Daniela Andraus de Figueiredo Ferrarezi

**Variações alélicas no gene do receptor da
vitamina D (*VDR*) e risco de doença arterial
coronariana em pacientes diabéticos tipo 2**

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

Programa de: Endocrinologia

Orientadora: Profa. Dra. Maria Lúcia Cardillo Corrêa Giannella

São Paulo

2011

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Ferrarezi, Daniela Andraus de Figueiredo

Variações alélicas no gene do receptor da vitamina D (*VDR*) e risco de doença arterial coronariana em pacientes diabéticos tipo 2 / Daniela Andraus de Figueiredo Ferrarezi. -- São Paulo, 2011.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Endocrinologia.

Orientadora: Maria Lúcia Cardillo Corrêa Gianella.

Descritores: 1.Doença da artéria coronariana 2.Diabetes mellitus tipo 2
3.Receptores de calcitriol 4.Polimorfismo genético

USP/FM/DBD-018/11

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Edson de Figueiredo e Evellin Andraus de Figueiredo, pelo incentivo e apoio constante desde o início da minha formação, ao meu marido, Marcelo, pela paciência e compreensão e ao meu filho Davi de 3 anos pelos maravilhosos momentos de risadas e afeto.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador franco-brasileiro no INSERM, Prof. Dr. Gilberto Velho, agradeço primeiramente pela oportunidade de realizar este estudo, pela valiosa orientação durante esses anos de convivência durante o estágio em Paris ou por email, e principalmente por alimentar ainda mais a minha curiosidade e vontade de pesquisar. Agradeço por essa oportunidade única e por sua paciência, compreensão e profissionalismo.

A minha orientadora na FMUSP, Profa. Dra Maria Lúcia Cardillo Corrêa Giannella, pela disponibilidade dispensada e pelas sugestões preciosas para a concretização deste projeto. Gostaria muito de agradecer por sua compreensão, incentivo e carinho na realização deste projeto. Admiro sua capacidade de raciocínio, sabedoria e capacidade de administrar seu tempo, apesar dos seus vários compromissos e preocupações.

Ao diretor da unidade 695 do INSERM, professor Dr. Michel Marre por me aceitar em seu serviço e pela oportunidade de desfrutar de sua equipe de trabalho.

Ao colega Prof. José Timsit pela ajuda na realização deste projeto.

Ao meu colega Nadir Cheurfa, uma pessoa inteligente, alegre, sempre atarefado, com quem convivi intensamente no “labo” em Paris e que me ensinou tudo de prática em laboratório, desde a higiene, organização necessárias para o sucesso das manipulações, até os programas sofisticados de análise e interpretação dos dados. Obrigado, por me ajudar a mexer no meu MAC, pelas dúvidas do correio, enfim, pela paciência, pela amizade e pelo aprendizado científico e cultural.

Je vous souhaite ainsi qu'à votre famille beaucoup de bien

A colega Naïma Bellili Muñoz, por sua ajuda fundamental na finalização do projeto. **Je vous adresse toute mon amitié.**

Aos colegas do laboratório em Paris, Nathalie Emery, Roberte Aubert, Frédéric Fumeron, Suriya Maimaitiming, Riphed Jasiri, Franck Pean, Guilherme Brenner, Isabelle Porchay, e Miriam Million. Obrigado pelo esforço em compreender o meu francês, pela companhia nos cafezinhos acompanhados de galette, madelaines e pain aux olives...

Merci beaucoup à vous tous !

Dr. Alfredo Halpern, agradeço pelos anos de aprendizado no ambulatório de obesidade. Agradeço por ter me apresentado para a Malu e dessa maneira possibilitar que eu continuasse, ou melhor, recomeçasse o meu projeto de pesquisa. Admiro sua simplicidade, generosidade e alegria.

Dra Sandra Villares, agradeço por acreditar em mim, por me sacudir quando eu precisava e por estimular o meu raciocínio científico. Obrigada por sua amizade e confiança.

Ao colega André Reis, agradeço pela preocupação com as minhas dificuldades, pela disposição e atenção.

Aos meus queridos professores da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo, Dr. Osmar Monte, Dra. Nilza Scalissi, Dr. João Eduardo Nunes Salles, Dr. Carlos Longui e Dr. Luis Eduardo Calliari que participaram do início da minha formação e que me despertaram o interesse científico. Obrigado, pelas ricas discussões nos ambulatórios e pelos agradáveis anos de convivência.

As colegas de residência Alê, Mari, Déa Japinha e Déa turca pela amizade, pelos momentos de discussão e descontração durante os anos de residência. Sucesso para todas nós!

Ao meu pai Edson que merece todo meu agradecimento e reconhecimento por me fortalecer ao longo de toda a vida com conselhos e ajuda na realização de todos os meus sonhos e objetivos. Você é um exemplo de que com dedicação e responsabilidade as coisas sempre dão certo.

A minha mãe Evellin, pelos conselhos pertinentes, pelas conversas na cozinha, por sempre me ajudar a organizar os pensamentos, por seu espírito realista e humano, enfim, por seu empenho incansável de ser mãe, companheira e amiga.

Ao meu marido Marcelo que me acompanhou intensamente nesta jornada. Obrigado pelo seu apoio, carinho, paciência, compreensão e por me ajudar a ser uma pessoa melhor a cada dia. Apesar de parecer “reativa”, sempre guardei seus conselhos no fundo do meu coração. Te amo muito.

Ao meu irmão Alexandre, obrigado por sua musicalidade que transforma os dias estressantes em momentos de descontração.

A minha cunhadinha Érica pela amizade e aos meus sobrinhos queridos Vini e Mari.

A minha irmã Camila que admiro por sua inteligência, criatividade e transparência. Obrigada pela companhia nas viagens para São Paulo e Paris... foi um mês muito especial.

Ao meu irmão caçula Edsinho, talvez o mais parecido comigo... batalhador, alegre, prestativo... um amigo para a vida toda.

A minha prima, meio irmã, Dri, sempre companheira e disposta a me ajudar.

Ao meu sobrinho João que me ajudou na realização das figuras, um “carinha” massa.... carinhoso, simples e feliz.

A minha prima Carol, pelo apartamento emprestado em São Paulo e pela companhia nos restaurantes paulistanos.

A minha sogrinha querida, Lígia, que me ajudou a cuidar do Davi nos finais de semana de estudo, sempre com disposição e amor.

A Cida, por sua atenção e disposição em me ajudar desde o início da pós-graduação, sua ajuda foi fundamental para a finalização deste projeto.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas, símbolos e siglas

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Resumo

Summary

1	Introdução.....	1
1.1	Diabetes mellitus tipo 2	2
1.2	Doença Cardiovascular e diabetes mellitus tipo 2	2
1.3	Aterosclerose	4
1.4	Genética das Complicações Macrovasculares	6
1.5	Sistema hormonal da vitamina D.....	8
1.5.1	Receptor da Vitamina D - VDR	11
1.5.2	Mecanismos de ação da vitamina D	15
1.6	Ações pleiotrópicas da vitamina D	16
1.6.1	Vitamina D e sistema cardiovascular	17
1.6.1.1	Efeitos indiretos da vitamina sobre o sistema cardiovascular	24
1.6.1.1.1	Vitamina D e hipertensão arterial	24
1.6.1.1.2	Vitamina D e dislipidemia	27
1.6.1.1.3	Vitamina D e diabetes mellitus tipo 2	28
1.6.1.1.4	Vitamina D e obesidade	29
1.6.1.2	Efeitos diretos da vitamina D sobre o sistema cardiovascular	31
1.6.1.2.1	Efeitos sobre os cardiomiócitos.....	31
1.6.1.2.2	Efeitos sobre as células da parede vascular e macrófagos	33
1.6.1.2.2.1	Efeitos antiproliferativos.....	33
1.6.1.2.2.2	Efeitos inibitórios sobre a calcificação vascular	34
1.6.1.2.2.3	Efeitos Antitrombóticos	35
1.6.1.2.2.4	Efeitos antiinflamatórios.....	37
1.6.1.2.2.5	Modulação do sistema das metaloproteinases e de seus inibidores..	39

1.7	Epidemiologia genética	40
1.7.1	Definição de polimorfismo	41
1.7.2	Estudos de associação em análises genéticas	42
1.7.3	Escolha do gene candidato	47
1.8	Gene do receptor da vitamina D	48
1.8.1	Variações alélicas no gene <i>VDR</i> e doença cardiovascular	48
2	Objetivos	52
3	Métodos	54
3.1	Pacientes e características fenotípicas	55
3.1.1	Coorte prospectiva DIABHYCAR	55
3.1.2	Estudo transversal - Coorte Necker-Cochin (NCH)	60
3.2	Protocolo Experimental	62
3.2.1	Extração do DNA	62
3.2.2	Metodologia de Análise Molecular	62
3.2.2.1	PCR em tempo real: técnica TaqMan	62
3.3	Análise Estatística	67
4	Resultados	69
4.1	Estudo Prospectivo - Coorte Diabhycar	70
4.1.1	Genótipos <i>VDR</i> e prevalência inicial de doença arterial coronariana	70
4.1.2	Incidência de doença arterial coronariana no seguimento em relação ao genótipo <i>VDR</i>	72
4.1.3	Prevalência total de doença arterial coronariana ao final do estudo - haplótipos <i>VDR</i>	77
4.1.4	Genótipo <i>VDR</i> e fenótipos intermediários	80
4.2	Estudo Transversal – Coorte NCH	81
4.2.1	Prevalência de doença arterial coronariana em relação aos genótipos e haplótipos <i>VDR</i>	81
5	Discussão	85
6	Conclusão	92
7	Anexo	95
8	Referências	97

LISTA DE ABREVIATURAS

Dr. Doutor

Dra. Doutora

Et al. E outros

Prof. professor

Profa. Professora

Vs. Versus

LISTA DE SÍMBOLOS

β . beta

Kb. Kilobase

Kd. Kilodalton

Kg. Quilo

Kg/m^2 . Quilo por metro quadrado

<. Menor

>. Maior

$\geq$. Maior ou igual

$\leq$. Menor ou igual

mg. miligramas

mg/ dL. Miligramas por decilitro

mg/L. Miligramas por litro

ng/mL. Nanogramas por mililitro

mg/24h. Miligramas em 24 horas

mL/min. Mililitro por minuto

mmHg. Milímetros de mercúrio

ng/ μ L Nanogramas por microlitro

μ L. Microlitro

μ M. micromolar

%. Percentagem

UI. Unidades internacionais

LISTA DE SIGLAS

A. Adenina

ADO. Antidiabéticos orais

AGEs. Produtos finais de glicação avançada

AMPc. Adenosina monofosfato

APC. Células apresentadoras de antígenos

Apo. Apolipoproteína

AVC. Acidente vascular cerebral

CE. Células endoteliais

C. Citosina

CPK. Creatinofosfoquinase

CRE. Elemento regulador da adenosina monofosfato

CREB. Proteína de ligação ao elemento de resposta da adenosina monofosfato

DAC. Doença arterial coronariana

DIABHYCAR. DIABetes não insulino dependente, HYpertensão, microalbuminúria, ou proteinúria, eventos CARdiovasculares e ramipril

DBD. Domínio de ligação ao DNA

DBP. Proteína transportadora da vitamina D

DM 1. Diabetes mellitus tipo 1

DM2. Diabetes mellitus tipo 2

DNA. Ácido desoxirribonucléico

DCV. Doença cardiovascular

DRC. Doença renal crônica

EUA. Excreção urinária de albumina

FGF23. Fator de crescimento dos fibroblastos 23

FRET. *Fluorescence ressonance energy transfer*

GLUT 4. Transportador de glicose-4

G.Guanina

HAS. Hipertensão arterial sistêmica

HbA1c. Hemoglobina glicada

HDL. Lipoproteína de alta densidade

HMG-CoA. Hidroxi-metilglutaril coenzima A redutase

HPFS = *Health Professionals Follow-up Study*

HR. *Hazard ratio*

IAM. Infarto agudo do miocárdio

IC. Intervalo de confiança

IDL. Lipoproteína de densidade intermediária

IE. Indivíduos expostos

IECA. Inibidor da enzima conversora da angiotensina

IL- Interleucinas

IMC. Índice de massa corpórea

IO. Indivíduo não expostos

INSERM. Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale

JNK. Cinase c-jun N-terminal

LBD. Domínio de ligação ao ligante

LD. Desequilíbrio de ligação

LDL. Lipoproteína de baixa densidade

LURIC = *Ludwigshafen Risk and Cardiovascular Health Cohort*

VLDL. Lipoproteína de muito baixa densidade

M-CSF. Fator estimulador de colônias de macrófagos

MMP. Metaloproteinases de matriz

MS. Morte súbita

mRNA. RNA mensageiro

mVDR. Receptor de membrana da vitamina D

N. número

NCBI. *National Center of Biotechnology Information*

NCH. *Necher Cochlin*

NF κ B. Fator nuclear kappa B

NHANES III = *Third National Health and Nutrition Examination Survey*

NS. Não significativa

OR. *Odds ratio*

PAD. Pressão arterial diastólica

PAI1. Inibidor do ativador do plasminogênio 1

PAS. Pressão arterial sistólica

PCR. Reação em cadeia da polimerase

PKA. Proteína cinase A

PKC. Proteína cinase C

PNA. Peptídeo natriurético atrial

PNB. Peptídeo natriurético cerebral

PPAR γ . Receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama

PTH. Paratormônio

RFLP. Polimorfismos do comprimento dos fragmentos de restrição

RM. Revascularização do miocárdio

RNA. Ácido ribonucleico

RR. Risco relativo

RXR. Receptor X do ácido retinóico

SNP. Polimorfismo de um único nucleotídeo

SR-A1. Receptor *scavenger*

SRAA. Sistema renina-angiotensina-aldosterona

TG. Triglicérides

T. Timina

TIMP. Inibidor das metaloproteinases

Tm. Tempo de dissociação

UVB. Raios ultravioleta B

VDR. Receptor da vitamina D

VDREs. Elementos responsivos a vitamina D

VNTR. *Variable number of tandem repeat*

WHI. *Women's Health Initiative*

Zn. zinco

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Fontes e metabolismo da vitamina D.	10
Figura 2.	Representação esquemática dos domínios funcionais do <i>VDR</i> humano.	13
Figura 3.	Representação esquemática do mecanismo de ação do receptor nuclear da vitamina D.	14
Figura 4.	Sistema endócrino da vitamina D e o sistema renina angiotensina aldosterona (SRAA)..	26
Figura 5.	Efeitos diretos da $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ sobre as células da parede vascular e os cardiomiócitos	36
Figura 6.	Representação esquemática da estrutura de exons e introns do gene <i>VDR</i> e o posicionamento dos polimorfismos estudados.	49
Figura 7.	Figura representativa da metodologia de reação em cadeia da polimerase pela técnica TaqMan.....	64
Figura 8.	Gráfico representativo da leitura da fluorescência.....	65
Figura 9.	Curva de sobrevida para a coorte Diabhykar durante o seguimento em relação ao genótipo BsmI (Curva de Kaplan-Meier).....	75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Estudos avaliando o status de vitamina D e risco de doença cardiovascular.....	18
Tabela 2.	Características demográficas, clínicas e laboratoriais dos pacientes da coorte DIABHYCAR ao início do estudo	58
Tabela 3.	Estratificação dos casos de doença arterial coronariana (DAC) durante o seguimento de acordo com o <i>status</i> de DAC ao início do estudo.....	59
Tabela 4.	Características demográficas, clínicas e laboratoriais dos pacientes da coorte Necker-Cochin ao início do estudo.....	60
Tabela 5.	Sequência dos iniciadores utilizados para amplificação dos fragmentos que contêm os polimorfismos avaliados.	65
Tabela 6.	Preparação dos reagentes para uma reação em cadeia da polimerase pela técnica TaqMan	66
Tabela 7.	Características demográficas, clínicas e laboratoriais dos pacientes da coorte Diabhycar de acordo com o status da doença arterial coronariana ao início do estudo.....	70
Tabela 8.	Prevalência de doença arterial coronariana nos pacientes da coorte Diabhycar de acordo com o genótipo do gene <i>VDR</i> ao início o estudo.....	71
Tabela 9.	Frequência dos genótipos do gene <i>VDR</i> nos pacientes da coorte Diabhycar em relação ao <i>status</i> inicial da doença arterial coronariana.....	72
Tabela 10.	Características demográficas, clínicas e laboratoriais dos pacientes da coorte Diabhycar ao início do estudo em relação ao <i>status</i> da doença arterial coronariana no seguimento.	73

Tabela 11. Incidência de doença arterial coronariana nos pacientes da coorte Diabhycar no seguimento de acordo com o genótipo do gene <i>VDR</i>	74
Tabela 12. Frequência dos genótipos do gene <i>VDR</i> e incidência de doença arterial coronariana nos pacientes da coorte Diabhycar no seguimento	76
Tabela 13. Características demográficas, clínicas, e laboratoriais dos pacientes da coorte Diabhycar no início do estudo em relação à prevalência total de doença arterial coronariana ao final do estudo (basal + seguimento)	78
Tabela 14. Frequência dos genótipos do gene <i>VDR</i> e prevalência total de doença arterial coronariana na coorte Diabhycar ao final do estudo (basal + seguimento)	79
Tabela 15. Características demográficas, clínicas e laboratoriais dos pacientes da coorte DIABHYCAR ao início do estudo de acordo com o genótipo <i>Bsml</i>	80
Tabela 16. Características demográficas, clínicas e laboratoriais dos pacientes da coorte NCH em relação ao status da doença arterial coronariana	82
Tabela 17. Prevalência de doença arterial coronariana na coorte NCH de acordo com os genótipos do gene <i>VDR</i>	83
Tabela 18. Frequências dos genótipos na coorte NCH em relação ao <i>status</i> de doença arterial coronariana.	83

RESUMO

Ferrarezi DAF. *Variações alélicas no gene do receptor da vitamina D (VDR) e risco de doença arterial coronariana em pacientes diabéticos tipo 2* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2010. 118p.

A doença cardiovascular (DCV) é a principal causa de mortalidade e morbidade em pacientes portadores de diabetes mellitus tipo 2 (DM 2), estando associada com mais de 80% das mortes nesses pacientes. Portadores de DM 2 têm um risco três vezes maior em relação à indivíduos não diabéticos de desenvolver aterosclerose e suas complicações clínicas como infarto agudo do miocárdio (IAM), acidente vascular cerebral (AVC) e doença vascular periférica. O sistema endócrino da vitamina D regula a diferenciação e a proliferação de vários tipos celulares, além de possuir propriedades antiinflamatórias e antiangiogênicas. Assim, a vitamina D poderia ter um papel protetor contra as doenças degenerativas crônicas como a DCV. Estudos epidemiológicos sugerem que a deficiência de vitamina D está associada com doença arterial coronariana (DAC). As ações da $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ são mediadas pela sua ligação ao seu receptor nuclear (VDR). O objetivo do presente estudo foi investigar as associações de polimorfismos de um único nucleotídeo (SNPs) no gene VDR com DAC em duas coortes de pacientes portadores de DM 2. Um total de 3.137 pacientes provenientes do estudo prospectivo DIABHYCAR (14,8% de incidência de DAC no seguimento) foi estudado. Uma outra coorte (NECKER - COCHIN) independente composta de 713 indivíduos portadores de DM 2 (32,3% dos quais tinham DAC) também foi avaliada. Três SNPs no gene VDR foram genotipados: rs1544410 (BsmI), rs7975232 (ApaI) e rs731236 (TaqI). Uma associação do alelo A de BsmI com casos incidentes de DAC (*Hazard Ratio* = 1,16; IC 95% = 1,05-1,29; $p = 0,002$) foi observada, assim como associações do alelo A de BsmI ($p = 0,01$) e do alelo C de TaqI ($p = 0,04$) com casos de DAC no início do estudo. O haplótipo AAC (BsmI / ApaI / TaqI) foi significativamente associado com aumento da prevalência de DAC no final do estudo, em comparação com o haplótipo GCT (*Odds Ratio* = 1,12; IC 95% = 1,02-1,28; $p = 0,04$). Associações do alelo A de ApaI ($p = 0,009$) e do alelo C de TaqI ($p = 0,05$) com DAC foram observadas no estudo transversal da coorte Necker - Cochin. Os resultados obtidos com os haplótipos também foram replicados nessa coorte (*Odds Ratio* = 1,33; IC 95% = 1,03-1,73; $p = 0,03$). Em conclusão, o haplótipo composto pelo alelo raro de BsmI, pelo alelo frequente de ApaI e pelo alelo raro de TaqI (AAC) foi associado a um maior risco de DAC em pacientes portadores de DM 2. Este efeito foi independente dos efeitos de outros fatores de risco cardiovasculares.

Descritores: 1.Doença da artéria coronariana 2.Diabetes mellitus tipo 2
3.Receptores de calcitriol 4.Polimorfismo genético

SUMMARY

Ferrarezi DAF. *Allelic variations in the vitamin D receptor (VDR) gene are associated with increased risk of coronary artery disease in type 2 diabetic subjects* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2010. 118p.

Cardiovascular (CVD) disease is the leading cause of mortality and morbidity in patients with type 2 diabetes being associated with up to 80% of the deaths in these patients. Diabetic patients have a 3-fold higher risk than non diabetic individuals for developing atherosclerosis and its clinical complications such as myocardial infarction, stroke, and peripheral vascular disease. The vitamin D endocrine system regulates the differentiation and replication of several cell types and has antiangiogenic and antiinflammatory properties. Thus, it could have a protective role against chronic degenerative disorders such as CVD. Epidemiological studies suggested that vitamin D deficiency is associated with coronary heart disease. Actions of vitamin D are mediated by the binding of 1,25-(OH)₂D₃ to a specific cytosolic/nuclear vitamin D receptor (VDR). The present study investigated associations of *VDR* gene variants with coronary artery disease (CAD) in two cohorts of type 2 diabetic subjects. A total of 3,137 subjects participating in the 6-year prospective DIABHYCAR study (14.8% of CAD incidence at follow-up) were evaluated. An independent, hospital-based cohort (NECKER-COCHIN) of 713 diabetic subjects, 32.3% of whom had CAD, was also studied. Three single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the *VDR* gene were genotyped: rs1544410 (*BsmI*), rs7975232 (*Apal*) and rs731236 (*TaqI*). In the DIABHYCAR cohort, an association of the A-allele of *BsmI* with incident cases of CAD was found (Hazard Risk = 1.16; 95% C.I. = 1.05-1.29; p = 0.002). Associations were also observed for the A- allele of *BsmI* (p=0.01) and C-allele of *TaqI* (p = 0.04) polymorphic variants with baseline cases of CAD. The AAC haplotype (*BsmI*/*Apal*/*TaqI*) was significantly associated with increased CAD prevalence at the end of the study as compared with the GCT haplotype (Odds Ratio = 1.12; 95% C.I. = 1.02-1.28; p = 0.04). Associations of *Apal* (p = 0.009) and *TaqI* (p = 0.05) alleles with CAD were observed in a cross-sectional study of the NECKER-COCHIN cohort. The haplotype results were also replicated (Odds ratio = 1.33; 95% C.I. = 1.03 - 1.73; p = 0.03). In conclusion, the haplotype composed by the minor allele of *BsmI*, the major allele of *Apal* and the minor allele of *TaqI* (AAC) was associated with increased risk of CAD in type 2 diabetic patients. This effect was independent from effects of other known cardiovascular risk factors.

