ANA LUDIMILA ESPADA CANCELA

**Avaliação da relação entre metabolismo mineral e
doença arterial coronariana em pacientes com
função renal preservada**

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

Programa de Nefrologia
Orientadora: Dra. Rosa Maria Affonso Moysés

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

Cancela, Ana Ludimila Espada

Avaliação da relação entre metabolismo mineral e doença arterial coronariana em pacientes com função renal preservada / Ana Ludimila Espada Cancela.-- São Paulo, 2011.

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

Orientadora: Rosa Maria Affonso Moysés.

Descritores: 1.Fósforo 2.Doença da artéria coronariana 3.Metabolismo mineral
4.Calcificação vascular 5.Fator de crescimento de fibroblastos 23

USP/FM/DBD-244/11

Dedicatória

Aos meus queridos pais Sandra e José Carlos,
que sempre acreditaram e me fizeram acreditar.

Ao meu marido Ramon,
amor e presença essenciais.

Agradecimentos

Esta tese é resultado do esforço e colaboração de várias pessoas que, direta ou indiretamente, são por ela responsáveis. Ela não seria possível, em primeiro lugar, sem o apoio e incentivo de meus pais, exemplos de integridade e generosidade que sempre nos proporcionaram acesso ao conhecimento e um ambiente propício ao desenvolvimento pessoal. A eles, devo a lição da persistência e a certeza de que seria capaz. Agradeço por sua dedicação e suporte constantes. Amo vocês.

Também não seria possível sem Ramon, pela coragem em mudar de cidade e mergulhar nesta aventura que iniciamos juntos. Agradeço por apoiar meu crescimento profissional e por tornar mais fácil este caminho que, certamente, seria muito mais difícil sem seu carinho, amor e bom humor.

Agradeço ainda à minha irmã Tatiane, que com talentos tão diversos dos meus, me ensinou a valorizar as diferenças. A ela e ao meu cunhado Cláudio, agradeço por nos darem minha linda sobrinha Bárbara, que trouxe alegria à nossa família.

Aos avós Lourdes e José (*in memoriam*), pela paciência e cuidado comigo. À avó Maria (*in memoriam*), pelos bons momentos. Aos tios e primos, pela convivência agradável. Aos meus sogros Cleuza e Sérgio e à Valéria, por permitirem uma integração familiar tão harmoniosa. Às amigas Catarina e Graciela, pelo apoio e companheirismo.

Aos pacientes, pela contribuição e confiança.

À Rosa, com quem tanto aprendi, agradeço imensamente pela paciência, incentivo e acompanhamento próximo ao longo de todo este período. À Dra. Vanda, criadora do grupo, pela acolhida calorosa e por ser, além de referência técnica, exemplo de ser humano.

À Sílvia Titan, minha admiração e gratidão pela disponibilidade e auxílio inestimável na análise estatística e revisão do texto.

Ao Dr. Raul Dias Santos, por viabilizar a realização do projeto no Instituto do Coração e pela valiosa colaboração.

Meus agradecimentos sinceros à Luciene e Fabiana, pelas dosagens de FGF-23 e pela prontidão em ajudar sempre.

Ao Dr. Rui Toledo e todos os funcionários da Pós-Graduação da Nefrologia, pela qualidade do trabalho desenvolvido e auxílio aos pós-graduandos.

Ao Dr. Carlos Eduardo Rochitte e equipe, pela análise dos Escores de Agatston; Drs. Luis Antônio Machado César e Eulógio Martinez por permitirem a inclusão de seus pacientes e ao Dr. Pedro Lemos e equipe, pelas análises referentes à cineangiocoronariografia.

À Dra. Maria Goretti Penido, grande incentivadora.

Por fim, agradeço a todos os profissionais do LIM-16 pela convivência amistosa e aos colegas de pós-graduação e amigos Juliana, Bia, Luciene, Rodrigo Bueno, Rodrigo Azevedo, Melani, Daniela e Patrícia, que tornaram este período mais agradável.

“A mente que se abre a uma nova idéia
jamais voltará ao seu tamanho original.”

Albert Einstein

Essa tese está de acordo com:

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

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 2a ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

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

Sumário

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

RESUMO

SUMMARY

1. INTRODUÇÃO	2
1.1 CALCIFICAÇÃO VASCULAR	3
1.1.1 Calcificação vascular e morbimortalidade	3
1.1.2 Fisiopatologia da calcificação vascular	5
1.1.3 Métodos de imagem para avaliação da calcificação vascular	10
1.2 METABOLISMO MINERAL	11
1.2.1 Homeostase do fósforo	11
1.2.1.1 Paratormônio	12
1.2.1.2 Vitamina D	15
1.2.1.3 Fibroblast Growth Factor 23	18
1.2.1.4 Klotho	23
1.2.2 Homeostase do cálcio	26
1.3 METABOLISMO MINERAL E MORTALIDADE/MORBIDADE CARDIOVASCULAR	27
1.3.1 Fósforo e doenças cardiovasculares	27
1.3.1.1 Fósforo e calcificação vascular	31
1.3.2 Vitamina D e doenças cardiovasculares	32
1.3.3 PTH e doenças cardiovasculares	36
1.3.4 FGF-23 e doenças cardiovasculares	37
2. OBJETIVOS	41
2.1 OBJETIVO PRINCIPAL	41
2.2 OBJETIVOS SECUNDÁRIOS	41
3. CASUÍSTICA E MÉTODOS	43
3.1 DEFINIÇÃO DOS FATORES DE RISCO	44
3.2 ANÁLISES BIOQUÍMICAS	45
3.3 ESCORE DE CALCIFICAÇÃO CORONARIANA (ESCORE DE AGATSTON)	45
3.4 CINEANGIOCORONARIOGRAFIA E ESCORES ASSOCIADOS	46
3.4.1 Escore de Friesinger	46
3.4.2 Escore de Gensini	47
3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA	47
3.6.1 Cálculo do tamanho amostral	47
3.6.2 Tratamento e testes estatísticos	48
3.7 RECURSOS FINANCEIROS	49
4. RESULTADOS	51
4.1 FATORES PREDITORES DA PRESENÇA DE CALCIFICAÇÃO CORONARIANA	54
4.2 FATORES PREDITORES DA PRESENÇA DE DOENÇA CORONARIANA OBSTRUTIVA	63
4.2.1 Efeito das variáveis analisadas sobre o Escore de Gensini	63
4.2.2 Efeito das variáveis analisadas sobre o Escore de Friesinger	72
4.2.3 Efeito das variáveis analisadas sobre a presença de obstrução coronariana superior a 50%	76
4.3 ANÁLISE DAS VARIÁVEIS DETERMINANTES DO FÓSFORO SÉRICO	81
4.4 ANÁLISE DAS VARIÁVEIS DETERMINANTES DO FGF-23 SÉRICO	84
4.5 ANÁLISE DAS VARIÁVEIS DETERMINANTES DO PTH	86
5. DISCUSSÃO	90
6. CONCLUSÃO	105
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	108

Lista de Abreviatura e Siglas

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

25(OH)vitD	25 hidroxí-vitamina D
BMP	Bone morphogenetic protein
Ca	Cálcio
CaR	Receptor sensível a cálcio
ClCr	Clearance de creatinina
CML	Células musculares lisas
CV	Calcificação vascular
DAC	Doença arterial coronariana
DCV	Doenças cardiovasculares
DM	Diabetes mellitus
DMP-1	Proteína matriz da dentina-1
DP	Desvio padrão
DRC	Doença renal crônica
EA	Escore de Agatston
EBCT	Tomografia computadorizada por emissão de elétrons
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
FGF-23	<i>Fibroblast Growth Factor 23</i>
FGFR	Receptor para os <i>Fibroblast Growth Factor's</i>
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HAS	Hipertensão arterial sistêmica
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HR	Hazard ratio
HU	Unidades Hounsfield

HVE	Hipertrofia ventricular esquerda
IAM	Infarto agudo do miocárdio
ICC	Insuficiência cardíaca congestiva
IL	Interleucina
InCor	Instituto do Coração da FMUSP
INF- γ	Interferon- γ
IMC	Índice de massa corpórea
IQR	Intervalo interquartil
KL	Klotho
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
MCP-1	<i>Monocyte chemoattractant protein 1</i>
MDRD	Modification of Diet in Renal Disease
MEPE	Fosfoglicoproteína extracelular
MGP	Proteína de matriz Gla
MMP	Metaloproteinase de matriz
MSTC	Tomografia computadorizada helicoidal
Na	Sódio
NF- κ B	Fator Nuclear Kappa B
OPG	Osteoprotegerina
OR	Odds ratio
P	Fósforo
PAD	Pressão arterial diastólica
PAS	Pressão arterial sistólica
PCR	Proteína C reativa

PHEX	Gene regulador do fósforo com homologias às endopeptidases no cromossomo X
PPi	Pirofosfato inorgânico
PTH	Paratormônio
PTHr	Receptor de paratormônio
RANK	Receptor Ativador do Fator Nuclear Kappa B
RANKL	Ligante do Receptor Ativador do Fator Nuclear Kappa B
sFRP-4	<i>Secreted frizzled-related protein-4</i>
TC	Tomografia computadorizada
TGF- β	<i>Transforming growth factor β</i>
TNF- α	Fator de necrose tumoral α
VDR	Receptor de vitamina D
Vit D	Vitamina D
VLDL	Lipoproteína de muito baixa densidade

Lista de Figuras

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Fatores que participam da regulação da calcificação vascular.....	9
Figura 2 – Regulação da homeostase do fósforo.....	26
Figura 3 – Efeito da hiperfosfatemia sobre as células vasculares lisas.....	32
Figura 4 – Processo de inclusão dos pacientes no protocolo.....	51
Figura 5 – Distribuição do Escore de Agatston na população estudada.....	54
Figura 6 – Distribuição dos níveis séricos de fósforo entre os grupos divididos de acordo com o Escore de Agatston.....	60
Figura 7 – Escore de Agatston de acordo com os tercis de fósforo.....	83

Lista de Tabelas

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Características clínicas e escores da população estudada.....	52
Tabela 2 -	Parâmetros laboratoriais da população estudada.....	53
Tabela 3 -	Análise univariada dos fatores preditores do Escore de Agatston de acordo com o modelo binomial negativo com excesso de zeros	56
Tabela 4 -	Análise multivariada dos fatores preditores do Escore de Agatston de acordo com o modelo binomial negativo com excesso de zeros.....	57
Tabela 5 -	Características clínicas e laboratoriais de acordo com o Escore de Agatston.....	59
Tabela 6 -	Regressão logística univariada sobre o risco de apresentar o Escore de Agatston maior que 10 HU.....	61
Tabela 7 -	Modelos de regressão logística multivariada sobre o risco de apresentar o Escore de Agatston maior que 10 HU.....	62
Tabela 8 -	Características dos grupos divididos de acordo com os tercís do Escore de Gensini	65
Tabela 9 -	Correlações entre o Escore de Gensini e variáveis contínuas.....	66
Tabela 10 -	Fatores associados ao logGensini na análise de regressão linear univariada.....	67
Tabela 11 -	Fatores associados ao logGensini na análise de regressão linear multivariada.....	68
Tabela 12 -	Modelos de regressão linear multivariada: avaliação do efeito do FGF-23 sobre o Escore de Gensini.....	69
Tabela 13 -	Regressão logística univariada sobre o risco de apresentar Escore de Gensini no terceiro tercil vs primeiro+segundo tercís.....	70
Tabela 14 -	Modelos de regressão logística multivariada: avaliação do fósforo como fator de risco para Escores de Gensini no terceiro tercil	71
Tabela 15 -	Modelos de regressão logística multivariada: avaliação do FGF-23 como fator de risco para Escores de Gensini no terceiro tercil.....	71
Tabela 16 -	Características dos grupos divididos de acordo com a mediana do Escore de Friesinger.....	73
Tabela 17 -	Regressão logística univariada sobre o risco de apresentar Escore de Friesinger superior à mediana.....	74
Tabela 18 -	Regressão logística multivariada: efeito ajustado do fósforo sobre o risco de apresentar Escore de Friesinger superior à mediana.....	75
Tabela 19 -	Regressão logística multivariada: efeito ajustado do FGF-23 sobre o risco de apresentar Escore de Friesinger superior à mediana.....	76
Tabela 20 -	Características dos grupos divididos de acordo com a presença de obstrução coronariana acima de 50%.....	78
Tabela 21 -	Regressão logística univariada sobre o risco de apresentar obstrução coronariana superior a 50%.....	79
Tabela 22 -	Regressão logística multivariada: efeito ajustado do fósforo sobre o risco de apresentar obstrução coronariana superior a 50%.....	79

Tabela 23 -	Regressão logística multivariada: efeito ajustado do FGF-23 sobre o risco de apresentar obstrução coronariana superior a 50%.....	80
Tabela 24 -	Características dos grupos divididos de acordo com o tercil de fósforo sérico.....	82
Tabela 25 -	Correlações entre o fósforo sérico e demais variáveis.....	83
Tabela 26 -	Análise de regressão linear multivariada <i>stepwise</i> sobre o fósforo sérico.....	84
Tabela 27 -	Características dos grupos divididos de acordo com o tercil de FGF-23 sérico.....	85
Tabela 28 -	Correlações entre FGF-23 e demais variáveis.....	86
Tabela 29 -	Características dos grupos de acordo com o tercil de PTH.....	87
Tabela 30 -	Correlações entre o PTH e demais variáveis.....	88
Tabela 31 -	Análise de regressão linear multivariada <i>stepwise</i> sobre o logPTH.....	88

Resumo

Resumo

Cancela ALE. *Avaliação da relação entre metabolismo mineral e doença arterial coronariana em pacientes com função renal preservada* [tese] São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2011.

INTRODUÇÃO: Os níveis séricos de fósforo (P) têm sido associados a doenças cardiovasculares e mortalidade em pacientes com doença renal crônica e na população geral. Estudos *in vitro* demonstram que altas concentrações de fósforo extracelular são capazes de induzir calcificação vascular e disfunção endotelial. O Fibroblast Growth Factor 23 (FGF-23) é um hormônio fosfatúrico e foi relacionado à presença de aterosclerose em pacientes idosos. **OBJETIVO:** O objetivo deste estudo foi investigar as relações entre P, FGF-23 e outros atores do metabolismo mineral e a ocorrência de doença arterial coronariana em pacientes com função renal preservada. **MÉTODOS:** Duzentos e noventa pacientes clinicamente estáveis com indicação de cineangiocoronariografia eletiva e clearance de creatinina superior a 60 ml/min/1.73 m² foram submetidos à Tomografia Computadorizada Multislice para avaliação da calcificação coronariana e coleta de sangue para dosagens bioquímicas. A calcificação coronariana foi quantificada através do Escore de Agatston (EA) e os Escores de Friesinger e Gensini foram calculados para quantificar a obstrução coronariana. **RESULTADOS:** A média de idade dos pacientes foi 58,1± 9,3 anos, 81% eram hipertensos e 35,5% diabéticos. Os pacientes foram divididos em grupos de acordo com o EA utilizando-se como ponto de corte o valor de 10 Unidades Hounsfield (HU). O P sérico foi maior no grupo de pacientes com EA > 10 HU (3,63±0,55 vs 3,49±0,52mg/dL; $p=0,019$). Cada 1 mg/dL de elevação no P sérico associou-se a um aumento de 92% no risco de apresentar o EA > 10HU [Odds Ratio (OR) =1,92, CI 1,56-3,19; $p=0,01$]. Quando os pacientes foram divididos de acordo com a mediana do Escore de Friesinger (4 pontos), o grupo com valores superiores à mediana apresentou P sérico maior (3,6±0,5 vs. 3,5±0,6 mg/dl; $p=0,04$) e FGF-23 menor (mediana 40,3 pg/mL intervalo interquartil 24,1-62,2 vs. 45,7 pg/mL intervalo interquartil 31,7-76,1; $p=0,01$) quando comparado àquele com valores menores ou iguais a 4. Pacientes no tercil mais alto do escore de Gensini também apresentaram P sérico mais elevado que os demais ($p<0,05$). Nas análises de regressão logística uni e multivariadas, cada 1 mg/dL de elevação no P sérico implicou em um aumento de 74% no risco de apresentar o Escore de Friesinger superior à mediana (OR 1,74, CI 1,06-2,88; $p=0,03$) e o FGF-23 sérico foi preditor negativo do Escore de Friesinger (OR 0,26, CI 0,11-0,63; $p=0,002$) Os níveis séricos de cálcio e paratormônio não mostraram associação com a presença de doença coronariana. **CONCLUSÃO:** Em pacientes com suspeita de doença arterial coronariana e função renal preservada, o fósforo sérico foi preditor da presença de calcificação e obstrução coronariana e houve uma associação negativa entre o FGF-23 sérico e a presença de obstrução coronariana.

Descritores: 1. Fósforo; 2 Doença da artéria coronária; 3. Metabolismo mineral; 4. Calcificação vascular; 5. Fator de crescimento de fibroblastos 23.

Summary

Summary

Cancela ALE. *Evaluation of the relationship between mineral metabolism and coronary artery disease in patients with preserved renal function*. [thesis]. Faculty of Medicine, University of Sao Paulo, SP (Brazil); 2011.

INTRODUCTION: Serum phosphorus (P) has been associated with cardiovascular diseases and mortality in chronic kidney disease patients and in the general population. *In vitro* studies suggest that excessive phosphorus induces vascular calcification and endothelial dysfunction. Fibroblast growth factor 23 (FGF-23) is a phosphaturic hormone and has been correlated to atherosclerosis in the community. **AIM:** This study intended to investigate the associations between P, FGF-23 and other mineral metabolism players and coronary artery disease in patients with preserved renal function. **METHODS:** Two-hundred ninety patients with a creatinine clearance higher than 60ml/min/1.73m² undergoing elective coronary angiography were submitted to Multislice Computed Tomography in order to evaluate coronary calcification and blood was collected for biochemical analyses. Coronary artery calcification was quantified using the Agatston Score (AS). Friesinger (FS) and Gensini Scores (GS) were calculated to quantify coronary obstruction. **RESULTS:** Considering the whole population, mean age was 58.1±9.3 anos, 81% were hypertensive and 35.5% were diabetics. Patients were divided according to AS using the value of 10 Hounsfield Units (HU) as the cutoff point. Serum phosphorus was higher in patients with an AS > 10HU when compared to the group with an AS ≤ 10 HU (3.63±0.55 vs 3.49±0.52mg/dL, *p*=0.019). Each 1 mg/dL of elevation in the serum phosphorus implied a 92% additional risk of presenting an AS > 10 HU [Odds Ratio (OR) =1.92, CI 1.56-3.19; *p*=0.01]. Patients were also divided using the median Friesinger score (4 points) as the cutoff value. Serum phosphorus was higher (3.6±0.5 vs. 3.5±0.6 mg/dl, *p*=0.04) and intact FGF-23 was lower (median 40.3 interquartile range 24.1-62.2 pg/mL vs. 45.7 interquartile range 31.7-76.1 pg/mL, *p*=0.01) in the FS > 4 group. Patients in the higher Gensini Score tertile presented elevated serum phosphorus when compared to the other groups (*p*<0.05). In the uni and multivariate logistic regression analyses, a rise of 1 mg/dL of serum phosphorus carried a 74% increase in the risk of having a FS higher than 4 (OR 1.74, CI 1.06-2.88; *p*=0.03) and FGF-23 was a negative predictor of FS (OR 0.26, CI 0.11-0.63; *p*=0.002). Serum calcium and parathormone were not associated with the presence of coronary artery disease. **CONCLUSIONS:** In patients with suspected coronary artery disease and preserved renal function, phosphorus was predictive of both coronary artery calcification and obstruction. There was a negative association between FGF-23 and coronary obstruction.

