tumor necrosis factor locus and waist-hip ratio in obese Koreans. *Clin Chim Acta.* 2003;338(1-2):117-22.
- 144 Yu GI, Ha E, Park SH, Park JH, Jang HS, Bae JH, et al. Association of tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) promoter polymorphisms with overweight/obesity in a Korean population. *Inflamm Res.* 2011;60(12):1099-105.
- 145 Hakkinen T, Luoma JS, Hiltunen MO, Macphee CH, Milliner KJ, Patel L, et al. Lipoprotein-associated phospholipase A(2), platelet-activating factor acetylhydrolase, is expressed by macrophages in human and rabbit atherosclerotic lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999;19(12):2909-17.

- 146 Kolodgie FD, Burke AP, Skorija KS, Ladich E, Kutys R, Makuria AT, et al. Lipoprotein-associated phospholipase A2 protein expression in the natural progression of human coronary atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006;26(11):2523-9.
- 147 Tsiotra PC, Tsigos C, Yfanti E, Anastasiou E, Vikentiou M, Psarra K, et al. Visfatin, TNF-alpha and IL-6 mRNA expression is increased in mononuclear cells from type 2 diabetic women. *Horm Metab Res.* 2007;39(10):758-63.
- 148 Gokulakrishnan K, Mohanavalli KT, Monickaraj F, Mohan V, Balasubramanyam M. Subclinical inflammation/oxidation as revealed by altered gene expression profiles in subjects with impaired glucose tolerance and Type 2 diabetes patients. *Mol Cell Biochem.* 2009;324(1-2):173-81.
- 149 American Diabetes Association. Standards of medical care in diabetes--2014. *Diabetes Care.* 2014;37 Suppl 1:S14-80.
- 150 World Health Organization. Tobacco control country profiles. 2nd ed. *Proceedings of the 12th World Conference on Tobacco or Health.* Helsinki, Finland, 2003.
- 151 O'Keefe JH, Bybee KA, Lavie CJ. Alcohol and cardiovascular health: the razor-sharp double-edged sword. *J Am Coll Cardiol.* 2007;50(11):1009-14.
- 152 Fernandes CE, Baracat EC, Lima GR. Climatério: aspectos conceituais e epidemiologia. In: Fernandes CE, Baracat EC, Lima GR, eds. *Climatério: manual de orientação.* São Paulo: Ponto; 2004.

- 153 World Health Organization. Obesity: preventing and managing the global epidemic. *Report of a WHO Consultation (WHO Technical Report Series 894)*. Geneva: WHO, 2000.
- 154 Sociedade Brasileira de Cardiologia/Sociedade Brasileira de Hipertensão/Sociedade Brasileira de Nefrologia. VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão. *Arq Bras Cardiol*. 2010;95(1 Supl 1):1-51.
- 155 Grundy SM, Cleeman JI, Daniels SR, Donato KA, Eckel RH, Franklin BA, et al. Diagnosis and management of the metabolic syndrome: an American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute Scientific Statement. *Circulation*. 2005;112(17):2735-52.
- 156 Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem*. 1972;18(6):499-502.
- 157 Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia*. 1985;28(7):412-9.
- 158 Levy JC, Matthews DR, Hermans MP. Correct homeostasis model assessment (HOMA) evaluation uses the computer program. *Diabetes Care*. 1998;21(12):2191-2.
- 159 Agatston AS, Janowitz WR, Hildner FJ, Zusmer NR, Viamonte M Jr, Detrano R. Quantification of coronary artery calcium using ultrafast computed tomography. *J Am Coll Cardiol*. 1990;15(4):827-32.