Descriptors: 1.Coronary artery disease 2.Type 2 diabetes 3.Calcitriol receptors 4.Polymorphism genetic

1 Introdução

1.1 Diabetes mellitus tipo 2

O diabetes mellitus tipo 2 (DM 2) é considerado uma das doenças crônicas mais comuns em quase todos os países do mundo. Estima-se que exista 285 milhões de adultos portadores de diabetes (DM) no mundo, e este número continuará a aumentar em consequência do crescimento e envelhecimento da população, da urbanização e das elevadas prevalências de obesidade e sedentarismo ¹. O DM 2 é responsável por 80 a 90% de todos os casos de DM e caracteriza-se por uma combinação de resistência periférica à ação insulínica nos adipócitos e, principalmente, no músculo esquelético; deficiência de secreção insulínica pelas células β pancreáticas e aumento da produção hepática de glicose resultante da resistência insulínica no fígado ².

1.2 Doença Cardiovascular e diabetes mellitus tipo 2

A doença cardiovascular (DCV) é a principal causa de morbidade e mortalidade em pacientes com DM 2 estando associada com aproximadamente 80% das mortes desses pacientes ³. Os pacientes portadores de DM 2 têm um risco três vezes maior em relação aos

indivíduos não diabéticos de desenvolver aterosclerose e suas complicações clínicas como infarto agudo do miocárdio (IAM), acidente vascular cerebral (AVC) e doença arterial periférica ⁴. O DM 2 comumente faz parte da síndrome da resistência insulínica ou síndrome plurimetabólica, que se caracteriza por obesidade abdominal, resistência à insulina e hiperinsulinemia, hipertrigliceridemia, diminuição das lipoproteínas de alta densidade (HDL) e hipertensão arterial sistêmica (HAS). Essas disfunções metabólicas encontradas nos pacientes com DM 2 levam a um aumento do estresse oxidativo, disfunção endotelial, aumento da formação dos produtos finais de glicação avançada, inflamação crônica e alterações da coagulação implicando assim em risco aumentado de DCV. Entretanto, o DM 2 parece ser um fator de risco independente para o desenvolvimento da DCV ⁵. Os mecanismos e as causas do risco cardiovascular aumentado observado em pacientes com DM 2 permanecem incertos ⁶, porém as disfunções metabólicas associadas com o DM 2 têm sido propostas como tendo um papel na aceleração do processo aterosclerótico, que ocorre em uma idade mais precoce e avança mais rapidamente para eventos cardiovasculares clínicos nos pacientes diabéticos. Os pacientes portadores de DM também são propensos ao desenvolvimento de trombose arterial, devido à ativação persistente de vias trombogênicas e à fibrinólise reduzida ^{7,8}. Essa combinação de doença arterial aumentada e meio pró-trombótico é uma importante causa subjacente de doença coronariana isquêmica aguda. Além disso, a doença coronariana no DM é frequentemente difusa, com aumento do número de vasos afetados e maior incidência de estenose moderada ⁹.

1.3 Aterosclerose

Aterosclerose é uma doença inflamatória, progressiva que ocorre devido ao acúmulo de lipídios, elementos do tecido conjuntivo, células e fragmentos que resultam no espessamento focal e assimétrico da camada mais interna da artéria, a camada íntima ¹⁰. A interação de mecanismos imunes, metabólicos e hemodinâmicos está presente nos estágios iniciais e finais da aterosclerose.

Os macrófagos repletos de lipídios são chamados de células espumosas e são o principal componente das estrias gordurosas, lesões macroscópicas iniciais da aterosclerose. Essas lesões iniciais estão presentes nos indivíduos jovens, não são clinicamente significativas e podem regredir, entretanto, elas também são as precursoras de lesões mais avançadas. Alguns mediadores da inflamação estimulam a migração e proliferação das células musculares lisas da camada média arterial. Estas, ao migrarem para a íntima, passam a produzir não só citocinas e fatores de crescimento, como também matriz extracelular que formará parte da capa fibrosa da placa aterosclerótica.

O endotélio, um epitélio simples e plano constituído de uma camada única de células que recobre a face interna dos vasos sanguíneos, atua como uma barreira de permeabilidade seletiva ao intercâmbio de nutrientes entre o plasma e o interstício celular, regulando ao mesmo tempo o transporte de substâncias entre ambos e podendo regular a trombose, inflamação, tônus vascular e remodelamento vascular. Entre as importantes

forças físicas que agem sobre as células endoteliais (CE), a tensão de cisalhamento de fluidos afeta a morfologia das CE. As células das regiões de ramificação arterial ou curvatura, onde o fluxo sanguíneo é perturbado, mostram aumento da permeabilidade a macromoléculas, tais como as lipoproteínas de baixa densidade (LDL), e são locais preferenciais para a formação de lesões.

A formação da placa aterosclerótica inicia-se com a agressão ao endotélio vascular devida a diversos fatores de risco como elevação de lipoproteínas aterogênicas (LDL, IDL, VLDL, remanescentes de quilomícrons), HAS, DM e tabagismo. A infiltração e retenção de LDL na camada íntima da artéria iniciam uma resposta inflamatória na parede arterial. Retidas, as partículas de LDL estimulam as células endoteliais a produzir inúmeras moléculas proinflamatórias, incluindo as moléculas de adesão e fatores de crescimento como o fator estimulador de colônias de macrófagos (M-CSF). Além disso, em condições de hiperglicemia, a formação dos produtos finais de glicação avançada (AGEs) pode contribuir para a inflamação e para a produção de espécies reativas de oxigênio.

A placa aterosclerótica plenamente desenvolvida é constituída por elementos celulares, componentes da matriz extracelular e núcleo lipídico. As placas estáveis caracterizam-se por predomínio de colágeno, organizado em capa fibrosa espessa, escassas células inflamatórias e núcleo lipídico de proporções menores enquanto as placas instáveis apresentam atividade inflamatória intensa, especialmente nas suas bordas laterais, com grande atividade proteolítica, núcleo lipídico proeminente e capa fibrosa fina.

Nesses locais são particularmente abundantes células T, macrófagos e mastócitos que produzem citocinas inflamatórias e proteases, especialmente as metaloproteinases de matriz (MMPs). As MMPs contribuem para o *turnover* da matriz extracelular e sua atividade é contrabalanceada pelos inibidores teciduais naturais das MMPs (TIMPs). Vários membros dessa família de enzimas estão presentes na placa e podem degradar a matriz extracelular, o que resulta em enfraquecimento da capa fibrosa, ativação das células no interior do núcleo e transformação de uma placa estável em uma estrutura vulnerável e instável que pode se romper, provocando trombose e síndrome coronária aguda ¹⁰.

1.4 Genética das Complicações Macrovasculares

A aterosclerose é uma condição complexa que envolve um grande número de processos patofisiológicos e a suscetibilidade para seu desenvolvimento é determinada por fatores de risco influenciados tanto por fatores genéticos quanto por fatores ambientais. Dentro de uma população, a heritabilidade da aterosclerose (a fração da doença explicada pela genética) é elevada na maioria dos estudos, com frequência superior a 50%. Por outro lado, estudos de migração populacional mostram que o ambiente explica grande parte da variação na incidência da doença entre as populações ^{11,12}.

Acridita-se que centenas de genes, no mínimo, estejam envolvidas na suscetibilidade para a DCV ¹¹, caracterizando-a como uma condição poligênica. Assim, diferentemente das doenças monogênicas, nas quais uma mutação relativamente rara em um único gene confere alto risco para o desenvolvimento da doença, a DCV muito provavelmente resulta de variantes alélicas comuns em um grande número de genes que interagem entre si, que isoladamente determinam um risco modesto e que sofrem influências das condições metabólicas, hemodinâmicas e ambientais ^{13,14}.

A história familiar é o principal fator de risco para DCV e ambos os padrões de heranças, mendeliana e complexa estão envolvidas na transmissão da doença ¹⁵. Defeitos monogênicos levando a um quadro de aterosclerose acelerada têm sido descritos, mas eles são responsáveis por somente uma pequena percentagem de pacientes com DCV.

Estudos na população em geral demonstram que a variabilidade genética que afeta o metabolismo lipídico, a pressão arterial, os mecanismos hemodinâmicos, a coagulação sanguínea e a inflamação têm impacto no risco cardiovascular ¹⁶. Acridita-se que os fatores genéticos associados com as complicações macrovasculares nos pacientes diabéticos sejam os mesmos que aqueles associados com a aterosclerose e suas complicações clínicas em indivíduos não diabéticos. A aceleração da aterosclerose ocorreria secundariamente à deficiência da ação insulínica, hiperglicemia e outros defeitos metabólicos ¹⁷.

1.5 Sistema hormonal da vitamina D

Os seres humanos obtêm a vitamina D a partir da exposição solar, da dieta e de suplementos alimentares. As principais fontes alimentares de vitamina D são os produtos de origem animal, particularmente os peixes gordos como o salmão, sardinhas, cavala e arenque, e o óleo de fígado de bacalhau, atum e tubarão. Cogumelos desidratados também contêm quantidades variáveis de vitamina D₂. Alimentos fortificados com vitamina D naturalmente são limitados.

Embora sejam conhecidas cinco formas de vitamina D (D₁ a D₅), as vitaminas D₂ e D₃ são as formas mais estudadas. A vitamina D₂ (ergocalciferol) é produzida após a radiação ultravioleta (UV-B) do esterol vegetal ergosterol, e pode ser consumida em suplementos alimentares ou alimentos fortificados. A forma endógena da vitamina D, a vitamina D₃ (colecalfiferol) é sintetizada nos queratinócitos da epiderme a partir de um metabólito do colesterol, o 7-desidrocolesterol. Sob a influência da luz solar, o 7-desidrocolesterol é fotoconvertido a pré-vitamina D₃. A seguir, a pré-vitamina D₃ é convertida à vitamina D₃ (colecalfiferol) em reação acionada pela energia térmica, representada pelos raios solares. O excesso de exposição aos raios solares degrada a pré-vitamina D₃ e a vitamina D₃ em fotoprodutos inativos. As vitaminas D₂ e D₃ provenientes da dieta são incorporadas aos quilomícrons e transportadas pelo sistema linfático para a circulação venosa. A vitamina D produzida na pele ou ingerida na dieta pode ser armazenada e em seguida,

liberada partir das células adiposas. A vitamina D proveniente da dieta e da pele requer um metabolismo adicional para atingir a forma ativa. Ela é transportada para o fígado por uma proteína de ligação da vitamina D, onde é hidroxilada pela enzima 25-hidroxilase para produzir 25-hidroxivitamina D (25-OH-D₃). A 25(OH)D₃ é transportada pela proteína de ligação da vitamina D para reservatórios na gordura corporal, onde constitui a principal forma de armazenamento da vitamina D. Por esta razão, as concentrações séricas de 25(OH)D₃ são a melhor medida disponível das reservas corporais de vitamina D.

A etapa de síntese final na ativação da vitamina D ocorre no túbulo proximal do rim onde ela é hidroxilada novamente pela ação da enzima 1 α -hidroxilase, e dá origem a dois metabólicos; a 1,25(OH)₂D₃ e a 24,25(OH)₂D₃. A vitamina 1,25(OH)₂D₃ é a forma biologicamente ativa da vitamina D₃ (Figura 1). A atividade da 24,25(OH)₂D₃ é menos potente e representa, provavelmente, apenas um meio de inativar o excesso de vitamina D. Em seres humanos, cuja dieta é suplementada com ergocalciferol (vitamina D₂), a 1,25(OH)₂D₃ formada no rim será uma mistura de 1,25(OH)₂D₂ e 1,25(OH)₂D₃, equipotentes no receptor. Ao contrário das etapas anteriores no metabolismo da vitamina D, esta etapa final é finamente controlada. Os fatores mais importantes na regulação da atividade da enzima sintetizadora 1- α hidroxilase são o hormônio paratormônio (PTH), a ingestão alimentar de fósforo, o cálcio sérico, a própria concentração de 1,25(OH)₂D₃ e o fator de crescimento dos fibroblastos 23 (FGF23) produzido pelos osteócitos¹⁸⁻²¹.

A $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ é também produzida a partir de seu precursor, a $25(\text{OH})\text{D}_3$ pela ação local da $1-\alpha$ hidroxilase em vários tecidos extra-renais, incluindo o trato gastrointestinal, pele, vasos, miocárdio e placenta. Esse achado sugere que a síntese autócrina e parácrina da $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ contribua para a fisiologia normal, principalmente na mediação dos potentes efeitos da vitamina D sobre a imunidade adquirida e inata (macrófagos) ²².

Figura 1. Fontes e metabolismo da vitamina D. UVB= raios ultravioleta B

A dose diária atualmente recomendada de vitamina D é de 400UI, porém, alguns autores têm recomendado uma dose diária de vitamina D entre 1.000 a 2.000 UI para a maioria das pessoas conseguir manter concentrações plasmáticas de $25(\text{OH})_2\text{D}_3 \geq 30\text{ng/mL}$ ^{23,24}.

1.5.1 Receptor da Vitamina D - VDR

Quase todas as células nucleadas expressam o receptor da vitamina D (VDR), embora a magnitude de expressão seja bastante variável entre os diferentes tipos celulares. Esta presença universal dos receptores VDR demonstra o amplo espectro de atividades da vitamina D.

A vitamina D assim como os hormônios esteróides, tiroidianos e retinóides agem ligando-se a receptores nucleares, membros da superfamília dos receptores nucleares que têm a capacidade de se ligar diretamente ao ácido desoxirribonucleico (DNA) e regular a expressão de genes adjacentes, atuando assim como fatores de transcrição. A propriedade única dos receptores nucleares, que os diferencia de outras classes de receptores, é a habilidade de interagir diretamente e controlar a expressão do DNA. Estes receptores contêm um domínio de ligação a esteróides, um domínio de interação com outros membros da superfamília de receptores e um terceiro domínio de ligação ao DNA (DBD). Existe também uma pequena região entre o DBD e o domínio de ligação ao ligante (LBD), conhecida como dobradiça

(*hinge*), responsável pela translocação nuclear do receptor e importante para a flexibilidade do VDR permitindo sua ligação ao DNA através do DBD, bem como a interação do LBD com os co-ativadores.

O DBD está situado na porção central do receptor e é composto por dois segmentos estruturais conhecidos como dedos de zinco (Figura 2). O DBD entra em contato com uma sequência hexamérica de DNA, ou seja, uma sequência padrão de seis nucleotídeos específicos. Para a ligação de um complexo estável DNA-proteína, deve haver a formação de homo ou heterodímeros com um outro receptor nuclear a fim de que ocorra uma ligação eficiente ao DNA. Na maior parte dos casos o receptor que participa do heterodímero é o receptor X do ácido retinóico (RXR), o qual vai se ligar às sequências regulatórias específicas presente na região promotora dos genes responsivos à vitamina D. A modulação da expressão gênica não é, no entanto, mediada diretamente pela ligação do heterodímero VDR / RXR ao DNA, mas depende da capacidade deste dímero de recrutar complexos protéicos co-reguladores, em vez de ser silenciado por co-repressores (Figura 3). O sitio de ligação do VDR e VDR/RXR ao DNA é constituído por dois hexanucleotídeos separados por três pares de bases conhecidos como elementos responsivos à vitamina D (VDREs). O mRNA (RNA mensageiro) do *VDR* contém aproximadamente, 4.6kb, os quais traduzem uma proteína de 50 kd em humanos ²⁵.

Figura 2. Representação esquemática dos domínios funcionais do *VDR* humano. A/B= região aminoterminal; LBD= domínio de ligação ao ligante; DBD= domínio de ligação ao DNA; Zn=zinco. Fonte: Adaptado de Roger Bouillon (2008)

Figura 3. Representação esquemática do mecanismo de ação do receptor nuclear da vitamina D. A forma ativa da vitamina D ($1,25(\text{OH})_2\text{ D}_3$) está ligada à proteína transportadora da vitamina D (DBP) na circulação, ela atravessa a membrana celular, e se liga ao receptor da vitamina D (VDR). A vitamina D acoplada ao seu receptor forma um heterodímero complexo com o receptor X do ácido retinóico (RXR), se liga à sequência regulatória específica presente na região promotora de genes responsivos a vitamina D e altera a expressão gênica. RNA: ácido ribonucléico, RXR: receptor X do ácido retinóico. Fonte: Adaptado de Subba Reddy Vanga (2010)

1.5.2 Mecanismos de ação da vitamina D

Um amplo conjunto de estudos tem sido realizado para desvendar as vias moleculares envolvidas na ação biológica da $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. Recentemente, um estudo utilizando a técnica de imunoprecipitação de cromatina e sequenciamento gerou uma rede de ligação do receptor da vitamina D com todo o genoma, identificando mais de 200 genes que sofrem influência direta da vitamina D, cuja deficiência pode aumentar a suscetibilidade a várias doenças. Os autores encontraram 2.776 sítios de ligação para o receptor da vitamina D ao longo do genoma concentrados próximos a genes associados à suscetibilidade para doenças autoimunes, tais como esclerose múltipla, doença de Crohn, lúpus e artrite reumatóide, e para doenças neoplásicas, como a leucemia linfocítica crônica e o câncer colorretal ²⁶.

Inúmeros estudos indicam que a $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ regula, direta ou indiretamente, um grande número de genes (0,8-5% do genoma total) e que ela está envolvida em uma grande variedade de funções celulares incluindo a regulação do crescimento celular, reparo do DNA, diferenciação, apoptose, transporte de membrana, metabolismo, adesão celular e estresse oxidativo ²⁷.

A vitamina D exerce suas funções de duas maneiras: pela via de sinalização genômica e por vias não genômicas:

Vias Genômicas: são ativadas pela ligação hormônio / receptor intracelular específico da vitamina D (VDR). Estes receptores se ligam a sequências regulatórias bem definidas dos genes-alvo, modulando, portanto, a atividade transcripcional da região promotora.

Vias Não Genômicas: São vias que seriam ativadas supostamente pela ligação da vitamina D a um receptor de membrana não clássico (mVDR), levando a uma série de alterações intracelulares transitórias e rápidas (segundos a minutos) não dependentes de síntese protéica. Os efeitos definidos como não genômicos envolvem alterações transitórias no transporte transmembrana de íons como o cálcio ou algumas vias de transdução de sinais (AMPc, calmodulina, fosfatidilinositol 3, diacilglicerol, fosfolipase C) ²⁷. Nessas vias, ocorre alteração da atividade de determinadas proteínas celulares, como as proteínas cinases A e C (PKA, PKC) as quais têm participação central na produção das respostas celulares. Acredita-se que as ações genômicas e não genômicas se completam, uma vez que a ativação de segundos mensageiros pode ativar (isto é, fosforilar) o VDR e amplificar suas atividades genômicas, e a presença do VDR é necessária para as ações rápidas não genômicas ²⁵.

1.6 Ações pleiotrópicas da vitamina D

Além dos alvos clássicos implicados na homeostase do cálcio, a $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ tem ações biológicas em outros numerosos tecidos e sistemas, entre os quais podemos citar o sistema imunológico, o sistema nervoso, o sistema cardiovascular, o pâncreas endócrino, além de estar envolvida no controle do ciclo celular em praticamente todas as células, regulando a proliferação e diferenciação celular ^{27,28}.

1.6.1 Vitamina D e sistema cardiovascular

No início dos anos 80 e 90 várias evidências epidemiológicas sugeriram que um fator ambiental, como a vitamina D poderia explicar as diferenças na mortalidade causada por doença isquêmica coronariana. Esses trabalhos identificaram maiores níveis pressóricos e maior mortalidade com o aumento da distância da linha do equador, além de um forte padrão sazonal, com índices de mortalidade maiores no inverno ²⁹⁻³². Em seguida, alguns estudos demonstraram associações inversas entre as concentrações de vitamina D e fatores de risco cardiovascular ³⁵, DCV ^{33,34} e mortalidade ³⁶ em várias populações. Posteriormente, os estudos de coorte e caso-controle avaliaram a relação entre o *status* de vitamina D e a suscetibilidade para o desenvolvimento de DCV em pacientes sem DCV estabelecida e/ou com fatores de risco cardiovascular. Esses estudos demonstram maior risco de desenvolvimento de DCV nos pacientes com menores concentrações de vitamina D. As evidências a partir de estudos clínicos sugerem que suplementos de vitamina D em doses moderadas a altas poderiam reduzir o risco de doenças cardiovasculares. Os estudos clínicos que avaliaram o efeito da suplementação da vitamina D na prevenção de doença cardiovascular, entretanto, não foram desenhados especificamente para avaliar os efeitos primários da vitamina D sobre os desfechos cardiovasculares, impedindo portanto, conclusões definitivas (Tabela1).