Descriptors: 1. Phosphorus; 2. Coronary Artery Disease; 3. Mineral metabolism; 4. Vascular calcification; 5. Fibroblast Growth Factor 23.

Introdução

1. INTRODUÇÃO

As doenças cardiovasculares (DCV) são consideradas a principal causa de morte nos países desenvolvidos (1). No Brasil, 300.000 óbitos, ou 32% do total, foram atribuídos a este tipo de evento no ano de 2006 (2). Apesar dos avanços obtidos nas últimas décadas no controle de condições de risco tradicionalmente estabelecidas como diabetes, hipertensão e dislipidemia, a incidência de DCV permanece estável (1,2). Paralelamente, surgem novos fatores antes desconhecidos que parecem estar envolvidos na fisiopatologia da doença aterosclerótica, responsável, em última instância, pela ocorrência de eventos clínicos.

Marcadores bioquímicos do metabolismo mineral e ósseo, principalmente o fósforo (P) sérico e seus moduladores, foram associados já há algum tempo à morbimortalidade cardiovascular na população de portadores de doença renal crônica (DRC) (3) e mais recentemente na população geral (4). O mecanismo fisiopatológico subjacente a estas associações provavelmente relaciona-se ao envolvimento do fósforo no processo de calcificação vascular (5) que, por sua vez, está intimamente relacionado à aterosclerose. Curiosamente, levantamentos populacionais americanos mostram que a ingestão de fósforo é superior aos níveis recomendados pelos órgãos reguladores e tende a aumentar proporcionalmente ao uso de produtos industrializados que contêm conservantes fosfatados (6). Os efeitos deletérios da ingestão abusiva de

fósforo sobre diversos sistemas começam a ser estudados e possuem uma dimensão ainda desconhecida.

1.1 Calcificação vascular

1.1.1 Calcificação vascular e morbimortalidade

A presença de calcificação vascular (CV) está associada à ocorrência de eventos cardiovasculares, sejam eles fatais ou não. Uma metanálise realizada em 2009 incluiu 30 estudos prospectivos que utilizaram diversos métodos de avaliação da calcificação vascular (radiografias, ecocardiograma e tomografia computadorizada). Após uma média de 10,1 anos de seguimento de 218.080 pacientes, a presença de calcificação em um destes métodos conferiu uma razão de chances (*odds ratio*) de 4,62 para mortalidade por qualquer causa e 3,94 para mortalidade cardiovascular (7). Em uma coorte que seguiu mais de 25.000 pacientes por uma média de 6,8 anos, os riscos relativos de morte aumentaram progressivamente de 2,2 a 12,5 vezes para escores de calcificação coronariana de 11 a 100 até escores maiores que 1000 unidades Hounsfield quando comparados a escores de 0 (8). O valor prognóstico da presença de calcificação coronariana se mantém entre as diferentes raças (9).

As diretrizes da *American Heart Association* em conjunto com o *American College of Cardiology* de 2007 reforçam a importância destes métodos diagnósticos e do escore de calcificação na avaliação do risco de

doença coronariana, principalmente em pacientes assintomáticos com risco cardiovascular intermediário e em pacientes com sintomas atípicos (10).

A calcificação vascular e a aterosclerose são processos relacionados e ocorrem simultaneamente do ponto de vista histopatológico. Estudo que avaliou 723 segmentos coronarianos encontrou correlação entre a presença de cálcio e a área da placa aterosclerótica. Os autores observaram que a ausência de calcificação não excluía a possibilidade de haver placas, mas que a probabilidade de haver doença obstrutiva era proporcional ao conteúdo arterial de cálcio (11). A presença da calcificação vascular também instabiliza a placa aterosclerótica e aumenta o risco de ruptura (12).

Agatston e cols, no estudo em que descreveram o escore usado atualmente, avaliaram 584 pacientes divididos em dois grupos: o primeiro grupo era composto por 109 pacientes com história de infarto agudo do miocárdio (IAM) ou mais de 50% de estenose luminal à angiografia (grupo aterosclerose clínica) e o segundo grupo não tinha história de doença arterial coronariana (DAC). O primeiro grupo, como esperado, apresentou maior prevalência de placas calcificadas que o grupo sem DAC; um escore de calcificação maior que 300 apresentou uma sensibilidade de 74% e uma especificidade de 81% para a detecção de aterosclerose clínica (IAM ou estenose luminal > 50%). O valor preditivo negativo do escore de cálcio igual a 0 foi de 98% (13).

1.1.2 Fisiopatologia da calcificação vascular

Existem quatro tipos de calcificação cardiovascular: calcificação aterosclerótica, calcificação da camada média arterial, calcificação valvar e arteriopatía urêmica calcificante(14). As duas primeiras são quase sempre concomitantes e contribuem para a ocorrência de eventos clínicos. A calcificação valvar compartilha fatores de risco com os dois primeiros tipos, enquanto a arteriopatía urêmica calcificante ocorre em pacientes portadores de doença renal crônica e usuários de varfarin e possui mecanismos diversos das demais categorias de calcificação (15).

A aterosclerose é um processo predominantemente inflamatório do qual participam macrófagos, linfócitos, mediadores inflamatórios, como as interleucinas (IL) 1, 4 e 6, interferon- γ (INF- γ) e fator de necrose tumoral- α (TNF- α), adiponectina e a lipoproteína de baixa densidade (LDL) em sua forma oxidada (14). Esses fatores favorecem a proliferação das células endoteliais, apoptose celular, necrose, calcificação e a formação da placa aterosclerótica (16). A calcificação aterosclerótica, como o próprio nome diz, ocorre na camada íntima vascular dentro da placa aterosclerótica e sua extensão reflete a gravidade do processo (17). Histopatologicamente apresenta-se de forma excêntrica, com distribuição irregular e obstrução do lúmen vascular (15). As estruturas se assemelham àquelas da ossificação endocondral, além de haver a mineralização do núcleo lipídico com áreas fibrosas, infiltrado inflamatório e expressão de diversas citocinas (15).

A calcificação da camada média, também conhecida como arteriosclerose de Mönckeberg, é bastante frequente em pacientes diabéticos, portadores de DRC e idosos (15). Esse tipo de calcificação compartilha as características da ossificação não-endocondral ou intramembranosa (18). O acometimento da camada média reduz a complacência vascular, aumenta a pressão de pulso e o trabalho miocárdico e, através destes mecanismos, contribui para a ocorrência de eventos cardiovasculares (15).

Nosso entendimento da fisiopatologia da calcificação vascular evoluiu muito nos últimos anos. Inicialmente considerava-se a calcificação um evento meramente passivo, decorrente da interação físico-química entre cálcio e fósforo e sua consequente deposição sob a forma de hidroxapatita na parede vascular. Recentemente, porém, várias evidências sugerem que se trata de um processo ativo, regulado biologicamente (18). Sabe-se que ocorre uma espécie de osteogênese dentro da parede vascular, que pode ser endocondral ou membranosa, e que isto só é possível devido à transformação fenotípica das células musculares lisas vasculares em células com características semelhantes às dos osteoblastos (18). Estas passam a expressar fatores de regulação do tecido ósseo e proteínas estruturais ósseas, como o fator de transcrição conhecido como Cbfa-1, responsável pela diferenciação osteoblástica, a fosfatase alcalina, a osteopontina, as BMP's (bone morphogenetic proteins), a proteína de matriz Gla (MGP), RANK/RANKL (Receptor Ativador do Fator Nuclear Kappa B/Ligante do Receptor Ativador do Fator Nuclear Kappa B) e a osteoprotegerina (OPG)

(17). Além disto, células semelhantes a osteoclastos também foram observadas nas placas calcificadas e teriam a função de reabsorver parte do mineral depositado (18).

A regulação do processo de calcificação vascular é feita através do balanço entre inibidores e ativadores da transição fenotípica que resulta na produção de células semelhantes aos osteoblastos. As BMP's 2 e 4 participam ativamente via Msx2 e Wnt (19) e sua produção é estimulada pela hiperglicemia (20). A presença de concentrações elevadas de fósforo no meio extracelular também age sobre as células musculares lisas dos vasos, efeito que será descrito com mais detalhes posteriormente (5, 21).

Entre os inibidores deste processo destacam-se a MGP e a fetuína, que evitam a precipitação dos cristais de hidroxiapatita ligando-se a eles e, assim, facilitam sua eliminação pelas células (19). Ambas são ainda antagonistas do efeito osteogênico das BMP's (19).

Estudos sobre a regulação da calcificação tecidual têm destacado o papel de moléculas pertencentes à família do TNF: o RANK, seu ligante (RANKL) e a OPG. O RANKL, uma proteína transmembrana, está presente na superfície dos osteoblastos. Quando o RANKL se liga ao RANK presente na superfície dos precursores dos osteoclastos, estas células se diferenciam e passam a reabsorver o tecido ósseo. Se, por outro lado, a OPG presente no meio extracelular se liga à RANKL, não ocorre a diferenciação osteoclástica e a reabsorção óssea é inibida (22). Assim, o balanço entre RANKL-OPG influencia a remodelação e a massa óssea (23). Além disso, esse sistema é também importante para o funcionamento das células

imunológicas (24) e parece participar da regulação da calcificação vascular (22, 23). Ratos *knock-out* para OPG desenvolvem, além de redução de massa óssea, calcificação arterial média difusa (23).

Os níveis séricos de OPG já foram correlacionados com a gravidade da lesão coronariana observada à angiografia (24) e com o aumento de eventos cerebrovasculares (25). Também já foi demonstrada associação entre níveis elevados de OPG e progressão acelerada de calcificação vascular em pacientes dialíticos (26). Ainda não se sabe se a elevação da OPG é parte do mecanismo que leva à calcificação vascular ou uma tentativa de auto-regulação e limitação do processo.

A complexidade das vias responsáveis pela calcificação vascular pode ser estimada pelo grande número de mediadores inflamatórios, hormônios e outras proteínas sabidamente envolvidas, conforme demonstra a Figura 1.

Figura 1- Fatores que participam da regulação da calcificação vascular

IFN- γ : Interferon γ , IL-6: Interleucina 6, MMP: Metaloproteinase de matriz, TNF: Fator de necrose tumoral, HDL: Lipoproteína de alta densidade, RANKL: Ligante do receptor ativador do fator nuclear κ B, OPG: Osteoprotegerina, PPi: Pirofosfato inorgânico, vit D: Vitamina D, PTH: Paratormônio, FGF-23: Fator de crescimento de fibroblastos-23, BMP: Proteína morfogenética óssea, MGP: Proteína Gla de matriz

FONTE: Adaptado de Sage e cols (18)

1.1.3 Métodos de imagem para avaliação da calcificação vascular

Os principais métodos de imagem utilizados para avaliar a presença de calcificações vasculares são: radiografia simples, ultrassonografia e tomografia computadorizada (27). Nenhum deles, no entanto, é capaz de localizar a camada vascular em que se encontra a calcificação, ou seja, se na íntima ou na camada média.

Apenas calcificações extensas são visualizadas na radiografia comum, o que torna este método pouco sensível. A ultrassonografia é bastante útil no diagnóstico de calcificações valvares. Seu uso para a detecção de depósitos vasculares, no entanto, é limitado, uma vez que o ultrassom intravascular, apesar de muito sensível e específico (28), é invasivo e indisponível na maioria dos centros.

A tomografia computadorizada (TC), inicialmente realizada por emissão de elétrons (EBCT) e mais recentemente a TC helicoidal (MDTC), ganha progressivamente mais espaço e tornou-se o método mais popular na avaliação da calcificação vascular coronariana. Isto foi possível devido ao desenvolvimento de escores como o de Agatston (13), capazes de fornecer uma quantificação da área calcificada que permite acompanhar a progressão da doença e avaliar os efeitos de diferentes intervenções. Já foi demonstrada correlação entre a área de cálcio detectada pela EBCT e a área da placa aterosclerótica na análise histopatológica (29). Além do seu valor preditivo em relação a eventos clínicos, o escore de calcificação coronariana obtido pela TC é também preditor de isquemia silenciosa à

cintilografia miocárdica (30) e de estenose coronariana significativa detectada tanto à cineangiocoronariografia (31, 32) quanto à angiotomografia (33).

1.2 Metabolismo mineral

1.2.1 Homeostase do fósforo

O fósforo (P) é um elemento fundamental em diversos processos celulares, principalmente de geração e transferência de energia e mineralização óssea. Participa ainda da estrutura da membrana celular, DNA e RNA e vários outros mediadores intracelulares. No entanto, dos cerca de 600 gramas de fósforo presentes no organismo humano, 85% encontram-se depositados na matriz extracelular óssea (34).

A concentração sérica de fósforo em adultos com função renal normal varia de 3,0 a 4,5 mg/dL e apresenta um ritmo circadiano próprio, com valores mais baixos pela manhã e mais elevados à noite, além de variar de acordo com sexo, idade, ingesta proteica e taxa de crescimento (34). O P está presente no soro principalmente sob a forma inorgânica (PO_4) e pode ser dividido em três frações: iônica (55%), ligada a proteínas (10%) e ligada a cátions como sódio, cálcio e magnésio (35%) (35). A homeostase do fósforo depende da absorção intestinal, da excreção urinária e do balanço entre os processos de reabsorção e formação ósseas.

O transporte de fósforo através das membranas das células intestinais e tubulares é feito por co-transportadores sódio/fósforo (Na/Pi) regulados biologicamente por hormônios.

O fósforo é encontrado na maioria dos grupos de alimentos e aproximadamente 800-1400 mg de fósforo são ingeridos ao dia. Destes, 60% são absorvidos no intestino delgado, principalmente no jejuno. A absorção de P no intestino ocorre tanto por mecanismo difusional, passivo, pela via paracelular, quanto de forma ativa, mediada pelo cotransportador Na/Pi tipo 2b e é regulada pelo calcitriol (34).

Aproximadamente 85% do fósforo sérico é filtrado através dos glomérulos e apenas 12 a 13% são excretados pela urina. Mais de 80% da reabsorção tubular de fósforo é realizada no túbulo proximal pelos cotransportadores Na/Pi tipos 2a e 2c presentes na membrana apical das células tubulares. Hipercalcemia, depleção do volume extracelular e redução da ingestão de fósforo aumentam a reabsorção proximal de fósforo, enquanto hipocalcemia, PTH e FGF-23 promovem a fosfatúria pela redução do número de cotransportadores Na/Pi na membrana celular (35).

1.2.1.1 Paratormônio

O PTH é produzido pelas células principais das glândulas paratireóides e o principal estímulo para sua produção é a redução da concentração extracelular de cálcio. Além da hipocalcemia, outros estímulos são o aumento do fósforo extracelular e a redução na concentração sérica da forma ativa de vitamina D (calcitriol). O PTH regula as concentrações

séricas de fósforo e cálcio agindo principalmente no intestino, rins e tecido ósseo. (35)

A molécula do paratormônio é composta por 84 aminoácidos. Além da forma intacta, diversos fragmentos são produzidos tanto pelas paratireóides quanto pelo metabolismo sistêmico do PTH. O fragmento aminoterminal contém 34 aminoácidos (1-34) e é responsável por suas funções biológicas conhecidas, pois é a porção que se liga ao receptor específico para PTH (PTHR1). Os fragmentos carboxiterminais englobam os últimos 50 aminoácidos e não são capazes de ativar o PTHR1. Por este motivo, tradicionalmente não se atribuía nenhuma função biológica a estes peptídeos, considerados inativos. Entretanto, foi demonstrada a presença de um receptor específico para os fragmentos C-terminais e, em algumas circunstâncias de acúmulo destes fragmentos, como na insuficiência renal, sua importância biológica pode ser maior do que se pensava anteriormente (36).

A administração de PTH promove a liberação de cálcio e fósforo do osso pelos osteoclastos e, em situações de exposição prolongada ao PTH, como no hiperparatireodismo, ocorre um aumento no número de osteoclastos e da reabsorção óssea. No rim, o paratormônio exerce três funções principais: estimula a reabsorção de cálcio e a síntese de calcitriol e inibe a reabsorção de fósforo (35).

A ação fosfatúrica do PTH ocorre através da inibição da reabsorção do fósforo tanto no túbulo proximal quanto no distal. O mecanismo de ação é melhor conhecido no segmento proximal e consiste basicamente na redução

da produção e internalização dos cotransportadores Na/Pi 2a (e provavelmente 2c), diminuindo a reabsorção tubular (35).

O cálcio extracelular é o principal regulador da síntese de PTH e o faz através do receptor sensível a cálcio (CaR). A presença de hipocalcemia estimula a produção e secreção do PTH, além de promover a proliferação das células da paratireóide. A relação PTH-Ca iônico pode ser representada por uma curva sigmoide inversa que reflete a grande resposta do PTH a pequenas variações do cálcio sérico. As células paratireóides são capazes de aumentar a secreção de PTH em segundos, o que ajuda a manter os níveis de cálcio sérico dentro de uma estreita faixa de referência (35).

O fósforo, por outro lado, promove a produção do PTH e, provavelmente, também sua secreção. O mecanismo sensor de fósforo nas células paratireóides, no entanto, ainda não está esclarecido (35). O calcitriol age ativando o receptor nuclear para vitamina D (VDR) e reduz a secreção de PTH.

O Fibroblast Growth Factor 23 (FGF-23) influencia de diversas formas a regulação do PTH. Antes considerado um regulador positivo da produção de PTH por seu efeito inibitório sobre a síntese de vitamina D ativa (37), hoje se sabe que o FGF-23 reduz a produção de PTH agindo diretamente sobre as paratireóides através de seu receptor (38). Indiretamente, a fosfatúria resultante do aumento de FGF-23 pode reduzir a concentração sérica de fósforo e inibir a secreção do PTH. Por outro lado, se os níveis de FGF-23 mantiverem-se cronicamente elevados, há uma diminuição significativa da síntese de calcitriol, o que, por sua vez, estimulará a síntese de PTH. Assim,

a depender da situação considerada, a interação FGF-23-paratireóide pode variar e resulta do balanço entre suas ações diretas e indiretas. (39).

1.2.1.2 Vitamina D

Os seres humanos obtêm vitamina D basicamente através da produção endógena de vitamina D₃ pela pele e, em menor grau, pela ingestão de alimentos que contêm naturalmente os precursores D₃ ou D₂ ou que foram enriquecidos artificialmente. Na pele, a vitamina D₃ é gerada pela conversão fotolítica do 7-deidrocolesterol induzida pela exposição aos raios UV. Estas formas não possuem atividade biológica e, para que sejam capazes de ativar o receptor de vitamina D (VDR), precisam sofrer duas hidroxilações que ocorrem no fígado e no rim (35).