- 160 Rumberger JA, Brundage BH, Rader DJ, Kondos G. Electron beam computed tomographic coronary calcium scanning: a review and guidelines for use in asymptomatic persons. *Mayo Clin Proc.* 1999;74(3):243-52.
- 161 McClelland RL, Chung H, Detrano R, Post W, Kronmal RA. Distribution of coronary artery calcium by race, gender, and age: results from the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA). *Circulation.* 2006;113(1):30-7.
- 162 Touboul PJ, Hennerici MG, Meairs S, Adams H, Amarenco P, Bornstein N, et al. Mannheim carotid intima-media thickness and plaque consensus (2004-2006-2011). An update on behalf of the advisory board of the 3rd, 4th and 5th watching the risk symposia, at the 13th, 15th and 20th European Stroke Conferences, Mannheim, Germany, 2004, Brussels, Belgium, 2006, and Hamburg, Germany, 2011. *Cerebrovasc Dis.* 2012;34(4):290-6.
- 163 Grant EG, Benson CB, Moneta GL, Alexandrov AV, Baker JD, Bluth EI, et al. Carotid artery stenosis: gray-scale and Doppler US diagnosis--Society of Radiologists in Ultrasound Consensus Conference. *Radiology.* 2003;229(2):340-6.
- 164 Meneghelo RS, Araújo CGS, Stein R, Mastrocolla LE, Albuquerque PF, Serra SM, et al. Sociedade Brasileira de Cardiologia. III Diretrizes da Sociedade Brasileira de Cardiologia sobre Teste Ergométrico. *Arq Bras Cardiol.* 2010;95(5 Supl.1):1-26.

- 165 Bustin SA. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol*. 2000;25(2):169-93.
- 166 Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001;25(4):402-8.
- 167 Agresti A. *Categorical data analysis*. New York: Wiley Interscience; 1990.
- 168 Kirkwood R, Sterne JAC. *Essential medical statistics*. 2nd ed. Massachusetts, USA: Blackwell Science; 2006. 502 p.
- 169 Neter J, Kutner MH, Nachtsheim CJ, Wasserman W. *Applied Linear Statistical Models*. 4th ed. Chicago, IL: Irwin; 1996.
- 170 Hosmer DW, Lemeshow S. *Applied Logistic Regression*. 2nd ed. New York: Wiley; 2000. 320 p.
- 171 De Bacquer D, De Backer G, Kornitzer M, Blackburn H. Prognostic value of ECG findings for total, cardiovascular disease, and coronary heart disease death in men and women. *Heart*. 1998;80(6):570-7.
- 172 Kuller L, Fisher L, McClelland R, Fried L, Cushman M, Jackson S, et al. Differences in prevalence of and risk factors for subclinical vascular disease among black and white participants in the Cardiovascular Health Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1998;18(2):283-93.

- 173 Emerging Risk Factors Collaboration, Di Angelantonio E, Gao P, Khan H, Butterworth AS, Wormser D, Kaptoge S, et al. Glycated hemoglobin measurement and prediction of cardiovascular disease. *JAMA*. 2014;311(12):1225-33.
- 174 Kasami R, Kaneto H, Katakami N, Sumitsuji S, Yamasaki K, Kuroda T, et al. Relationship between carotid intima-media thickness and the presence and extent of coronary stenosis in type 2 diabetic patients with carotid atherosclerosis but without history of coronary artery disease. *Diabetes Care*. 2011;34(2):468-70.
- 175 Irie Y, Katakami N, Kaneto H, Kasami R, Sumitsuji S, Yamasaki K, et al. Maximum carotid intima-media thickness improves the prediction ability of coronary artery stenosis in type 2 diabetic patients without history of coronary artery disease. *Atherosclerosis*. 2012;221(2):438-44.
- 176 Salonen JT, Salonen R. Ultrasound B-mode imaging in observational studies of atherosclerotic progression. *Circulation*. 1993;87(3 Suppl):II56-65.
- 177 Yamasaki Y, Kawamori R, Matsushima H, Nishizawa H, Kodama M, Kubota M, et al. Asymptomatic hyperglycaemia is associated with increased intimal plus medial thickness of the carotid artery. *Diabetologia*. 1995;38(5):585-91.
- 178 Wagenknecht LE, D'Agostino RB Jr, Haffner SM, Savage PJ, Rewers M. Impaired glucose tolerance, type 2 diabetes, and carotid wall thickness: the Insulin Resistance Atherosclerosis Study. *Diabetes Care*. 1998;21(11):1812-8.