Tabela 1. Estudos avaliando o status de vitamina D e risco de doença cardiovascular

Doença avaliada	População estudada	Desfecho primário	Resultados	Significância estatística
Aterosclerose				
	Pacientes DM2 sem doença renal ou hepática (n=390) ³⁷	comparar a espessura da camada íntima média da carótida entre os pacientes com DM 2 com e sem deficiência de vitamina D	a espessura da camada íntima média da carótida foi significativamente maior nos pacientes com deficiência de vitamina D comparado com aqueles sem deficiência	1,10 ± 0,15 vs 0,87 ± 0,14 mm, p=0,001 Diferenças na espessura da camada íntima média da carótida permaneceram significantes após ajuste para múltiplas variáveis
IAM				
	150 pacientes com IAM, 88 com angina, pareados com 238 controles ³⁸	comparar a ingestão diária de vitamina D entre os pacientes com IAM prévio e aqueles sem IAM prévio	Ingestão diária de vitamina D foi significativamente maior no grupo com IAM prévio comparado com aqueles sem IAM prévio Não houve diferença significativa entre o grupo angina e os controles	IAM vs sem IAM:31,3 vs 22,9 ug (homens) p<0,001; 34,1 vs 20,7ug (mulheres), p<0,00025
IAM				
	15 pacientes com IAM prévio, pareados com 60 controles ³⁹	comparar as concentrações de 25(OH)D entre os pacientes com IAM prévio e controles	Não houve nenhuma diferença significativa nas concentrações de 25(OH)D entre os grupos	p=NS

Continua

Doença avaliada	Desfecho primário	Resultados	Significância estatística
População estudada			
IAM 128 pacientes com dor torácica (53 com IAM e 75 com angina), e 409 controles saudáveis ⁴⁰	comparar as concentrações de 25(OH)D entre os pacientes com dor torácica e controles saudáveis nas quatro estações do ano	As concentrações de 25(OH)D significativamente menores em pacientes com dor torácica na primavera e verão e nenhuma diferença significativa no outono e inverno; no geral não houve diferença significativa entre os grupos	Pacientes com dor torácica vs controles saudáveis Primavera: $p < 0,01$; Verão: $p < 0,05$; outono: $p = \text{NS}$; inverno: $p = \text{NS}$, todas: $p = \text{NS}$
IAM 90 pacientes da coorte prospectiva <i>Tromso Heart Study</i> (30 com IAM prévio, 60 controles sem IAM) ⁴¹	comparar a concentração média de 25(OH)D entre os pacientes com IAM prévio e aqueles sem IAM prévio	Nenhuma diferença significativa nas concentrações de vitamina D entre os grupos durante 4 anos de seguimento	$p = 0,002$
IAM 1.354 homens da coorte prospectiva HPFS (454 com IAM prévio e 900 controles sem IAM prévio) ⁴²	Comparar a concentração média de 25(OH)D entre aqueles com IAM prévio e aqueles sem IAM. Determinar o RR de ter um IAM durante um seguimento de 10 anos	As concentrações de 25(OH)D foram significativamente menores naqueles com IAM prévio comparado com aqueles que não tiveram IAM. Homens com deficiência de vitamina D ($< 15 \text{ ng/mL}$) tiveram um risco significativamente maior de IAM em 10 anos	RR 2,42 (95% IC 1,53-3,84), $p < 0,001$ RR permaneceu significativo após ajuste para as múltiplas variáveis

Continua

Doença avaliada			
População estudada	Desfecho primário	Resultados	Significância estatística
IAM 179 pacientes com IAM pareados com 179 controles saudáveis ⁴³	Comparar as concentrações de vitamina D entre os pacientes com IAM e os controles saudáveis e avaliar o risco de ter um IAM nos pacientes com deficiência de vitamina D (<15ng/mL)	Pacientes com IAM tiveram menores concentrações de vitamina D em relação àqueles que não tiveram IAM Pacientes com deficiência de vitamina D tiveram um risco significativamente elevado de ter um IAM em 10 anos	12,8 vs 14,2 ng/mL; p = 0,017. RR = 0,43; IC 95% = 0,27-0,69; p = 0,05
Todos os tipos de DCV^a Pacientes com DM 2 sem doença renal ou hepática (n= 459) ⁴⁴	Comparar a prevalência de todos os tipos de DCV entre os pacientes com DM 2 com e sem deficiência de vitamina D (<20ng/mL)	Prevalência de DCV foi maior entre os pacientes DM2 com deficiência de vitamina D. Análise de regressão logística revelou uma associação significativa entre deficiência de vitamina D e prevalência de DCV.	24,4% vs 35,5%, p = 0,01 OR = 1,7; IC 95% = 1,1-2,6; p<0,01. OR permaneceu significativa após ajuste para as múltiplas variáveis.
Todos os tipos de DCV^a 3.258 participantes da coorte prospectiva LURIC encaminhados para angiografia coronariana (737 morreram, sendo 463 mortes de origem cardiovascular) ⁴⁵	Determinar o HR da mortalidade por todas as causas e mortalidade cardiovascular em pacientes dentro do menor quartil de vitamina D comparado com aqueles do maior quartil durante um seguimento de 7,7 anos	A mortalidade por todas as causas e mortalidade cardiovascular aumentou significativamente nos pacientes com os menores quartis de vitamina D comparado com aqueles com os maiores quartis durante uma mediana de 7,7 anos	Mortalidade por todas as causas: HR = 3,33; IC 95% 2,66 - 4,16. Mortalidade CV: HR = 2,22; IC 95% = 1,57-3,13 HR permaneceu significativa após ajuste para múltiplas variáveis

Continua

Doença avaliada	Desfecho primário	Resultados	Significância estatística
Todos os tipos de DCV^a 1.739 participantes da coorte prospectiva <i>Framingham Offspring Study</i> (120 desenvolveram DCV, 1.619 não desenvolveram DCV) ⁴⁶	Determinar o HR de desenvolver DCV em pacientes com deficiência de vitamina D (<15 ng/mL) durante um seguimento de 5,4 anos	O risco de desenvolvimento de DCV foi duas vezes maior naqueles com deficiência de vitamina D em comparação àqueles sem deficiência durante um seguimento médio de 5,4 anos	HR = 2,04; IC 95% = 1,42-2,94); p < 0,001 HR permaneceu significativo após ajuste para múltiplas variáveis
Todos os tipos de DCV^a 3.408 participantes da coorte prospectiva NHANES III (houve 1.493 mortes, incluindo 767 mortes cardiovasculares) ⁴⁷	Avaliar o risco de mortalidade por todas as causas e mortalidade cardiovascular de acordo com as concentrações de vitamina D durante um seguimento médio de 7,3 anos	A concentração de 25(OH)D associou-se inversamente com o risco de mortalidade por todas as causas, a associação foi mais forte para concentrações de 25(OH) D < 10 ng/mL	Mortalidade por todas as causas: HR = 2,50; IC 95% = 1,64-3,80; p<0,05. Mortalidade CV: HR = 3,06; IC 95% = 1,72 - 5,52; p<0,05. HR permaneceu significativo após ajuste para múltiplas variáveis
Todos os tipos de DCV^a Registros de 41.504 pacientes provenientes do sistema integrado <i>Intermountain Healthcare</i> (1.193 pacientes morreram, sendo 763 de causa de IAM, 594 de ICC, 513 de fibrilação arterial e 197 de AVC) ⁴⁸	Avaliar a relação entre as concentrações de vitamina D e a prevalência e incidência dos fatores de risco cardiovascular Determinar a associação entre as concentrações de vitamina D e incidência de evento CV durante um seguimento de 1,3 anos	Observou-se associação da deficiência de vitamina D com o aumento da prevalência e incidência dos fatores de risco CV ^b Observou-se associação da deficiência de vitamina D com o aumento da prevalência e incidência das doenças CV ^c	todos os p<0,0001 todos os p<0,0001

Continua

Doença avaliada	Desfecho primário	Resultados	Significância estatística
População estudada Morte Súbita e ICC 3.299 pacientes com indicação de angiografia coronariana da coorte prospectiva LURIC (116 morreram devido a ICC e 188 devido a morte súbita) ⁴⁹	Avaliar a associação das concentrações de 25(OH)D com marcadores de ICC Determinar o HR para morte devido ICC e morte súbita de acordo com o status da vitamina D durante um seguimento de 7,7 anos	25(OH)D correlacionou-se negativamente com PNB e inversa mente com as maiores classes NYHA Baixas concentrações de 25(OH)D foram um fator de risco significativo para mortalidade devido ICC e para morte súbita	Mortalidade por ICC: HR = 4,13; IC 95% = 1,77-9,62 Morte súbita: HR = 5,98; IC 95% = 2,60-13,74 HR permaneceu significativo após ajuste das multivariáveis
Mortalidade por todas as causas, morte súbita e eventos cardiovasculares^d 1.108 pacientes diabéticos em programa de hemodiálise participantes do <i>German Diabetes and Dialysis Study</i> ⁵⁰	Avaliar o impacto do <i>status</i> da vitamina D nos desfechos vasculares (morte súbita, eventos cardiovasculares e mortalidade por todas as causas)	Deficiência de vitamina D esteve significativamente associada com risco de morte súbita, eventos cardiovasculares e mortalidade por todas as causas durante um período de 4 anos	HR para morte súbita = 2,99, IC 95% = 1,39-6,40 HR para evento cardiovascular = 1,78 IC 95% = 1,18-2,69 HR para mortalidade por todas as causas = 1,74 IC 95% = 1,22-2,47 HR permaneceu significativo após ajuste para múltiplas variáveis

Continua

Doença avaliada	Desfecho primário	Resultados	Significância estatística
População estudada			
Todos os tipos de DCV^a (Ensaio clínico randomizado) 36.282 mulheres menopausadas da coorte prospectiva WHI (18.176 receberam 500mg de cálcio + 200 UI de colecalciferol 2x/dia e 18.106 receberam placebo) ⁵¹	Avaliar o risco de ocorrência de DCV entre os pacientes que receberam cálcio + vitamina D vs aqueles que receberam placebo	A suplementação com cálcio e vitamina D não interferiu no risco de desenvolvimento de DCV em 7 anos de seguimento	p = NS
Mortalidade (Ensaio clínico randomizado) 36.282 mulheres menopausadas da coorte prospectiva WHI (1.000mg de cálcio + 400 UI de vitamina D e 18.106 receberam placebo) ⁵²	Avaliar o efeito da suplementação de cálcio + vitamina D na mortalidade total e na mortalidade por causas específicas (DCV, IAM, AVC)	A suplementação de cálcio + vitamina D reduziu o risco de mortalidade por todas as causas, mortalidade devido a DCV, IAM, mas não foi significante para AVC	HR para mortalidade total = 0,91; IC 95% = 0,83-1,01 HR para mortalidade por DCV = 0,92; IC 95% = 0,77-1,10 HR para mortalidade para IAM = 1,01; IC 95% = 0,79-1,29

25(OH)D = 25 hidroxivitamina D; IAM = infarto agudo do miocárdio, NS = não significativo, DCV = doença cardiovascular, CV = cardiovascular, DM2 = diabetes mellitus tipo 2, ICC = insuficiência cardíaca congestiva, PNB = peptideo natriurético cerebral, HPFS = *Health Professionals Follow-up Study*, LURIC = *Ludwigshafen Risk and Cardiovascular Health Cohort*, WHI = *Women's Health Initiative*, NHANES III = *Third National Health and Nutrition Examination Survey*, NYHA = *New York Heart Association*, RR = risco relativo, IC = intervalo de confiança, OR = *odds ratio*, HR = *hazard ratio*, VS = *versus*

^a Doença cardiovascular definida como doença arterial coronariana, doença arterial periférica e doença cerebrovascular.

^b Fatores de risco cardiovasculares = DM, HAS, hiperlipidemia e doença arterial periférica.

^c Doença Cardiovascular = doença arterial coronariana, insuficiência cardíaca, fibrilação atrial, doença vascular periférica, IAM prévio, acidente vascular cerebral (AVC) e acidente isquêmico transitório (AIT) prévio e taquicardia ventricular.

^d Eventos cardiovasculares = um composto de morte de causas cardíacas (morte súbita, IAM fatal, morte por ICC), AVC fatal e não fatal e IAM não fatal.

Muitas células que desempenham um papel crucial no sistema cardiovascular expressam o VDR e respondem a $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ com regulação gênica de células específicas e consequências funcionais. Essas células incluem os cardiomiócitos, CE vasculares, células musculares lisas vasculares e monócitos/macrófagos. Vários mecanismos têm sido propostos para explicar de que maneira a vitamina D poderia afetar a função cardíaca e a aterosclerose, esses mecanismos podem ser classificados em efeitos diretos e indiretos.

1.6.1.1 Efeitos indiretos da vitamina sobre o sistema cardiovascular

A vitamina D pode afetar indiretamente a função cardíaca por interferir nos vários fatores de risco envolvidos na fisiopatologia da DCV como a HAS, dislipidemia, DM e obesidade.

1.6.1.1.1 Vitamina D e hipertensão arterial

O sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) é o principal regulador do volume plasmático, dos eletrólitos e da pressão arterial e a ativação desse sistema contribui para o desenvolvimento da HAS. A renina é sintetizada pelas células justaglomerulares renais e cliva o angiotensinogênio em angiotensina I, a qual é posteriormente convertida em angiotensina II, que aumenta diretamente a pressão arterial pela vasoconstrição e indiretamente pela retenção de sal e água. A vitamina D parece estar relacionada com o controle da pressão arterial, estando inversamente

relacionada com as concentrações séricas de renina; a deficiência de vitamina D ativa o SRAA (Figura 4).

O aumento da atividade do sistema SRAA tem sido demonstrado em trabalhos experimentais com ratos *knockout* para o *VDR* e para a enzima 1α - hidroxilase com consequente aumento das concentrações plasmáticas de angiotensina II, HAS e hipertrofia cardíaca.

Esses estudos demonstram claramente que ratos *knockout* para o *VDR* apresentam aumento da expressão do mRNA da renina, e que os efeitos hipertensivos da deleção do *VDR* são revertidos com o uso do inibidor da enzima conversora de angiotensina ⁵³. Além disso, os efeitos da ativação do SRAA foram revertidos após a utilização da $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ nos ratos *knockout* para a enzima 1α - hidroxilase ⁵⁴.

O mecanismo molecular pelo qual a vitamina D suprime a atividade da renina se deve provavelmente à ligação da vitamina D a uma proteína conhecida como elemento fixador de proteínas em resposta ao AMPc (CREB) que funciona como fator de transcrição ao interagir com um elemento regulador de AMPc (CRE) nos genes-alvo. A ligação da vitamina D ao CREB impede sua ligação ao CRE localizado na região promotora do gene da renina, diminuindo sua transcrição ⁵⁵. Em pacientes com HAS, a atividade da renina tem sido inversamente associada com as concentrações de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ⁵⁶.

A associação entre as concentrações de vitamina D e HAS foi avaliada em vários estudos ⁵⁷. Apesar das conclusões inconsistentes de alguns estudos, a maioria dos estudos com grandes amostras demonstrou uma

relação inversa entre as concentrações de 25(OH)D e pressão arterial ^{35,58-60}. Essas associações foram confirmadas por estudos prospectivos, randomizados e controlados ⁶¹⁻⁶³ demonstrando benefícios da suplementação com vitamina D na redução da pressão arterial. Esses estudos sugerem que o efeito da suplementação de vitamina D na pressão arterial é evidente principalmente quando a pressão arterial sistólica (PAS) inicial é maior que 140 mmHg, sem nenhum efeito naqueles não hipertensos ⁶⁴.

Figura 4. Sistema endócrino da vitamina D e o sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA). A $1,25\text{(OH)}_2\text{D}_3$ diminui a expressão do gene da renina, diminuindo a produção renal de renina, a pressão arterial e a função cardíaca. VDR = receptor de vitamina D, KO = *knockout*, CYP27B1 = enzima 1α – hidroxilase. Fonte: Adaptado de Roger Bouillon (2008).

1.6.1.1.2 Vitamina D e dislipidemia

A vitamina D tem sido inversamente associada à dislipidemia em alguns estudos, entretanto os resultados na literatura são conflitantes. As concentrações lipídicas variam sazonalmente e as concentrações de colesterol total, colesterol LDL e triglicérides são maiores durante o inverno ⁶⁵. Alguns estudos demonstraram uma associação inversa entre 25(OH)D e as concentrações de triglicérides, colesterol LDL e colesterol total ^{44,66,67}. Associações positivas entre *status* de vitamina D e as concentrações de HDL ⁶⁸ e apo A1 ⁶⁹ também têm sido demonstrada em alguns estudos.

Os mecanismos plausíveis para essas associações têm sido relacionado aos efeitos do cálcio, PTH e das estatinas. Em 2005, Shepherd e cols (1995) ⁷⁰, demonstraram que a pravastatina reduzia a mortalidade cardiovascular em homens com fatores de risco cardiovasculares, independentemente da diminuição das concentrações de colesterol. Em seguida, foi levantada a hipótese de que as estatinas seriam análogas da vitamina D e agiriam ativando os receptores de vitamina D e que esse mecanismo estaria relacionado com a proteção cardiovascular ⁷¹. Posteriormente, outros estudos com o uso de atorvastatina ⁷² e rosuvastatina ⁷³ demonstraram um aumento significativo nas concentrações de vitamina D após o uso dessas estatinas em pacientes com doença arterial coronariana (DAC) e/ou portadores de fatores de risco para DCV, como DM e HAS.

O mecanismo pelo qual as estatinas aumentariam as concentrações de vitamina D está possivelmente relacionado com a inibição da enzima hidroximetilglutaril coenzima A redutase (HMG-CoA). O colesterol é

sintetizado a partir do 7-deidrocolesterol pela ação da enzima HMG-CoA. O 7-deidrocolesterol também é precursor da vitamina D pela ação dos raios ultravioletas. A inibição da enzima HMG-CoA provocada pelas estatinas aumenta as concentrações de 7-deidrocolesterol que é então convertido a 25 hidroxivitamina D. Além disso, estudos *in vitro* demonstraram que a 25(OH)D inibe a atividade da enzima HMG-CoA ⁷⁴. Isso poderia justificar a maior redução das concentrações de colesterol total e triglicérides nos pacientes com concentrações normais e insuficientes de vitamina D em relação aos pacientes deficientes de vitamina D ⁷⁵. A maior concentração de vitamina D poderia aumentar a inibição enzimática, agindo de maneira sinérgica com as estatinas na diminuição do colesterol total.

1.6.1.1.3 Vitamina D e diabetes mellitus tipo 2

A patogênese do DM 2 envolve a disfunção das células β pancreáticas levando à deficiência de secreção insulínica, associada à resistência insulínica nos tecidos periféricos.

A identificação de receptores para $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ e a expressão da enzima 1α - hidroxilase nas células β pancreáticas confirmaram o papel da vitamina D na regulação da função do pâncreas endócrino ⁷⁶.

Estudos em animais revelaram que a deficiência de vitamina D inibe a secreção pancreática de insulina ⁷⁷ e está associada com intolerância à glicose. A vitamina D é essencial para a produção de insulina, enquanto a suplementação de vitamina D e cálcio aumentam a secreção de insulina e restauram a tolerância à glicose ^{78,79}.

As concentrações de vitamina D também têm sido relacionadas com a sensibilidade insulínica em indivíduos saudáveis ⁸⁰. Dois estudos *in vitro* e *in vivo* demonstraram que a 1,25(OH)₂D₃ pode aumentar a sensibilidade insulínica nos tecidos periféricos por estimular a expressão de receptores de insulina nesses tecidos e a resposta insulínica no transporte de glicose ⁸¹, sugerindo uma ação direta da 1,25(OH)₂D₃ na ativação transcripcional do gene do receptor de insulina em ratos diabéticos ⁸².

Além desses possíveis mecanismos citados, a vitamina D também pode exercer seus efeitos nas células β por meio do controle do fluxo de cálcio e na regulação dos estoques intracelulares de cálcio, essenciais na regulação da secreção de insulina.

A hipovitaminose D é mais prevalente em pacientes portadores de DM 2 em relação a indivíduos não diabéticos ³⁷ e está associada com resistência insulínica avaliada por glicemia de jejum e concentrações plasmáticas de insulina ⁸³. Uma recente meta-análise de estudos observacionais e intervencionais demonstrou que as insuficiências de vitamina D e cálcio influenciam negativamente a glicemia e que a suplementação com ambos os nutrientes poderia ser benéfica no metabolismo da glicose ⁸⁴.

1.6.1.1.4 Vitamina D e obesidade

Vários estudos demonstram que as concentrações de vitamina D estão inversamente correlacionadas com as várias medidas de adiposidade incluindo peso, índice de massa corporal (IMC), circunferência abdominal e

percentual de gordura ⁸⁵⁻⁸⁸. As baixas concentrações de 25(OH)D associadas à obesidade foram inicialmente atribuídas a múltiplos fatores, entre eles a baixa exposição à luz solar devido a dificuldade de locomoção dos pacientes obesos ⁸⁹, a fixação da vitamina D nos compartimentos de gordura corporal, e pelo *feedback* negativo das concentrações elevadas de 1,25(OH)₂D₃ na síntese hepática de 25(OH)D ⁹⁰.

No entanto, se o *status* da vitamina D é o fator causal associado com o aumento da adiposidade ou se o *status* da vitamina D é resultado da redução da biodisponibilidade da vitamina D devido ao sequestro pelo tecido adiposo, isso ainda precisa ser esclarecido ⁹¹.

Estudos experimentais evidenciaram que a 1,25(OH)₂D₃ regula a diferenciação adipocitária; já foi demonstrado que a 1,25(OH)₂D₃ inibe a fase inicial da diferenciação dos pré-adipócitos em adipócitos maduros *in vitro* (células 3T3-L1) ⁹². Fibroblastos embrionários retirados de ratos selvagens e de ratos *knockout* para o VDR com expressão aumentada do receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama (PPAR_γ), um membro da família dos receptores nucleares altamente expresso no tecido adiposo e envolvido na diferenciação dos adipócitos e no início da adipogênese, foram tratados com 1,25(OH)₂D₃, para avaliar o papel do VDR na adipogênese. O tratamento com a 1,25(OH)₂D₃ bloqueou a expressão do PPAR_γ nas células VDR^{+/+}, mas não nas células VDR^{-/-}, com consequente aumento da diferenciação dos adipócitos nas células VDR^{-/-}, o que significa que o VDR é um mediador chave da ação da 1,25(OH)₂D₃ na diferenciação dos adipócitos ^{92,93}.

Outros estudos apontam para o papel do VDR na adipogênese com base nas variações da expressão do seu mRNA durante a diferenciação adipocitária⁹⁴. Além disso, o tecido adiposo está associado com a produção de citocinas, incluindo a leptina, adiponectina e interleucina 6 (IL-6). Vários estudos transversais sugerem que as concentrações de leptina e IL-6 estão inversamente associadas com as concentrações de 25(OH)D^{95,96}. Um estudo *in vitro* demonstrou o efeito direto da vitamina D sobre a secreção de leptina⁹⁷, entretanto, os mecanismos exatos pelos quais a vitamina D suprime a secreção de leptina, assim como seu papel na regulação *in vivo* das concentrações séricas de leptina continuam a ser investigados.

1.6.1.2 Efeitos diretos da vitamina D sobre o sistema cardiovascular

Os principais mecanismos que poderiam explicar os efeitos diretos da vitamina D sobre o sistema cardiovascular incluem o controle da contratilidade cardíaca, regulação da secreção dos hormônios natriuréticos, remodelamento da matriz extracelular, regulação das citocinas inflamatórias, ação do PTH, regulação do crescimento e da proliferação dos cardiomiócitos, além de efeitos nas CE, célula muscular lisa vascular e no processo de calcificação vascular^{23,98}.

1.6.1.2.1 Efeitos sobre os cardiomiócitos

Estudos experimentais demonstraram a presença de VDR⁹⁹ e da enzima 1- α hidroxilase nos miócitos cardíacos¹⁰⁰. Ratos *knockout* para VDR desenvolvem HAS, hipertrofia cardíaca com aumento dos miócitos e elevação da expressão do peptídeo natriurético atrial (PNA)¹⁰¹. Células

cardíacas (células HL-1) em cultura tratadas com $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ apresentam significativa diminuição da proliferação, aumento da expressão da miotropina e diminuição da expressão do PNA e do proto-oncogene *c-myc*¹⁰². O proto-oncogene *c-myc* está relacionado com o crescimento e diferenciação celular. A miotropina tem sido relacionada com a patogênese da hipertrofia cardíaca, assim como com o desenvolvimento dos cardiomiócitos e funciona como um potente mecanismo compensatório para a insuficiência cardíaca congestiva. O PNA é considerado um marcador de risco inversamente relacionado com a função cardíaca, uma vez que doenças cardíacas que cursam com hipertrofia e estresse mecânico estimulam a síntese e secreção desta proteína pelas células atriais. Além da ação da vitamina D sobre o PNA, foi demonstrado que o VDR tem a capacidade de se ligar diretamente à região promotora do gene do peptídeo natriurético cerebral (*PNB*) inibindo a expressão desse gene cuja transcrição está estimulada no quadro da hipertrofia cardíaca¹⁰⁰.

Além dos mecanismos citados acima, a deficiência crônica de vitamina D cursa com quadro de hiperparatireoidismo secundário, caracterizado pela elevação das concentrações de PTH. Os cardiomiócitos têm sido identificados como células alvo para a ação do PTH^{103,104}. Schluter (1992)¹⁰⁵ demonstrou que o PTH exerce efeitos diretos sobre cardiomiócitos ventriculares isolados de ratos que apresentam resposta hipertrófica caracterizada por aumento da síntese protéica.

1.6.1.2.2 Efeitos sobre as células da parede vascular e macrófagos

As células musculares lisas vasculares, as CE e os macrófagos expressam o VDR, assim como a enzima 1α - hidroxilase, responsável pela síntese extra-renal de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ²⁷. Os efeitos protetores da vitamina D sobre os macrófagos e as células da parede vascular incluem efeitos antiproliferativos, antitrombóticos, antiinflamatórios, inibição da calcificação vascular e diminuição da síntese e/ou diminuição dos efeitos deletérios das MMPs.

1.6.1.2.2.1 Efeitos antiproliferativos

Os fatores envolvidos na proliferação das células musculares lisas vasculares ainda não estão completamente elucidados. Muitos estudos têm demonstrado que a $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ é uma potente supressora da proliferação e indutora da diferenciação celular em numerosos tipos celulares ¹⁰⁶. Entretanto, os raros estudos que tiveram como objetivo analisar o efeito da $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ sobre a proliferação das células musculares lisas vasculares são controversos. Estudos *in vitro* demonstraram que a $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ diminui a proliferação dessas células, provavelmente por bloquear a expressão do proto-oncogene *c-myc* ¹⁰⁷. Existem, no entanto, estudos que demonstram que a $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ tem efeitos proliferativos diretos e independentes de outros fatores de crescimento ¹⁰⁸.