No fígado, as vitaminas D₂ e D₃ sofrem a primeira hidroxilação, no carbono 25, reação que produz a 25-hidroxi-vitaminaD (25(OH)vitD), que circula no sangue ligada à proteína carreadora de vitamina D e outras proteínas. O nível sérico da 25(OH)vitD é utilizado clinicamente como indicador do status de vitamina D, uma vez que é proporcional à exposição solar e ingesta de vitamina D₂ e D₃ (35, 40).

O último passo na ativação da vitamina D é a segunda hidroxilação, desta vez no carbono 1, catalisada pela enzima 1 α -hidroxilase presente principalmente nas células tubulares renais. O resultado é a formação da 1,25(OH)₂vitD ou calcitriol, que é responsável pelos efeitos conhecidos da vitamina D. O nível sérico de calcitriol é aproximadamente 1000 vezes

menor que o de 25(OH)vitD, da ordem de pg/mL, o que torna sua dosagem pouco prática do ponto de vista clínico. Ainda nos túbulos renais existe uma segunda enzima que utiliza a 25(OH)vitD como substrato, a 24-hidroxilase, capaz de produzir um metabólito inativo, a 24,25(OH)₂vitD (35).

A atividade da 1 α -hidroxilase é amplamente regulada. PTH e FGF-23 possuem efeitos opostos sobre a produção renal de calcitriol, estimulando e inibindo o processo, respectivamente. A hipocalcemia aumenta a atividade da 1 α -hidroxilase diretamente no rim e indiretamente através do estímulo à produção de PTH pelas paratireóides. A sobrecarga de fósforo, por outro lado, reduz o calcitriol sérico tanto indiretamente pelo aumento da secreção de FGF-23 quanto de forma direta (35, 41).

O calcitriol pode ser considerado um hormônio, pois age em várias células do organismo através de um receptor nuclear próprio, o VDR. Sua função mais importante parece ser auxiliar na manutenção dos níveis séricos de cálcio dentro dos limites fisiológicos através da integração entre tecido renal, onde é produzido, e paratireóides, intestino e osso (35).

No intestino, o calcitriol aumenta o transporte de cálcio e fósforo. Nas paratireóides, inibe a produção de PTH em um mecanismo de retroalimentação, aumenta a sensibilidade celular ao cálcio e à própria vitamina D ativa promovendo a expressão dos receptores CaR e VDR e impede a proliferação celular. No rim, ocorre o aumento da produção dos canais TRPV5, responsáveis pelo transporte de cálcio pelos túbulos distais em resposta ao calcitriol. Por fim, a presença de níveis adequados de calcitriol é fundamental para o processo de mineralização e acoplamento

apropriado entre os processos de reabsorção e formação óssea, além de aumentar a expressão de FGF-23 pelas células ósseas em um mecanismo de feedback (35, 42) .

Na presença de níveis baixos de 25(OH)vitD e, conseqüentemente, de 1,25(OH)₂vitD, o cálcio sérico cai e ativa os CaR das glândulas paratireóides, aumentando a produção de PTH. Este mecanismo fisiológico levou os primeiros estudiosos do assunto a considerar inadequados níveis séricos de 25(OH)vitD abaixo dos quais o PTH se eleva, o que ocorre a partir dos 30 ng/mL. A deficiência de vitamina D é definida como níveis inferiores a 20 ng/mL enquanto insuficiência é definida como níveis entre 20 e 30 ng/mL (40). Os hábitos alimentares ocidentais e o uso cada vez mais freqüente de bloqueadores solares tornaram a deficiência de vitamina D um problema crescente em diversas populações (43), incluindo a população brasileira (44).

A conversão da 25(OH)vitD para 1,25(OH)₂D não acontece apenas nas células renais, pois vários outros tecidos expressam a 1 α -hidroxilase. O receptor da vitamina D também foi encontrado em outras células que não eram consideradas, a princípio, alvos da ação do calcitriol, como cardiomiócitos, células musculares lisas vasculares e várias células do sistema imune (41). Assim, o calcitriol não se presta apenas ao controle do metabolismo mineral, mas participa também de outros processos, como controle da proliferação celular e imunomodulação (45).

A deficiência de vitamina D parece estar relacionada ao aparecimento

de neoplasias como o câncer de cólon (46) e mama (47), embora esta associação não tenha sido demonstrada para outros tipos de tumores, como o câncer de próstata (48). Além disso, estoques inapropriados de vitamina D favorecem o aparecimento de doenças auto-imunes como diabetes tipo 1 (49), esclerose múltipla (50), artrite reumatóide, lúpus eritematoso sistêmico e doença de Chron (51). Os efeitos da vitamina D sobre o sistema cardiovascular serão descritos adiante.

1.2.1.3 Fibroblast Growth Factor 23

O Fibroblast Growth Factor-23 (FGF-23) é um hormônio identificado recentemente que pertence à família dos FGF's, mais especificamente à subfamília FGF-19, e é composto por 251 aminoácidos (52). O aumento da atividade do FGF-23, seja por superexpressão do gene responsável ou pela diminuição de seu metabolismo, é responsável pelo aparecimento de condições que cursam com hipofosfatemia secundária ao aumento da excreção renal de fósforo, como o raquitismo hipofosfatêmico autossômico dominante (ADHR) (53) e a osteomalácia induzida por tumor (TIO) (52). A partir desta observação, pesquisas *in vitro* e *in vivo* progressivamente esclareceram o papel do FGF-23 no metabolismo do fósforo e da vitamina D e sua descoberta foi fundamental para a compreensão atual da homeostase do fósforo. Assim, o FGF-23 parece ser o principal membro da família das “fosfatoninas”, termo cunhado para designar a classe de substâncias fosfatúricas composta ainda pela “secreted frizzled-related protein-4” (sFRP-

4) e pela fosfoglicoproteína extracelular (MEPE), entre outras (54, 55).

O FGF-23 é produzido principalmente no tecido ósseo pelos osteoblastos e osteócitos em resposta ao aumento na concentração de fósforo extracelular e também em menor quantidade por outros tecidos como fígado e rim (56). Além do fósforo sérico, o calcitriol estimula a produção do FGF-23 de maneira dose-dependente (57, 58) e o tratamento com calcitriol aumenta os níveis séricos de FGF-23 (59, 60).

A resposta ao aumento do conteúdo de fósforo na dieta foi inicialmente demonstrada tanto em animais saudáveis (61,62) quanto na presença de insuficiência renal (63). Em humanos, o FGF-23 se eleva apenas após uma sobrecarga mantida de fósforo na dieta. Nishida e cols não conseguiram demonstrar alteração aguda em seu nível sérico após a ingestão de uma única refeição rica em fósforo (64). Já Burnett e cols (65) estudaram 66 indivíduos saudáveis randomizados para receber dietas com diferentes concentrações de fósforo por 5 dias. O FGF-23 intacto sérico aumentou em média 23% após a sobrecarga dietética de fósforo e houve redução de 9% após restrição de fósforo. Provavelmente um aumento mais prolongado na ingestão de fósforo seja necessário para estimular à produção de FGF-23.

Ao contrário dos demais componentes da família dos FGF's, o FGF-23 atua de maneira sistêmica através de receptores, principalmente o FGFR1, que possuem o Klotho (KL) como cofator (66). Seu órgão alvo principal é o rim, onde aumenta a excreção de fósforo. O local exato de ação do FGF-23 no néfron, no entanto, ainda é controverso. O FGF-23 é capaz de

diminuir a reabsorção de fósforo no túbulo proximal através da inibição da expressão dos cotransportadores Na/Pi2a e Na/Pi2c (67), ativando a via da MAP-quinase (68). Ainda no túbulo proximal, inibe a enzima 1 α -hidroxilase, responsável pela produção da forma ativa da vitamina D e aumenta a atividade da 24-hidroxilase (69).

Além de agir no rim, o FGF-23 também inibe a produção de PTH pelas paratireóides, cujas células expressam FGFR e klotho (37,38). Esta ação direta do FGF-23 é antagônica ao efeito indireto causado pela supressão da 1- α -hidroxilase; o resultado final sobre a concentração de PTH depende, portanto, do balanço entre estas duas ações aparentemente contrárias. Por outro lado, o FGF-23 também parece ser regulado pelo PTH. Neves e cols (70) demonstraram que, em animais nefrectomizados, os níveis de FGF-23 eram maiores naqueles que receberam altas doses de PTH, sendo esse o primeiro estudo a revelar um efeito independente do PTH nos níveis de FGF-23, achados que foram posteriormente confirmados em ratos sem disfunção renal (71). O PHEX (gene regulador do fósforo com homologias às endopeptidases no cromossomo X) e a DMP-1 (proteína matriz da dentina-1) agem inibindo a produção de FGF-23 pelo osteócitos por mecanismos ainda incertos (72).

Animais deficientes em FGF-23 apresentam, além de hiperfosfatemia, alterações ósseas, calcificações ectópicas e hipoglicemia (73). Estas alterações são revertidas após a deleção do receptor de vitamina D (VDR), sugerindo que algumas das características destes animais são resultantes de seus altos níveis de calcitriol (74). A hipoglicemia e o aumento da

sensibilidade à insulina aparentemente são mediados pela produção de vitamina D, corroborando a hipótese da existência de uma interação entre a regulação do metabolismo ósseo e dos níveis glicêmicos.

Em humanos, a deficiência de FGF-23 leva à hiperfosfatemia e calcinose tumoral, condição debilitante por cursar com grandes e deformantes calcificações ectópicas, principalmente em articulações (75).

A concentração sérica de FGF-23 se eleva precocemente com a queda do ritmo de filtração glomerular (76, 77) e em estágios mais avançados da DRC, atinge níveis até 1000 vezes maiores que os encontrados em indivíduos com função renal preservada (78). As possíveis causas de aumento do FGF-23 nesta população são o estímulo da hiperfosfatemia, a alteração de seu metabolismo e a menor excreção renal.

O aumento do FGF-23 sérico no estágio 3 da DRC acontece antes mesmo que sejam observadas alterações laboratoriais de cálcio, fósforo, PTH ou calcitriol (76, 77). Em pacientes com clearance de creatinina acima de 30 ml/min/1,73m² o FGF-23 apresenta correlação inversa com a 1,25(OH)₂vitD e reabsorção tubular máxima de fósforo, o que já não ocorre em situações de perdas mais acentuadas de função renal (79). Estes achados mudaram paradigmas e permitiram uma nova interpretação da tradicional teoria do *trade-off* (80). Nos estágios precoces da DRC a elevação do FGF-23 consegue aumentar a excreção de fósforo e exerce efeito direto de inibição da produção do PTH. A produção de calcitriol, no entanto, é reduzida, o que estimula as paratireóides. À medida que néfrons são perdidos, no entanto, o FGF-23 elevado não é suficiente para normalizar

a fosfatemia. Os níveis elevados de fósforo passam a ser mais um estímulo ao desenvolvimento do hiperparatireoidismo secundário (81) e o efeito inibidor sobre o PTH é perdido, pois as células paratireóides tornam-se progressivamente menos sensíveis ao FGF-23 devido à redução na expressão dos receptores para FGF e de klotho em glândulas hiperplásicas (82). Podemos concluir, portanto, que durante a fase precoce de perda renal o FGF-23 protege o organismo da hiperfosfatemia e do hiperparatireoidismo, enquanto em estágios mais avançados de DRC passa a se comportar como marcador de perda de massa renal e da sobrecarga de fósforo.

O FGF-23 basal medido em 103 pacientes dialíticos foi fator preditor para o surgimento de hiperparatireoidismo secundário após dois anos de seguimento (83) e em outro estudo os níveis de FGF-23 foram capazes de prever a resposta dos níveis de PTH à terapia com calcitriol (84). Além disto, o tipo de quelante de fósforo utilizado também altera os níveis de FGF-23. Quelantes que não contêm cálcio reduzem de maneira mais significativa o FGF-23 sérico quando comparados aos quelantes à base de cálcio tanto em pacientes dialíticos (60) quando naqueles em tratamento conservador (85). O impacto de possíveis intervenções sobre o FGF-23, no entanto, ainda é desconhecido.

Os níveis séricos do FGF-23 são mensurados por ensaios imunoenzimáticos (ELISA) capazes de detectar apenas a molécula inteira (FGF-23 intacto) ou a molécula inteira e o fragmento C-terminal, resultado da quebra da molécula. A utilidade dos dois tipos de ensaio varia de acordo com o contexto clínico. Em pacientes portadores das síndromes

hipofosfatêmicas, o ensaio que mensura apenas a molécula intacta foi mais sensível para o diagnóstico (86). Entretanto, não existem estudos comparando os ensaios na população geral sem disfunção renal.

1.2.1.4 Klotho

O gene klotho, cujo nome se refere a uma das deusas da mitologia grega que controlam o fio da vida, foi identificado acidentalmente em 1997 como uma mutação presente em uma linhagem de camundongos que apresentavam um fenótipo de envelhecimento precoce (87). Os animais com expressão defeituosa da proteína klotho apresentavam alterações características do processo de senescência, como tempo de vida reduzido, atrofia muscular, osteopenia, calcificações vasculares e enfisema pulmonar (87), que posteriormente foram reconhecidas também em animais knockout para FGF-23 (73). Por outro lado, demonstrou-se que o aumento da expressão do gene klotho era capaz de prolongar o tempo de vida (88), o que sugeriu seu envolvimento direto na regulação da sobrevivência e do ritmo de envelhecimento.

O gene klotho codifica uma proteína transmembrana que possui uma porção extracelular passível de ser secretada na circulação e é codificado apenas em alguns tecidos, como o rim, mais especificamente nos túbulos contorcidos distais, e no plexo coróide. Sua forma livre, no entanto, pode ser responsável pela ação em outros tecidos. A presença do klotho na membrana celular aumenta a afinidade de diversas proteínas da família FGF

por seus receptores, principalmente os FGF-23, FGF-21 e FGF-19/15, responsáveis, respectivamente, pela regulação do metabolismo mineral, metabolismo energético e produção da bile (89). Como a proteína Klotho é essencial para a ligação do FGF-23 ao seu receptor, sua presença apenas em algumas células confere seletividade à ação deste hormônio.

Além de alterações relacionadas ao envelhecimento, animais deficientes em klotho desenvolvem alterações no metabolismo energético e mineral. (90) A falta de sinalização do FGF-23 nas células tubulares renais, por exemplo, leva à produção exagerada de calcitriol e ao aumento da reabsorção tubular de fósforo, com conseqüente hiperfosfatemia (90).

O papel do klotho na homeostase do cálcio é mais complexo e envolve vários mecanismos. Animais knockout para klotho cursam com hipercalcemia secundária aos níveis séricos elevados de calcitriol e conseqüente aumento na reabsorção intestinal de cálcio e hipercalciúria devido à hipercalcemia (90). No entanto, estudos recentes demonstram que o klotho aumenta a quantidade de canais TPRV5 nos túbulos distais, e sua ausência provoca um defeito na reabsorção tubular de cálcio, adicionando um mecanismo alternativo às alterações encontradas nestes animais (91). As calcificações vasculares presentes neste modelo acometem a camada média dos vasos e se assemelham à arteriosclerose de Monckeberg presente em pacientes idosos, diabéticos e portadores de DRC (87).

Os fenótipos decorrentes da ausência dos genes responsáveis pela produção tanto do klotho quanto do FGF-23 podem ser atribuídos principalmente à hiperfosfatemia encontrada nestes animais, pois a deleção

do gene responsável pelo cotransportador Na/Pi 2a corrige a fosforemia e o envelhecimento precoce (92). Por outro lado, uma dieta rica em fósforo resgata as alterações fenotípicas nestes animais duplo *knockout* para *klotho* e Na/Pi 2a (92). Em outras palavras, neste modelo, o fósforo induz ao envelhecimento.

O excesso de calcitriol também colabora para a senescência, pois a ablação do receptor de vitamina D (VDR) (74) ou da 1 α -hidroxilase (93) é capaz de reverter as alterações encontradas nestes animais. Este efeito, no entanto, é provavelmente indireto e mediado pela hiperfosfatemia induzida pelo excesso de calcitriol.

Em humanos, polimorfismos do gene *klotho* já foram associados à osteoartrite (94), densidade mineral óssea reduzida (95), doença arterial coronariana (96, 97, 98) e seus fatores de risco como níveis de HDL e pressão arterial (99) e LDL e ácido úrico (100), além de longevidade (99) na população geral e mortalidade em pacientes em hemodiálise (101).

A Figura 2 ilustra resumidamente o controle da homeostase do fósforo.

Figura 2 – Regulação da homeostase do fósforo

Pit-2: Transportador de fósforo inorgânico-2, PTHR1: receptor para PTH-1
 FONTE: Adaptado de Bergwitz e cols (72).

1.2.2 Homeostase do cálcio

O cálcio é o quinto elemento mais abundante no organismo humano, que contém em média 1000 gramas de cálcio. Deste total, mais de 99% se encontram no osso sob a forma de cristais de cálcio, principalmente hidroxiapatita, o que proporciona rigidez à estrutura óssea. O cálcio que não se encontra imobilizado perfaz menos de 10 g. No entanto, é responsável por vários processos essenciais como a sinalização intra e extracelular, a contração muscular e a transmissão dos impulsos nervosos. Os níveis

normais de cálcio total vão de 8,8 a 10,4 mg/dL e incluem íons livres (51%), ligados a proteínas como albumina e globulina (40%) e a outros íons (9%). Os níveis de cálcio iônico são regulados rigidamente e se mantêm entre 4,4 e 5,4 mg/dL. O balanço de cálcio depende da ingestão, da absorção intestinal e da excreção renal de cálcio e varia de acordo com a faixa etária e sexo do indivíduo (33, 102).

A homeostase do cálcio depende basicamente de dois hormônios reguladores: o paratormônio (PTH) e o calcitriol. Além disso, os receptores para estes hormônios (PTHr e VDR) e o receptor sensível a cálcio (CaR) também são fundamentais na manutenção de níveis séricos adequados. Quando há redução dos níveis séricos de cálcio, o CaR presente nas glândulas paratireóides deixa de ser ativado, o que induz a produção de PTH. O PTH secretado aumenta a reabsorção óssea e liberação de cálcio pelo osso, além de estimular a reabsorção de cálcio e a produção de calcitriol pelos túbulos renais. O calcitriol contribui para a normalização dos níveis de cálcio agindo no epitélio intestinal no sentido de aumentar a reabsorção a partir do lúmen (33, 102).

1.3 Metabolismo mineral e mortalidade/morbidade cardiovascular

1.3.1 Fósforo e doenças cardiovasculares

A associação entre fósforo e morbimortalidade foi demonstrada há alguns anos, inicialmente na população de portadores de DRC em hemodiálise no clássico estudo de Block e cols. (3), e posteriormente

confirmada em diversas outras coortes populacionais (103). Análise dos dados de pacientes originários de 12 países participantes do DOPPS (Dialysis Outcomes and Practice Pattern Study) mostrou que níveis séricos de fósforo entre 6,1 e 7,0 mg/dL e acima de 7,1 mg/dL no início do estudo conferiam um aumento no risco de morte por qualquer causa de 18% e 43%, respectivamente, quando comparados a níveis de fósforo na faixa de referência (entre 3,6-5,0 mg/dL). Para o risco de morte por causas cardiovasculares o aumento de risco foi de 61% e 81%, respectivamente (103). Níveis muito reduzidos de fósforo também foram associados à mortalidade aumentada, refletindo talvez o pior estado nutricional deste pacientes. Sabe-se ainda que concentrações elevadas de fósforo estão associadas à presença de calcificações vasculares, valvares e de tecidos moles nesta população (104) e em fases mais precoces da disfunção renal (105).