- 179 Brohall G, Oden A, Fagerberg B. Carotid artery intima-media thickness in patients with Type 2 diabetes mellitus and impaired glucose tolerance: a systematic review. *Diabet Med*. 2006;23(6):609-16.
- 180 Pankow JS, Kwan DK, Duncan BB, Schmidt MI, Couper DJ, Golden S, et al. Cardiometabolic risk in impaired fasting glucose and impaired glucose tolerance: the Atherosclerosis Risk in Communities Study. *Diabetes Care*. 2007;30(2):325-31.
- 181 Parildar H, Gulmez O, Cigerli O, Dogruk Unal A, Erdal R, Guvener Demirag N. Carotid Artery Intima Media Thickness and HsCRP; Predictors for Atherosclerosis in Prediabetic Patients? *Pak J Med Sci*. 2013;29(2):495-9..
- 182 Temelkova-Kurktschiev TS, Koehler C, Leonhardt W, Schaper F, Henkel E, Siegert G, et al. Increased intimal-medial thickness in newly detected type 2 diabetes: risk factors. *Diabetes Care*. 1999;22(2):333-8.
- 183 MacMahon S, Sharpe N, Gamble G, Hart H, Scott J, Simes J, et al. Effects of lowering average of below-average cholesterol levels on the progression of carotid atherosclerosis: results of the LIPID Atherosclerosis Substudy. LIPID Trial Research Group. *Circulation*. 1998;97(18):1784-90.
- 184 Crouse JR 3rd, Raichlen JS, Riley WA, Evans GW, Palmer MK, O'Leary DH, et al. Effect of rosuvastatin on progression of carotid intima-media thickness in low-risk individuals with subclinical atherosclerosis: the METEOR Trial. *JAMA*. 2007;297(12):1344-53.

- 185 Smilde TJ, van Wissen S, Wollersheim H, Trip MD, Kastelein JJ, Stalenhoef AF. Effect of aggressive versus conventional lipid lowering on atherosclerosis progression in familial hypercholesterolaemia (ASAP): a prospective, randomised, double-blind trial. *Lancet*. 2001;357(9256):577-81.
- 186 Wei M, Kampert JB, Barlow CE, Nichaman MZ, Gibbons LW, Paffenbarger RS Jr, et al. Relationship between low cardiorespiratory fitness and mortality in normal-weight, overweight, and obese men. *JAMA*. 1999;282(16):1547-53.
- 187 Pierre-Louis B, Guddati AK, Khyzar Hayat Syed M, Gorospe VE, Manguerra M, Bagchi C, et al. Exercise capacity as an independent risk factor for adverse cardiovascular outcomes among nondiabetic and diabetic patients. *Arch Med Sci*. 2014;10(1):25-32.
- 188 Hage FG, Lusa L, Dondi M, Giubbini R, Iskandrian AE; IAEA Diabetes Investigators. Exercise stress tests for detecting myocardial ischemia in asymptomatic patients with diabetes mellitus. *Am J Cardiol*. 2013;112(1):14-20.
- 189 Mark DB, Shaw L, Harrell FE Jr, Hlatky MA, Lee KL, Bengtson JR, et al. Prognostic value of a treadmill exercise score in outpatients with suspected coronary artery disease. *N Engl J Med*. 1991;325(12):849-53.
- 190 Lakkireddy DR, Bhakkad J, Korlakunta HL, Ryschon K, Shen X, Mooss AN, et al. Prognostic value of the Duke Treadmill Score in diabetic patients. *Am Heart J*. 2005;150(3):516-21.

- 191 Dachun X, Jue L, Liling Z, Yawei X, Dayi H, Pagoto SL, et al. Sensitivity and specificity of the ankle--brachial index to diagnose peripheral artery disease: a structured review. *Vasc Med*. 2010;15(5):361-9.
- 192 Parameswaran GI, Brand K, Dolan J. Pulse oximetry as a potential screening tool for lower extremity arterial disease in asymptomatic patients with diabetes mellitus. *Arch Intern Med*. 2005;165(4):442-6.
- 193 Takahashi O, Shimbo T, Rahman M, Musa R, Kurokawa W, Yoshinaka T, et al. Validation of the auscultatory method for diagnosing peripheral arterial disease. *Fam Pract*. 2006;23(1):10-4.
- 194 Naghavi M, Falk E, Hecht HS, Shah PK; SHAPE Task Force. The first SHAPE (Screening for Heart Attack Prevention and Education) guideline. *Crit Path Cardiol*. 2006;5(4):187-90.
- 195 Lauer MS. Primary prevention of atherosclerotic cardiovascular disease: the high public burden of low individual risk. *JAMA*. 2007;297(12):1376-8.
- 196 Gibbons RJ, Jones DW, Gardner TJ, Goldstein LB, Moller JH, Yancy CW, et al. The American Heart Association's 2008 Statement of Principles for Healthcare Reform. *Circulation*. 2008;118(21):2209-18.
- 197 Shah PK. Screening asymptomatic subjects for subclinical atherosclerosis: can we, does it matter, and should we? *J Am Coll Cardiol*. 2010;56(2):98-105.
- 198 Shareghi S, Ahmadi N, Young E, Gopal A, Liu ST, Budoff MJ. Prognostic significance of zero coronary calcium scores on cardiac computed tomography. *J Cardiovasc Comput Tomogr*. 2007;1(3):155-9.