1.6.1.2.2.2 Efeitos inibitórios sobre a calcificação vascular

A calcificação vascular pode acometer a camada íntima ou a camada média arterial. O processo de calcificação vascular é complexo, dependente dos efeitos físico químicos do cálcio e fósforo e também de alguns fatores produzidos pelas células musculares lisas vasculares que podem ser regulados por esses íons, assim como pelo PTH e pela $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$.

As ações fisiológicas da vitamina D na regulação da produção de citocinas inflamatórias, na inibição das moléculas de adesão pelas CE e no controle da proliferação e migração das células musculares lisas vasculares e na produção de MMPs são fundamentais para a inibição do processo de calcificação vascular da camada íntima das artérias, que está associada com aterosclerose e tem sido reconhecida como fator de risco para mortalidade cardiovascular ¹⁰⁹. A calcificação da camada média das artérias é caracterizada por um depósito concêntrico de cálcio nas células musculares lisas vasculares resultando em enrijecimento da parede arterial, e alterações hemodinâmicas associadas com hipertrofia ventricular e aumento de mortalidade. Os pacientes diabéticos e portadores de insuficiência renal crônica são os de maior risco para o desenvolvimento da calcificação da camada média arterial. Sabe-se que as células musculares lisas vasculares sofrem uma transformação e adquirem características de célula osteoblástica. Essa célula osteoblasto-símile expressa várias proteínas características do tecido ósseo como a osteopontina, MGP (proteína Gla da matriz), fosfatase alcalina, osteocalcina e colágeno tipo I. Estudos indicam que a vitamina D estimula a produção de inibidores da calcificação vascular, entre eles a

MGP, osteopontina e colágeno tipo IV pelas células musculares lisas vasculares ¹¹⁰.

Existem poucos dados em relação à calcificação vascular e a deficiência de vitamina D em pacientes sem doença renal crônica (DRC). Há evidências a partir de uma população com risco moderado de DAC; neste estudo a calcificação coronariana correlacionou-se negativamente com as concentrações de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ¹¹¹. Infelizmente, este estudo avalia as concentrações de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, a qual não se relaciona bem com as concentrações de $25(\text{OH})\text{D}$, podendo não representar uma boa medida dos estoques corporais de vitamina D. Em outro estudo também envolvendo pacientes sem DRC, as baixas concentrações de vitamina D e as maiores concentrações de PTH estiveram independentemente associadas com estenose aórtica calcificada ¹¹². Altas doses de vitamina D, entretanto, estimulam a calcificação aórtica ¹¹³, de forma que há dados sugerindo que tanto as concentrações de vitamina D elevadas quanto as baixas concentrações estão associadas com efeitos deletérios sobre a vasculatura.

1.6.1.2.2.3 Efeitos Antitrombóticos

Em cultura de monócitos, a $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ tem efeitos anticoagulantes demonstrados pela regulação positiva (*upregulation*) da expressão do mRNA da glicoproteína anticoagulante trombomodulina e pela regulação negativa da expressão do mRNA de um fator regulador pró-coagulante, o fator tecidual ¹¹⁴. Em ratos *knockout* para o VDR a

agregação plaquetária induzida por lipopolissacárides aumentou, além da formação de trombos em vários órgãos ¹¹⁵.

As células musculares lisas vasculares, assim como as CE são responsivas a ação da $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ diminuindo a expressão do fator tecidual, da trombospondina e do inibidor do ativador do plasminogênio (PAI-1) ¹¹⁶. Essas alterações geram um perfil cardiovascular favorável por reduzir a trombogênese e aumentar a fibrinólise (Figura 5).

Figura 5. Efeitos diretos da $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ sobre as células da parede vascular e os cardiomiócitos. As células musculares lisas vasculares, assim como as células endoteliais são responsivas a ação da $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ e sofrem a regulação da produção dos fatores pró/anti-trombóticos e fibrinolíticos. Nos cardiomiócitos a vitamina D age regulando a proliferação celular. PNB: peptídeo natriurético cerebral, PAI-1: inibidor do ativador do plasminogênio. Fonte: Adaptado de Roger Bouillon (2008)

1.6.1.2.2.4 Efeitos antiinflamatórios

A inflamação crônica subaguda tem sido relacionada com o aumento do risco cardiovascular. No sistema imune, a vitamina D promove a diferenciação de monócitos em macrófagos e aumenta a função dos monócitos na apresentação de antígenos. Além disso, a vitamina D diminui as citocinas inflamatórias, entre elas, as interleucinas 1 (IL-1) e 6 (IL-6) e o TNF- α e aumenta a IL-10, que tem ação antiinflamatória.

O aumento das citocinas pró-inflamatórias na parede dos vasos contribui para o recrutamento de células imunes e para a deposição de partículas de LDL colesterol modificadas, aumentando, dessa maneira, a expressão do receptor “scavenger” e a síntese de ésteres de colesterol e diminuindo o efluxo de colesterol. Estudos já demonstram que a 1,25(OH) $_2$ D $_3$, e seus análogos promovem a diferenciação dos precursores dos monócitos para macrófagos e diminuem a produção de citocinas pró-inflamatórias pelas células mononucleares em pacientes diabéticos, sugerindo que a 1,25(OH) $_2$ D $_3$ regule a infiltração vascular pelos monócitos e a retenção de colesterol pelos macrófagos na parede dos vasos nestes pacientes ¹¹⁷.

Um outro estudo demonstrou em macrófagos retirados de pacientes diabéticos e colocados em cultura que a 1,25(OH) $_2$ D $_3$ inibe a formação de células espumosas nesses pacientes, por reduzir a captação de moléculas de colesterol LDL oxidadas pelos macrófagos. Por outro lado, a deleção do *VDR* nos macrófagos acelera a formação de células espumosas induzida pelas partículas de LDL modificadas. Os autores do estudo

concluíram que a sinalização reduzida do VDR é um mecanismo potencial para o aumento da formação das células espumosas e aceleração da DCV nos pacientes diabéticos.

Também já foi demonstrado que a $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ reduz a ativação da cinase c-Jun N-terminal (JNK), do $\text{PPAR}\gamma$, do receptor trombospondina CD36 e a expressão do receptor *scavenger* A1 (SR-A1) em macrófagos, melhorando o estresse do retículo endoplasmático e a sinalização insulínica ¹¹⁸.

AGEs, que estão elevados em pacientes diabéticos mal controlados, podem induzir disfunções vasculares. Tamor e cols. (2008) ¹¹⁹ evidenciaram que o calcitriol atenua o impacto dos AGEs sobre as CE, inibindo sua ação sobre a sintase do óxido nítrico endotelial, diminuindo a expressão do mRNA da IL- 6 e atenuando a atividade do fator nuclear kappa beta (NF- κ B).

O NF- κ B é um fator de transcrição que regula a expressão de várias citocinas próinflamatórias e proaterogênicas. O aumento da sua atividade tem sido associado à resistência à insulina, DM 2 e aterosclerose. Outros estudos experimentais sugerem que a vitamina D possa inibir a atividade do NF- κ B e a expressão de mRNA de fatores proaterogênicos ¹²⁰.

A $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ também é potente moduladora das moléculas de adesão produzida pelas CE. Zehnder D e cols (2002) ¹²¹ demonstraram que as CE sintetizam $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ podendo agir de modo parácrino ou autócrino.

1.6.1.2.2.5 Modulação do sistema das metaloproteinases e de seus inibidores

As MMPs constituem-se de um grupo de enzimas (endopeptidases) responsáveis pela degradação dos componentes da matriz extracelular. A atividade das MMPs é regulada por inibidores específicos, conhecidos como inibidores teciduais de MMPs (TIMPs). As TIMPs são proteínas pequenas e multifuncionais que regulam as funções das MMPs, o nível de sua ativação e sua habilidade de hidrolisar um determinado substrato. As principais células que produzem MMPs são os leucócitos polimorfonucleares, os queratinócitos, os monócitos, os macrófagos, os fibroblastos e as células mesenquimais. Essas células são capazes de responder a fatores de crescimento e citocinas, incluindo a IL-1 e o TNF- α . Na presença dessas substâncias, essas células liberam as MMPs de grânulos específicos de armazenamento para o meio extracelular. O equilíbrio entre a produção de MMPs e a de TIMPs representa um ponto principal para manter a homeostase da matriz extracelular.

O sistema das MMPs é essencial para o processo de remodelamento da parede vascular e do miocárdio, além de ter um papel importante no desenvolvimento da placa aterosclerótica. A vitamina D parece ter uma ação moduladora do sistema das MMPs, diminuindo sua síntese, atenuando seus efeitos deletérios ou aumentando a síntese das TIMPs.

Um dos mecanismos de proteção da vitamina D no cardiomiócito inclui um importante papel na supressão da expressão das MMPs no tecido cardíaco. Análises de microarranjos de DNA revelaram que as

TIMPs apresentavam expressão diminuída em ratos *knockout* para *VDR* comparados com ratos selvagens com presença de fibrose e deposição de colágeno ¹²².

Evidências recentes sugerem que a MMP-2 e a MMP-9 desempenham um papel patogênico no desenvolvimento das placas ateroscleróticas. A MMP-2 é expressa nas células musculares lisas vasculares das artérias normais. As placas ateroscleróticas propensas a se romper apresentam expressão aumentada da MMP-2, induzindo a ativação da MMP-9 e levando à infiltração de macrófagos, degradação da matriz extracelular e desestabilização da placa aterosclerótica com ruptura e trombose ¹⁴⁶.

1.7 Epidemiologia genética

As análises genéticas convencionais concentram-se no estudo de genes relacionados a fenótipos específicos, enquanto a epidemiologia tradicional está mais preocupada com as causas ambientais e fatores de risco relacionados às doenças. A epidemiologia genética é a união desses dois campos, a genética, incluindo as variantes alélicas nas diferentes populações e o meio ambiente, a fim de explicar exatamente como os genes transmitem seus efeitos em diferentes contextos ambientais, levando, assim a uma compreensão mais completa da etiologia dos traços complexos (aqueles que são influenciados por um grande número de fatores, a maioria dos quais de difícil identificação) ¹²³.

1.7.1 Definição de polimorfismo

A sequência completa do DNA (genoma humano) é composta de cerca de 3,3 bilhões de pares de bases. Cerca de 3% do genoma consiste de sequências codificantes, e há 30.000 - 40.000 genes codificadores de proteínas. Se compararmos ao acaso dois indivíduos não aparentados, 99,9% da sequência do DNA serão idênticas. Os 0,1% restantes consistem em variações na sequência do DNA. Existem vários tipos de variações na sequência de DNA, sendo classificadas de diferentes maneiras, como por exemplo, pela natureza física da variação da sequência, pelo efeito sobre a formação da proteína, e pela susceptibilidade associada a uma doença. Essas variações estáveis e transmitidas de maneira mendeliana são o substrato molecular da diversidade fenotípica dos indivíduos. A possibilidade de detectar esses polimorfismos do DNA genômico fornece um conjunto de marcadores que torna possível a cartografia dos genes associados a doenças com componente hereditário.

Podemos separar os polimorfismos genômicos em dois grandes grupos. O primeiro grupo compreende os polimorfismos de repetição, nos quais os diferentes alelos diferem pelo número de repetições de uma sequência de base (ou "motivo"). Dentro deste grupo se encontram os microsátélites (motivos de dois a cinco nucleotídeos) e os minisátélites e *VNTRs* (*variable number of tandem repeat*), com motivos de mais de 10 nucleotídeos. Microsátélites são altamente variáveis e muitos indivíduos são heterozigotos em qualquer *locus* determinado. Regiões codificantes tendem a não conter sequências

microssatélites. O segundo grupo de polimorfismos genômicos compreende os SNPs (polimorfismos de um único nucleotídeo), polimorfismos pontuais bi-alélicos devido à variação de somente um nucleotídeo, bastante abundantes no genoma humano. Os SNPs podem se localizar dentro das regiões codificadoras do gene (exons), nas regiões não codificadoras (introns e região promotora), ou nas áreas intergênicas, ou seja, entre os genes. Quando os SNPs se encontram dentro das regiões codificadoras, eles não vão obrigatoriamente modificar a sequência dos aminoácidos da proteína produzida, o que se deve a redundância do código genético. Os polimorfismos de restrição são SNPs nos quais a troca do nucleotídeo induz a uma modificação de um sítio reconhecido por uma enzima de restrição, propriedade que pode ser usada para sua detecção ¹²³.

Embora SNPs individuais possam carregar informações limitadas, o seu grande número demonstra sua importância na utilização em epidemiologia genética. Atualmente, os SNPs são os marcadores genéticos mais utilizados no estudo de doenças multifatoriais complexas como os diferentes tipos de DM e suas complicações ¹²⁴.

1.7.2 Estudos de associação em análises genéticas

Em genética das doenças complexas os estudos de associação de um gene são baseados na comparação de frequências alélicas entre indivíduos não aparentados, afetados ou não afetados por uma determinada doença avaliada dentro de uma população ¹²⁵. Os estudos de associação dentro de

uma população testam os produtos entre alelos dentro de um segmento mais curto de um cromossomo (± 100 Kb). Os métodos de análise de associação alélica apresentam uma fraca sensibilidade, mas uma resolução mais elevada em relação ao método de análise de ligação genética. Existem várias maneiras de testar a existência de associação entre um gene marcador e uma determinada característica. Os estudos epidemiológicos de caso-controle e os estudos prospectivos são os mais utilizados para avaliar essas associações. Nos estudos de caso-controle, os indivíduos são selecionados em função da doença e são comparados em relação à exposição e/ou característica de interesse, permitindo, dessa maneira quantificar os fatores de risco que ocorrem com maior (ou menor) frequência nos casos e nos controles¹²⁶. Dessa forma, em um estudo de caso-controle, comparam-se as frequências alélicas ou genóticas de um SNP entre os casos e os controles, e avalia-se o efeito de um SNP pelo cálculo do *odds ratio* (OR: medida de risco estimada a partir de estudos de caso/controlado).

Os estudos prospectivos são constituídos de uma amostra representativa de uma determinada população seguida até o aparecimento de evento ou da doença. Estas características permitem o cálculo direto das medidas de incidência. O objetivo dos estudos prospectivos é identificar, dentro da população geral, os fatores de risco que predispoem um indivíduo a doença, ou os marcadores biológicos para a predição do desenvolvimento da doença¹²⁶. Nesse tipo de estudo, a exposição pode (ou não) já ter ocorrido, mas o desfecho ainda não ocorreu. A maioria dos estudos de coorte tem como objetivo primário a comparação da incidência do desfecho

entre indivíduos expostos (IE) e não expostos (IO), o que é feito a partir do cálculo de medidas de associação baseadas em diferenças de incidências ($IE - IO$) ou em razão de incidências ($IE \div IO$) e através dessas, possibilita o cálculo do risco relativo (RR).

A utilização de grandes populações é indispensável para avaliar com maior precisão as contribuições, muitas vezes modestas, das variações genéticas na predisposição a doenças complexas como o DM 2 e as DCV.

Dessa forma, os métodos de análise de associação são considerados os mais apropriados para detectar as contribuições menores ou fracas de um alelo de suscetibilidade genética de uma doença poligênica e multifatorial. A associação entre um alelo “a” de um *locus* “A” e a doença “M” pode acontecer por 3 razões:

1. O alelo “a” do *locus* “A” causa diretamente a suscetibilidade à doença “M”. Geralmente a presença deste alelo não é suficiente para o desenvolvimento da doença, mas aumenta sua probabilidade de ocorrência. Dentro desse exemplo, o alelo “a” estará igualmente ligado à doença “M” dentro de diferentes populações.
2. O alelo “a” do *locus* “A” não causa diretamente a suscetibilidade à doença “M”, mas ele está em desequilíbrio de ligação com o alelo “b” de um *locus* “B”, implicado diretamente na suscetibilidade à doença “M”. Se o desequilíbrio de ligação é a origem da associação de um alelo “a” com a doença “M”, isso significa que o *locus* “B” está fisicamente próximo ao *locus* “A”. Neste caso, o alelo do *locus* “A” associado à doença “M” pode ser diferente entre as populações.

3. Erro de tipo 1 (falso positivo), situação frequente quando os pacientes e o grupo controle não pertencem à mesma população do ponto de vista da estratificação genética.

O conceito de desequilíbrio de ligação (LD) entre os polimorfismos é essencial nesses estudos. O desequilíbrio de ligação corresponde a uma situação em que dois alelos correspondentes a dois polimorfismos distintos de um mesmo cromossomo estão mais comumente associados na população em geral, do que se fosse ao acaso. Esta correlação (D) é definida como a diferença entre as frequências observadas das combinações alélicas e as frequências teóricas. Se D for positivo, o alelo raro do primeiro polimorfismo está mais frequentemente associado com o alelo raro do segundo polimorfismo. Inversamente, se D é negativo, o alelo raro do primeiro polimorfismo está mais frequentemente associado ao alelo frequente do segundo polimorfismo. O valor do desequilíbrio de ligação depende, em parte, das variações das frequências dos polimorfismos. Uma medida de desequilíbrio de ligação menos sensível às variações de frequência (D') é mais frequentemente utilizada. Ela corresponde a razão de D observada em seu valor máximo ou mínimo possível em função das frequências alélicas:

$$D' = D / D_{\min}, \text{ se } D < 0 \text{ e } D' = D / D_{\max} \text{ se } D \geq 0.$$

Quanto mais D' se aproxima de 1, mais o desequilíbrio é forte. Se D' for igual ao valor 1, dois alelos estão em desequilíbrio completo:

apenas três combinações alélicas existem na população. Se, além disso, as frequências alélicas são iguais, então, apenas duas combinações das quatro estão presentes na população. A intensidade do desequilíbrio de ligação também pode ser expressa pelo coeficiente de correlação r^2 :

$$r^2 = D^2 / (f(a_1) * f(b_1) * f(a_2) * f(b_2))$$
 se o valor de r^2 é alto (próximo a 1), a genotipagem de um dos dois é o suficiente, não sendo necessário genotipar o segundo polimorfismo, o qual não trará nenhuma informação adicional. A noção de haplótipo também é importante para esses estudos. Um haplótipo corresponde a um conjunto de alelos de vários polimorfismos, próximos uns dos outros no mesmo par de cromossomos. Devido ao desequilíbrio de ligação, as combinações alélicas dos polimorfismos próximos uns dos outros geram menos diversidade do que se eles não estivessem correlacionados. Ao selecionar um subconjunto adequado de polimorfismos (SNPs ou tag SNPs) para caracterizar os blocos de haplótipos, é possível captar a diversidade da sequência de uma região com um número limitado de SNPs ¹²⁷. O interesse de uma análise por bloco de haplótipos utilizando tag SNP é o fato de permitir cobrir o conjunto da variabilidade genética de um *locus*, reduzindo assim o número de genotipagens e mantendo o poder estatístico dos estudos de associação ¹²⁸.

1.7.3 Escolha do gene candidato

A maioria das pesquisas relacionadas com fatores genéticos em aterosclerose em humanos utiliza a estratégia de genes candidatos, definidos como genes implicados na suscetibilidade às doenças genéticas complexas, e que poderiam, dessa maneira, modular os fatores de risco cardiovasculares, a fisiopatologia da placa ateromatosa e sua estabilidade. A escolha do gene candidato baseia-se no estado de conhecimento científico dos processos fisiopatológicos da doença. Os argumentos fisiológicos para o estudo do papel desempenhado pelo gene geralmente são provenientes de estudos *in vivo* ou *in vitro*. A invalidação global ou tecido específico de um gene (*knockout*), a super expressão gênica em modelos animais, a utilização de ferramentas de bloqueio de expressão, como os RNA de interferência, e a análise do transcriptoma compreendem as várias fontes que podem contribuir para a identificação de genes candidatos para a susceptibilidade ao DM 2 e a suas complicações cardiovasculares.

Após a seleção do gene candidato, o primeiro passo é caracterizar a variabilidade de sua sequência (polimorfismos) nas regiões codificadoras ou reguladoras do gene, ou por meio da investigação nas bases de dados genéticas do projeto HapMap. Depois de um subconjunto adequado de SNPs que caracterizam a variabilidade de genes candidatos selecionados, o segundo passo é a genotipagem populacional, seja nos estudos de caso-controle, ou nas coortes prospectivas com a finalidade de testar seu potencial envolvimento na susceptibilidade para as doenças complexas.

1.8 Gene do receptor da vitamina D

A vitamina D apresenta efeitos pleiotrópicos em vários tipos celulares envolvidos no desenvolvimento e progressão das DCV e genes que codificam proteínas que participam desse sistema hormonal são candidatos a conferirem suscetibilidade ou proteção contra a doença macrovascular, pois podem abrigar polimorfismos que, influenciando a concentração plasmática da vitamina D ou seus efeitos celulares, poderiam modular os mecanismos envolvidos na aterogênese.

O gene *VDR* está localizado no cromossomo 12q12-q14 e sua clonagem em humanos foi concluída e publicada em 1988 ¹²⁹. Ele abrange no mínimo 105 Kb, possui 14 exons, sendo oito exons codificadores de proteínas (exons 2-9), seis exons que não são traduzidos (exons 1a-1f) na região 5' e uma extensa região promotora capaz de gerar múltiplos transcritos tecido específicos ¹³⁰. O gene *VDR* possui uma longa região 3' não traduzida (3'-UTR) comum a todos os receptores esteróides que está envolvida na regulação da expressão gênica, especialmente na regulação da estabilidade do mRNA ¹³¹.

1.8.1 Variações alélicas no gene *VDR* e doença cardiovascular

Os polimorfismos no gene *VDR* mais frequentemente estudados foram previamente reconhecidos pelo uso das enzimas de restrição utilizadas para sua genotipagem por meio de *PCR-RFLP* (polimorfismos do

comprimento dos fragmentos de restrição após amplificação por reação em cadeia da polimerase) e são conhecidos como: BsmI, ApaI e TaqI (Figura 6).

Figura 6. Representação esquemática da estrutura de exons e introns do gene *VDR* e o posicionamento dos polimorfismos estudados. Fonte: Adaptado de André G. Uitterlinden (2004).

Esses polimorfismos presentes no gene *VDR* ocorrem com frequência na população geral, mas o significado desses polimorfismos não foram sistematicamente analisados e seus efeitos na função do *VDR* ainda não foram completamente esclarecidos ¹³¹. Esses polimorfismos, em especial o BsmI, foram descritos como sendo associados a uma grande variedade de fenótipos relacionados aos fatores de risco cardiovasculares em muitas populações. Esses estudos demonstram associações dos polimorfismos do gene *VDR* com as variações no peso corporal em DM 2 ¹³², sensibilidade à insulina ¹³³, secreção de insulina em resposta à glicose ¹³⁴, suscetibilidade

para o desenvolvimento de diabetes mellitus tipo 1 (DM 1)^{135,136}, e DM 2¹³⁷, suscetibilidade para doença renal crônica¹³⁸, hipertrofia do ventrículo esquerdo¹³⁹ e pressão arterial¹⁴⁰. Poucos estudos avaliaram as associações dos polimorfismos do gene *VDR* com DCV. O primeiro estudo demonstrou uma associação não significativa do alelo b (da variante BsmI) com a gravidade da DAC¹⁴¹. O segundo estudo encontrou uma associação do alelo B da variante BsmI com a prevalência de DM 2 e de DAC em uma população considerada de risco para DCV (angina e/ou hipercolesterolemia) submetidos a angiografia coronariana diagnóstica¹⁴³. O terceiro estudo demonstrou um aumento na suscetibilidade para IAM associado à presença do alelo B da variante BsmI¹⁴². Esses resultados estão de acordo com outros estudos que avaliaram associações do genótipo BsmI com vários fenótipos de DCV. Um deles comparou pacientes com estenose da válvula aórtica calcificada a controles normais em relação à variante BsmI. A frequência do alelo B foi 35% maior nos pacientes com estenose valvar em relação aos controles¹⁴³. Kammerer e cols (2004)¹⁴⁴ demonstraram uma associação do genótipo BB com uma maior espessura da camada íntima-média da artéria carótida. Um outro estudo de Ortlepp JR e cols (2003)¹⁴⁵ que incluiu um grande número de pacientes, entretanto, não demonstrou associação do genótipo *VDR* (BsmI) com fenótipos cardiovasculares definidos a partir de angiografia coronariana.