Posteriormente, estas observações foram estendidas à população geral e, surpreendentemente, níveis de P ainda nos limites superiores da normalidade mostraram-se associados à maior morbimortalidade (106). O primeiro estudo a replicar estes achados na população sem disfunção renal foi uma análise post hoc do estudo CARE (Cholesterol And Recurrent Event), cujo objetivo original era avaliar o benefício do uso de pravastatina em pacientes com história prévia de infarto agudo do miocárdio (106). Tonelli et al (106) estudaram 4.127 pacientes e após 5 anos de seguimento foi encontrada associação positiva e gradual entre o fósforo sérico basal e mortalidade por qualquer causa (hazard ratio [HR] por 1 mg/dL, 1,27; 95% IC

1,02-1,58; $P=0,03$). Pacientes com P sérico superior a 4 mg/dL apresentaram um HR aumentado para o surgimento de insuficiência cardíaca e eventos coronarianos não-fatais (1,43 e 1,50, respectivamente) quando comparados àqueles com P entre 2,5 e 3,4 mg/dL. Apenas 5,2% dos pacientes apresentavam hiperfosfatemia. As associações permaneceram inalteradas após a exclusão de pacientes com clearance de creatinina estimado inferior a 60 ml/min/1,73m².

Mais recentemente, uma análise derivada da coorte de Framingham incluindo mais de 3000 pacientes com tempo médio de seguimento de 16 anos confirmou a associação entre os quartis mais altos de P sérico basal e mortalidade cardiovascular no período observado (4).

Os mecanismos através dos quais o fósforo aumenta a mortalidade e a incidência de eventos cardiovasculares ainda não estão estabelecidos, mas é provável que esta associação seja consequência de sua participação na patogênese da calcificação vascular e do processo de aterosclerose (107, 108).

Se a relação entre P e eventos parece cada vez mais clara, pelo menos dois estudos demonstraram associação entre P e gravidade das lesões coronarianas à angiografia. Estudo de 1997 realizado em indivíduos com função renal normal e suspeita de doença coronariana mostrou uma correlação positiva entre os níveis de fósforo e o número de vasos acometidos observados na angiografia (109). Neste estudo, um aumento de 0,5 mmol/L no fósforo sérico implicou em um aumento da razão de chances

de 3,01 para doença coronariana significativa. No entanto, não houve correlação entre os níveis de cálcio e a gravidade das lesões. A termo de comparação com outros fatores de risco já descritos para doença coronariana, os autores observaram que as razões de chance obtidas para hipercolesterolemia e tabagismo foram, respectivamente, 2,69 e 2,29 (109).

Já Rasouli et al (110), estudando 260 pacientes portadores de doença coronariana, encontraram correlação não só entre fósforo e gravidade das lesões coronarianas como também entre o grau de lesão arterial e as concentrações de cálcio e produto CaxP.

O fósforo também parece ser fator de risco para o surgimento de calcificações vasculares na população geral. Em uma coorte de 3015 pacientes adultos jovens (média de idade 25 anos) participantes do estudo CARDIA e seguidos durante 15 anos houve associação entre o nível sérico de P basal e o aparecimento de calcificações coronarianas avaliadas por tomografia computadorizada (111). Em outra coorte que incluiu pacientes com média de idade mais elevada (48 anos) seguidos por 6 anos, o fósforo sérico na primeira avaliação foi preditor tanto do surgimento de calcificação coronariana quanto da sua progressão durante o seguimento (OR 1,54, $p=0,002$), embora não tenha havido correlação entre os dois parâmetros basais (112).

1.3.1.1 Fósforo e calcificação vascular

O fósforo participa do processo de calcificação vascular induzindo a transformação fenotípica das células musculares lisas dos vasos em osteoblastos. Jono et al (5), estudaram células musculares lisas humanas extraídas da aorta expostas a diferentes concentrações de fósforo e observaram que quando essas células eram expostas a concentrações elevadas de fósforo no meio ($>2\text{mmol/L}$), ocorria uma mudança no padrão da expressão gênica celular. Ao invés de marcadores musculares, como a alfa-actina, estas células passavam a produzir marcadores tipicamente osteocondrogênicos como o fator transcricional Runx2 (também conhecido como Cbfa). Esta mudança fenotípica conduzia à calcificação acentuada do meio extracelular, com deposição de colágeno e cálcio. Foi demonstrado ainda que o efeito do fósforo é dependente do co-transportador sódio-fosfato tipo III (Pit-1) presente na membrana celular (5). A figura 3 ilustra o processo.

Além disso, a hiperfosfatemia induz a elevação de PTH, que tem efeito deletério sobre os cardiomiócitos (113) e participa da regulação da calcificação vascular (114). Este mecanismo explicaria a relação entre calcificação vascular e fósforo sérico na vigência de hiperfosfatemia, como, por exemplo, na população portadora de disfunção renal. Entretanto, a transposição destes achados para a população geral que habitualmente

possui fosforemia dentro dos limites de referência implicaria no envolvimento dos outros mecanismos de regulação e uma possível supressão dos inibidores da calcificação vascular.

Figura 3 – Efeito da hiperfosfatemia sobre as células vasculares lisas

Alkaline phosphatase: fosfatase alcalina; *calcium-binding proteins*: proteínas ligadoras de cálcio; *collagen-rich ECM*: matriz extracelular rica em colágeno; *matrix vesicles*: vesículas de matriz; *CML*: células musculares lisas. Adaptado de Giachelli e cols (115).

1.3.2 Vitamina D e doenças cardiovasculares

O impacto do status de vitamina D no sistema cardiovascular começou a despertar interesse a partir de observações epidemiológicas que relacionaram a deficiência de vitamina D ao aumento da mortalidade

cardiovascular na população geral (116, 117). Em estudo derivado da coorte de Framingham com 1739 indivíduos, aqueles com níveis reduzidos de 25(OH)vitD tiveram a razão de risco de 1,62 para o surgimento de doenças cardiovasculares quando comparados a seus pares suficientes em vitamina D (118) e em metanálise recente que avaliou a associação entre níveis de 25(OH)vitD e mortalidade/eventos cardiovasculares, 5 dos 9 estudos considerados de boa qualidade metodológica demonstraram risco elevado na vigência de deficiência de vitamina D (119).

Os mecanismos fisiopatológicos responsáveis por estas associações são diversos. Em primeiro lugar, o VDR está presente na superfície de células vasculares e cardiomiócitos. Análogos da vitamina D foram capazes de alterar o perfil genético de células musculares lisas coronarianas, reduzindo sua capacidade de proliferação e trombogenicidade e aumentando sua capacidade de relaxamento (120). *In vivo*, pacientes deficientes em vitamina D apresentaram provas de função endotelial e peroxidação lipídica piores do que aqueles com níveis séricos adequados, situação que foi revertida após a suplementação (121).

É também conhecido o efeito supressor do calcitriol sobre a produção de renina. Animais knockout para o VDR apresentam níveis de renina, angiotensina II e pressão arterial elevados em relação aos controles, além de hipertrofia miocárdica, o que confirma a participação da vitamina D na inibição deste eixo. (122, 123). A 1,25(OH)vitD também é importante na manutenção da estrutura miocárdica em animais (124) e sua reposição

reduziu a hipertrofia ventricular em pacientes em hemodiálise (125). Este efeito poderia ser direto, através da ação sobre o receptor de vitamina D (VDR) presente nas células cardíacas e/ou através da supressão do sistema renina-angiotensina promovida pelo calcitriol (123).

A intolerância à glicose é reconhecida como fator de risco clássico para o surgimento das doenças cardiovasculares. Animais deficientes em vitamina D apresentam intolerância à glicose que desaparece após a correção do estado de deficiência (126). Em humanos foi demonstrado que pacientes intolerantes à glicose ou diabéticos apresentavam maior prevalência de deficiência de 25(OH)vitD (127, 128, 129). Confirmando este efeito, a associação entre a deficiência de vitamina D e o surgimento da síndrome metabólica aparece em diversos estudos populacionais em adultos (127) e adolescentes (130).

A relação entre vitamina D e hipertensão também já está estabelecida. Além do efeito inibitório sobre o sistema renina-angiotensina e da atividade antiinflamatória, a redução da resistência insulínica, do hiperparatireoidismo secundário e a renoproteção promovidas pela vitamina D parecem responsáveis por seus efeitos benéficos sobre a pressão arterial (131). A maioria dos estudos epidemiológicos disponíveis mostram uma correlação inversa entre níveis pressóricos ou prevalência de hipertensão arterial e a 25(OH)vitD sérica (131).

Se por um lado a deficiência de vitamina D acentua os fatores de risco para doenças cardiovasculares e confere maior risco de morte, existem evidências contraditórias no que se refere a sua participação no processo de

calcificação vascular. Um modelo animal de aterosclerose foi obtido pela intoxicação com vitamina D (132) e células musculares lisas vasculares bovinas, quando submetidas a meio rico em calcitriol, calcificam sua matriz e aumentam a atividade da fosfatase alcalina (133). No outro extremo, contam-se entre os potenciais efeitos benéficos a inibição da expressão de citocinas pró-inflamatórias como a IL-1, IL-6 e TNF α , além do estímulo à produção da citocina pró-inflamatória IL10 e de inibidores da calcificação vascular como osteopontina, MGP e colágeno tipo IV (134).

Watson e cols. (136) encontraram correlação negativa entre o nível sérico de 1,25(OH) $_2$ vitD e o grau de calcificação coronária medida por EBCT em pacientes com função renal normal. Corroborando estes achados, Doherty e cols. (137) obtiveram resultados semelhantes em pacientes de alto risco para doença arterial coronariana. Por outro lado, Arad et al (138) não encontraram em 50 pacientes submetidos a coronariografia qualquer correlação entre os níveis séricos de 1,25(OH) $_2$ vitD e a gravidade da lesão aterosclerótica ou da calcificação vascular.

A ativação do VDR parece benéfica em pacientes com doença renal crônica avançada. Vários estudos epidemiológicos que avaliaram o impacto do uso do calcitriol e seus análogos, como doxercalciferol, paricalcitol e alfacalcidol concluíram que a mortalidade foi maior entre os pacientes que não usaram nenhuma forma de vitamina D (139, 140, 141). Este efeito independe dos níveis de PTH, cálcio e fósforo. O uso destas substâncias também foi capaz de atenuar o maior risco de morte conferido pela

deficiência de 25(OH)vitD, conforme demonstrado por Wolf e cols (142).

Apesar dessas observações, o benefício da suplementação de vitamina D com relação à mortalidade na população geral ainda não está claro devido à escassez de estudos prospectivos e randomizados de boa qualidade. Hsia et al (143), em trial randomizado para o *Women's Initiative Health Study*, encontraram efeito discretamente protetor do uso de 400 UI de vitamina D na incidência de eventos cardiovasculares. São necessários ensaios prospectivos de larga escala para determinar o real papel da deficiência de vitamina D como marcador e fator de risco modificável para o surgimento de doenças cardiovasculares.

1.3.3 PTH e doenças cardiovasculares

A presença prolongada de níveis elevados de PTH parece ser prejudicial ao sistema cardiovascular. Pacientes portadores de hiperparatireoidismo primário apresentam maior mortalidade tanto antes (144) quanto após a paratireoidectomia (145). Também existe associação entre PTH e mortalidade em pacientes portadores de DRC (146) e na população geral, como demonstrado recentemente em dois estudos de coorte (147,148). Este excesso de mortalidade pode ser atribuído principalmente a eventos cardiovasculares (147,149).

Vários mecanismos podem explicar esta associação. O PTH tem sido implicado diretamente na aterogênese através da calcificação (150) e

remodelamento (151, 152) vascular, além de apresentar efeitos deletérios sobre o miocárdio, induzindo hipertrofia e fibrose (153, 154).

1.3.4 FGF-23 e doenças cardiovasculares

Assim como outros envolvidos na homeostase do fósforo, a relação entre os níveis séricos de FGF-23 e a ocorrência de eventos clínicos relevantes também tem despertado interesse. Esta associação foi estabelecida inicialmente em pacientes portadores de doença renal crônica em hemodiálise. Em 2008, Gutiérrez e cols relataram pela primeira vez a associação entre níveis de FGF-23 à admissão para a hemodiálise e a mortalidade após um ano de tratamento (155). Este achado, no entanto, foi confirmado em outra coorte apenas em um subgrupo de pacientes – homens sabidamente portadores de doença cardiovascular (156). Ainda na população de renais crônicos, o FGF-23 foi associado com hipertrofia ventricular esquerda (HVE) (157) inclusive em estágios precoces de disfunção renal (158) e com doença arterial coronariana obstrutiva (159). Com relação ao possível envolvimento do FGF-23 na calcificação vascular em pacientes com disfunção renal, os resultados são controversos. Na população pré-diálise um único estudo falhou em estabelecer tal associação (157), enquanto em pacientes em terapia renal substitutiva o FGF-23 foi preditor da presença de calcificação periférica mas não de calcificação aórtica avaliadas através de radiografias das mãos e abdome em um estudo (160) e também de calcificação coronariana em outro (60).

Os estudos disponíveis que avaliaram FGF-23 e alterações cardiovasculares ou eventos na população geral sofrem de uma séria limitação, que é a inclusão de indivíduos com disfunção renal. Considerando-se este fato, já foram encontradas associações entre FGF-23 e HVE (161), testes de disfunção endotelial (162) e aterosclerose corporal total avaliada através de ressonância magnética (163) na comunidade. Até o momento, a relação entre o FGF-23 e calcificação vascular em pacientes com função renal normal permanece obscura, pois apenas uma publicação com número reduzido de pacientes e resultado negativo avaliou a questão (164). Recentemente, análise da coorte participante do estudo Heart and Soul que incluiu 833 pacientes portadores de doença arterial coronariana seguidos por cerca de 6 anos estabeleceu o FGF-23 como preditor de eventos nesta população (165). Este estudo incluiu pacientes com disfunção renal, mas os resultados se mantiveram após ajuste para esta variável.

O verdadeiro papel do FGF-23 na doença cardiovascular ainda não está esclarecido. Parece pouco provável que haja uma ação direta sobre células cardíacas ou vasculares, uma vez que o *klotho* não é expresso nestes tecidos. No entanto, em circunstâncias como a DRC, é possível que níveis extremamente elevados ativem de maneira não-seletiva os receptores de FGF. Curiosamente, em patologias que se caracterizam por superexpressão de FGF-23 como a osteomalácia induzida por tumor não encontramos incidência elevada de DCV, o que praticamente descarta esta possibilidade (166).

Assim, parece que o fato de o fósforo sérico, mesmo que dentro dos limites considerados normais, apresentar correlação com a mortalidade cardiovascular em pacientes com função renal normal é um alerta quanto à importância não só do próprio fósforo, mas de todos os seus reguladores, nos processos de aterosclerose e calcificação vascular na população geral. Porém, não há até hoje um estudo que tenha avaliado simultaneamente todos estes fatores e que tenha procurado observar a provável associação de cada um deles com a presença de aterosclerose e calcificação vascular em indivíduos com função renal preservada.

2 . Objetivos

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo principal

Avaliar a possível associação entre os níveis séricos dos principais marcadores do metabolismo mineral (fósforo, cálcio, fosfatase alcalina, PTH, FGF-23, 25(OH)vitamina D) e a ocorrência de calcificação vascular/doença coronariana obstrutiva em indivíduos com suspeita de doença arterial coronariana e função renal preservada.

2.2 Objetivos secundários

2.2.1. Avaliar a possível associação entre a ocorrência de calcificação vascular/doença coronariana obstrutiva e marcadores do metabolismo lipídico (colesterol total e suas frações, triglicérides, apolipoproteína B), metabolismo glicídico (glicemia e peptídeo C) e proteína C reativa (marcador inflamatório).

2.2.2. Avaliar as associações entre os marcadores do metabolismo mineral mensurados.

3 . Casuística e Métodos

3. CASUÍSTICA E MÉTODOS

Foram incluídos 290 pacientes do Instituto do Coração / Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo com indicação de cineangiocoronariografia eletiva pelo médico assistente no período de 01 de junho de 2008 a 15 de dezembro de 2009. Os critérios de inclusão foram: idade superior a 18 anos, clearance de creatinina calculado pela fórmula MDRD [Modification of Diet in Renal Disease - $\text{ClCr (mL/min/1.73 m}^2\text{)} = 186 \times (\text{Cr sérica})^{-1,154} \times (\text{Idade})^{-0,203} \times (0,742 \text{ se mulher}) \times (1,212 \text{ se afro-americano})$] superior a 60 mL/min/1,73m^2 e estabilidade clínica e hemodinâmica. Os critérios de exclusão foram: presença de hepatopatia, nefropatia (história clínica de litíase, glomerulopatia, doença renal crônica), doenças auto-imunes ou malignidades prévias; história pregressa de angioplastia coronariana ou cirurgia de revascularização miocárdica; uso atual de bisfosfonatos, corticóides, terapia de reposição hormonal, sais de cálcio, suplementos contendo vitamina D ou anticonvulsivantes.

Os pacientes foram entrevistados no dia da realização da cineangiocoronariografia e, após assinatura de termo de consentimento informado, foram obtidos os dados demográficos e aplicado questionário quanto à presença de fatores de risco, além de mensuração de peso, altura e pressão arterial. Os pacientes retornaram após um período mínimo de 15 dias, contados a partir do dia da cineangiocoronariografia, para a obtenção do escore de calcificação coronariana por MSCT e coleta de sangue

periférico para as análises bioquímicas. Este protocolo de pesquisa foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo sob o número 0755/07.

3.1 Definição dos fatores de risco

A presença de fatores de risco como diabetes mellitus, hipertensão arterial sistêmica e dislipidemia foi definida de acordo com a informação do paciente. Foi considerado apenas o tabagismo atual. Obesidade foi definida como IMC igual ou superior a 30 kg/m². A indicação clínica para a realização de cineangiocoronariografia foi obtida através de consulta ao prontuário do paciente. No caso de pacientes externos, portanto sem prontuário no Instituto do Coração, foi consultado o pedido do exame feito pelo médico assistente; na minoria dos casos em que nenhum dos recursos acima estava disponível, a informação foi coletada com o próprio paciente. O escore de Framingham foi obtido a partir dos dados de idade, sexo, presença ou não de diabetes e tabagismo, pressão arterial e perfil lipídico. O risco de eventos cardiovasculares em 10 anos foi estimado a partir deste escore (169).