- 199 Raggi P, Shaw LJ, Berman DS, Callister TQ. Prognostic value of coronary artery calcium screening in subjects with and without diabetes. *J Am Coll Cardiol.* 2004;43(9):1663-9.
- 200 Budoff MJ, Shaw LJ, Liu ST, Weinstein SR, Mosler TP, Tseng PH, et al. Long-term prognosis associated with coronary calcification: observations from a registry of 25,253 patients. *J Am Coll Cardiol.* 2007;49(18):1860-70.
- 201 Wong ND, Detrano RC, Diamond G, Rezayat C, Mahmoudi R, Chong EC, et al. Does coronary artery screening by electron beam computed tomography motivate potentially beneficial lifestyle behaviors? *Am J Cardiol.* 1996;78(11):1220-3.
- 202 Orakzai RH, Nasir K, Orakzai SH, Kalia N, Gopal A, Musunuru K, et al. Effect of patient visualization of coronary calcium by electron beam computed tomography on changes in beneficial lifestyle behaviors. *Am J Cardiol.* 2008;101(7):999-1002.
- 203 Newman AB, Naydeck BL, Sutton-Tyrrell K, Edmundowicz D, O'Leary D, Kronmal R, et al. Relationship between coronary artery calcification and other measures of subclinical cardiovascular disease in older adults. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002;22(10):1674-9.
- 204 Folsom AR, Kronmal RA, Detrano RC, O'Leary DH, Bild DE, Bluemke DA, et al. Coronary artery calcification compared with carotid intima-media thickness in the prediction of cardiovascular disease incidence: the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA). *Arch Intern Med.* 2008;168(12):1333-9.

- 205 Barzilay JI, Forsberg C, Heckbert SR, Cushman M, Newman AB. The association of markers of inflammation with weight change in older adults: the Cardiovascular Health Study. *Int J Obes (Lond)*. 2006;30(9):1362-7.
- 206 Sesso HD, Buring JE, Rifai N, Blake GJ, Gaziano JM, Ridker PM. C-reactive protein and the risk of developing hypertension. *JAMA*. 2003;290(22):2945-51.
- 207 Folsom AR, Chambless LE, Ballantyne CM, Coresh J, Heiss G, Wu KK, et al. An assessment of incremental coronary risk prediction using C-reactive protein and other novel risk markers: the atherosclerosis risk in communities study. *Arch Intern Med*. 2006;166(13):1368-73.
- 208 Gerszten RE, Garcia-Zepeda EA, Lim YC, Yoshida M, Ding HA, Gimbrone MA Jr, et al. MCP-1 and IL-8 trigger firm adhesion of monocytes to vascular endothelium under flow conditions. *Nature*. 1999;398(6729):718-23.
- 209 Kern PA, Saghizadeh M, Ong JM, Bosch RJ, Deem R, Simsolo RB. The expression of tumor necrosis factor in human adipose tissue. Regulation by obesity, weight loss, and relationship to lipoprotein lipase. *J Clin Invest*. 1995;95(5):2111-9.
- 210 van Dielen FM, van't Veer C, Schols AM, Soeters PB, Buurman WA, Greve JW. Increased leptin concentrations correlate with increased concentrations of inflammatory markers in morbidly obese individuals. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2001;25(12):1759-66.