A relação entre *status* de vitamina D, genótipo *VDR* (variante TaqI) e o sistema das MMPs foi avaliada por Timms PM e cols (2002)¹⁴⁶. Nesse estudo, a variante do gene *VDR* contribuiu para a determinação das

concentrações circulantes das TIMPs em pacientes britânicos originários de Bangladeshi.

Postula-se que as associações observadas desses SNPs com doenças complexas sejam devidas ao desequilíbrio de ligação com uma variante funcional na região 3'-UTR do gene *VDR* que afeta a estabilidade do mRNA¹³⁰. Os dois haplótipos mais frequentes definidos pelas variantes BsmI, ApaI e TaqI em caucasianos, GCT e AAC, estão em desequilíbrio de ligação com o VNTR poli (A) presente na região 3'-UTR: (A)¹³⁻¹⁷, designado como curto e (A)¹⁸⁻²⁴, designado como longo, respectivamente¹⁴⁷. Em alguns estudos, esses haplótipos foram associados com a estabilidade do mRNA, com o número de cópias do mRNA do *VDR*, bem como com o nível de expressão da proteína *VDR*^{148,149}, enquanto Durrin LK e cols (1999)¹⁵⁰ não evidenciaram efeitos desses SNPs sobre a estabilidade do mRNA.

Embora alguns estudos tenham incluído pacientes com DM 2 entre os pacientes de alto risco para DCV para analisar a associação de polimorfismos no *VDR* com a suscetibilidade para o desenvolvimento de DCV, não havia estudos publicados em casuísticas compostas exclusivamente por pacientes diabéticos.

A procura de marcadores genéticos para identificar pacientes diabéticos com maior risco para o desenvolvimento de DCV é importante, pois poderia possibilitar uma adequação do tratamento ao grau de risco genético, com intensificação das medidas terapêuticas naqueles pacientes de maior risco.

2 Objetivos

O objetivo desse estudo foi avaliar o papel de variações alélicas no gene que codifica o receptor da vitamina D (*VDR*) na predisposição a doenças cardiovasculares em pacientes portadores de DM 2. Os seguintes polimorfismos foram estudados:

- BsmI G>A (rs1544410) no intron 8
- Apal A>C (rs7975232) no intron 8
- TaqI C>T (rs731236) no exon 9

3 Métodos

Este trabalho foi realizado sob orientação do Dr. Gilberto Velho na Unidade de Pesquisa 695 do "*Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale - INSERM*" (Instituto Nacional da Saúde e da Pesquisa Médica da França) situado em Paris. Este laboratório, dirigido pelo Professor Michel Marre, foi criado em janeiro de 2005 na Faculdade de Medicina Xavier Bichat, Universidade Paris Diderot (*Paris 7*) e tem como temática o estudo dos determinantes genéticos do DM 2 e de suas complicações vasculares.

3.1 Pacientes e características fenotípicas

Esse estudo genético foi realizado a partir de duas coortes de pacientes de origem francesa, portadores de DM 2 com fenótipos detalhados no que diz respeito aos fatores de risco cardiovasculares.

3.1.1 Coorte prospectiva DIABHYCAR

O estudo DIABHYCAR (DIABetes não insulino dependente, HYpertensão, microalbuminúria, ou proteinúria, eventos CARdiovasculares e ramipril) foi um estudo multicêntrico, internacional (envolveu 15 países

além da França) randomizado, prospectivo, duplo-cego, placebo controlado com início em 1995 e com duração de seis anos. A população do estudo era composta de 4.912 pacientes portadores de DM 2 (homens e mulheres) com forte risco para o desenvolvimento de DCV. Esse estudo tinha como objetivo inicial avaliar se baixas doses de ramipril (12,5 mg) poderiam reduzir a morbidade e mortalidade renal e cardiovascular em pacientes com DM 2 normotensos ou hipertensos com microalbuminúria ou proteinúria. O desfecho primário avaliado era a combinação de morte de origem cardiovascular ou desconhecida (incluindo morte súbita), IAM e AVC, ou necessidade de hemodiálise ou transplante renal. Os desfechos secundários avaliados foram: incidência de morte independente da causa, pacientes admitidos no hospital com indicação de angioplastia ou revascularização do miocárdio (RM), insuficiência cardíaca congestiva documentada, acidente isquêmico transitório e duplicação das concentrações de creatinina sérica. O IAM foi diagnosticado como a ocorrência de pelo menos dois de três dos seguintes critérios: dor torácica constritiva com duração de 20 minutos ou mais, aumento da creatinina fosfoquinase sérica (CPK) e ou das concentrações de troponina ou alterações eletrocardiográficas típicas. A morte súbita foi definida como morte ocorrida instantaneamente ou dentro de uma hora após o início de novos sintomas cardíacos (arritmia, IAM) ou o não testemunho da morte, quando o corpo fosse encontrado e a causa da morte não pudesse ser descoberta. Todos os eventos foram julgados por uma comissão independente do estudo ¹⁵¹.

A média de acompanhamento dos pacientes foi de 3,6 anos, com consultas médicas a cada seis meses.

Os critérios de inclusão do estudo foram os seguintes:

- Homens ou mulheres com idade ≥ 50 anos ao início do estudo;
- Tratamento com pelo menos um antidiabético oral (ADO);
- Albuminúria ≥ 20 mg/L determinada a partir de duas amostras consecutivas de urina;
- Creatinina sérica $\leq 1,7$ mg/dL.

Os critérios de exclusão foram os seguintes:

- Tratamento com insulina, inibidores da enzima conversora da angiotensina (IECA), ou antagonistas do receptor da angiotensina II;
- Insuficiência cardíaca congestiva documentada;
- IAM nos três meses que antecederam o início do estudo;
- Infecção do trato urinário;
- Intolerância prévia aos IECA (como tosse, angioedema ou outras reações alérgicas);
- Uso de drogas, alcoolismo crônico e incapacidade de compreender os métodos e metas do estudo;
- Baixa expectativa de vida (câncer, AIDS, etc.).

O delineamento experimental, a metodologia e os resultados desse estudo, que demonstrou não haver efeito de baixas doses de ramipril na prevenção de eventos cardiovasculares e renais, foram publicados anteriormente ^{151,152}. Na França, foram recrutados 3.137 participantes.

Amostras de sangue foram coletadas para extração do DNA genômico e armazenadas em um banco de DNA. Todos os participantes assinaram o consentimento informado. O protocolo de estudo foi aprovado pelo comitê de ética da Universidade de Angers.

As características clínicas e laboratoriais da coorte Diabhykar ao início do estudo estão detalhadas na Tabela 2.

Tabela 2. Características demográficas, clínicas e laboratoriais dos pacientes da coorte DIABHYCAR ao início do estudo

Pacientes (n)	3.137
Sexo masculino (%)	73%
Idade (anos)	66 ± 8
Idade ao diagnóstico de diabetes (anos)	55 ± 10
Duração do diabetes (anos)	10 ± 8
Glicemia plasmática de jejum (mg/dL)	171 ± 54
HbA1c (%)	7,9 ± 1,8
IMC (kg/m ²)	29,4 ± 4,6
Triglicérides (mg/dL)	196 ± 126
Colesterol total (mg/dL)	223 ± 41
LDL colesterol (mg/dL) †	136 ± 34
HDL colesterol (mg/dL)	51 ± 13
Clearance de creatinina (mL/min/1,73 m ²)	86 ± 30
Excreção urinária de albumina (mg/L) ‡	230 ± 623
EUA: Microalbuminúria / Macroalbuminúria (%)	77% / 23%
Hipertensão arterial (%) §	56%
Tabagismo (%)	15%

† Dados válidos para 2.510 pacientes

‡ EUA = Excreção urinária de albumina : microalbuminúria: 20 mg/L ≤ EUA < 200mg/L; macroalbuminúria: EUA ≥ 200mg/L

§ Hipertensão arterial: pressão arterial sistólica (PAS) >140 mmHg e / ou pressão arterial diastólica (PAD) >90 mmHg; ou PAS e PAD abaixo desses valores na presença de medicações anti-hipertensivas e história de hipertensão.

No presente estudo foram considerados como portadores de DAC na avaliação inicial os casos de IAM ou, também, angina pectoris. Durante o seguimento, foram considerados portadores de DAC os pacientes que apresentaram IAM, morte súbita ou história de revascularização do miocárdio (desfecho considerado no estudo do SNP do VDR). No início do estudo, 172 indivíduos (5,5%) tinham história prévia de IAM e 311 indivíduos (9,9%) tiveram o diagnóstico de angina pectoris. O IAM ocorreu em 95 pacientes (3%) durante o estudo, sendo que 10 desses indivíduos já tinham tido história de IAM no início do estudo. A RM foi realizada em 295 indivíduos (9,4%) durante o estudo, incluindo 80 pacientes com IAM prévio no início ou durante o estudo. A morte súbita ocorreu em 137 indivíduos (4,4%) durante o estudo, incluindo 25 pacientes com IAM prévio no início ou durante o estudo (Tabela 3).

Tabela 3. Estratificação dos casos de doença arterial coronariana (DAC) durante o seguimento de acordo com o *status* de DAC ao início do estudo.

Início de estudo		Seguimento							
		Ausência de DAC	RM	IAM	MS	RM + IAM	RM + MS	IAM + MS	RM + IAM + MS
Ausência de DAC	2.654	2.332	165	31	85	30	4	5	2
Angina Pectoris	311	227	44	7	21	9	2	1	0
IAM	172	113	33	6	13	3	3	1	0
TOTAL	3.137	2.672	242	44	119	42	9	7	2

DAC: Doença arterial coronariana; RM: Revascularização do miocárdio; IAM: Infarto agudo do miocárdio; MS: Morte súbita

IAM = 95 (44 + 42 + 7 + 2); RM= 295 (242+ 42 + 9 + 2); MS= 137 (119 + 9 + 7 + 2)

3.1.2 Estudo transversal - Coorte Necker-Cochin (NCH)

A população da coorte Necker-Cochin era composta de 713 pacientes caucasianos de origem francesa com diagnóstico de DM 2 recrutados de maneira consecutiva a partir dos Departamentos de Diabetologia dos Hospitais Necker e Cochin, em Paris.

As características demográficas, clínicas e laboratoriais estão demonstradas na Tabela 4.

Tabela 4. Características demográficas, clínicas e laboratoriais dos pacientes da coorte Necker-Cochin ao início do estudo.

Pacientes (n)	713
Sexo masculino (%)	63%
Idade (anos)	63 ± 11
Idade ao diagnóstico (anos)	52 ± 12
Duração do diabetes (anos)	11 ± 10
Glicemia plasmática de jejum (mg/dL)	166 ± 67
Hemoglobina A1c (%)	8,2 ± 2,0
Tratamento (Dieta / ADO/ Insulina)	17% / 52% / 31%
IMC (kg/m ²)	28,9 ± 5,4
Triglicérides ≥150 mg/dL (%) †	54%
Colesterol total ≥230 mg/dL (%) †	45%
LDL colesterol ≥130 mg/dL (%) †#	58%
HDL colesterol ≤40mg/dL (%)†	24%
Clearance de creatinina (mL/min/1,73 m ²)	82 ± 34
EUA: Normal / Microalbuminúria / Proteinúria (%) ‡	63% / 24% / 13%
Hipertensão arterial (%) §	77%
Tabagismo (%)	49%

Dados expressos como média ± SD.

ADO: antidiabéticos orais

† Valores coletados durante o estudo ou pré tratamento com estatinas e fibratos

Dados válidos para 604 pacientes

‡ EUA = Excreção urinária de albumina. Normal: <30 mg/24h; microalbuminúria: 30 mg/24h ≤ <300 mg/24h; proteinúria: ≥300 mg/24h

§ Hipertensão arterial: pressão arterial sistólica (PAS) ≥ 140 mmHg e / ou pressão arterial diastólica (PAD) ≥ 90 mmHg; ou PAS e PAD abaixo desses valores na presença de medicações anti-hipertensivas e história de hipertensão.

|| Tabagismo atual ou no passado

A presença de DAC foi documentada por uma história de IAM ou RM (n = 144), ou pela avaliação de isquemia miocárdica em pacientes com fatores de risco cardiovascular, com suspeita clínica de DAC (n = 86). Neste último caso, 347 pacientes foram submetidos a testes de estresse (eletrocardiograma de esforço ou tomografia computadorizada com tálio por emissão de fóton único ou ecocardiograma com dobutamina). Os pacientes com teste de esforço positivo foram submetidos à angiografia coronariana. A presença de DAC foi considerada presente se houvesse estenoses significativas ($\geq 50\%$) em pelo menos um vaso principal ou ramo. A DAC foi considerada ausente em pacientes com teste de esforço normal ou com ausência de estenose coronariana significativa à angiografia. Os procedimentos detalhados dos testes de esforço e da angiografia foram relatados previamente ¹⁵³. O grupo controle consistiu de 261 indivíduos diabéticos com teste de esforço normal ou com ausência de estenose coronária significativa na angiografia, mais 222 indivíduos diabéticos com eletrocardiograma normal e sem antecedentes, sintomas ou suspeita clínica de DAC. Todos os participantes assinaram o consentimento informado. O estudo foi aprovado pelo comitê de ética do hospital Necker (Paris CCPPRB Necker).

3.2 Protocolo Experimental

3.2.1 Extração do DNA

O DNA foi extraído a partir de amostras de sangue periférico conforme procedimento padrão previamente descrito ¹⁵⁴.

3.2.2 Metodologia de Análise Molecular

3.2.2.1 PCR em tempo real: técnica TaqMan

Esse método de genotipagem associa um método de amplificação clássica por reação em cadeia da polimerase (PCR) com a hibridização de sondas fluorescentes. A PCR foi realizada com a utilização do estojo comercial *StepOne Plus, Applied Biosystems* (Applied Biosystems, Foster City, California, USA), conforme as recomendações do fabricante. Como para a realização da PCR clássica, utilizamos dois iniciadores necessários para a amplificação do produto. Essa técnica utilizando as sondas TaqMan é baseada na atividade exonuclease 5' – 3' da DNA polimerase. A sonda Taqman é uma sonda linear duplamente marcada complementar a sequência do polimorfismo a identificar. Na extremidade 5' se encontra um fluorocromo (*reporter*) e na extremidade 3' se encontra um grupo *quencher* (extintor que absorve toda a emissão do fluorocromo).

Quando estimulado, o fluorocromo (*reporter*) transfere sua energia ao fluorocromo *quencher* pelo princípio FRET (*fluorescence resonance energy transfer*) que dissipa essa energia sob a forma de calor, emitindo a fluorescência. Quando se inicia a hibridização, a sonda e os iniciadores se fixam as suas sequências complementares, respectivamente. Na etapa seguinte a Taq polimerase inicia a elongação da nova fita de DNA a partir do iniciador até que ela encontre a sonda, removendo e hidrolisando a sonda com sua atividade 5' exonuclease. O *reporter* é então liberado da proteção do supressor (*quencher*) permitindo assim a emissão da fluorescência que aumenta a cada ciclo, proporcionalmente a taxa de hidrólise da sonda (Figura 7). As sondas associadas a dois fluorocromos diferentes são utilizados para discriminar a variância alélica e são denominadas de VIC e FAM. Como a Taq polimerase hidrolisa a sonda somente quando a mesma está hibridizada a sua sequência complementar, as condições de temperatura da etapa de polimerização devem ser ajustadas de maneira a permitir que a sonda fique hibridizada durante esta etapa. A maioria das sondas tem uma temperatura de dissociação (T_m) em torno de 70°C ou 5 a 10°C mais elevada que os iniciadores.

Polimerização**R = Reporter****Q = Quencher** **CLIVAGEM**

Figura 7. Figura representativa da metodologia de reação em cadeia da polimerase pela técnica TaqMan.

A medida da fluorescência é realizada por um equipamento de leitura (Chromo 4, Bio – Rad, France). A análise dos dados é realizada pelo programa *Opticon Monitor*. O resultado se apresenta sob a forma de um gráfico com o eixo da abscissa medindo a fluorescência da primeira sonda e o eixo da ordenada com as medidas da fluorescência da segunda sonda,

definindo assim três padrões que permitem distinguir os homozigotos frequentes, os heterozigotos e os homozigotos raros. Desta maneira teremos três genótipos, como por exemplo, na Figura 8: TT, CC e CT.

Figura 8. Gráfico representativo da leitura da fluorescência. Estão demonstrados os três possíveis genótipos: TT, CC e CT e o controle. Quando não conseguimos caracterizar um paciente dentro de uma nuvem específica, ele é considerado indeterminado e deverá ser repetido em uma nova análise.

Durante a aplicação da técnica TaqMan, foram utilizados os iniciadores demonstrados na Tabela 5.

Tabela 5. Sequência dos iniciadores utilizados para amplificação dos fragmentos que contêm os polimorfismos avaliados.

Polimorfismo	Sequência dos iniciadores	
	Foward	Reverse
BsmI	5'-GGCAACCTGAAGGGAGACGTAG-3'	5'-CTCTTTGGACCTCATCACCGAC-3'
Apal /TaqI	5'-CAGAGCATGGACAGGGAGCAA-3'	5'-GCAACTCCTCATGGCTGAGGTCTC-3'

Os reagentes utilizados na reação PCR TaqMan estão detalhados na Tabela 6.

Tabela 6. Preparação dos reagentes para uma reação em cadeia da polimerase pela técnica TaqMan

Reagentes	Volume	Concentração
<i>ABsolute QPCR Mix 2x</i> (ABgene)	2,5 µL	1x
<i>80x Assay Mix</i> (Applied Biosystems)	0,0625 µL	1x
Iniciador 1 (72 µM)		
Iniciador 2 (72 µM)		
Sondas (16 µM)		
H ₂ O	1,4375 µL	-
DNA (20 ng/µL)	1 µL	-
Volume total da reação	5 µL	

Três SNPs no gene VDR foram genotipadas: rs1544410 (ínton 8, G>A), rs7975232 (ínton 8, A>C) and rs731236 (exon 9, C>T). Esses polimorfismos foram previamente reconhecidos através de enzimas que cortam o DNA em sequências alvo específicas chamados sítios de restrição e denominados como BsmI, ApaI e TaqI respectivamente, sendo essa nomenclatura utilizada em todo o manuscrito. Todos esses polimorfismos estão depositados no banco de dados dbSNP no NCBI (National Center of Biotechnology Information) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>).

3.3 Análise Estatística

Os resultados estão expressos como médias $\pm$ desvio padrão. As diferenças entre os grupos foram avaliadas pelo teste *t* de Student, pela tabela de contingência do chi quadrado e pelo teste exato de Fisher. Antes das análises estatísticas genótipo-relacionadas serem realizadas, foi verificado se os genótipos estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg em todos os grupos de pacientes. As associações dos genótipos com DAC foram avaliadas pelo uso de modelos de regressão. O modelo de riscos proporcionais de Cox (também chamada de regressão de Cox) para dados de análise de sobrevivência foi utilizado para examinar o efeito de variáveis explicativas nas taxas de sobrevivência relacionadas ao tempo (ausência de doença) em análises prospectivas. As curvas de Kaplan-Meier foram utilizadas para traçar as taxas de sobrevivência (ausência de doença) ao longo do tempo de acordo com o genótipo. Análises de regressão logística foram utilizadas para as análises transversais. O *Hazard ratio* (HR) e o *Odds ratio* (OR), com seus respectivos intervalos de confiança de 95% foram computados nessas análises em relação ao alelo raro. Ajustes para as variáveis clínicas e biológicas foram realizadas incluindo essas variáveis como covariáveis num modelo de regressão. Os dados foram transformados em log para as análises quando a normalidade da distribuição foi rejeitada pelo teste W de Shapiro-Wilk. $P < 0,05$ foi considerado significativo.

As estatísticas foram realizadas com o *software* JMP (SAS Institute Inc., Carey, NC).

A determinação do desequilíbrio de ligação entre os SNPs, das frequências dos haplótipos, e o cálculo do *HR* e do *OR* associado com os haplótipos foram realizados com o software *THESIAS* v3. (<http://ecgene.net/genecanvas/uploads/THESIAS3.1/Documentation3.1.htm>)¹⁵⁵.

4 Resultados

4.1 Estudo Prospectivo - Coorte Diabhycar

4.1.1 Genótipos VDR e prevalência inicial de doença arterial coronariana

A prevalência de DAC (história de IAM ou diagnóstico de angina pectoris) na avaliação inicial foi de 15,4%. As principais características dos pacientes com e sem DAC na avaliação inicial são mostradas na Tabela 7.

Tabela 7. Características demográficas, clínicas e laboratoriais dos pacientes da coorte Diabhycar de acordo com o status da doença arterial coronariana ao início do estudo

	Doença Arterial Coronariana - Início do estudo		p
	Não	Sim	
Pacientes (n)	2.654	483	-
Sexo masculino: (%)	72%	80%	0,0003
Idade (anos)	65 ± 8	68 ± 8	<0,0001
Idade ao diagnóstico (anos)	55 ± 10	56 ± 10	0,05
Duração do diabetes (anos)	10 ± 8	12 ± 8	<0,0001
Glicemia plasmática de jejum (mg/dL)	171 ± 54	169 ± 54	0,2
HbA1c (%)	7,9 ± 1,8	7,9 ± 1,6	0,77
IMC (kg/m ²)	29,4 ± 4,6	29,2 ± 4,4	0,27
Triglicérides (mg/dL)	194 ± 124	206 ± 130	0,03
Colesterol total (mg/dL)	223 ± 41	225 ± 40	0,28
LDL colesterol (mg/dL) †	135 ± 34	137 ± 33	0,23
HDL colesterol (mg/dL)	50 ± 14	49 ± 13	0,01
Clearance de creatinina (mL/min/1,73 m ²)	87 ± 30	81 ± 29	<0,0001
Excreção urinária de albumina (mg/L)	218 ± 614	294 ± 668	0,0002
EUA: Microalbuminúria / Macroalbuminúria (%) ‡	78% / 22%	71% / 29%	0,004
Hipertensão arterial (%) §	54%	66%	<0,0001
Tabagismo (%)	18%	12%	0,02

DAC representa os casos de angina pectoris ou IAM no início do estudo

Dados são expressos como média ± SD. Estatísticas das variáveis quantitativas foram realizadas pelo teste *t* de Student com os dados log- transformados

† Dados válidos para 367 pacientes com DAC e 2.143 pacientes sem DAC

‡ EUA = Excreção urinária de albumina: microalbuminúria: 20 mg/L ≤ EUA <200 mg/L; macroalbuminúria: EUA ≥200 mg/L

§ Hipertensão arterial: Pressão arterial sistólica (PAS) >140 mmHg e / ou Pressão arterial diastólica (PAD) >90 mmHg; ou PAS e PAD abaixo desses valores na presença de medicações anti-hipertensivas e história de hipertensão

No grupo de pacientes com DAC observou-se maior frequência de pacientes do sexo masculino, maior idade, maior duração do DM, maiores concentrações plasmáticas de triglicérides, menores concentrações plasmáticas de HDL, menor *clearance* de creatinina, maior EUA e maior frequência de HAS em comparação ao grupo de pacientes sem DAC .