3.2 Análises bioquímicas

Foi colhido sangue periférico em jejum de 12 horas para as seguintes dosagens: uréia (valores de referência [VR]: 10-50 mg/dL), creatinina (VR: mulheres 0,5-0,9 mg/dL; homens 0,7-1,2 mg/dL), cálcio total (VR: 8,6-10,2 mg/dL), cálcio iônico (VR: 4,6-5,3 mg/dL), fósforo (VR: 2,7-4,5 mg/dL), PTH intacto (VR: 16-87 pg/mL; quimioluminescência – kit Immulite 2000, DPC - Los Angeles, CA/EUA), fosfatase alcalina (VR: mulheres 35-104 U/L, homens 40-129 U/L), FGF-23 intacto (VR: 27,8-30,0 pg/mL, ELISA - Kainos, Japão), 25(OH)vitamina D (VR: > 30ng/mL; radioimunoensaio - Dia-Sorin™, Stillwater, MN/EUA), PCR ultrasensível (VR: < 3,0 mg/L), colesterol total (VR: < 200 mg/dL), HDL colesterol (VR: > 55 mg/dL), LDL colesterol (VR: < 130 mg/dL), triglicérides (VR: < 150 mg/dL), apolipoproteína B (VR: 60-160 mg/dL), glicose (VR: 70-100 mg/dL) e peptídeo C (VR: 0,4-3,6 ng/mL).

3.3 Escore de calcificação coronariana (Escore de Agatston)

A MSCT foi realizada utilizando um detector de 64 canais (*Aquilion64™-Toshiba™ Medical Systems Corporation*, Otawara, Japan). No início do exame, os pacientes foram monitorizados por eletrocardiograma para a sincronização da aquisição das imagens e uma imagem radiológica do tórax foi obtida em apnéia para determinação dos níveis inicial e final da tomografia. Os cortes foram realizados utilizando um protocolo de 64 cortes (espessura de 3 mm) e aquisição das imagens desencadeada em 80% do

intervalo RR. O escore de calcificação coronariana foi obtido utilizando o método de Agatston (13) pelo software *Vitrea*TM2 (version 3.5 - *Vital Images Inc*, Plymouth, MN, EUA). Um foco de calcificação coronariana foi definido como a presença de quatro ou mais pixels de mais de 130 unidades Hounsfield (HU). O escore de Agatston (EA) foi determinado através da soma dos escores individuais das quatro artérias epicárdicas principais (tronco de coronária esquerda, artéria descendente anterior, artéria circunflexa, artéria coronária direita).

3.4 Cineangiocoronariografia e escores associados

A cineangiocoronariografia foi realizada no Serviço de Hemodinâmica do InCor utilizando técnica percutânea com acesso pelas artérias braquial ou femoral. Foram usados sistemas Phillips (Intergris BH 3000) nas projeções ortogonais típicas. As análises dos escores de gravidade (Friesinger e Gensini) foram realizadas por médicos não-relacionados ao estudo.

3.4.1 Escore de Friesinger

Os valores mínimo e máximo são 0 e 15, respectivamente. O escore é obtido atribuindo-se uma pontuação individual de zero a cinco a cada uma das três artérias coronárias principais (descendente anterior, circunflexa e coronária direita). Os critérios para pontuação são: 0 - sem obstruções; 1 - estenose luminal inferior a 30%; 2 - estenose luminal localizada de 30-68%;

3- múltiplas estenoses de 30-68%; 4 -estenose luminal de 69-100% sem oclusão de 100% dos segmentos proximais; 5 –obstrução total de um segmento proximal.(167)

3.4.2 Escore de Gensini

Este escore atribui a cada segmento dois pesos. O primeiro considera a gravidade da estenose luminal e o segundo o tamanho e importância da artéria à qual pertence aquele segmento. Assim, segmentos de artérias dominantes, ou seja, que irrigam áreas mais amplas do miocárdio, recebem pontuação maior. Para cada segmento os dois pesos são multiplicados e a soma dos produtos forma o escore total (168).

3.6 Análise estatística

3.6.1 Cálculo do tamanho amostral

As variáveis que serviram como base para o cálculo do tamanho amostral foram: fósforo (variável contínua com distribuição supostamente normal) e presença de obstrução coronariana (SIM, se uni, bi ou triarterial; NÃO, caso contrário). As suposições foram feitas de acordo com o estudo de Narang et al (109). Consideramos assim uma média de fósforo de 3,6 mg/dL, desvio padrão de 0,59 mg/dL e razão de risco entre os grupos de 1,5. Para um poder de 80% e um erro alfa de 5%, o tamanho de amostra foi estimado em 300 pacientes.

3.6.2 Tratamento e testes estatísticos

As variáveis contínuas gaussianas foram descritas como média e desvio padrão e as não-gaussianas como mediana e intervalo interquartil. Variáveis não gaussianas como FGF-23, PTH e escore de Gensini sofreram transformações logarítmicas. Para as análises univariadas utilizou-se teste não-paramétrico de Mann-Whitney em variáveis contínuas e teste de Qui-quadrado em variáveis categóricas. Nas análises de tercil foi utilizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. Coeficientes e p valores das correlações de Spearman foram calculadas para diversas variáveis.

Para as análises com escore de Agatston, que apresenta distribuição assimétrica com grande frequência de valor zero (37,1%), comparamos a eficiência entre diversos modelos com excesso de zeros. Utilizando-se os testes de Vuong (comparação entre distribuição com excesso de zeros e distribuição de Poisson), Likelihood ratio (comparação entre distribuição de Poisson e distribuição binomial negativa) e novamente Vuong (comparação entre distribuição binomial negativa com excesso de zeros e distribuição binomial negativa), optamos pela utilização da regressão binomial negativa com excesso de zeros (ou modelo binomial negativo inflacionado de zeros). Os modelos paramétricos com efeito proporcional de covariáveis já foram validados para a predição de calcificação medida através do escore de Agatston (169). Os resultados destes modelos são apresentados em duas partes: a primeira refere-se à contagem positiva (dados não-zero) e a segunda à predição de excessos de zeros.

A seguir, modelos de regressão linear uni e multivariados foram construídos utilizando-se como variáveis dependentes fósforo e os valores logaritmos do escore de Gensini, de FGF-23 e de PTH. Para a regressão linear *stepwise* foram analisadas as seguintes variáveis: idade, sexo, raça, tabagismo, HAS, DM, IMC, 25(OH)vitamina D, cálcio total, fósforo, logFGF-23, log PTH, uréia e clearance de creatinina.

Modelos de regressão logística uni e multivariados foram realizados com diversas variáveis dependentes: escore de Agatston ($\leq 10\text{HU}$ vs $> 10\text{HU}$), Friesinger ($\leq$ mediana vs $>$ mediana), Gensini (terceiro tercil vs primeiro+segundo tercis) e obstrução coronariana superior a 50% do lúmen arterial (presença de obstrução vs ausência de obstrução).

Os testes utilizados foram todos bi-caudais, com nível de significância estabelecido em 5%. Para as análises de modelos com excesso de zeros utilizamos o R-2.12.2 for Windows. Para o restante das análises, utilizamos o software SPSS® for Windows versão 13.0.

3.7 Recursos financeiros

Este projeto recebeu apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP sob o número 2007/56238-4.

4 . Resultados

4. RESULTADOS

A figura 4 ilustra o processo de recrutamento e inclusão dos pacientes.

Figura 4 – Processo de inclusão dos pacientes no protocolo

As características clínicas, laboratoriais e escores de Agatston, Gensini e Friesinger dos 290 pacientes estão descritos nas tabelas 1 e 2. Houve um predomínio da raça branca e sexo masculino. A maioria dos pacientes era hipertenso e usava estatinas, o que justifica a ausência de níveis elevados de colesterol.

Tabela 1 – Características clínicas e escores da população estudada

N	290
Sexo (n, % masculino)	167 (57,5)
Idade (média ± DP)	58,1 ± 9,3
Raça (Branços, n,%)	188 (64,8)
Indicação de cineangiocoronariografia (n, %)	
Angina estável	76 (26,2)
Angina instável	93 (32,1)
IAM prévio	75 (25,9)
Outras	46 (15,9)
HAS (n,%)	235 (81,0)
DM (n, %)	103 (35,5)
Tabagismo (n, %)	93 (32,1)
Dislipidemia (n, %)	131 (45,2)
Uso de estatinas (n, %)	150 (51,7)
ICC (n, %)	57 (19,7)
Obesidade (n, %)	83 (28,6)
IMC (kg/m²)	28,0 ± 4,9
PAS (mmHg)	131,2 ± 18,8
PAD (mmHg)	82,3 ± 11,9
Escore de Agatston (HU)	46 (0-297)
Escore de Framingham (risco em 10 anos)	10 (6-16)
Escore de Friesinger (pontos)	4 (4-9)
Escore de Gensini (pontos)	52 (47-108)

Variáveis contínuas paramétricas apresentadas como média ± DP; variáveis contínuas não-paramétricas apresentadas como mediana (intervalo interquartil).
 IMC, índice de massa corpórea; PAS, pressão arterial sistólica; PAD, pressão arterial diastólica.

Tabela 2 – Parâmetros laboratoriais da população estudada

Creatinina (mg/dL)	0,89 ± 0,17
Uréia (mg/dL)	36 (30-44)
Cálcio total (mg/dL)	9,5 ± 0,5
Cálcio iônico (mg/dL)	5,1 (5,0-5,3)
Fósforo (mg/dL)	3,57 ± 0,54
Fosfatase alcalina (U/L)	71,0 ± 24,1
25(OH)vit D (ng/mL)	23,9 ± 8,5
PTH (pg/mL)	57,0 (41,0-78,0)
FGF-23 (pg/mL)	43,8 (27,0-68,8)
Apolipoproteína B (mg/dL)	86,2 ± 25,2
Triglicérides (mg/dL)	130,0 (97,0-190,0)
Colesterol total (mg/dL)	171,6 ± 42,0
HDL colesterol (mg/dL)	43,0 (36,0-52,0)
LDL colesterol (mg/dL)	97,3 ± 34,7
VLDL colesterol (mg/dL)	26,0 (19,0-37,0)
Glicemia (mg/dL)	105,0 (94,0-121,0)
Proteína C reativa (mg/L)	2,8 (1,2-5,3)
Peptídeo C (ng/mL)	2,6 (1,8-3,7)
Clearance de creatinina (ml/min/1,73m²)	92,0 (79,1-109,0)

Variáveis contínuas paramétricas apresentadas como média ± DP; variáveis contínuas não-paramétricas apresentadas como mediana (intervalo interquartil).

HDL: Lipoproteína de alta densidade; LDL: Lipoproteína de baixa densidade, VLDL: Lipoproteína de densidade muito baixa.

A função renal estimada pela fórmula MDRD mostra ausência de disfunção renal. Os níveis de fósforo e cálcio foram normais. A insuficiência de vitamina D foi comum e 220 pacientes, correspondentes a 75,9% da população total, apresentaram níveis de 25(OH)vitamina D inferiores a 30

ng/mL. Com relação à PCR, um total de 132 pacientes (45,5%) apresentaram valores superiores a 3,0 mg/L.

4.1 Fatores preditores da presença de calcificação coronariana

A figura 5 mostra a distribuição assimétrica da variável Escore de Agatston na população estudada. O valor zero foi encontrado em 37,1% dos pacientes.

Figura 5 – Distribuição do Escore de Agatston na população estudada

As tabelas 3 e 4 mostram os resultados dos modelos de regressão binomial negativa com excesso de zeros sobre os preditores do Escore de Agatston. Na análise univariada (tabela 3), observa-se que nenhuma das variáveis mostrou relação estatisticamente significativa com o Escore de Agatston, tanto em relação à predição de zeros quanto à contagem positiva. Na análise multivariada (tabela 4), após o ajuste para sexo, idade e raça (modelo 1), o fósforo mostrou-se inversamente relacionado ao valor zero (estimativa -0,635, $p=0,04$), ou seja, quanto maior o valor do fósforo sérico menor a chance do indivíduo apresentar o Escore de Agatston igual a zero. Ainda na análise multivariada, sexo masculino, idade e presença de diabetes mellitus foram preditores positivos do Escore de Agatston: ser do sexo masculino associou-se a um aumento de 0,647 vezes no $\log(\text{Escore de Agatston})$, cada ano de envelhecimento associou-se a um aumento de 0,053 vezes no $\log(\text{Escore de Agatston})$ no modelo 2 e ser diabético associou-se a um aumento de 0,636 vezes no $\log(\text{Escore de Agatston})$. Além do fósforo, sexo, idade e HAS também foram preditores negativos do valor zero do Escore de Agatston.

Tabela 3 - Análise univariada dos fatores preditores do Escore de Agatston de acordo com o modelo binomial negativo com excesso de zeros

Variável	Estimativa	Desvio padrão	Valor z	p
<u>Contagem</u>				
Fósforo (mg/dL)	0,254	0,208	1,219	0,22
FGF-23 (pg/mL)	0,001	0,003	0,491	0,62
25(OH)vit D (ng/mL)	0,022	0,013	1,720	0,08
PTH (pg/mL)	-0,001	0,004	-0,369	0,71
<u>Predição de zero</u>				
Fósforo (mg/dL)	-0,472	0,285	-1,656	0,09
FGF-23 (pg/mL)	0,005	0,003	1,577	0,11
25(OH)vit D (ng/mL)	0,009	0,017	0,544	0,58
PTH (pg/mL)	0,005	0,004	1,122	0,26

Tabela 4 - Análise multivariada dos fatores preditores do Escore de Agatston de acordo com o modelo binomial negativo com excesso de zeros

	Variável	Estimativa	Desvio padrão	Valor z	p
Modelo 1	<u>Contagem</u>				
	Fósforo (mg/dL)	0,345	0,205	1,683	0,09
	Sexo (masculino)	0,565	0,228	2,475	0,01
	Idade (anos)	0,050	0,014	3,506	<0,001
	Raça (brancos)	-0,341	0,243	-1,402	0,16
	<u>Predição de zeros</u>				
	Fósforo (mg/dL)	-0,635	0,304	-2,089	0,04
	Sexo (masculino)	-1,132	0,345	-3,275	0,001
	Idade (anos)	-0,094	0,019	-4,866	<0,001
	Raça (brancos)	-0,353	,0336	-1,051	0,29
Modelo 2	<u>Contagem</u>				
	Fósforo (mg/dL)	0,299	0,217	1,377	0,17
	Sexo (masculino)	0,647	0,232	2,784	0,005
	Idade (anos)	0,053	0,014	3,846	<0,001
	Raça (brancos)	-0,382	0,240	-1,589	0,11
	HAS	0,403	0,316	1,272	0,20
	DM	0,636	0,216	2,945	0,003
	FGF-23 (pg/mL)	-0,0004	0,003	-0,167	0,86
	PTH (pg/mL)	-0,002	0,004	-0,508	0,61
	<u>Predição de zeros</u>				
	Fósforo (mg/dL)	-0,619	0,309	-2,003	0,04
	Sexo (masculino)	-1,231	0,365	-3,366	<0,001
	Idade (anos)	-0,086	0,019	-4,35	<0,001
	Raça (brancos)	-0,375	0,349	-1,073	0,28
	HAS	-0,965	0,406	-2,372	0,017
	DM	-0,561	0,380	-1,476	0,14
	FGF-23 (pg/mL)	0,006	0,003	1,686	0,09
	PTH (pg/mL)	0,004	0,005	0,672	0,50

Os pacientes foram divididos de acordo com o escore de Agatston (EA) em dois grupos, considerando-se como ponto de corte um escore de 10

HU, escolhido devido ao valor prognóstico com relação à mortalidade cardiovascular demonstrado em estudo anterior (8). Assim, a presença de calcificação coronariana foi definida com EA > 10.

A tabela 5 mostra as características clínicas, laboratoriais e escores dos dois grupos. Nota-se que o grupo que apresentou EA >10 é composto por um maior percentual de indivíduos do sexo masculino, hipertensos, diabéticos e dislipidêmicos em uso de estatinas. Além disto, a média de idade foi mais elevada neste grupo quando comparado ao grupo sem calcificação coronariana.

A média de fósforo sérico foi maior no grupo calcificado e a figura 6 ilustra sua distribuição entre os dois grupos. As diferenças nos níveis de fósforo sérico persistiram quando foram utilizados outros níveis de corte para o EA, como por exemplo 100HU ou 400HU ($p=0,04$). Não houve diferença significativa entre os níveis de cálcio, fosfatase alcalina, 25(OH)vitamina D ou FGF-23. Nota-se que o PTH sérico foi menor no grupo com escore superior a 10HU; esta tendência, entretanto, não atingiu significância estatística.

O risco cardiovascular medido através do Escore de Framingham e a presença de alterações à cineangiocoronariografia refletida nos Escores de Gensini e Friesinger apresentaram valores superiores no grupo EA > 10. Já os níveis séricos de colesterol total e LDL foram maiores no grupo não calcificado, diferenças que desapareceram após o ajuste para o uso de estatinas. Peptídeo C e PCR não foram preditores do EA.

Tabela 5 – Características clínicas e laboratoriais de acordo com o Escore de Agatston

	Escore de Agatston ≤10	Escore de Agatston > 10	P
N	121	169	
Sexo (n, % masculino)	60 (49,6)	107 (63,3)	0,02
Idade (média±DP)	54,7 ± 8,8	60,4 ± 8,9	<0,001
Raça (Brancos, n,%)	74 (61,1)	118 (69,8)	0,13
HAS (n,%)	88 (72,2)	147 (86,9)	0,004
DM (n, %)	30 (24,8)	73 (43,2)	0,001
Tabagismo (n, %)	36 (29,7)	57 (33,7)	0,52
Dislipidemia (n, %)	46 (38,0)	85 (50,2)	0,04
Uso de estatinas (n, %)	52 (42,9)	98 (57,9)	0,01
IMC (kg/m²)	28,5 ± 4,7	27,7 ± 5,1	0,05
PAS (mmHg)	133,4 ± 20,0	129,6 ± 17,7	0,22
PAD (mmHg)	84,0 ± 12,5	81,1 ± 11,2	0,06
Creatinina (mg/dL)	0,9 ± 0,2	0,9 ± 0,2	0,90
Uréia (mg/dL)	37 (29-45)	36 (30-44)	0,80
Cálcio total (mg/dL)	9,4 ± 0,5	9,5 ± 0,5	0,20
Cálcio iônico (mg/dL)	5,1 (4,9-5,3)	5,1 (5,0-5,3)	0,10
Fósforo (mg/dL)	3,49 ± 0,52	3,63 ± 0,55	0,02
Fosfatase alcalina (U/L)	76,4 ± 22,1	77,5 ± 25,4	0,89
25(OH)vit D (ng/mL)	23,6 ± 8,4	24,2 ± 8,7	0,43
PTH (pg/mL)	61,0 (43,0-85,0)	53,0 (38,0-76,0)	0,06
FGF-23 (pg/mL)	45,7 (28,6-76,8)	42,1 (26,1-65,3)	0,21
Apolipoproteína B (mg/dL)	92,2 ± 28,1	81,9 ± 22,1	0,01
Triglicérides (mg/dL)	132,0 (93,0-202,0)	129,0 (99,0-181,0)	0,50
Colesterol total (mg/dL)	182,4 ± 45,4	163,8 ± 37,2	<0,001
HDL colesterol (mg/dL)	44,0 (36,0-55,0)	43,0 (36,0-52,0)	0,80
LDL colesterol (mg/dL)	106,4 ± 37,2	90,7 ± 31,2	<0,001
VLDL colesterol (mg/dL)	26,0 (10,0-40,0)	26,0 (20,0-36,0)	0,60
Glicemia (mg/dL)	101,0 (91,0-119,0)	106,0 (96,0-129,0)	0,03
Proteína C reativa (mg/L)	2,7 (1,3-4,9)	2,9 (1,2-5,7)	0,60
Peptídeo C (ng/mL)	2,6 (1,8-3,5)	2,6 (1,8-3,7)	0,45
Clearance de creatinina (ml/min/1,73m²)	90,5 (77,6-106,6)	93,1 (79,6-110,7)	0,50
Escore de Framingham (risco em 10 anos, %)	8 (5-16)	10 (7-17)	0,03
Escore de Friesinger (pontos)	0 (0-3)	8 (4-11)	<0,001
Escore de Gensini (pontos)	47 (46-49)	86 (52-150)	<0,001

Variáveis contínuas paramétricas apresentadas como média ± DP; variáveis contínuas não-paramétricas apresentadas como mediana (intervalo interquartil).