- 211 Hotta K, Funahashi T, Arita Y, Takahashi M, Matsuda M, Okamoto Y, et al. Plasma concentrations of a novel, adipose-specific protein, adiponectin, in type 2 diabetic patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000;20(6):1595-9.
- 212 Cnop M, Havel PJ, Utzschneider KM, Carr DB, Sinha MK, Boyko EJ, et al. Relationship of adiponectin to body fat distribution, insulin sensitivity and plasma lipoproteins: evidence for independent roles of age and sex. *Diabetologia.* 2003;46(4):459-69.
- 213 Patel L, Buckels AC, Kinghorn IJ, Murdock PR, Holbrook JD, Plumpton C, et al. Resistin is expressed in human macrophages and directly regulated by PPAR gamma activators. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003;300(2):472-6.
- 214 Zhang MH, Na B, Schiller NB, Whooley MA. Association of resistin with heart failure and mortality in patients with stable coronary heart disease: data from the heart and soul study. *J Card Fail.* 2011;17(1):24-30.
- 215 Perkovic V, Verdon C, Ninomiya T, Barzi F, Cass A, Patel A, et al. The relationship between proteinuria and coronary risk: a systematic review and meta-analysis. *PLoS Med.* 2008;5(10):e207.
- 216 The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study: design and objectives. The ARIC investigators. *Am J Epidemiol.* 1989;129(4):687-702.

- 217 Victor RG, Haley RW, Willett DL, Peshock RM, Vaeth PC, Leonard D, et al. The Dallas Heart Study: a population-based probability sample for the multidisciplinary study of ethnic differences in cardiovascular health. *Am J Cardiol.* 2004;93(12):1473-80.
- 218 Folsom AR, Nambi V, Pankow JS, Tang W, Farbaksh K, Yamagishi K, et al. Effect of 9p21 genetic variation on coronary heart disease is not modified by other risk markers. The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *Atherosclerosis.* 2012;224(2):435-9.
- 219 Assimes TL, Knowles JW, Basu A, Iribarren C, Southwick A, Tang H, et al. Susceptibility locus for clinical and subclinical coronary artery disease at chromosome 9p21 in the multi-ethnic ADVANCE study. *Hum Mol Genet.* 2008;17(15):2320-8.
- 220 Doria A, Wojcik J, Xu R, Gervino EV, Hauser TH, Johnstone MT, et al. Interaction between poor glycemic control and 9p21 locus on risk of coronary artery disease in type 2 diabetes. *JAMA.* 2008;300(20):2389-97.
- 221 Huang HY, Thuita L, Strickland P, Hoffman SC, Comstock GW, Helzlsouer KJ. Frequencies of single nucleotide polymorphisms in genes regulating inflammatory responses in a community-based population. *BMC Genet.* 2007;8:7.
- 222 Asifa GZ, Liaquat A, Murtaza I, Kazmi SA, Javed Q. Tumor necrosis factor-alpha gene promoter region polymorphism and the risk of coronary heart disease. *TheScientificWorldJournal.* 2013;2013:203492.

- 223 Cho HC, Yu G, Lee MY, Kim HS, Shin DH, Kim YN. TNF- α polymorphisms and coronary artery disease: association study in the Korean population. *Cytokine*. 2013;62(1):104-9.
- 224 Zhao Y, Li Z, Zhang L, Zhang Y, Yang Y, Tang Y, et al. The TNF-alpha -308G/A polymorphism is associated with type 2 diabetes mellitus: an updated meta-analysis. *Mol Biol Rep*. 2014;41(1):73-83.
- 225 Kempf K, Haltern G, Fth R, Herder C, Mller-Scholze S, Glker H, et al. Increased TNF-alpha and decreased TGF-beta expression in peripheral blood leukocytes after acute myocardial infarction. *Horm Metab Res*. 2006;38(5):346-51.
- 226 Savji N, Rockman CB, Skolnick AH, Guo Y, Adelman MA, Riles T, et al. Association between advanced age and vascular disease in different arterial territories: a population database of over 3.6 million subjects. *J Am Coll Cardiol*. 2013;61(16):1736-43.
- 227 Young CE, Karas RH, Kuvin JT. High-density lipoprotein cholesterol and coronary heart disease. *Cardiol Rev*. 2004;12(2):107-19.
- 228 Baigent C, Keech A, Kearney PM, Blackwell L, Buck G, Pollicino C, et al. Efficacy and safety of cholesterol-lowering treatment: prospective meta-analysis of data from 90,056 participants in 14 randomised trials of statins. *Lancet*. 2005;366(9493):1267-78.