A prevalência de DAC ao início do estudo de acordo com o genótipo está demonstrada na Tabela 8 e sugere um possível efeito dominante do alelo raro dos SNPs BsmI e TaqI (Tabela 8).

Tabela 8. Prevalência de doença arterial coronariana nos pacientes da coorte Diabhycar de acordo com o genótipo do gene *VDR* ao início o estudo

Prevalência de DAC			
Genótipo <i>VDR</i>			
rs1544410 (BsmI)	GG	GA	AA
	13,7%	16,1%	16,9%
rs7975232 (ApaI)	AA	AC	CC
	16,8%	14,6%	15,5%
rs731236 (TaqI)	TT	TC	CC
	14,2%	15,9%	16,6%

As frequências dos genótipos nos pacientes com e sem DAC ao início do estudo estão demonstradas na Tabela 9.

Tabela 9. Frequência dos genótipos do gene *VDR* nos pacientes da coorte Diabhycar em relação ao *status* inicial da doença arterial coronariana

Genótipo	DAC - Início do estudo		Odds Ratio (IC 95%)
	Não (n=2.654)	Sim (n=483)	
rs1544410 (BsmI): GG	0,365	0,319	1,30 (1,05 – 1,62) p=0,01
	GA	0,502	
	AA	0,179	
rs7975232 (ApaI): AA	0,256	0,283	1,16 (0,93 – 1,35) p=0,18
	AC	0,486	
	CC	0,231	
rs731236 (TaqI): TT	0,370	0,337	1,24 (1,02 – 1,54) p=0,04
	TC	0,496	
	CC	0,167	

DAC: história de angina pectoris ou IAM no início do estudo

Odds ratio para os genótipos BsmI (XA vs GG), ApaI (AA vs XC), e TaqI (XC vs TT) determinados em análises de regressão logística ajustados para idade, sexo e duração do DM.

Análises de regressão logística ajustadas para as variáveis idade, sexo e duração de DM mostraram uma associação do alelo A do genótipo BsmI ($OR = 1,30$; IC 95% = 1,05 - 1,62; $p = 0,01$) e do alelo C de TaqI ($OR = 1,24$; IC 95% = 1,02-1,54; $P=0,04$) com a prevalência de DAC ao início do estudo.

Não foi observada nenhuma associação entre o SNP ApaI e a presença de DAC ao início do estudo (Tabela 9).

4.1.2 Incidência de doença arterial coronariana no seguimento em relação ao genótipo *VDR*

A incidência de DAC durante o seguimento da coorte DIABHYCAR foi de 14,8%. Os eventos de DAC compreenderam 95 casos de IAM, 295 casos de RM e 137 casos de morte súbita nos 465 pacientes. As principais

características basais dos pacientes com e sem DAC durante o seguimento (casos incidentes) são mostrados na Tabela 10.

Tabela 10. Características demográficas, clínicas e laboratoriais dos pacientes da coorte Diabhycar ao início do estudo em relação ao *status* da doença arterial coronariana no seguimento.

	Doença arterial coronariana no seguimento (incidência)		p
	Não	Sim	
Pacientes (n)	2.672	465	-
Sexo masculino: (%)	71%	80%	<0,0001
Idade (anos)	65 ± 8	67 ± 8	<0,0001
Idade ao diagnóstico de diabetes (anos)	55 ± 10	56 ± 10	0,11
Duração do diabetes (anos)	10 ± 8	11 ± 8	0,005
Glicemia plasmática de jejum (mg/dL)	171 ± 55	172 ± 52	0,53
HbA1c (%)	7,8 ± 1,8	8,0 ± 1,8	0,02
IMC (kg/m ²)	29,5 ± 4,7	28,9 ± 4,4	0,01
Triglicérides (mg/dL)	193 ± 127	210 ± 116	0,0003
Colesterol Total (mg/dL)	222 ± 40	230 ± 42	0,0002
LDL colesterol (mg/dL) †	135 ± 33	142 ± 34	0,0006
HDL colesterol (mg/dL)	51 ± 13	48 ± 11	<0,0001
Clearance de creatinina (mL/min/1,73m ²)	87 ± 30	80 ± 27	<0,0001
Excreção urinária de albumina (mg/L) ‡	202 ± 446	391 ± 1207	<0,0001
EUA: Microalbuminúria / Macroalbuminúria (%)	78% / 22%	68% / 32%	<0,0001
Hipertensão arterial (%) §	55%	62%	0,01
Tabagismo(%)	14%	15%	0,67
Grupo randomizado: ramipril (%)	50%	47%	0,37
Infarto agudo do miocárdio prévio (%)	4%	13%	<0,0001
Angina pectoris (%)	10%	23%	<0,0001

DAC representa a incidência de casos de IAM, RM ou morte súbita durante o estudo.

Dados são expressos como média ± SD; Estatísticas das variáveis quantitativas foram realizadas pelo teste *t* de Student com os dados log- transformados

† Dados válidos para 354 pacientes com DAC e 2.156 pacientes sem DAC

‡ EUA = Excreção urinária de albumina: microalbuminúria: 20 mg/L ≤ EUA <200 mg/L; macroalbuminúria: EUA ≥200 mg/L

§ Hipertensão arterial: pressão arterial sistólica (PAS) >140 mmHg e/ou pressão arterial diastólica (PAD) >90 mmHg; ou PAS e PAD abaixo desses valores na presença de medicação anti-hipertensiva e história de hipertensão

|| Grupo randomizado (ramipril) no estudo diabhycar original vs placebo

No grupo de pacientes com DAC durante o seguimento, observou-se maior frequência de pacientes do sexo masculino, maior idade, maior duração do DM, maiores concentrações de hemoglobina glicada (HbA1c) menor IMC, maiores concentrações plasmáticas de triglicérides, de colesterol total e de colesterol LDL, menores concentrações plasmáticas de HDL, menor *clearance* de creatinina, maior EUA e maior frequência de HAS em comparação ao grupo de pacientes sem DAC. A frequência de IAM e de angina pectoris ao início do estudo foi significativamente maior no grupo de pacientes que apresentou DAC durante o seguimento em comparação ao grupo sem DAC durante o seguimento.

A incidência de DAC de acordo com o genótipo está demonstrada na Tabela 11 e sugere um possível efeito dominante do alelo raro dos SNPs BsmI e TaqI.

Tabela 11. Incidência de doença arterial coronariana nos pacientes da coorte DiabhyCar no seguimento de acordo com o genótipo do gene *VDR*

Incidência de DAC			
Genótipo VDR			
rs1544410 (BsmI)	GG	GA	AA
	12,3%	16,5%	15,9%
rs7975232 (ApaI)	AA	AC	CC
	13,5%	15,5%	14,7%
rs731236 (TaqI)	TT	TC	CC
	13,2%	16,4%	13,8%

A curva de Kaplan-Meier para a coorte DIABHYCAR em relação ao genótipo do BsmI está demonstrada na Figura 9, na qual observa-se um maior número de eventos (IAM, RM ou morte súbita) nos portadores do alelo A ao longo dos 2.250 dias de seguimento.

Figura 9. Curva de sobrevida para a coorte Diabhycar durante o seguimento em relação ao genótipo BsmI (Curva de Kaplan-Meier). O eixo de sobrevivência (y) representa a ausência de doença arterial coronariana (DAC) definida como IAM, RM ou morte súbita. A incidência acumulada de DAC pode ser computada como 100% - sobreviventes

As frequências genótípicas dos pacientes com e sem evento cardiovascular durante o seguimento são mostradas na Tabela 12.

Tabela 12. Frequência dos genótipos do gene *VDR* e incidência de doença arterial coronariana nos pacientes da coorte Diabhycar no seguimento

Genótipo	DAC no seguimento (incidência)		<i>Hazard Ratio</i> (IC 95%)
	Não	Sim	
	(n=2.672)	(n=465)	
rs1544410 (BsmI): GG	0,369	0,297	1,16 (1,05 – 1,29) p=0,002
GA	0,47	0,529	
AA	0,161	0,174	
rs7975232 (ApaI): AA	0,261	0,258	1,08 (0,97 – 1,12) p=0,14
AC	0,507	0,534	
CC	0,232	0,208	
rs731236 (TaqI): TT	0,372	0,328	1,10 (0,99 – 1,21) p=0,05
TC	0,47	0,531	
CC	0,158	0,141	

DAC: casos incidentes de IAM, RM ou morte súbita. *Hazard ratio* para os genótipos BsmI (XA vs GG), ApaI (AX vs CC), e para TaqI (XC vs TT) determinado pelo método de riscos proporcionais de Cox para análise de sobrevivência. Cálculos ajustados para idade, sexo, duração do DM e alocação do grupo no estudo DIABHYCAR original (droga ou placebo)

As análises de riscos proporcionais de Cox para análise de sobrevivência mostraram uma associação do alelo A do BsmI com a incidência de DAC num modelo dominante (HR = 1,16; IC 95% = 1,05 - 1,29; p = 0,002) ajustados para idade, sexo, duração do diabetes e alocação do grupo no estudo DIABHYCAR original (droga ou placebo) (Tabela 12).

Não houve nenhuma interação entre o grupo que recebeu tratamento no estudo DIABHYCAR original e o efeito do genótipo na DAC (dados não mostrados). A associação permaneceu significativa após o ajuste para IMC, colesterol total, HDL colesterol, triglicérides e EUA, *clearance* de creatinina, HbA1c e a presença de HAS.

Uma tendência de associação do alelo C de TaqI com a incidência de DAC durante o seguimento foi observada após o ajuste para as mesmas covariáveis citadas acima ($HR = 1,10$; IC 95% = 0,99-1,21; $p = 0,05$). Nenhuma associação foi verificada com Apal (Tabela 12).

4.1.3 Prevalência total de doença arterial coronariana ao final do estudo - haplótipos VDR

Uma análise adicional foi realizada considerando a prevalência total de DAC ao final do estudo (casos presentes na fase inicial mais os casos incidentes). No grupo de pacientes com DAC observou-se uma maior frequência de pacientes do sexo masculino, maior idade, maior idade ao diagnóstico de DM, maior duração do DM, maior HbA1c, menor IMC, maiores concentrações plasmáticas de triglicérides, colesterol total e LDL, menores concentrações plasmáticas de HDL, menor *clearance* de creatinina, maior EUA e maior frequência de HAS em comparação ao grupo sem DAC (Tabela 13).

Tabela 13. Características demográficas, clínicas, e laboratoriais dos pacientes da coorte Diabhycar no início do estudo em relação à prevalência total de doença arterial coronariana ao final do estudo (basal + seguimento)

	DAC ao final do estudo (basal + seguimento)		p
	Não	Sim	
Pacientes (n)	2.332	805	-
Sexo masculino: (%)	71%	79%	<0,0001
Idade (anos)	65 ± 8	67 ± 8	<0,0001
Idade ao diagnóstico do diabetes (anos)	55 ± 10	56 ± 10	0,007
Duração do diabetes (anos)	10 ± 8	12 ± 8	<0,0001
Glicemia plasmática de jejum (mg/dL)	171 ± 54	171 ± 56	0,77
HbA1c (%)	7,8 ± 1,8	8,0 ± 1,8	0,04
IMC (kg/m ²)	29,5 ± 4,7	29,0 ± 4,5	0,01
Triglicérides (mg/dL)	192 ± 125	204 ± 125	0,003
Colesterol total (mg/dL)	222 ± 40	227 ± 42	0,001
LDL colesterol (mg/dL) †	134 ± 33	140 ± 34	0,001
HDL colesterol (mg/dL)	51 ± 13	49 ± 12	0,0001
Clearance de creatinina (mL/min/1,73m ²)	87 ± 30	81 ± 28	<0,0001
Excreção urinária de albumina (mg/L) ‡	192 ± 442	338 ± 996	<0,0001
EUA: Microalbuminúria / Macroalbuminúria (%)	78% / 22%	69% / 31%	<0,0001
Hipertensão arterial (%) §	54%	63%	<0,0001
Tabagismo (%)	15%	13%	0,12

DAC representa os casos de angina pectoris, IAM, RM, ou morte súbita ao final do estudo. Dados são expressos como média ± SD. Estatística das variáveis quantitativas foram calculadas pelo teste *t* de student com os dados transformados em log

† Dados válidos para 625 pacientes com DAC e 1.885 pacientes sem DAC

‡ EUA = Excreção urinária de albumina: microalbuminúria: 20 mg/L ≤ EUA <200 mg/L; macroalbuminúria: EUA ≥200 mg/L

§ Hipertensão arterial: Pressão arterial sistólica (PAS) >140 mmHg e / ou Pressão arterial diastólica (PAD) > 90 mmHg; ou PAS e PAD abaixo desses valores na presença de medicações antihipertensivas e história de hipertensão arterial

As associações alélicas previamente observadas foram confirmadas nessa análise, com uma significância estatística mais robusta. O *odds ratio* foi de 1,42 (IC 95% = 1,19 - 1,69; p = 0,0001) para o alelo A do Bsml e 1,31 (IC 95% = 1,10 - 1,56; p = 0,002) para o alelo C de Taql num modelo dominante,

ajustado para a idade, sexo e duração do DM. Resultados similares foram observados após ajuste para IMC, colesterol total, HDL colesterol, triglicérides, EUA, *clearance* de creatinina, HbA1c, e presença de HAS (Tabela 14).

Tabela 14. Frequência dos genótipos do gene VDR e prevalência total de doença arterial coronariana na coorte Diabhycar ao final do estudo (basal + seguimento).

Genótipo	DAC ao final do estudo (basal + seguimento)		Odds Ratio (IC 95%)
	Não (n=2332)	Sim (n=805)	
rs1544410 (BsmI): GG	0,375	0,308	1,42 (1,19 – 1,69) p=0,0001
GA	0,465	0,519	
AA	0,160	0,173	
rs7975232 (ApaI): AA	0,258	0,267	1,13 (0,97 – 1,38) p=0,23
AC	0,510	0,514	
CC	0,232	0,219	
rs731236 (TaqI): TT	0,378	0,329	1,31 (1,10 – 1,56) p=0,002
TC	0,467	0,515	
CC	0,155	0,156	

DAC: angina pectoris, IAM, RM ou morte súbita. Odds ratio para BsmI (XA vs GG), ApaI (AX vs CC), e TaqI (XC vs TT) determinado em análise de regressão logística ajustada para idade, sexo e duração do DM

Houve um forte desequilíbrio de ligação entre os três SNPs ($0,90 \leq D' \leq 0,94$) na coorte Diabhycar, com os dois haplótipos mais frequentes, GCT e AAC (BsmI/ApaI/taqI) representando aproximadamente 82% do total de haplótipos. A frequência do haplótipo GCT foi de 46,6% nos casos de DAC ao final do estudo e 44,0% nos indivíduos sem DAC, enquanto a frequência do haplótipo AAC foi 38,8% e 36,0% respectivamente. O haplótipo AAC esteve significativamente associado com aumento da prevalência de DAC quando comparado ao haplótipo GCT ($OR = 1,12$; $IC\ 95\% = 1,02-1,28$; $p = 0,04$) sendo essa análise ajustada para sexo, idade e duração do DM.

4.1.4 Genótipo *VDR* e fenótipos intermediários

A fim de investigar o papel de possíveis fenótipos intermediários nessas associações alélicas com DAC, foram comparadas as variáveis clínicas e laboratoriais ao início do estudo de acordo com o genótipo *Bsml* (Tabela 15).

Tabela 15. Características demográficas, clínicas e laboratoriais dos pacientes da coorte DIABHYCAR ao início do estudo de acordo com o genótipo *Bsml*

	rs1544410 (<i>Bsml</i>)			p
	GG	GA	AA	
Pacientes (n)	1.141	1.497	499	-
Sexo masculino: (%)	74%	72%	74%	0,53
Idade (anos)	66 ± 9	65 ± 8	66 ± 8	0,86
Idade ao diagnóstico do diabetes (anos)	55 ± 10	55 ± 10	55 ± 10	0,95
Duração do diabetes (anos)	10 ± 8	10 ± 8	11 ± 8	0,92
Glicemia plasmática de jejum (mg/dL)	169 ± 52	173 ± 56	169 ± 58	0,16
HbA1c (%)	7,9 ± 1,7	7,9 ± 1,8	7,7 ± 1,7	0,14
IMC(kg/m ²)	29,1 ± 4,4	29,6 ± 4,8	29,6 ± 4,8	0,09
Triglicérides (mg/dL)	198 ± 119	200 ± 134	183 ± 111	0,02
Colesterol total (mg/dL)	224 ± 40	224 ± 42	223 ± 40	0,86
LDL colesterol (mg/dL)	135 ± 35	136 ± 34	137 ± 33	0,26
HDL colesterol (mg/dL)	52 ± 14	50 ± 13	52 ± 14	0,0004
<i>Clearance</i> de creatinina (mL/min)	85 ± 29	86 ± 30	86 ± 30	0,70
Excreção urinária de albumina (mg/L)	226 ± 462	215 ± 469	204 ± 414	0,16
EUA.: Microalbuminúria / Macroalbuminúria (%)‡	77% / 23%	76% / 24%	77% / 23%	0,98
Hipertensão arterial(%)	55%	57%	56%	0,70

Dados expressos como média ± SD. Estatística das variáveis quantitativas foram realizadas com ANOVA com os dados transformados em log

‡ EUA = Excreção urinária de albumina: microalbuminúria: 20 mg/L ≤ EUA <200 mg/L; macroalbuminúria: EUA ≥200 mg/L

|| Hipertensão arterial: Pressão arterial sistólica (PAS) >140 mmHg e / ou Pressão arterial diastólica (PAD) > 90 mmHg; ou PAS e PAD abaixo desses valores na presença de medicações antihipertensivas e história de hipertensão arterial

A idade ao diagnóstico do DM, os valores de HbA1c, o IMC , a função renal, a prevalência de HAS, as concentrações plasmáticas de colesterol total e LDL colesterol foram semelhantes nos diferentes genótipos. Curiosamente, as concentrações de triglicérides foram discretamente, mas significativamente inferiores em portadores do genótipo AA (risco), e as concentrações de HDL colesterol foram significativamente menores em portadores do genótipo GA.

4.2 Estudo Transversal – Coorte NCH

4.2.1 Prevalência de doença arterial coronariana em relação aos genótipos e haplótipos *VDR*

No presente estudo, a prevalência de DAC foi de 32,3%. As principais características demográficas, clínicas e laboratoriais dos pacientes com e sem DAC estão demonstradas na Tabela 16.

Tabela 16. Características demográficas, clínicas e laboratoriais dos pacientes da coorte NCH em relação ao status da doença arterial coronariana

	Sem DAC	Com DAC	p
Pacientes (n)	483	230	-
Sexo masculino (%)	59%	72%	0,0007
Idade (anos)	61 ± 11	67 ± 10	<0,0001
Idade ao diagnóstico de diabetes (anos)	51 ± 12	53 ± 12	0,05
Duração do diabetes (anos)	10 ± 9	14 ± 10	<0,0001
Glicemia plasmática de jejum (mg/dL)	169 ± 67	160 ± 67	0,06
Hemoglobina A1c (%)	8,2 ± 2,1	8,2 ± 1,8	0,65
Tratamento (Dieta / ADO / Insulina)	20%/54%/26%	13%/47%/40%	0,0003
IMC (kg/m ²)	28,8 ± 5,5	29,0 ± 5,2	0,52
Triglicérides ≥150 mg/dL (%) †	55%	53%	0,80
Colesterol total ≥ 230 mg/dL (%) †	38%	59%	<0,0001
LDL colesterol ≥130 mg/dL (%) †#	55%	65%	0,02
HDL colesterol ≤ 40 mg/dL (%)†	22%	29%	0,04
Clearance de creatinina (mL/min)	87 ± 34	72 ± 31	<0,0001
EUA: Normal / Microalbuminúria / Proteinúria (%) ‡	69%/21%/10%	53%/29%/18%	0,0008
Hipertensão arterial (%) §	72%	88%	<0,0001
Tabagismo (%)	44%	59%	0,0002

Dados expressos como média ± SD. Estatística das variáveis quantitativas foram calculadas pelo teste *t* de student com os dados transformados em log.

ADO: antidiabéticos orais

† Valores coletados durante o estudo ou pré tratamento com estatinas e fibratos

Dados válidos para 389 pacientes com DAC e 215 pacientes sem DAC

‡ EUA = Excreção urinária de albumina: Normal: <30 mg/24h; microalbuminúria: 30 mg/24h ≤ EUA < 300 mg/24h; proteinúria: ≥ 300 mg/24h

§ Hipertensão arterial: Pressão arterial sistólica (PAS) ≥140 mmHg e / ou Pressão arterial diastólica (PAD) ≥ 90 mmHg; ou PAS e PAD abaixo desses valores na presença de medicações antihipertensivas e história de hipertensão arterial

|| Tabagismo atual ou no passado

No grupo de pacientes com DAC observou-se maior frequência do sexo masculino, maior idade, maior duração do DM, maior frequência de uso de insulina, maiores frequências de colesterol total ≥ 230 mg/dL, de colesterol LDL ≥ 130 mg/dL e de colesterol HDL ≤ 40, menor *clearance* de creatinina, maior frequência de micro e de macroalbuminúria, maior frequência de HAS e de tabagismo (Tabela 16).

A prevalência de DAC de acordo com o genótipo *VDR* está demonstrado na tabela 17.

Tabela 17. Prevalência de doença arterial coronariana na coorte NCH de acordo com os genótipos do gene *VDR*

Prevalência de DAC			
Genótipo <i>VDR</i>			
rs1544410 (BsmI)	GG	GA	AA
	30%	32%	37%
rs7975232 (ApaI)	AA	AC	CC
	39%	30%	26%
rs731236 (TaqI)	TT	TC	CC
	29%	34%	35%

Análises de regressão logística foram realizadas para avaliar a associação dos genótipos com DAC (Tabela 18).

Tabela 18. Frequências dos genótipos na coorte NCH em relação ao *status* de doença arterial coronariana.

Genótipo	DAC		Odds Ratio (IC 95%)
	Não (n=483)	Sim (n=230)	
rs1544410 (BsmI): GG	0,312	0,279	1,40 (0,83 – 2,36) p=0,21
	GA	0,517	
	AA	0,204	
rs7975232 (ApaI): AA	0,280	0,376	1,47 (1,14 – 1,77) p=0,009
	AC	0,440	
	CC	0,184	
rs731236 (TaqI): TT	0,411	0,348	1,59 (1,01 – 2,57) p=0,05
	TC	0,478	
	CC	0,174	

Odds ratio para os genótipos BsmI (alelo A), ApaI (alelo A) e TaqI (alelo C) em um modelo co-dominante determinado por análise de regressão logística ajustada para sexo, idade e duração do DM.

Observou-se uma associação do alelo A de Apal com DAC em um modelo de co-dominância ($OR = 1,47$; IC 95% = 1,14 – 1,77; $p = 0,009$) ajustado para sexo, idade e duração do diabetes (Tabela 18). A associação permaneceu significativa após o ajuste para IMC, HbA1c, colesterol total, colesterol HDL, HAS, *clearance* de creatinina, albuminúria, uso de insulina e tabagismo.

Observou-se uma associação limítrofe do alelo C de TaqI com DAC ($OR = 1,78$; IC 95% = 1,00 – 2,57; $p = 0,05$) e uma ausência de associação com os genótipos do SNP BsmI (Tabela 18).