PAS, pressão arterial sistólica; PAD, pressão arterial diastólica; IMC, índice de massa corpórea.; HDL: Lipoproteína de alta densidade; LDL: Lipoproteína de baixa densidade, VLDL: Lipoproteína de densidade muito baixa.

Figura 6 – Distribuição dos níveis séricos de fósforo entre os grupos divididos de acordo com o Escore de Agatston

A: distribuição do P sérico no grupo com EA ≤ 10; B: distribuição do P sérico no grupo com EA > 10.

As análises de regressão logística foram efetuadas considerando como variável dependente a presença do Escore de Agatston superior a 10 HU (tabelas 6 e 7). Na análise univariada (tabela 6), o incremento em 1 mg/dL no P sérico mostrou-se associado a um aumento em 61% no risco do paciente apresentar calcificação coronariana (OR 1,61, IC95% 1,03-2,51, $p=0,03$). Nota-se ainda que, como esperado, fatores de risco tradicionais

como idade, sexo masculino, HAS e DM foram preditores da presença de calcificação coronária. Interessantemente, o PTH mostrou-se inversamente associado ao risco de calcificação na população estudada (OR 0,34, IC95% 0,11-0,99, $p=0,05$). Por outro lado, o FGF-23 isoladamente não se mostrou associado ao risco de calcificação.

Nos modelos de regressão logística multivariada, observa-se que o P sérico continua a ser um fator de risco independente para a presença de calcificação coronariana, mesmo após ajuste para possíveis variáveis de confusão como idade, sexo, DM, HAS, FGF-23, PTH e IMC.

Tabela 6 – Regressão logística univariada sobre o risco de apresentar o
Escore de Agatston superior a 10 HU

Variável	OR	IC 95%	<i>p</i>
Idade (anos)	1,07	1,04-1,10	<0,001
Sexo (masculino)	1,75	1,09-2,82	0,02
Raça (brancos)	1,32	0,81-2,14	0,27
DM	2,31	1,38-3,85	0,001
HAS	2,51	1,37-4,57	0,003
Tabagismo	0,83	0,51-1,37	0,47
Fósforo (mg/dL)	1,61	1,03-2,51	0,03
Cálcio total (mg/dL)	1,42	0,86-2,33	0,17
FA (U/L)	1,00	0,99-1,01	0,68
Glicose (mg/dL)	1,00	0,99-1,01	0,19
LDL (mg/dL)	0,99	0,98-0,99	<0,001
CICr (ml/min/1,73m ²)	1,00	0,99-1,01	0,74
logPTH	0,34	0,11-0,99	0,05
logFGF-23	0,56	0,26-1,22	0,14

OR = EA>10 vs EA≤10

Tabela 7 – Modelos de regressão logística multivariada sobre o risco de apresentar o Escore de Agatston superior a 10 HU

Modelos	Variáveis	OR	IC 95%	p
Modelo 1	Fósforo (mg/dL)	1,74	1,09-2,77	0,02
	Idade (anos)	1,08	1,05-1,11	<0,001
Modelo 2	Fósforo (mg/dL)	1,75	1,11-2,76	0,02
	Sexo (masculino)	1,91	1,17-3,11	0,01
Modelo 3	Fósforo (mg/dL)	1,62	1,03-2,52	0,03
	logFGF-23	0,56	0,25-1,21	0,14
Modelo 4	Fósforo (mg/dL)	1,55	0,99-2,42	0,05
	logPTH	0,37	0,12-1,11	0,08
Modelo 5	Fósforo (mg/dL)	1,59	1,02-2,48	0,04
	IMC (kg/m ²)	0,97	0,92-1,01	0,18
Modelo 6	Fósforo (mg/dL)	1,56	0,99-2,14	0,05
	logFGF-23	0,58	0,26-1,27	0,17
	logPTH	0,39	0,13-1,17	0,09
Modelo 7	Fósforo (mg/dL)	1,98	1,19-3,29	0,01
	Idade (anos)	1,08	1,05-1,11	<0,001
	Sexo (masculino)	3,02	1,72-5,28	<0,001
	HAS	2,32	1,18-4,54	0,01
	DM	1,82	1,04-3,18	0,04
Modelo 8	Fósforo (mg/dL)	1,92	1,17-3,15	0,01
	Idade (anos)	1,09	1,05-1,12	<0,001
	Sexo (masculino)	2,51	1,45-4,32	0,001
	logPTH	0,39	0,12-1,29	0,12
	logFGF-23	0,58	0,25-1,35	0,21
Modelo 9	Fósforo (mg/dL)	1,87	1,13-3,07	0,01
	Idade (anos)	1,09	1,05-1,12	<0,001
	Sexo (masculino)	2,58	1,49-4,48	0,001
	DM	1,94	1,10-3,39	0,02
	logPTH	0,44	0,13-1,51	0,19
	logFGF-23	0,56	0,24-1,30	0,17
Modelo 10	Fósforo (mg/dL)	1,92	1,56-3,19	0,01
	Idade (anos)	1,08	1,05-1,12	<0,001
	Sexo (masculino)	2,85	1,62-5,02	<0,001
	HAS	2,36	1,19-4,66	0,01
	DM	1,77	1,01-3,13	0,05
	logPTH	0,42	0,12-1,45	0,17
	logFGF-23	0,55	0,23-1,31	0,18
Modelo 11	Fósforo (mg/dL)	1,88	1,12-3,13	0,02
	Idade (anos)	1,08	1,05-1,12	<0,001
	Sexo (masculino)	2,75	1,55-4,86	<0,001
	HAS	2,59	1,29-5,19	0,01
	DM	1,90	1,06-3,38	0,03
	logPTH	0,47	0,13-1,66	0,24
	logFGF-23	0,57	0,25-1,35	0,20
	IMC	0,96	0,91-1,01	0,15

OR= EA>10 vs EA≤10

4.2 Fatores preditores da presença de doença coronariana obstrutiva

A presença de doença coronariana obstrutiva à cineangiocoronariografia foi avaliada de três formas: quantitativamente, através dos escores de Gensini e Friesinger, e qualitativamente, considerando-se a presença de obstrução superior a 50% de qualquer uma das artérias coronarianas principais como variável dicotômica (presença vs ausência de obstrução).

4.2.1 Efeito das variáveis analisadas sobre o Escore de Gensini

Conforme demonstrado na tabela 1, o Escore de Gensini apresenta uma ampla variabilidade (intervalo interquartil = 47-108 pontos) e sua distribuição é assimétrica. Optamos inicialmente por estudar esta variável dividindo a população de acordo com os tercís do Escore de Gensini. As características dos três grupos são apresentadas na tabela 8. A idade foi maior nos tercís mais altos, assim como o percentual de pacientes hipertensos, diabéticos e dislipidêmicos. O FGF-23 sérico foi menor nos tercís mais elevados, enquanto o fósforo sérico apresentou tendência oposta nestes grupos. Os níveis de colesterol total e sua fração LDL foram gradativamente menores com o incremento de Escore de Gensini, mas estas diferenças novamente perderam significância após a correção para o uso de estatinas. Não houve qualquer diferença nos valores de peptídeo C e PCR entre os grupos. O risco cardiovascular e os escores de Agatston e Friesinger também apresentaram elevação progressiva ao longo dos tercís.

A seguir, avaliamos as correlações entre o Escore de Gensini e as variáveis de interesse e encontramos uma correlação negativa deste escore com o logFGF-23 ($R=-0,148$; $p=0,01$) e positiva com idade ($R=0,182$; $p<0,001$). Não houve correlações significativas com as outras variáveis avaliadas, conforme demonstrado na tabela 9.

Tabela 8 – Características dos grupos divididos de acordo com os tercís do Escore de Gensini

	Tercil 1	Tercil 2	Tercil 3	
N	100	92	94	
Sexo (n, % masculino)	52 (52,0)	50 (54,3)	63 (67,0)	0,08
Idade (média±DP)	55,7 ± 9,2	58,2 ± 9,8	60,1 ± 8,3	0,01
Raça (Branco n, %)	59 (59,0)	62 (67,4)	63 (67,0)	0,38
HAS (n, %)	70 (70,0)	80 (86,9)	83 (88,2)	0,001
DM (n, %)	24 (24,0)	36 (39,1)	42 (44,7)	0,01
Tabagismo (n, %)	30 (30,0)	29 (31,5)	32 (34,0)	0,83
Dislipidemia (n, %)	34 (34,0)	43 (46,7)	51 (54,2)	0,02
Uso de estatinas (n, %)	33 (33,0)	47 (51,1)	68 (72,3)	<0,001
IMC (kg/m²)	28,2 ± 4,8	27,5 ± 4,9	27,8 ± 5,0	0,82
PAS (mmHg)	130,6 ± 12,8	135,0 ± 20,7	127,8 ± 17,0	0,07
PAD (mmHg)	81,9 ± 12,5	85,2 ± 12,8	79,8 ± 9,7	0,01
Creatinina (mg/dL)	0,87 ± 0,16	0,89 ± 0,17	0,90 ± 0,17	0,45
Uréia (mg/dL)	36 (30-45)	36 (30-44)	37 (30-44)	0,92
Cálcio total (mg/dL)	9,4 ± 0,4	9,6 ± 0,5	9,4 ± 0,5	0,07
Cálcio iônico (mg/dL)	5,1 (4,9-5,3)	5,1 (4,9-5,3)	5,1 (5,0-5,3)	0,56
Fósforo (mg/dL)	3,55 ± 0,53	3,51 ± 0,62	3,66 ± 0,45	0,10
Fosfatase alcalina (U/L)	74,8 ± 21,4	78,0 ± 26,7	79,2 ± 24,5	0,35
25(OH)vit D (ng/mL)	22,9 ± 7,5	25,8 ± 9,8	23,5 ± 7,9	0,19
PTH (pg/mL)	59,0 (44,0-80,0)	55,0 (41,0-75,0)	52,0 (35,0-79,0)	0,32
FGF-23 (pg/mL)	50,4 (33,3-85,7)	41,6 (25,7-62,5)	41,6 (24,5-63,8)	0,01
Apolipoproteína B (mg/dL)	90,0 ± 25,5	85,3 ± 26,7	82,0 ± 22,3	0,14
Triglicérides (mg/dL)	129,0 (92,0-185,0)	133,0 (99,0-208,0)	129,0 (99,0-175,0)	0,62
Colesterol total (mg/dL)	179,5 ± 43,9	172,2 ± 42,0	161,1 ± 37,3	<0,001
HDL colesterol (mg/dL)	45,0 (36,0-55,0)	45,0 (37,0-54,0)	41,0 (34,0-48,0)	0,01
LDL colesterol (mg/dL)	104,5 ± 35,9	95,5 ± 34,4	90,4 ± 32,5	0,02
VLDL colesterol (mg/dL)	26,0 (18,0-37,0)	26,0 (20,0-40,0)	26,0 (20,0-35,0)	0,64
Glicemia (mg/dL)	100,0 (91,0-116,0)	106,0 (94,0-138,0)	106,0 (96,0-120,0)	0,04
Proteína C reativa (mg/L)	2,2 (1,1-4,6)	2,9 (1,4-5,5)	3,5 (1,2-6,7)	0,26
Peptídeo C (ng/mL)	2,4 (1,8-3,3)	2,9 (2,2-3,9)	2,6 (1,7-3,7)	0,17
Clearance de creatinina (ml/min/1,73m²)	90,5 (79,3-106,7)	93,8 (79,1-106,6)	93,6 (82,2-111,9)	0,54
Escore de Friesinger (ponts)	0 (0-1)	2 (4-6)	9 (10-12)	<0,001
Escore de Framingham (risco em 10 anos, %)	8 (5-16)	10 (5-16)	10 (7-18)	0,04
Escore de Agatston (HU)	0 (0-7)	48 (1-257)	276 (100-891)	<0,001

Variáveis contínuas paramétricas apresentadas como média ± DP; variáveis contínuas não-paramétricas apresentadas como mediana (intervalo interquartil).

Tabela 9 - Correlações entre o Escore de Gensini e variáveis contínuas

	R	p
Idade	0,182	<0,001
Fósforo	0,062	0,30
logFGF-23	-0,148	0,01
logPTH	-0,074	0,21
Cálcio total	-0,006	0,92
25(OH)vitamina D	0,046	0,44

Para a análise de regressão linear, utilizamos como variável dependente logGensini. Conforme demonstrado na tabela 10, houve associação positiva e estatisticamente significativa das variáveis idade, DM e HAS com o escore de Gensini.

Em relação ao fósforo, apesar da regressão linear univariada ter demonstrado apenas uma tendência a uma associação positiva, atingiu-se significância estatística após o ajuste para sexo e idade na análise multivariada (tabela 11). Este fato sugere que o sexo e idade sejam variáveis de confusão importantes na relação entre fósforo e aterosclerose.

Nos modelos multivariados relacionados ao efeito do FGF-23 sobre Gensini (tabela 12), notamos que o FGF-23 segue como variável inversa e significativamente associada ao escore mesmo após ajustes para inúmeras variáveis.

Tabela 10 – Fatores associados ao logGensini na análise de regressão linear univariada

Variável	B	Desvio padrão	Beta	p
Idade (anos)	0,004	0,001	0,165	0,005
DM	0,077	0,029	0,158	0,01
HAS	0,073	0,035	0,122	0,04
Fósforo (mg/dL)	0,040	0,026	0,093	0,12
Cálcio total (mg/dL)	-0,034	0,029	-0,068	0,25
Glicose (mg/dL)	0,001	0,000	0,097	0,10
LDL (mg/dL)	-0,001	0,000	-0,112	0,06
logPTH	-0,059	0,062	-0,056	0,34
logFGF-23	-0,097	0,044	-0,128	0,03
25(OH)vitamina D (ng/mL)	-0,001	0,002	-0,021	0,73
PAS (mmHg)	-0,001	0,001	-0,097	0,10

Tabela 11 – Fatores associados ao logGensini na análise de regressão
linear multivariada

Modelos	Variáveis	B	Desvio padrão	Beta	p
Modelo 1	Idade (anos)	0,004	0,001	0,152	0,01
	Sexo (masculino)	0,093	0,027	0,195	<0,001
	HAS	0,052	0,035	0,086	0,14
	DM	0,052	0,029	0,106	0,08
	Dislipidemia	-0,038	0,028	-0,079	0,18
Modelo 2	Fósforo (mg/dL)	0,048	0,025	0,112	0,06
	Sexo (masculino)	0,078	0,028	0,164	0,006
Modelo 3	Fósforo (mg/dL)	0,040	0,025	0,093	0,11
	logFGF-23	-0,096	0,044	-0,128	0,03
Modelo 4	Fósforo (mg/dL)	0,051	0,025	0,118	0,04
	Sexo (masculino)	0,092	0,028	0,195	0,001
	Idade (anos)	0,005	0,001	0,196	0,001
Modelo 5	Fósforo (mg/dL)	0,050	0,025	0,116	0,05
	Sexo (masculino)	0,095	0,028	0,202	0,001
	Idade (anos)	0,005	0,001	0,184	0,002
	Raça (brancos)	0,042	0,028	0,087	0,14
Modelo 6	Fósforo (mg/dL)	0,043	0,024	0,099	0,08
	Sexo (masculino)	0,097	0,027	0,207	<0,001
	Idade (anos)	0,004	0,001	0,156	0,008
	HAS	0,053	0,035	0,088	0,13
	DM	0,047	0,029	0,098	0,10
	Dislipidemia	-0,032	0,028	-0,069	0,24
Modelo 7	Fósforo (mg/dL)	0,049	0,025	0,114	0,05
	Sexo (masculino)	0,094	0,028	0,198	0,001
	Idade (anos)	0,005	0,001	0,180	0,002
	Raça (brancos)	0,043	0,028	0,089	0,13
	logPTH	-0,009	0,062	-0,008	0,89
	logFGF-23	-0,092	0,043	-0,121	0,04
Modelo 8	Fósforo (mg/dL)	0,042	0,024	0,098	0,08
	Sexo (masculino)	0,096	0,027	0,205	<0,001
	Idade (anos)	0,003	0,001	0,152	<0,001
	HAS	0,052	0,035	0,086	0,14
	DM	0,049	0,029	0,100	0,09
	Dislipidemia	-0,035	0,028	-0,075	0,21
	logPTH	0,001	0,061	0,002	0,97
	logFGF-23	-0,094	0,042	-0,125	0,03

Tabela 12 – Modelos de regressão linear multivariada: avaliação do efeito do FGF-23 sobre o Escore de Gensini

		B	Desvio padrão	Beta	p
Modelo 1	logFGF-23	-0,096	0,044	-0,128	0,03
	Fósforo (mg/dL)	0,040	0,025	0,093	0,11
Modelo 2	logFGF-23	-0,097	0,043	-0,128	0,03
	Sexo (masculino)	0,085	0,029	0,179	0,003
	Idade (anos)	0,004	0,002	0,166	0,01
	Raça (brancos)	0,054	0,029	0,110	0,07
	DM	-0,069	0,028	-0,141	0,02
	CICr (ml/min/1,73m²)	0,001	0,001	0,069	0,27
	logPTH	-0,006	0,062	-0,006	0,93
	25(OH)vitamina D (ng/mL)	-0,001	0,002	-0,048	0,41

CICr: Clearance de creatinina.

Para a análise de regressão logística (tabelas 13, 14 e 15) consideramos o risco do paciente pertencer ao terceiro tercil populacional em relação ao risco de estar no primeiro e segundo tercís. À semelhança do que ocorreu com a regressão linear, embora já apresente uma tendência estatística na análise univariada (tabela 13), o fósforo aparece como fator de risco significativo apenas após ajuste para a variável sexo (tabela 14). É interessante notar que, após este primeiro ajuste, nenhuma outra variável inserida nos modelos subsequentes altera de forma importante a associação entre fósforo e Gensini. No modelo multivariado final, cada aumento de 1 mg/dL no P sérico implicou num aumento de 74% na chance de se apresentar um Escore de Gensini pertencente ao último tercil (tabela 14).

Em relação ao FGF-23, encontramos uma tendência estatística de associação inversa com o Gensini tratado como variável categórica (tabelas

13 e 15). É possível que isso tenha ocorrido em função de um menor poder da análise logística em relação à análise linear apresentada anteriormente.

Tabela 13 – Regressão logística univariada sobre o risco de apresentar
Escore de Gensini no terceiro tercil vs primeiro+segundo tercís

Variável	OR	IC 95%	<i>p</i>
Idade (anos)	1,04	1,01-1,07	0,007
Sexo (masculino)	1,79	1,07-3,00	0,03
Raça (brancos)	1,19	0,71-2,01	0,51
DM	1,78	1,07-2,95	0,03
HAS	2,11	1,03-4,32	0,04
Tabagismo	0,86	0,51-1,45	0,57
Fósforo (mg/dL)	1,56	0,98-2,48	0,06
Fosfatase alcalina (U/L)	1,00	0,99-1,01	0,35
25(OH)vitamina D (ng/mL)	0,99	0,96-1,02	0,46
logPTH	0,53	0,18-1,61	0,26
logFGF-23	0,50	0,22-1,12	0,09

OR= Terceiro tercil de Gensini vs Primeiro+segundo tercís de Gensini

Tabela 14 – Modelos de regressão logística multivariada: avaliação do fósforo como fator de risco para Escores de Gensini no terceiro tercil

Modelos	Variáveis	OR	IC 95%	p
Modelo 1	Fósforo (mg/dL)	1,67	1,04-2,68	0,03
	Sexo (masculino)	1,92	1,14-3,24	0,01
Modelo 2	Fósforo (mg/dL)	1,79	1,09-2,92	0,02
	Sexo (masculino)	2,30	1,33-3,99	0,003
	Idade (anos)	1,05	1,02-1,08	0,001
Modelo 3	Fósforo (mg/dL)	1,80	1,09-2,93	0,02
	Sexo (masculino)	2,33	1,34-4,05	0,003
	Idade (anos)	1,05	1,02-1,08	0,002
	Raça (brancos)	1,15	0,66-1,98	0,63
Modelo 4	Fósforo (mg/dL)	1,78	1,08-2,93	0,02
	Sexo (masculino)	2,29	1,30-4,02	0,004
	Idade (anos)	1,05	1,02-1,08	0,002
	Raça (brancos)	1,15	0,66-2,01	0,61
	logPTH	0,73	0,22-2,35	0,59
	logFGF-23	0,50	0,21-1,16	0,11
Modelo 5	Fósforo (mg/dL)	1,74	1,06-2,86	0,03
	Sexo (masculino)	2,48	1,42-4,36	0,001
	Idade (anos)	1,04	1,01-1,07	0,008
	Raça (brancos)	1,13	0,65-1,97	0,66
	HAS	1,98	0,93-4,20	0,08
	DM	1,48	0,86-2,53	0,16
Modelo 6	Fósforo (mg/dL)	1,74	1,05-2,87	0,03
	Sexo (masculino)	2,47	1,39-4,38	0,002
	Idade (anos)	1,04	1,01-1,07	0,009
	Raça (brancos)	1,15	0,65-2,01	0,63
	HAS	2,00	0,93-4,27	0,07
	DM	1,49	0,86-2,58	0,15
	logPTH	0,80	0,24-2,64	0,72
	logFGF-23	0,48	0,21-1,12	0,09

OR= Terceiro tercil de Gensini vs Primeiro+segundo tercís de Gensini

Tabela 15 - Modelos de regressão logística multivariada: avaliação do FGF-23 como fator de risco para Escores de Gensini no terceiro tercil

Modelos	Variáveis	OR	IC 95%	P
Modelo 1	logFGF-23	0,50	0,22-1,13	0,09
	Sexo (masculino)	1,80	1,07-3,01	0,03
Modelo 2	logFGF-23	0,50	0,22-1,15	0,10
	Sexo (masculino)	2,12	1,23-3,63	0,007
	Idade (anos)	1,04	1,01-1,07	0,003
	Raça (brancos)	1,17	0,67-2,01	0,58

OR= Terceiro tercil de Gensini vs Primeiro+segundo tercís de Gensini

4.2.2 Efeito das variáveis analisadas sobre o Escore de Friesinger

Os pacientes foram divididos em dois grupos de acordo com o Escore de Friesinger. O ponto de corte utilizado foi a mediana (4 pontos). As características gerais dos pacientes de acordo com esta divisão estão representadas na tabela 16. De maneira bastante consistente com os resultados encontrados na análise do Escore de Gensini, a média de fósforo foi maior e os níveis de FGF-23 sérico menores no grupo que apresentou Escore de Friesinger superior a 4 pontos. Ainda neste grupo, a média de idade foi maior, houve mais homens, mais pacientes da raça branca, hipertensos, diabéticos e dislipidêmicos. Curiosamente, o IMC médio dos pacientes com escores mais altos foi menor. Os achados em relação ao uso de estatinas e perfil lipídico também se repetiram, e o grupo com doença coronariana mais extensa apresentou uso de estatinas mais frequente e níveis de colesterol total e HDL mais baixos. Como esperado, nota-se que também neste grupo o risco cardiovascular e os escores de Agatston e Friesinger mostram valores superiores ao do grupo com Escore de Friesinger menor.

Tabela 16 – Características dos grupos divididos de acordo com a mediana do Escore de Friesinger

	Escore de Friesinger ≤ 4	Escore de Friesinger > 4	p
N	149	137	
Sexo (n, % masculino)	76 (51,0)	89 (64,9)	0,02
Idade (média±DP)	55,8 ± 9,2	60,3 ± 8,9	<0,001
Raça (Branco n,%)	85 (57,0)	99 (72,3)	0,01
HAS (n,%)	111 (74,5)	122 (89,05)	0,002
DM (n, %)	43 (38,8)	59 (43,0)	0,01
Tabagismo (n, %)	46 (30,8)	45 (32,8)	0,72
Dislipidemia (n, %)	57 (38,2)	71 (51,8)	0,02
Uso de estatinas (n, %)	59 (39,6)	89 (64,9)	<0,001
IMC (kg/m²)	28,3 ± 4,7	27,6 ± 5,1	0,04
PAS (mmHg)	131,3 ± 18,7	130,9 ± 19,1	0,96
PAD (mmHg)	82,3 ± 11,7	82,3 ± 12,2	0,89
Creatinina (mg/dL)	0,87 ± 0,16	0,90 ± 0,18	0,14
Uréia (mg/dL)	36 (29-44)	37 (30-44)	0,63
Cálcio total (mg/dL)	9,4 ± 0,5	9,5 ± 0,5	0,80
Cálcio iônico (mg/dL)	5,1 (4,9-5,3)	5,1 (5,0-5,3)	0,27
Fósforo (mg/dL)	3,52 ± 0,56	3,63 ± 0,52	0,04
Fosfatase alcalina (U/L)	75,3 ± 23,6	79,5 ± 24,6	0,06
25(OH)vit D (ng/mL)	23,8 ± 8,6	24,2 ± 8,4	0,42
PTH (pg/mL)	60,0 (43,0-79,0)	52,0 (36,0-79,0)	0,18
FGF-23 (pg/mL)	45,7 (31,7-76,1)	40,3 (24,1-62,2)	0,01
Apolipoproteína B (mg/dL)	87,8 ± 26,4	83,8 ± 23,4	0,35
Triglicérides (mg/dL)	129,0 (92,0-196,0)	131,0 (101,0-185,0)	0,56
Colesterol total (mg/dL)	176,8 ± 43,2	164,8 ± 39,4	0,03
HDL colesterol (mg/dL)	45,0 (36,0-54,0)	42,0 (35,0-50,0)	0,05
LDL colesterol (mg/dL)	101,1 ± 36,4	92,5 ± 32,2	0,08
VLDL colesterol (mg/dL)	25,0 (18,0-39,0)	26,0 (20,0-36,0)	0,52
Glicemia (mg/dL)	104,0 (92,0-121,0)	105,0 (95,0-122,0)	0,33
Proteína C reativa (mg/L)	2,5 (1,3-4,5)	3,2 (1,2-6,2)	0,14
Peptídeo C (ng/mL)	2,7 (1,9-3,6)	2,6 (1,8-3,7)	0,86
Clearance de creatinina (MDRD, ml/min/1,73m²)	93,7 (79,7-106,7)	92,3 (79,4-11,2)	0,89
Escore de Framingham (risco em 10 anos)	8 (5-15)	10 (7-20)	<0,001
Escore de Agatston (HU)	0 (0-35)	214 (87-838)	<0,001
Escore de Gensini (pontos)	47 (46-48)	109 (69-157)	<0,001

Variáveis contínuas paramétricas apresentadas como média ± DP; variáveis contínuas não-paramétricas apresentadas como mediana (intervalo interquartil).

Formatado: Fonte: (Padrão) Arial, Português (Portugal)

Tabela 17 – Regressão logística univariada sobre o risco de apresentar
Escore de Friesinger superior à mediana (4 pontos)

Variável	OR	IC 95%	p
Idade (anos)	1,06	1,03-1,08	<0,001
Sexo (masculino)	1,78	1,11-2,87	0,02
Raça (brancos)	1,96	1,19-3,22	0,01
DM	1,86	1,14-3,04	0,01
HAS	2,78	1,45-5,34	0,002
Fósforo (mg/dL)	1,47	0,95-2,28	0,08
Escore de Agatston (cada 10 HU aumento)	1,06	1,03-1,07	<0,001
logPTH	0,47	0,16-1,35	0,16
logFGF-23	0,32	0,14-0,71	0,005

OR= Escore de Friesinger > 4 vs Escore de Friesinger ≤ 4

Na análise de regressão logística foi avaliada a relação entre diversas variáveis e o risco de se apresentar um Escore de Friesinger superior à mediana (tabelas 17, 18 e 19). Idade, sexo masculino, raça branca, DM, HAS e Escore de Agatston foram fatores que se mostraram significativamente associadas ao escore (tabela 17). Novamente o FGF-23 apresentou associação inversa com a extensão da doença arterial coronariana representada aqui pelo Escore de Friesinger (OR 0,32; IC95% 0,14-0,71; $p=0,005$), que se manteve nos modelos multivariados (tabelas 18 e 19). Mais uma vez o PTH não apresentou associação estatisticamente significativa com o Escore de Friesinger.

Conforme observado em modelos anteriores, o fósforo sérico mostrou apenas uma tendência na relação com Escore de Friesinger no modelo de regressão logística univariada. Entretanto, observamos novamente que, após o ajuste para a variável sexo, o fósforo sérico passou a ter relação

significativa com este escore que se manteve em todos os demais modelos (tabela 18).

Tabela 18 – Regressão logística multivariada: efeito ajustado do fósforo sobre o risco de apresentar Escore de Friesinger superior à mediana

Modelos	Variáveis	OR	IC 95%	p
Modelo 1	Fósforo (mg/dL)	1,59	1,02-2,48	0,04
	Sexo (masculino)	1,90	1,17-3,09	0,01
Modelo 2	Fósforo (mg/dL)	1,73	1,08-2,76	0,02
	Sexo (masculino)	2,43	1,44-4,09	0,001
	Idade (anos)	1,07	1,04-1,09	<0,001
Modelo 3	Fósforo (mg/dL)	1,75	1,05-2,81	0,02
	Sexo (masculino)	2,63	1,54-4,47	<0,001
	Idade (anos)	1,06	1,03-1,09	<0,001
	Raça (brancos)	1,95	1,14-3,31	0,01
Modelo 4	Fósforo (mg/dL)	1,76	1,08-2,86	0,02
	Sexo (masculino)	2,61	1,51-4,51	<0,001
	Idade (anos)	1,07	1,03-1,09	<0,001
	Raça (brancos)	2,02	1,17-3,49	0,01
	logPTH	0,72	0,23-2,31	0,59
	logFGF-23	0,28	0,12-0,67	0,003
Modelo 5	Fósforo (mg/dL)	1,73	1,06-2,82	0,03
	Sexo (masculino)	2,94	1,68-5,09	<0,001
	Idade (anos)	1,06	1,03-1,09	<0,001
	Raça (brancos)	1,99	1,16-3,41	0,01
	HAS	2,71	1,34-5,49	0,01
	DM	1,46	0,85-2,49	0,16
Modelo 6	Fósforo (mg/dL)	1,74	1,06-2,88	0,03
	Sexo (masculino)	2,97	1,69-5,23	<0,001
	Idade (anos)	1,06	1,03-1,09	<0,001
	Raça (brancos)	2,07	1,19-3,61	0,01
	HAS	2,79	1,36-5,70	0,01
	DM	1,51	0,87-2,61	0,15
	logPTH	0,77	0,23-2,54	0,67
	logFGF-23	0,26	0,11-0,63	0,002

OR= Escore de Friesinger > 4 vs Escore de Friesinger ≤ 4

Tabela 19 – Regressão logística multivariada: efeito ajustado do FGF-23 sobre o risco de apresentar Escore de Friesinger superior à mediana

Modelos	Variáveis	OR	IC 95%	p
Modelo 1	logFGF-23	0,29	0,13-0,67	0,004
	Sexo (masculino)	2,42	1,43-4,09	0,001
	Idade (anos)	1,06	1,03-1,09	<0,001
	Raça (brancos)	2,02	1,18-3,44	0,01
Modelo 2	logFGF-23	0,26	0,11-0,63	0,002
	Sexo (masculino)	2,97	1,69-5,23	<0,001
	Idade (anos)	1,06	1,03-1,09	<0,001
	Raça (brancos)	2,07	1,19-3,61	0,01
	HAS	2,79	1,36-5,70	0,01
	DM	1,51	0,87-2,61	0,15
	logPTH	0,77	0,23-2,54	0,67
	Fósforo (mg/dL)	1,74	1,06-2,88	0,03

OR= Escore de Friesinger > 4 vs Escore de Friesinger ≤ 4

4.2.3 Efeito das variáveis analisadas sobre a presença de obstrução coronariana superior a 50%

A relação entre as variáveis clínicas e laboratoriais e o grau de lesão coronariana observada à cineangiocoronariografia também foi estudada de maneira qualitativa, ou seja, dividindo-se os pacientes de acordo com a presença ou ausência de obstrução superior a 50% em qualquer uma das quatro artérias coronarianas principais (coronária direita, descendente anterior, circunflexa ou tronco da coronária esquerda). Estas variáveis estão descritas na tabela 20. A maioria dos pacientes incluídos não apresentou obstrução coronariana significativa por este critério. À semelhança dos resultados encontrados durante a análise quantitativa através dos escores de Gensini e Friesinger, houve diferença entre os dois grupos quanto à idade

e presença de fatores de risco tradicionais como sexo masculino, HAS e DM. Estes pacientes usavam mais estatinas e os níveis de colesterol total e HDL foram inferiores neste grupo. Houve ainda uma tendência a maior frequência de dislipidemia no grupo que apresentou obstrução e a média de creatinina foi mais elevada neste grupo sem que houvesse, entretanto, diferença no clearance de creatinina calculado pela fórmula do MDRD.

O FGF-23 sérico foi inferior no grupo que apresentou obstrução coronariana (mediana 47,7 pg/mL; IQR 32,3-78,1 vs 39,5 IQR 22,2-61,5; $p=0,001$) e não houve diferença nos níveis de fósforo sérico entre os dois grupos. Observamos uma tendência a um maior risco de eventos cardiovasculares em 10 anos estimado pelo Escore de Framingham e a calcificação coronariana foi mais acentuada no grupo com obstrução coronariana. Como são medidas quantitativas do grau de lesão coronariana, já era esperado que os Escores de Gensini e Friesinger fossem mais altos no grupo com obstrução, o que foi de fato observado.

Na análise de regressão logística, idade e sexo masculino mantiveram-se como fatores de risco para obstrução coronariana mesmo após o ajuste para as demais variáveis (tabelas 21, 22 e 23).

Houve uma tendência a associação positiva entre fósforo e obstrução coronariana após o ajuste para sexo e idade, mas não atingiu-se significância estatística (tabela 22). O FGF-23 apresentou associação negativa com a presença de obstrução arterial que permaneceu significativa após ajuste multivariado (OR 0,19; IC95% 0,08-0,45; $p<0,001$; tabela 22). Não encontramos qualquer associação entre PTH e obstrução coronariana.

Tabela 20 – Características dos grupos divididos de acordo com a presença de obstrução coronariana acima de 50%

	Ausência de obstrução	Presença de obstrução	p
N	155	135	
Sexo (n, % masculino)	78 (50,3)	89 (65,9)	0,007
Idade (média±DP)	56,4 ± 9,6	59,9 ± 8,5	<0,001
Raça (Brancos, n,%)	92 (59,3)	96 (71,1)	0,04
HAS (n,%)	119 (76,8)	116 (85,9)	0,04
DM (n, %)	46 (29,6)	57 (42,2)	0,03
Tabagismo (n, %)	51 (32,9)	42 (31,1)	0,74
Dislipidemia (n, %)	62 (40,0)	69 (51,1)	0,06
Uso de estatinas (n, %)	62 (40,0)	88 (65,2)	<0,001
IMC (kg/m²)	28,3 ± 4,9	27,7 ± 4,9	0,05
PAS (mmHg)	132,3 ± 19,1	129,9 ± 18,4	0,38
PAD (mmHg)	82,9 ± 12,8	81,5 ± 10,6	0,66
Creatinina (mg/dL)	0,87 ± 0,16	0,91 ± 0,18	0,02
Uréia (mg/dL)	36 (30-44)	37 (30-45)	0,50
Cálcio total (mg/dL)	9,5 ± 0,5	9,4 ± 0,5	0,56
Cálcio iônico (mg/dL)	5,1 (4,9-5,3)	5,1 (5,0-5,3)	0,07
Fósforo (mg/dL)	3,54 ± 0,56	3,61 ± 0,52	0,23
Fosfatase alcalina (U/L)	75,7 ± 24,9	78,5 ± 23,2	0,14
25(OH)vit D (ng/mL)	23,8 ± 8,7	24,1 ± 8,3	0,53
PTH (pg/mL)	58,0 (42,0-79,0)	56,0 (38,0-78,0)	0,60
FGF-23 (pg/mL)	47,7 (32,3-78,1)	39,5 (22,2-61,5)	0,001
Apolipoproteína B (mg/dL)	87,7 ± 25,9	84,4 ± 24,3	0,34
Triglicérides (mg/dL)	128,0 (92,0-188,0)	137,0 (100,0-193,0)	0,20
Colesterol total (mg/dL)	176,4 ± 42,0	166,0 ± 41,4	0,04
HDL colesterol (mg/dL)	45,0 (37,0-55,0)	42,0 (35,0-49,0)	0,01
LDL colesterol (mg/dL)	100,7 ± 35,3	93,2 ± 33,6	0,09
VLDL colesterol (mg/dL)	25,0 (18,0-37,0)	27,0 (20,0-38,0)	0,15
Glicemia (mg/dL)	104,0 (92,0-121,0)	106,0 (96,0-122,0)	0,20
Proteína C reativa (mg/L)	2,7 (1,3-4,7)	3,2 (1,2-6,0)	0,27
Peptídio C (ng/mL)	2,7 (1,9-3,7)	2,6 (1,7-3,7)	0,73
Clearance de creatinina (ml/min/1,73m²)	91,8 (79,0-106,7)	93,1 (79,6-110,7)	0,85
Escore de Framingham (risco em 10 anos, %)	7 (4-10)	7 (5-11)	0,07
Escore de Agatston (HU)	0 (0-50)	210 (75-775)	<0,001
Escore de Friesinger (pontos)	1 (0-3)	9 (7-11)	<0,001
Escore de Gensini (pontos)	47 (46-49)	109 (74-159)	<0,001

Variáveis contínuas paramétricas apresentadas como média ± DP; variáveis contínuas não-paramétricas apresentadas como mediana (intervalo interquartil).