Os dois haplótipos mais frequentes dos genótipos BsmI/Apal/TaqI representam aproximadamente 81% de todos os haplótipos na coorte NCH. A frequência de GCT foi de 45% nos casos de DAC e 38,2% nos indivíduos sem DAC, enquanto a frequência de AAC foi de 40,1% e 36,3% respectivamente. O haplótipo AAC foi significativamente associado com DAC quando comparado ao haplotipo GCT ($OR = 1,33$; IC 95% = 1,03- 1.73; $p = 0,03$) após ajuste para idade, sexo e duração do DM.

5 Discussão

No presente estudo observou-se em duas diferentes coortes de pacientes portadores de DM 2 caucasianos franceses que variantes alélicas comuns do gene *VDR* modulam o risco de DAC.

A coorte DIABHYCAR foi inicialmente recrutada para um ensaio clínico prospectivo multicêntrico. Nesta coorte foram observadas associações do alelo A do genótipo BsmI com DAC no início assim como no seguimento do estudo (incidência) em um modelo dominante: os portadores do alelo A apresentam um aumento de 12 a 48% no risco para desenvolvimento de DAC. Associações menos robustas também foram observadas para o alelo C do SNP TaqI.

Esses resultados foram parcialmente confirmados em uma coorte menor composta de pacientes portadores de DM 2 recrutados a partir do Departamento de Diabetes de dois hospitais franceses (coorte-NCH). Nessa coorte, o alelo A de ApaI e o alelo C de TaqI estiveram associados com um aumento da prevalência de DAC. Interessantemente, a associação com DAC nas duas diferentes coortes foi observada com diferentes variantes do *VDR*. Embora seja difícil decifrar as razões para estas diferenças, algumas possibilidades devem ser consideradas, como por exemplo, as diferenças fenotípicas das duas populações, ou também os diferentes delineamentos experimentais ou os diferentes métodos de avaliação da DCV em ambas as coortes. Outra possível explicação poderia

ser os vários graus de desequilíbrio de ligação dos SNPs em cada uma das duas coortes com a variante funcional presente na região 3'-UTR do gene *VDR*, no entanto, em ambas as coortes estudadas, assim como na maioria das populações européias, os três SNPs estão em forte desequilíbrio de ligação. O haplótipo mais frequente foi composto pelo alelo frequente de BsmI, pelo alelo mais raro de Apal e pelo alelo frequente de TaqI (GCT). Em ambas as coortes, o haplótipo composto pelos alelos complementares (AAC) esteve associado com maior risco de DAC.

Uma série de estudos clínicos demonstrou associações destes polimorfismos no gene *VDR* com obesidade ¹⁵⁶, HAS ¹⁴⁰, DM e sensibilidade e secreção insulínica ¹⁵⁷, entretanto, os estudos com DAC são poucos. Além disso, estudos com tamanhos de amostra relativamente pequenos relataram resultados contraditórios. Alguns estudos evidenciaram uma associação do alelo B com prevalência de DAC ¹³⁷, com calcificação da válvula aórtica ¹⁴³, com prevalência de IAM ¹⁴² e com a espessura íntima média da artéria carótida ¹⁴⁴ em pacientes com fatores de risco cardiovasculares.

Diferentemente dos estudos anteriores, van Schooten e cols. (1998) ¹⁴¹ demonstraram uma associação do alelo b de BsmI com a gravidade da DAC. E um grande estudo envolvendo 3.441 pacientes alemães com fenótipos cardiovasculares determinados pela angiografia coronariana não demonstrou associação com a prevalência ou gravidade da DAC ¹⁴⁵. Resultados negativos também foram demonstrados em um estudo envolvendo a população chinesa ¹⁵⁹. Note-se que a maioria dos estudos citados acima envolve a variante BsmI do *VDR*.

Recentemente, Monraats e colaboradores (2010) investigou a contribuição de 15 haplótipos com o risco de re-estenose de artéria coronariana após a intervenção coronariana percutânea em 3.104 pacientes holandeses¹⁵⁸ e observaram associações de três haplótipos diferentes com o risco de re-estenose clínica. Todos os SNPs estavam localizados fora do bloco de haplótipos avaliado neste estudo.

Estudos epidemiológicos sugerem que a deficiência de vitamina D esteja associada com aumento do risco de aterosclerose, disfunção endotelial, HAS, DAC, insuficiência cardíaca e com mortalidade por todas as causas. A inativação do sistema da vitamina D em modelos animais confirma esses achados²⁵. Atualmente, está evidente que a vitamina D apresenta ações pleiotrópicas. Ramagopalan e cols. (2010)²⁶ identificaram recentemente 229 genes que sofrem influência direta da vitamina D após sua ligação ao VDR.

As bases fisiopatológicas propostas para explicar a associação entre o *status* de vitamina D e DAC são atribuídas a efeitos indiretos e diretos sobre o sistema cardiovascular. As células musculares lisas vasculares, as CE, os cardiomiócitos e os macrófagos expressam o VDR, assim como a enzima 1α -hidroxilase, responsável pela síntese extra-renal de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ²⁷. Os efeitos vasculares da vitamina D incluem a modulação da proliferação das células musculares lisas, supressão da calcificação vascular, modulação das citocinas inflamatórias, efeitos antitrombóticos e modulação do sistema das MMPs. Além disso, a vitamina D também modula os vários fatores de risco cardiovasculares. Ela é uma reguladora negativa do SRAA por suprimir

a expressão de renina, melhora a sensibilidade à insulina e também está associada a um melhor perfil lipídico ^{53,80,87}.

É interessante notar que a análise das características demográficas, clínicas e laboratoriais dos pacientes da coorte DIABHYCAR de acordo com o genótipo BsmI no início do estudo não evidenciou diferenças estatisticamente significantes no IMC, na frequência de HAS ou nas concentrações plasmáticas do colesterol total e do colesterol LDL. As únicas variáveis que foram diferentes entre os três genótipos foram a trigliceridemia e as concentrações de HDL, que foram respectivamente, menor e maior justamente no genótipo de risco para DCV (AA). Esses achados sugerem que o efeito dos genótipos no risco para DCV não dependa de diferenças que os mesmos determinam na prevalência desses fatores de risco.

Ainda não estão completamente estabelecidos os mecanismos pelos quais os SNPs avaliados se associam com as doenças complexas já estudadas. Os dois haplótipos mais frequentes definidos pelas variantes BsmI, ApaI e TaqI em caucasianos, GCT e AAC, estão em desequilíbrio de ligação com o VNTR poli (A) presente na região 3'-UTR: (A)₁₃₋₁₇, designado como curto e (A)₁₈₋₂₄, e longo, respectivamente ¹⁴⁷. Em alguns estudos, esses haplótipos foram associados com a estabilidade do mRNA, com o número de cópias do mRNA do VDR bem como com o nível de expressão da proteína VDR ^{148,149}. Assim, poderia se supor que o desequilíbrio de ligação do haplótipo AAC (risco) com o VNTR poli (A) longo estivesse associado à menor expressão do gene VDR. Sabendo-se que a quantidade de VDR é um fator crucial na atividade transcricional das células-

alvo ¹⁰⁸, uma diminuição na expressão de VDR poderia reduzir a ação da vitamina D nas células do sistema cardiovascular, comprometendo a ação protetora da 1,25(OH)₂D₃ sobre as artérias e o miocárdio.

Por outro lado, os resultados dos estudos que avaliram a repercussão funcional do VNTR na região 3'-UTR são contraditórios e Durrin e cols.(1999) ¹⁵⁰ não conseguiram demonstrar qualquer efeito dessa variante sobre o mRNA do gene *VDR*. Desta forma, não se pode afastar completamente que os SNPs estudados estejam, na verdade, em desequilíbrio de ligação com outras variantes alélicas no gene *VDR* que estejam, essas sim, associadas a predisposição a DCV.

Uma das limitações do presente estudo é a ausência de dados relacionados às concentrações plasmáticas de vitamina D nas populações estudadas, o que teria permitido uma análise de sua interação com os diferentes genótipos.

Em resumo, no presente estudo o haplótipo composto pelo alelo mais raro do genótipo BsmI, pelo alelo frequente de Apal e pelo alelo mais raro de TaqI (AAC) associou-se com maior risco de DAC em pacientes diabéticos tipo 2. Este efeito foi independente dos efeitos dos outros fatores de risco cardiovasculares conhecidos. Os mecanismos fisiopatológicos subjacentes para esta associação alélica precisam ser investigados em estudos futuros. Eles poderiam estar relacionados com o efeito modulador da vitamina D sobre os diferentes fatores associados ao desenvolvimento da aterosclerose. Mais estudos também são necessários para esclarecer os mecanismos genéticos subjacentes às associações das variantes do gene *VDR* com

DAC. Estes estudos devem ser baseados em haplótipos estendidos levando em conta os cinco blocos de haplótipos do gene *VDR*, incluindo a região promotora e a região 3'-UTR ¹⁵⁸. A interação dos genótipos do *VDR* com as concentrações circulantes de vitamina D também deve ser considerada.

6 Conclusão

Coorte DIABHYCAR :

- O alelo A do SNP BsmI associou-se com DAC no início e no seguimento do estudo em um modelo dominante, sendo que os portadores do alelo A apresentaram um aumento de 12 a 48% no risco para desenvolvimento de DAC;
- O alelo C do SNP TaqI associou-se com DAC no início e no seguimento do estudo em um modelo dominante;
- Não foi observada associação entre o SNP ApaI e a presença de DAC no início ou no seguimento do estudo;
- As associações estatísticas do alelo A do SNP BsmI e do alelo C do SNP TaqI foram mais robustas quando se considerou a prevalência total de DAC (casos presentes ao início do estudo mais casos incidentes);
- Houve um forte desequilíbrio de ligação entre os três SNPs ($0,90 \leq D' \leq 0,94$) sendo que os dois haplótipos mais frequentes, GCT e AAC (BsmI/ApaI/taqI) representaram aproximadamente 82% do total de haplótipos;
- O haplótipo AAC associou-se significativamente com a prevalência de DAC em comparação ao haplótipo GCT;
- Um maior número de eventos (IAM, RM ou morte súbita) foi observado nos portadores do alelo A do SNP BsmI ao longo dos 2.250 dias de seguimento.

Coorte Necker-Cochin:

- O alelo A do SNP Apal e o alelo C do SNP Taql associaram-se com um aumento na prevalência de DAC;
- Não foi observada associação entre o SNP Bsml e a prevalência de DAC;
- Os dois haplótipos mais frequentes, GCT e AAC (Bsml/Apal/taql) representaram aproximadamente 81% do total de haplótipos;
- O haplótipo AAC associou-se significativamente com a prevalência de DAC em comparação ao haplótipo GCT.

7 Anexo

Anexo 1. Correspondência entre os alelos reais e a nomenclatura RFLP.

- rs1544410 (BsmI) será usado **B** para designar o alelo com a presença de Adenina (A), e **b** para o alelo com a presença de Guanina (G). Portanto, BB = AA; Bb = AG; e bb = GG;
- rs7975232 (ApaI) será usado **A** para designar o alelo com a presença de Adenina (A), e **a** para o alelo com a presença de Citosina (C). Portanto, AA = AA; Aa = AC; e aa = CC;
- rs731236 (TaqI) será usado **T** para designar o alelo com a presença de Timina (T), e **t** para o alelo com a presença de Citosina (C). Portanto, TT = TT; Tt = TC e tt = CC.

8 Referências

1. Shaw JE, Sicree RA, Zimmet PZ. Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. *Diabetes Res Clin Pract.* 2010;87:4-14.
2. American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care.* 2010;33(supl 1).
3. 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;339:229-34.
4. Kannel WB, McGee DL. Diabetes and cardiovascular disease. The Framingham study. *JAMA.* 1979;241:2035-38.
5. Stamler J, Vaccaro O, Neaton JD, Wentworth D. Diabetes, other risk factors, and 12-yr cardiovascular mortality for men screened in the Multiple Risk Factor Intervention Trial. *Diabetes Care* 1993;16:434-44.
6. Goldberg IJ. Why does diabetes increase atherosclerosis? I don't know! *J Clin Invest.* 2004;114:613-15.
7. McGill JB, Schneider DJ, Arfken CL, et al. Factors responsible for impaired fibrinolysis in obese subjects and NIDDM patients. *Diabetes.* 1994;43:104-9.
8. Colwell JA. Vascular thrombosis in type II diabetes mellitus. *Diabetes.* 1993;42:8-11.
9. Henry P, Makowski S, Richard P, et al. Increased incidence of moderate stenosis among patients with diabetes: Substrate for myocardial infarction? *Am Heart J.* 1997;134:1037-43.

-
10. Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med*. 2005;352:1685-95.
 11. Lusis AJ, Ma R, Pajukanta P. Genetics of atherosclerosis. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2004;5:189-218.
 12. Lusis AJ. Genetic Factors in Cardiovascular Disease: 10 Questions. *Trends Cardiovasc Med*. 2003;13:309-16.
 13. Fumeron F, Reis AF, Velho G. Genetics of macrovascular complications in diabetes. *Curr Diab Rep*. 2006;6:162-8.
 14. Marenberg ME, Risch N, Berkman LF, Floderus B, de Faire U. Genetic susceptibility to death from coronary heart disease in a study of twins. *N Engl J Med*. 1994;330:1041-46.
 15. Shea S, Ottman R, Gabrieli C, Stein Z, Nichols A. Family history as an independent risk factor for coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol*. 1984;4:793-801.
 16. Cambien F. Coronary heart disease and polymorphisms in genes affecting lipid metabolism and inflammation. *Curr Atheroscler Rep*. 2005;7:188-95.
 17. Doria A, Wojcik J, Xu R, Gervino EV, Hauser TH, Johnstone MT, Nolan D, Hu FB, Warram JH. Interaction between poor glycemic control and 9p21 locus on risk of coronary artery disease in type 2 diabetes. *JAMA*. 2008;300:2389-97.
 18. Holick MF. Vitamin D deficiency. *N Engl J Med*. 2007;357:266-81.

19. Norman AW, Bouillon R. Vitamin D nutritional policy needs a vision for the future. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2010;235:1034-45.
20. Lee JH, O'Keef JH, Bell D, Hensrud DD, Holick MF. Vitamin D deficiency. An important, common, and easily treatable cardiovascular risk factor? *J Am Coll Cardiol*. 2008;52:1949-56.
21. Adams JS, Hewison M. Update in Vitamin D. *J Clin Endocrinol Metab*. 2010;95:471-78.
22. Hewison M, Burke F, Evans KN, Lammas DA, Sansom DM, Liu P, Modlin RL, Adams JS. Extra - renal 25-hydroxyvitamin D₃ -1 α -hydroxylase in human health and disease. *J Steroid Biochem Mol*. 2007;103:316-21.
23. Varga SR, Good M, Howard PA, Vacek JL. Role of vitamin D in cardiovascular health. *AM J Cardiol*. 2010;106:798-805.
24. Holick MF. The vitamin D deficiency pandemic and consequences for nonskeletal health: Mechanisms of action. *Mol Aspects Med*. 2008;29:361-68.
25. Bouillon R, Carmeliet G, Verlinden L, et al. Vitamin D and Human Health: Lessons from vitamin D receptor null mice. *Endocrine Reviews*. 2008; 29:726-76.
26. Ramagopalan SV, Heger A, Berlanga AJ et al. A ChIP-seq defined genome-wide map of vitamin D receptor binding: Associations with disease and evolution. *Genome Research*. 2010;20:1352-60.
27. Walters MR: Newly identified actions of the vitamin D endocrine system. *Endocr Rev*. 1992;13:719-64.

-
28. Hannah SS, Norman AW. 1,25(OH)₂D₃ regulated expression of the eukaryote genome. *Nutr. Rev.* 1994;52:376-82.
 29. Fleck A. Latitude and ischaemic heart disease. *Lancet* 1989;1:613.
 30. Grimes DS, Hindle E, Dyer T. Sunlight, cholesterol and coronary heart disease. *QJM.* 1996;89:579-89
 31. Douglas AS, Dunnigan MG, Allan TM, et al. Seasonal variation in coronary heart disease in Scotland. *J Epidemiol Community Health* 1995;49:575-82.
 32. Rostand SG. Ultraviolet light may contribute to geographic and racial blood pressure differences. *Hypertension* 1997;30:150-6.
 33. Kendrick J, Targher G, Smits G, et al. 25-Hydroxyvitamin D deficiency is independently associated with cardiovascular disease in the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Atherosclerosis.* 2009;205:255-60.
 34. Kim DH, Sabour S, Sagar UN, et al. Prevalence of hypovitaminosis D in cardiovascular diseases (from the National Health and Nutrition Examination Survey 2001 to 2004). *Am J Cardiol* 2008;102:1540-4.
 35. Martins D, Wolf M, Pan D, et al. Prevalence of cardiovascular risk factors and the serum levels of 25-hydroxyvitamin D in the United States: data from the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Arch Intern Med.* 2007;167:1159-65.

-
36. Melamed ML, Michos ED, Post W, Astor B. 25-hydroxyvitamin D levels and the risk of mortality in the general population. *Arch Intern Med*. 2008;168:1629-37.
 37. Targher G, Bertolini L, Padovani R, Zenari L, Scala L, Cigolini M, Arcaro G. Serum 25-hydroxyvitamin D3 concentrations and carotid artery intima-media thickness among type 2 diabetic patients. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2006;65(5):593-7
 38. Lindén V. Vitamin D and myocardial infarction. *Br Med J*. 1974;14;3(5932):647-50.
 39. Schmidt-Gayk H, Goossen J, Lendle F, Seidel D. Serum 25-hydroxycalciferol in myocardial infarction. *Atherosclerosis*. 1977;26:55-8.
 40. Lund B, Badskjaer J, Lund B Soerensen OH. Vitamin D and ischaemic heart disease. *Horm Metab Res*. 1978;10:553-6.
 41. Vik B, Try K, Thelle DS, Forde OH. Tromso Heart Study : vitamin D metabolism and myocardial infarction. *Br Med J*. 1979;2:176-9.
 42. Giovannucci E, Liu Y, Hollis BW, Rimm EB. 25 – Hidroxyvitamin D and risk of myocardial infarction in men : a prospective study. *Arch Intern Med* 2008;168:1174-1180.
 43. Scragg R, Jackson R, Holdaway IM, Lim T, Beaglehole R. Myocardial infarction is inversely associated with plasma 25-hydroxyvitamin D3 levels: a community-based study. *Int J Epidemiol*. 1990;19:559-63.
 44. Cigolini M, Iagulli MP, Miconi V, Galiotto M, Lombardi S, Targher G. Serum 25-hydroxyvitamin D3 concentrations and prevalence of cardiovascular disease among type 2 diabetic patients. *Diabetes Care*. 2006;29:722-4.

-
45. Dobnig H, Pilz S, Scharnagl H, et al. Independent association of low serum 25-hydroxyvitamin D and 1,25-dihydroxyvitamin D levels with all-cause and cardiovascular mortality. *Arch Intern Med* 2008;168:1340-9.
 46. Wang TJ, Pencina MJ, Booth SL, Jacques PF, Ingelsson E, Lanier K, Benjamin EJ, D'Agostino RB, Wolf M, Vasan RS: Vitamin D deficiency and risk of cardiovascular disease. *Circulation*. 2008;117:503-11.
 47. Ginde AA, Scragg R, Schwartz RS, Camargo CA Jr. Prospective study of serum 25-hydroxyvitamin D level, cardiovascular disease mortality, and all-cause mortality in older U.S. adults. *Am Geriatr Soc*. 2009; 57:1595-1603.
 48. Anderson JL, May HT, Horne BD, Bair TL, Hall NL, Carlquist JF, Lappé DL, Muhlestein JB; Intermountain Heart Collaborative (IHC) Study Group. Relation of vitamin D deficiency to cardiovascular risk factors, disease status, and incident events in a general healthcare population. *Am J Cardiol*. 2010;106:963-8.
 49. Pilz S, März W, Wellnitz B, Seelhorst U, Fahrleitner-Pammer A, Dimai HP, Boehm BO, Dobnig H. Association of vitamin D deficiency with heart failure and sudden cardiac death in a large cross-sectional study of patients referred for coronary angiography. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008;93:3927-35.
 50. Drechsler C, Pilz S, Obermayer-Pietsch B, Verduijn M, Tomaschitz A, Krane V, Espe K, Dekker F, Brandenburg V, März W, Ritz E, Wanner C. Vitamin D deficiency is associated with sudden cardiac death, combined cardiovascular events, and mortality in haemodialysis patients. *Eur Heart J*. 2010;31:2253-61.

-
51. Hsia J, Heiss G, Ren H, Allison M, Dolan NC, Greenland P, Heckbert SR, Johnson KC, Manson JE, Sidney S, Trevisan M : Women's Health Initiative Investigators. Calcium/vitamin D supplementation and cardiovascular events. *Circulation*. 2007;20;115:846-54.
 52. LaCroix AZ, Kotchen J, Anderson G, Brzyski R, Cauley JA, Cummings SR, Gass M, Johnson KC, Ko M, Larson J, Manson JE, Stefanick ML, Wactawski-Wende J. Calcium plus vitamin D supplementation and mortality in postmenopausal women: the Women's Health Initiative calcium-vitamin D randomized controlled trial. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2009;64:559-67.
 53. Li YC, Kong J, Wei M, Chen ZF, Liu SQ, Cao LP. 1,25-Dihydroxyvitamin D(3) is a negative endocrine regulator of the renin-angiotensin system. *J Clin Invest*. 2002;110:229-38.
 54. Zhou, C. et al. Calcium- independent and 1,25(OH)2D3- dependent regulation of the renin– angiotensin system in 1 α - hydroxylase knockout mice. *Kidney Int*. 2008;74:170-9.
 55. Yuan W, Pan W, Kong J, et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 suppresses renin gene transcription by blocking the activity of the cyclic AMP response element in the renin gene promoter. *J Biol Chem*. 2007;282: 29821–30.
 56. Burgess ED, Hawkins RG, Watanabe M. Interaction of 1,25 dihydroxyvitamin D and plasma rennin activity in high renin essential hypertension. *Am J Hypertens*. 1990;3:903-05. (Abstract)
 57. Pilz S, Tomaschitz A, Ritz E, Pieber TH. Vitamin D status and arterial hypertension: a systematic review. *Nat Rev Cardiol*. 2009;6:621-30.

-
58. Scragg R, Sowers M, Bell C. Serum 25-hydroxyvitamin D, ethnicity, and blood pressure in the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Am J Hypertens* 2007;20:713-9.
59. Forman JP, Giovannucci E, Holmes MD, Bischoff-Ferrari HA, Tworoger SS, Willett WC, Curhan GC. Plasma 25 hydroxyvitamin D level and risk of incident hypertension. *Hypertension*. 2007;49:1063-9.
60. Judd SE, Nanes MS, Ziegler TR, Wilson PW, Tangpricha V. Optimal vitamin D status attenuates the age-associated increase in systolic blood pressure in white Americans: results from the third National Health and Nutrition Examination Survey. *Am J Clin Nutr*. 2008;87:136-41.
61. Pfeifer M, Begerow B, Minne HW, Nachtigall D, Hansen C. Effects of a short-term vitamin D(3) and calcium supplementation on blood pressure and parathyroid hormone levels in elderly women. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001;86:1633-7.
62. Sugden JA, Davies JI, Witham MD, Morris AD, Struthers AD. Vitamin D improves endothelial function in patients with Type 2 diabetes mellitus and low vitamin D levels. *Diabet Med*. 2008;25:320-5.
63. Witham MD, Dove FJ, Dryburgh M, Sugden JA, Morris AD, Struthers AD. The effect of different doses of vitamin D₃ on markers of vascular health in patients with type 2 diabetes: a randomized controlled trial. *Diabetologia*. 2010;53:2112-9.
64. Witham MD, Nadir MA, Struthers AD. Effect of vitamin D on blood pressure- a systematic review and meta-analysis. *J Hypertens*. 2009;27:1948-54.

-
65. Kelly GS. Seasonal variations of selected cardiovascular risk factors. *Altern Med Rev*. 2005;10:307-20.
66. Liu E, Meigs JB, Pittas AG, McKeown NM, Economos CD, Booth SL, Jacques PF. Plasma 25-hydroxyvitamin d is associated with markers of the insulin resistant phenotype in nondiabetic adults. *J Nutr*. 2009;139:329-34.
67. Jorde R, Figenschau Y, Hutchinson M, Emaus N, Grimnes G. High serum 25-hydroxyvitamin D concentrations are associated with a favorable serum lipid profile. *Eur J Clin Nutr*. 2010;64:1457-64.
68. Kazlauskaitė R, Powell LH, Mandapakala C, Cursio JF, Avery EF, Calvin J. Vitamin D is associated with atheroprotective high-density lipoprotein profile in postmenopausal women. *J Clin Lipidol*. 2010;4(2):113-9.
69. Carbone LD, Rosenberg EW, Tolley EA, Holick MF, Hughes TA, Watsky MA, Barrow KD, Chen TC, Wilkin NK, Bhattacharya SK, Dowdy JC, Sayre RM, Weber KT. 25-Hydroxyvitamin D, cholesterol, and ultraviolet irradiation. *Metabolism*. 2008;57:741-8.
70. Shepherd J, Coble SM, Ford I, Isles CG, Lorimer AR, Macfarlane PW, McKillop JH, Packard CJ. For the west of Scotland coronary prevention study group. Prevention of coronary heart disease with pravastatin in men with hypercholesterolaemia. *N Engl J Med*. 1995;333:1301-07.
71. Grimes DS: Are statins analogues of Vitamin D? *The Lancet*. 368:83-86,2006.

-
72. Castrillón Pérez JL, Vega G, Abad L, et al. Effects of atorvastatin on vitamin D levels in patients with acute ischemic heart disease. *Am J Cardiol.* 2007;99:903-05.
73. Yavuz B, Ertugrul DT, Cil H, Ata N, Akin KO, Yalcin AA, Kucukazman M, Dal K, Hokkaomeroglu MS, Yavuz BB, Tural E. Increased levels of 25 hydroxyvitamin D and 1,25-dihydroxyvitamin D after rosuvastatin treatment: a novel pleiotropic effect of statins? *Cardio-vasc Drugs Ther* 2009;23:295-99.
74. Gupta AK, Sexton RC, Rudney H. Effects of vitamin D3 derivatives on cholesterol synthesis and HMG-CoA reductase activity in cultured cells. *J Lipid Res.* 1989;30:379-86.
75. Castrillón Pérez JL, Manteca LA, Vega G, Montes JP, de Luis D, Laita AD. Vitamin D Levels and Lipid Response to Atorvastatin. *Int J Endocrinol.* 2010;2010:1-4.
76. Bland R, Markovic D, Hills CE, Hughes SV, Chan SL, Squires PE, et al. Expression of 25 hydroxyvitamin D3-1alpha-hydroxylase in pancreatic islets. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2004;89-90(1- 5):121-5.
77. Norman AW, Frankel JB, Heldt AM, Grodsky GM. Vitamin D deficiency inhibits pancreatic secretion of insulin. *Science.* 1980;15;209(4458):823-5.
78. Boucher BJ, Mannan N, Noonan K, Hales CN, Evans SJ. Glucose intolerance and impairment of insulin secretion in relation to vitamin D deficiency in east London Asians. *Diabetologia.* 1995;38:1239-45.
79. Borissova AM, Tankova T, Kirilov G, Dakovska L, Kovacheva R. The effect of vitamin D3 on insulin secretion and peripheral insulin sensitivity in type 2 diabetic patients. *Int J Clin Pract.* 2003;57:258- 62.

-
80. Chiu KC, Chu A, Go VL, Saad MF. Hypovitaminosis D is associated with insulin resistance and beta cell dysfunction. *Am J Clin Nutr.* 2004;79:820-5.
 81. Maestro B, Campión J, Dávila N, Calle C. Stimulation by 1,25-dihydroxyvitamin D3 of insulin receptor expression and insulin responsiveness for glucose transport in U-937 human promonocytic cells. *Endocr J.* 2000;47:383-91.
 82. Calle C, Maestro B, García-Arencibia M. Genomic actions of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on insulin receptor gene expression, insulin receptor number and insulin activity in the kidney, liver and adipose tissue of streptozotocin-induced diabetic rats. *BMC Mol Biol.* 2008;18:9-65.
 83. Scragg R, Sowers M, Bell C; Third National Health and Nutrition Examination Survey. Serum 25-hydroxyvitamin D, diabetes, and ethnicity in the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Diabetes Care.* 2004;27:2813-8.
 84. Pittas AG, Lau J, Hu FB, Dawson-Hughes B. The role of vitamin D and calcium in type 2 diabetes. A systematic review and meta-analysis. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007; 92:2017-29.
 85. Need AG, O'Loughlin PD, Horowitz M, Nordin BE. Relationship between fasting serum glucose, age, body mass index and serum 25 hydroxyvitamin D in postmenopausal women. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2005;62:738-41.
 86. Macdonald HM, Mavroei A, Barr RJ, et al. Vitamin D status in postmenopausal women living at higher latitudes in the UK in relation to bone health, overweight, sunlight exposure and dietary vitamin D. *Bone.* 2008;42:996-1003.

-
87. Jorde R, Sneve M, Emaus N, Figenschau Y, Grimnes G. Cross-sectional and longitudinal relation between serum 25-hydroxyvitamin D and body mass index: the Tromsø study. *Eur J Nutr.* 2010;49:401-7.
 88. McGill AT, Stewart JM, Lithander FE, et al. Relationships of low serum vitamin D3 with anthropometry and markers of the metabolic syndrome and diabetes in overweight and obesity. *Nutr J.* 2008;28;7-12.
 89. Compston JE, Vedi S, Ledger JE, et al. Vitamin D status and bone histomorphometry in gross obesity. *Am J Clin.* 2008;34:2359-63.
 90. Bell NH, Epstein S, Greene A, et al. Evidence for alteration of the vitamin D – endocrine system in obese subjects. *J Clin Invest.* 1985;76:370-3.
 91. Wortsman J, Matsuoka LY, Chen TC, et al. Decreased bioavailability of vitamin D in obesity. *Am J Clin Nutr.* 2000;72:690-93.
 92. Kong J, Li YC. Molecular mechanism of 1,25-dihydroxyvitamin D3 inhibition of adipogenesis in 3T3-L1 cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2006;290:916-24.
 93. Wood RJ. Vitamin D and adipogenesis: new molecular insights. *Nutr Rev* 2008;66:40-6. (Abstract)
 94. Burton GR, Guan Y, Nagarajan R, and McGehee RE Jr. Microarray analysis of gene expression during early adipocyte differentiation. *Gene* 2002;293: 21-31.
 95. Vilarrasa N, Vendrell J, Maravall J, Elío I, Solano E, San José P, García I, Virgili N, Soler J, Gómez JM. Is plasma 25(OH) D related to adipokines, inflammatory cytokines and insulin resistance in both a healthy and morbidly obese population? *Endocrine.* 2010;38:235-42.

-
96. Ding C, Parameswaran V, Blizzard L, Burgess J, Jones G. Not a simple fat-soluble vitamin: Changes in serum 25-(OH)D levels are predicted by adiposity and adipocytokines in older adults. *J Intern Med.* 2010; 268:501-10.
97. C. Menendez, M. Lage, R. Peino, R. Baldelli, P. Concheiro, C. Diéguez, F.F. Casanueva. Retinoid acid and vitamin D3 power- fully inhibit in vitro leptin secretion by human adipose tissue. *J. Endocrinol.* 2001;170, 425-31.
98. Baz – Hecht M, Goldfine AB. The impact of vitamin D deficiency on diabetes and cardiovascular disease. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Care.* 2010;17:113-119.
99. Simpson RU, Thomas GA, and Arnold AJ. Identification of 1,25-dihydroxyvitamin D3 receptors and activities in muscle. *J Biol Chem.* 1985;260:8882-91.
100. Chen S, Glenn DJ, Ni W, Grigsby CL, Olsen K, Nishimoto M, Law CS, Gardner DG. Expression of the vitamin D receptor is increased in the hypertrophic heart. *Hypertension.* 2008;52:1106-12.
101. Xiang W, Kong J, Chen S, Cao LP, Qiao G, Zheng W, Liu W, Li X, Gardner DG, Li YC. Cardiac hypertrophy in vitamin D receptor knockout mice: role of the systemic and cardiac renin-angiotensin systems. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2005;288:E125-32.
102. Nibbelink KA, Tishkoff DX, Hershey SD, Rahman A, Simpson RU. 1,25(OH)₂-vitamin D₃ actions on cell proliferation, size, gene expression, and receptor localization, in the HL-1 cardiac myocyte. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2007;103:533-37.

-
103. Schlüter KD, Piper HM. Cardiovascular actions of parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide. *Cardiovasc Res.* 1998;39:523-4.
 104. Bogin E, Massry SG, Harary I. Effect of parathyroid hormone on rat heart cells. *J Clin Invest.* 1981;67:1215-27.
 105. Schluter KD, Piper HM. Trophic effects os catecholamines and parathyroid hormone on adult ventricular cardiomyocytes. *Am J Physiol.* 1992;263:H1739-46.
 106. Lin R, White JH: The pleiotropic actions of vitamin D. *Bioessays.* 2004;26:21-8.
 107. Mitsuhashi T, Morris RC Jr, Ives HE. 1,25-dihydroxyvitamin D3 modulates growth of vascular smooth muscle cells. *Clin Invest.* 1991;87:1889-95.
 108. Cardus A, Parisi E, Gallego C, Aldea M, Fernández E, Valdivielso JM. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 stimulates vascular smooth muscle cell proliferation through a VEGF-mediated pathway. *Kidney Int.* 2006;69:1377-84.
 109. Zittermann A, Schleithoff SS, Koerfer R. Vitamin D and vascular calcification. *Curr Opin Lipidol.* 2007;18:41-6.
 110. Zittermann A, Koerfer. Vitamin D in the prevention and treatment of coronary heart disease. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2008;11:752-57.
 111. Watson KE, Abrolat ML, Malone LL, et al. Active serum vitamin D levels are inversely correlated with coronary calcification. *Circulation* 1997; 96:1755-60.

-
112. Linhartová K, Veselka J, Sterbáková G, Racek J, Topolcan O, Cerbák R. Parathyroid hormone and vitamin D levels are independently associated with calcific aortic stenosis. *Circ J*. 2008;72:245-50.
113. Mathew S, Lund RJ, Chaudhary LR, Geurs T, Hruska KA. Vitamin D receptor activators can protect against vascular calcification. *J Am Soc Nephrol*. 2008;19:1509-19.
114. Koyama T, Shibakura M, Ohsawa M, Kamiyama R, Hirose S. Anticoagulant effects of 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ on human myelogenous leukemia cells and monocytes. *Blood*. 1998;1;92:160-7.
115. Aihara K, Azuma H, Akaike M, Ikeda Y, Yamashita M, Sudo T, Hayashi H, Yamada Y, Endoh F, Fujimura M, Yoshida T, Yamaguchi H, Hashizume S, Kato M, Yoshimura K, Yamamoto Y, Kato S, Matsumoto T. Disruption of nuclear vitamin D receptor gene causes enhanced thrombogenicity in mice. *J Biol Chem*. 2004;20;279:798-802.
116. Wu-Wong JR, Nakane M, Ma J. Vitamin D analogs modulate the expression of plasminogen activator inhibitor-1, thrombospondin-1 and thrombomodulin in human aortic smooth muscle cells. *J Vasc Res*. 2007;44:11-8.
117. Giuliatti A, Van Etten E, Overbergh L, Stoffels K, Bouillon R, Mathieu C. Monocytes from type 2 diabetic patients have a pro-inflammatory profile 1,25-Di hydroxyvitamin D₃ works as anti-inflammatory. *Diabetes Research and Clinical Practice*. 2007;77:47-57.
118. Oh J, Weng S, Felton SK, Bhandare S, Riek A, Butler B, Proctor BM, Petty M, Chen Z, Schechtman KB, Bernal-Mizrachi L, Bernal-Mizrachi C. 1,25(OH)₂ vitamin D inhibits foam cell formation and suppresses macrophage cholesterol uptake in patients with type 2 diabetes mellitus. *Circulation*. 2009;120:687-98.

-
119. Talmor Y, Golan E, Benchetrit S, Bernheim J, Klein O, Green J, Rashid G. Calcitriol blunts the deleterious impact of advanced glycation end products on endothelial cells. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2008;294:F1059-64.
120. Cohen-Lahav M, Shany S, Tobvin D, Chaimovitz C, Douvdevani A. Vitamin D decreases NF κ B activity by increasing I κ B α levels. *Nephrol Dial Transplant*. 2006;21:889-97.
121. Zehnder D, Bland R, Chana RS, Wheeler DC, Howie AJ, Williams MC, Stewart PM, Hewison M. Synthesis of 1,25-dihydroxyvitamin D(3) by human endothelial cells is regulated by inflammatory cytokines: a novel autocrine determinant of vascular cell adhesion. *J Am Soc Nephrol*. 2002;13:621-9.
122. Rahman A, Hershey S, Ahmed S, Nibbelink K, Simpson RU. Heart extracellular matrix gene expression profile in the vitamin D receptor knockout mice. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2007;103:416-9.
123. Burton PR, Tobin MD, Hopper JL. Key concepts in genetic epidemiology. *Lancet*. 2005;366(9489):941-51.
124. Permutt MA, Wasson J, Cox N. Genetic epidemiology of diabetes. *J Clin Invest*. 2005;115(6):1431-9.
125. Hattersley AT, McCarthy MI: What makes a good genetic association study? *Lancet*. 2005;366:1315-23.
126. Manolio TA, Bailey-Wilson JE, Collins FS. Genes, environment and the value of prospective cohort studies. *Nat Rev Genet*. 2006;7(10):812-20.Review.

127. Zeggini E, Rayner W, Morris AP, Hattersley AT, Walker M, Hitman GA, Deloukas P, Cardon LR, McCarthy MI: An evaluation of HapMap sample size and tagging SNP performance in large-scale empirical and simulated data sets. *Nat Genet.* 2005;37:1320-2.
128. Cardon LR, Abecasis GR. Using haplotype blocks to map human complex trait loci. *Trends Genet.* 2003;19:135-40. Review.
129. Baker AR, McDonnell DP, Hughes M, Crisp TM, Mangelsdorf DJ, Haussler MR, Pike JW, Shine J, O'Malley BW. Cloning and expression of full-length cDNA encoding human vitamin D receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1988;85:3294-8.
130. Uitterlinden AG, Fang Y, Van Meurs JB, Pols HA, Van Leeuwen JP. Genetics and biology of vitamin D receptor polymorphisms. *Gene.* 2004;338:143-56.
131. Valdivielso JM, Fernandez E. Vitamin D receptor polymorphisms and diseases. *Clin Chim Acta.* 2006;371:1-12.
132. Ye WZ, Reis AF, Dubois-Laforgue D, Bellanne-Chantelot C, Timsit J, Velho G: Vitamin D receptor gene polymorphisms are associated with obesity in type 2 diabetic subjects with early age of onset. *Eur J Endocrinol* 145:181-186, 2001.
133. Oh JY, Barrett-Connor E. Association between vitamin D receptor polymorphism and type 2 diabetes or metabolic syndrome in community-dwelling older adults: the Rancho Bernardo Study. *Metabolism.* 2002;51:356-9.
134. Hitman GA, Mannan N, McDermott MF, Aganna E, Ogunkolade W, Hales CN, Boucher BJ. Vitamin D receptor gene polymorphisms influence insulin secretion in Bangladeshi Asians. *Diabetes.* 1998;47:688-90.

-
135. McDermott MF, Ramachandran A, Ogunkolade BW, Aganna E, Curtis D, Boucher BJ et al. Allelic variation in the vitamin D receptor influences susceptibility to IDDM in Indian Asians. *Diabetologia*. 1997;40:971-75.
136. Pani MA, Knapp M, Donner H, Braun J, Baur MP, Usadel KH et al. Vitamin D receptor allele combinations influence genetic susceptibility to type 1 diabetes in Germans. *Diabetes*. 2000;49:504 -7.
137. Ortlepp JR, Lauscher J, Hoffmann R, Hanrath P, Joost HG: The vitamin D receptor gene variant is associated with the prevalence of type 2 diabetes mellitus and coronary artery disease. *Diabet Med*. 2001;18:842-5.
138. de Souza CM, Braosi AP, Luczyszyn SM, Avila AR, de Brito RB Jr, Ignácio SA, Probst CM, Riella MC, Sotomaior VS, Mira MT, Pecoits-Filho R, Trevilatto PC. Association between vitamin D receptor gene polymorphisms and susceptibility to chronic kidney disease and periodontitis. *Blood Purif*. 2007;25:411-9.
139. Testa A, Mallamaci F, Benedetto FA, Pisano A, Tripepi G, Malatino L, Thadhani R, Zoccali C. Vitamin D receptor (VDR) gene polymorphism is associated with left ventricular (LV) mass and predicts left ventricular hypertrophy (LVH) progression in end-stage renal disease (ESRD) patients. *J Bone Miner Res*. 2010;25:313-9.
140. Muray S, Parisi E, Cardus A, Craver L & Fernandez E. Influence of vitamin D receptor gene polymorphisms and 25-hydroxyvitamin D on blood pressure in apparently healthy subjects. *J Hypertens*. 2003;21:2069-75.
141. Van Schooten FJ, Hirvonen A, Maas LM, De Mol BA, Kleinjans JC, Bell DA, Durrer JD. Putative susceptibility markers of coronary artery disease: association between VDR genotype, smoking, and aromatic DNA adduct levels in human right atrial tissue. *FASEB J*. 1998;12:1409-17.

-
142. Ortlepp JR, Krantz C, Kimmel M, von Korff A, Vesper K, Schmitz F, Mevissen V, Janssens U, Franke A, Hanrath P, Zerres K, Hoffmann R. Additive effects of the chemokine receptor 2, vitamin D receptor, interleukin-6 polymorphisms and cardiovascular risk factors on the prevalence of myocardial infarction in patients below 65 years. *Int J Cardiol.* 2005;20;105:90-5.
143. Ortlepp JR, Hoffmann R, Ohme F, Lauscher J, Bleckmann F, Hanrath P. The vitamin D receptor genotype predisposes to the development of calcific aortic valve stenosis. *Heart.* 2001;85:635-8.
144. Kammerer CM, Dualan AA, Samollow PB, Périssé AR, Bauer RL, MacCluer JW, O'Leary DH, Mitchell BD. Bone mineral density, carotid artery intimal medial thickness, and the vitamin D receptor Bsm1 polymorphism in Mexican American women. *Calcif Tissue Int.* 2004;75:292-8.
145. Ortlepp JR, Von Korff A, Hanrath P, Zerres K, Hoffmann R: Vitamin D receptor gene polymorphism Bsm1 is not associated with the prevalence and severity of CAD in a large-scale angiographic cohort of 3441 patients. *Eur J Clin Invest.* 2003;33:106-9.
146. Timms PM, Mannan N, Hitman GA, Noonan K, Mills PG, Syndercombe-Court D, Aganna E, Price CP, Boucher BJ. Circulating MMP9, vitamin D and variation in the TIMP-1 response with VDR genotype: mechanisms for inflammatory damage in chronic disorders? *QJM.* 2002;95:787-96.
147. Ingles SA, Haile RW, Henderson BE, Kolonel LN, Nakaichi G, Shi CY, Yu MC, Ross RK, Coetzee GA. Strength of linkage disequilibrium between two vitamin D receptor markers in five ethnic groups: implications for association studies. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1997;6:93-8.

-
148. Ogunkolade BW, Boucher BJ, Prah J, Bustin SA, Burrin JM, Noonan K, North BV, Mannan N, McDermott MF, DeLuca HF, Hitman GA. Vitamin D receptor (VDR) mRNA and VDR protein levels in relation to vitamin D status, insulin secretory capacity, and VDR genotype in Bangladeshi Asians. *Diabetes*. 2002;51:2294-3000.
149. Fang Y, van Meurs JB, d'Alesio A, Jhamai M, Zhao H, Rivadeneira F, Hofman A, van Leeuwen JP, Jehan F, Pols HA, Uitterlinden AG. Promoter and 3'-untranslated-region haplotypes in the vitamin d receptor gene predispose to osteoporotic fracture: the rotterdam study. *Am J Hum Genet*. 2005;77:807-23.
150. Durkin LK, Haile RW, Ingles SA, Coetzee GA. Vitamin D receptor 3'-untranslated region polymorphisms: lack of effect on mRNA stability. *Biochim Biophys Acta*. 1999;30:1453:311-20.
151. Lievre M, Marre M, Chatellier G, Plouin P, Reglier J, Richardson L, Bugnard F, Vasmant D. The non insulin-dependent diabetes, hypertension, microalbuminuria or proteinuria, cardiovascular events, and ramipril (DIABHYCAR) study: design, organization, and patient recruitment. DIABHYCAR Study Group. *Control Clin Trials*. 2000;21:383-96.
152. Marre M, Lievre M, Chatellier G, Mann JF, Passa P, Menard J. Effects of low dose ramipril on cardiovascular and renal outcomes in patients with type 2 diabetes and raised excretion of urinary albumin: randomised, double blind, placebo controlled trial (the DIABHYCAR study). *BMJ*. 2004;328:495.
153. Le Feuvre CL, Barthelemy O, Dubois-Laforgue D, Maunoury C, Mogenet A, Baubion N, Metzger JP, Timsit J. Stress myocardial scintigraphy and dobutamine echocardiography in the detection of coronary disease in asymptomatic patients with type 2 diabetes. *Diabetes Metab*. 2005;31:135-42.

154. Joe Sambrook and David Russell. Preparation and analysis of eukaryotic genome DNA, Chapter 6. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Third Edition, 2001, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
155. Tregouet DA, Escolano S, Tired L, Mallet A, Golmard JL. A new algorithm for haplotype-based association analysis: the Stochastic-EM algorithm. *Ann Hum Genet.* 2004;68:165-77.
156. Filus A, Trzmiel A, Kuliczowska-Płaksej J, Tworowska U, Jedrzejuk D, Milewicz A, Medraś M. Relationship between vitamin D receptor BsmI and FokI polymorphisms and anthropometric and biochemical parameters describing metabolic syndrome. *Aging Male.* 2008;11:134-9.
157. Reis AF, Hauache OM, Velho G: Vitamin D endocrine system and the genetic susceptibility to diabetes, obesity and vascular disease. A review of evidence. *Diabetes Metab.* 31:318-325, 2005.
158. Monraats PS, Fang Y, Pons D, Pires NM, Pols HA, Zwinderman AH, de Maat MP, Doevendans PA, DeWinter RJ, Tio RA, Waltenberger J, Frants RR, Quax PH, van der Laarse A, van der Wall EE, Uitterlinden AG, Jukema JW. Vitamin D receptor: a new risk marker for clinical restenosis after percutaneous coronary intervention. *Expert Opin Ther Targets.* 2010;14:243-51.
159. Pan XM, Li DR, Yang L, Wang EY, Chen TY, Liu YJ, Liu M, Liao ZG. No association between vitamin D receptor polymorphisms and coronary artery disease in a Chinese population. *DNA Cell Biol.* 2009;28:521-5.