Tabela 21 – Regressão logística univariada sobre o risco de apresentar obstrução coronariana superior a 50%

Variável	OR	IC 95%	p
Idade (anos)	1,04	1,02-1,07	0,001
Sexo (masculino)	1,91	1,18-3,07	0,01
Raça (brancos)	1,69	1,03-2,75	0,04
DM	1,73	1,06-2,81	0,03
HAS	1,85	1,00-3,40	0,05
Fósforo (mg/dL)	1,28	0,83-1,98	0,25
25(OH)vitaminaD (ng/mL)	1,00	0,98-1,03	0,79
logPTH	0,71	0,25-2,01	0,52
logFGF-23	0,22	0,09-0,51	<0,001

OR= Presença vs ausência de obstrução > 50%

Tabela 22 – Regressão logística multivariada: efeito ajustado do fósforo sobre o risco de apresentar obstrução coronariana superior a 50%

Modelos	Variáveis	OR	IC 95%	p
Modelo 1	Fósforo (mg/dL)	1,39	0,89-2,16	0,14
	Sexo (masculino)	2,00	1,24-3,24	0,004
Modelo 2	Fósforo (mg/dL)	1,49	0,94-2,35	0,08
	Sexo (masculino)	2,46	1,48-4,11	<0,001
	Idade (anos)	1,05	1,03-1,08	<0,001
Modelo 3	Fósforo (mg/dL)	1,49	0,94-2,38	0,09
	Sexo (masculino)	2,60	1,54-4,37	<0,001
	Idade (anos)	1,05	1,02-1,08	<0,001
	Raça (brancos)	1,67	0,99-2,80	0,05
Modelo 4	Fósforo (mg/dL)	1,49	0,94-2,38	0,08
	Sexo (masculino)	2,61	1,54-4,41	<0,001
	Idade (anos)	1,05	1,02-1,08	<0,001
	Raça (brancos)	1,67	0,99-2,82	0,05
	logPTH	1,03	0,34-3,14	0,95
	logFGF-23	0,19	0,08-0,46	<0,001
Modelo 5	Fósforo (mg/dL)	1,53	0,94-2,48	0,08
	Sexo (masculino)	2,61	1,49-4,57	<0,001
	Idade (anos)	1,05	1,02-1,08	<0,001
	Raça (brancos)	1,87	1,06-3,30	0,03
	logPTH	1,21	0,37-3,8	0,75
	logFGF-23	0,19	0,07-0,46	<0,001
	25(OH)vitamina D (ng/mL)	1,00	0,97-1,03	0,93
	ClCr (ml/min/1,73m ²)	1,00	0,99-1,01	0,63

OR= Presença vs ausência de obstrução > 50%

Tabela 23 – Regressão logística multivariada: efeito ajustado do FGF-23 sobre o risco de apresentar obstrução coronariana superior a 50%

		OR	IC 95%	p
Modelo 1	logFGF-23	0,22	0,09-0,50	<0,001
	Fósforo (mg/dL)	1,31	0,84-2,03	0,23
Modelo 2	logFGF-23	0,20	0,09-0,48	<0,001
	Sexo (masculino)	2,48	1,47-4,19	<0,001
	Idade (anos)	1,05	1,02-1,08	<0,001
	Raça (brancos)	1,77	1,04-3,02	0,04
Modelo 3	logFGF-23	0,19	0,08-0,46	<0,001
	Sexo (masculino)	2,69	1,57-4,59	<0,001
	Idade (anos)	1,05	1,01-1,08	0,003
	Raça (brancos)	1,79	1,05-3,08	0,03
	HAS	1,78	0,91-3,48	0,09
	DM	1,60	0,94-2,71	0,08
Modelo 4	logFGF-23	0,19	0,08-0,45	<0,001
	Sexo (masculino)	2,94	1,69-5,11	<0,001
	Idade (anos)	1,05	1,02-1,08	0,002
	Raça (brancos)	1,83	1,06-3,16	0,03
	HAS	1,81	0,92-3,55	0,08
	DM	1,55	0,90-2,66	0,11
	Fósforo (mg/dL)	1,51	0,93-2,45	0,10
	logPTH	1,33	0,41-4,30	0,64

OR= Presença vs ausência de obstrução > 50%

4.3 Análise das variáveis determinantes do fósforo sérico

Para a análise das variáveis determinantes da fosforemia os pacientes foram divididos de acordo com os tercís de fósforo (tabela 24). Observamos que nenhuma das principais variáveis demográficas apresentou diferença entre os grupos. Curiosamente a prevalência de tabagismo atual aumentou gradativamente do menor para o maior tercíl de fósforo. Particularmente em relação à diferença entre sexos, apesar de não haver diferença significativa na análise de tercís, a população feminina apresentou uma média de fósforo sérico maior em relação à masculina ($3,65 \pm 0,49$ mg/dL vs $3,52 \pm 0,57$ mg/dL; $p=0,04$), o que explica a importância da variável sexo durante as análises multivariadas realizadas previamente.

Dentre os parâmetros laboratoriais, nota-se uma tendência a encontrarmos valores mais elevados de uréia em tercís mais altos de fósforo. Não houve qualquer diferença entre os grupos quanto aos níveis séricos de cálcio, PTH, 25(OH)vitamina D ou FGF-23. Conforme demonstra a figura 7, a calcificação coronariana foi mais expressiva nos pacientes pertencentes aos últimos tercís de fósforo.

A correlação entre P e o Escore de Agatston foi positiva (tabela 25) e encontramos correlações positivas também entre P sérico e uréia, além de uma tendência a correlações positivas com o PTH e creatinina (tabela 25).

Tabela 24 – Características dos grupos divididos de acordo com o tercil de fósforo sérico

	Tercil 1	Tercil 2	Tercil 3	p
N	109	100	81	
Sexo (n, % masculino)	69 (63,3)	57 (57)	41 (50,6)	0,21
Idade (média±DP)	58,3 ± 9,1	58,4 ± 9,5	57,3 ± 9,5	0,56
Raça (Branco, n,%)	69 (63,3)	64 (64)	55 (67,9)	0,79
HAS (n,%)	86 (78,9)	87 (87)	62 (76,5)	0,16
DM (n, %)	34 (31,2)	32 (32,0)	37 (45,7)	0,08
Dislipidemias (n, %)	43 (39,4)	45 (45,0)	43 (53,1)	0,17
ICC (n, %)	22 (20,2)	18 (18,0)	17 (21,0)	0,87
Tabagismo (n, %)	26 (23,8)	34 (34,0)	33 (40,7)	0,04
Uso de estatinas (n, %)	50 (45,8)	53 (53,0)	47 (58,0)	0,24
IMC (kg/m²)	28,3 ± 4,9	28,2 ± 5,4	27,6 ± 4,4	0,65
PAS (mmHg)	133,2 ± 18,5	129,8 ± 18,2	130,1 ± 19,8	0,49
PAD (mmHg)	84,1 ± 12,4	80,9 ± 11,0	81,7 ± 12,0	0,29
Creatinina (mg/dL)	0,91 ± 0,17	0,88 ± 0,16	0,87 ± 0,18	0,47
Uréia (mg/dL)	36,2 ± 9,6	37,3 ± 10,9	39,5 ± 9,4	0,07
Cálcio total (mg/dL)	9,41 ± 0,49	9,49 ± 0,43	9,50 ± 0,51	0,26
Cálcio iônico (mg/dL)	5,1 (4,9 - 5,3)	5,1 (5,0 - 5,3)	5,2 (5,0 - 5,3)	0,22
Fosfatase alcalina (U/L)	76,3 ± 23,1	76,7 ± 23,7	78,4 ± 26,1	0,88
25(OH)vit D (ng/mL)	24,9 ± 8,3	23,8 ± 8,8	23,9 ± 8,4	0,18
PTH (pg/mL)	61,0 (44,0-87,0)	52,0 (38,0-72,0)	56,0 (41,0-78,0)	0,11
FGF-23 (pg/mL)	43,6 (27,6-60,9)	45,6 (28,5-71,9)	39,4 (25,3-71,3)	0,33
Apolipoproteína B (mg/dL)	85,4 ± 25,5	87,8 ± 25,8	85,4 ± 24,3	0,66
Triglicérides (mg/dL)	123,0 (93,0-190,0)	130,0 (97,0-189,0)	142,0 (99,0-192,0)	0,66
Colesterol total (mg/dL)	169,4 ± 41,4	176,9 ± 43,6	168 ± 40,7	0,25
HDL colesterol (mg/dL)	44,0 (35,0-55,0)	44,0 (37,0-52,0)	43,0 (36,0-49,0)	0,40
LDL colesterol (mg/dL)	96,4 ± 34,8	99,7 ± 35,0	95,3 ± 34,4	0,59
VLDL colesterol (mg/dL)	25,0 (19,0-37,0)	26,0 (19,0-38,0)	28,0 (20,0-38,0)	0,57
Glicemia (mg/dL)	105,0 (93,0-118,0)	105,0 (95,0-123,0)	105,0 (93,0-134,0)	0,95
Proteína C reativa (mg/L)	2,6 (1,3-5,8)	3,1 (1,3-5,7)	2,8 (1,2-4,9)	0,54
Peptídeo C (ng/mL)	2,7 (2,0-3,6)	2,3 (1,7-2,7)	2,8 (2,0-3,8)	0,30
Clearance de creatinina (ml/min/1,73m²)	95,4 ± 21,2	96,9 ± 26,4	98,4 ± 26,5	0,88
Escore de Framingham (risco em 10 anos)	7 (4-11)	8 (4-12)	7 (5-11)	0,57
Escore de Agatston (HU)	14 (0-188)	40 (0-257)	119 (3-449)	0,01
Escore de Friesinger (pontos)	4 (0-8)	4 (0-9)	6 (1-10)	0,21
Escore de Gensini (pontos)	52 (47-85)	51 (46-128)	62 (47-125)	0,35

Variáveis contínuas paramétricas apresentadas como média ± DP; variáveis contínuas não-paramétricas apresentadas como mediana (intervalo interquartil).

Figura 7 – Escore de Agatston de acordo com os tercís de fósforo

Representação em mediana do escore de Agatston. $p = 0,01$

Tabela 25 – Correlações entre o fósforo sérico e demais variáveis

	R	p
Idade (anos)	-0,038	0,52
Creatinina (mg/dL)	-0,111	0,06
logFGF-23	0,021	0,72
logPTH	-0,107	0,07
Cálcio iônico (mg/dL)	0,091	0,12
ClCr (ml/min/1,73m ²)	0,018	0,76
Escore de Agatston (HU)	0,149	0,01
Uréia (mg/dL)	0,150	0,01

Para a análise de regressão linear multivariada *stepwise* usando fósforo como variável dependente foram inseridas as variáveis idade, sexo, raça, tabagismo, HAS, DM, IMC, 25(OH)vitamina D, logPTH, logFGF-23,

uréia e clearance de creatinina. Permaneceram no modelo escolhido apenas as associações entre P sérico e as variáveis uréia, clearance de creatinina e sexo (tabela 26). O modelo 3, que incluiu todas as variáveis selecionadas, apresentou um R^2 de 0,06.

Tabela 26 – Análise de regressão linear multivariada *stepwise* sobre o fósforo sérico

Modelos	Variáveis	B	Desvio padrão	Beta	p
Modelo 1	Uréia (mg/dL)	0,008	0,003	0,147	0,01
Modelo 2	Uréia (mg/dL)	0,009	0,003	0,167	0,005
	Sexo (masculino)	-0,153	0,064	-0,140	0,02
Modelo 3	Uréia (mg/dL)	0,010	0,003	0,189	0,001
	Sexo (masculino)	-0,202	0,066	-0,185	0,003
	CICr (ml/min/1,73m ²)	0,003	0,001	0,149	0,01

4.4 Análise das variáveis determinantes do FGF-23 sérico

Os pacientes foram divididos de acordo com os tercís de FGF-23 (tabela 27). As variáveis clínicas e demográficas foram semelhantes entre os tercís. Dentre as variáveis laboratoriais, curiosamente nota-se que P e PTH não apresentaram diferenças significativas entre os grupos e tampouco qualquer correlação com o FGF-23 (tabela 28). O escore de Friesinger foi estatisticamente menor nos tercís mais elevados de FGF-23.

Tabela 27 – Características dos grupos divididos de acordo com o tercil de FGF-23 sérico

	Tercil 1	Tercil 2	Tercil 3	p
N	97	97	96	
Sexo (n, % masculino)	57 (58,7)	60 (61,8)	50 (52,1)	0,37
Idade (média±DP)	58,6 ± 8,5	56,9 ± 10,3	58,5 ± 9,0	0,43
Raça (Branços, n,%)	60 (61,8)	62 (63,9)	66 (68,75)	0,59
HAS (n,%)	80 (82,5)	76 (78,3)	79 (82,3)	0,71
DM (n, %)	33 (34,0)	38 (39,2)	32 (33,3)	0,65
Dislipidemias (n, %)	41 (42,3)	45 (46,4)	45 (46,9)	0,78
Tabagismo (n, %)	26 (26,8)	31 (31,9)	36 (37,5)	0,28
IMC (kg/m²)	27,7 ± 4,6	27,8 ± 5,2	28,6 ± 5,1	0,46
PAS (mmHg)	132,0 ± 20,2	130,4 ± 16,9	131,1 ± 19,4	0,91
PAD (mmHg)	82,3 ± 11,9	82,5 ± 12,2	82,1 ± 11,6	0,98
Creatinina (mg/dL)	0,86 ± 0,17	0,92 ± 0,17	0,89 ± 0,17	0,08
Uréia (mg/dL)	35,9 ± 9,2	36,8 ± 10,9	39,8 ± 9,7	0,02
Cálcio total (mg/dL)	9,3 ± 0,4	9,5 ± 0,5	9,5 ± 0,5	<0,001
Cálcio iônico (mg/dL)	5,1 (5,0 - 5,3)	5,1 (4,9-5,2)	5,2 (5,0 - 5,3)	0,07
Fosfatase alcalina (U/L)	77,6 ± 24,2	78,1 ± 23,1	75,4 ± 25,2	0,75
25(OH)vit D (ng/mL)	23,1 ± 9,2	24,5 ± 8,6	24,3 ± 7,8	0,23
PTH (pg/mL)	55,0 (40,0-76,0)	56,0 (40,0-74,0)	63,0 (42,0-87,0)	0,41
Fósforo (mg/dL)	3,61 ± 0,51	3,48 ± 0,53	3,64 ± 0,57	0,08
Glicemia (mg/dL)	101 (92-125)	107 (95-135)	104 (95-116)	0,24
Proteína C reativa (mg/L)	2,2 (1,3-4,1)	3,0 (1,3-5,8)	3,3 (1,3-6,4)	0,19
Peptídeo C (ng/mL)	2,5 (1,7-3,5)	2,8 (1,8-3,7)	2,8 (1,9-3,8)	0,32
Clearance de creatinina (ml/min/1,73m²)	96,6 ± 19,5	96,5 ± 25,2	97,2 ± 28,4	0,69
Escore de Framingham (risco em 10 anos)	10 (7-16)	10 (5-18)	10 (7-16)	0,79
Escore de Agatston (HU)	50 (1-290)	47 (0-282)	35 (0-333)	0,49
Escore de Friesinger (pontos)	6 (2-10)	4 (0-8)	2 (0-8)	0,016
Escore de Gensini (pontos)	56 (47-121)	52 (46-106)	48 (46-95)	0,11

Variáveis contínuas paramétricas apresentadas como média ± DP; variáveis contínuas não-paramétricas apresentadas como mediana (intervalo interquartil).

O cálcio total e a uréia sérica foram maiores nos tercís mais altos de FGF-23 e apresentaram correlações positivas com esta variável (tabela 28). Foi novamente utilizado o modelo de regressão linear *stepwise*, com a inclusão de todas as variáveis encontradas na tabela 27 e o melhor modelo preditor foi aquele que incluiu apenas o cálcio total ($B=0,123$; $DP=0,037$; $Beta=0,191$; $p<0,001$) e apresentou um $R^2=0,03$.

Tabela 28 – Correlações entre FGF-23 e demais variáveis

	R	p
Creatinina (mg/dL)	0,096	0,10
Cálcio iônico (mg/dL)	0,036	0,54
Cálcio total (mg/dL)	0,197	<0,001
ClCr (ml/min/1,73m²)	-0,009	0,89
Fósforo (mg/dL)	0,021	0,72
Uréia (mg/dL)	0,149	0,01

4.5 Análise das variáveis determinantes do PTH

A Tabela 29 mostra as características dos pacientes divididos de acordo com o PTH. Pode ser observado que quanto menor o tercil de PTH maior a proporção de homens e diabéticos. O cálcio sérico foi maior nos tercís mais baixos de PTH.

Nota-se uma correlação negativa entre PTH e cálcio total (tabela 30) que persiste após a análise multivariada (tabela 31). Há uma tendência a correlação positiva entre PTH e FGF-23 que se torna significativa após a análise de regressão linear *stepwise*. Para esta análise (tabela 31) foram

incluídas as variáveis idade, sexo, raça, tabagismo, HAS, DM, IMC, 25(OH)vit D, cálcio total, fósforo, logFGF-23, uréia e clearance de creatinina. O modelo mais ajustado incluiu as variáveis cálcio total, sexo, raça, DM e logFGF-23 e apresentou um $R^2=0,10$.

Tabela 29 – Características dos grupos de acordo com o tercil de PTH

	Tercil 1	Tercil 2	Tercil 3	<i>p</i>
N	97	99	94	
Sexo (n, % masculino)	64 (65,9)	58 (58,6)	45 (47,8)	0,04
Idade (média±DP)	57,3 ± 9,4	57,5 ± 9,6	59,4 ± 8,7	0,28
Raça (Branco, n,%)	68 (70,1)	63 (63,6)	57 (60,6)	0,37
HAS (n,%)	77 (79,4)	81 (81,8)	77 (81,9)	0,87
DM (n, %)	45 (46,4)	24 (24,2)	34 (36,2)	0,01
Dislipidemias (n, %)	49 (50,5)	43 (43,4)	39 (41,5)	0,42
Tabagismo (n, %)	34 (35,1)	29 (29,3)	30 (31,9)	0,68
IMC (kg/m²)	27,3 ± 3,8	27,8 ± 4,5	28,8 ± 6,2	0,66
PAS (mmHg)	128,1 ± 17,6	131,6 ± 16,2	133,9 ± 21,9	0,33
PAD (mmHg)	79,7 ± 11,5	82,9 ± 11,2	84,3 ± 12,6	0,03
Creatinina (mg/dL)	0,89 ± 0,17	0,89 ± 0,17	0,88 ± 0,17	0,82
Uréia (mg/dL)	38,4 ± 10,4	36,8 ± 10,1	37,2 ± 9,6	0,65
Cálcio total (mg/dL)	9,5 ± 0,5	9,5 ± 0,4	9,4 ± 0,5	0,02
Cálcio iônico (mg/dL)	5,1 (4,9 - 5,3)	5,1 (5,0 - 5,3)	5,1 (4,9 - 5,3)	0,25
Fosfatase alcalina (U/L)	72,7 ± 20,8	77,9 ± 24,6	80,6 ± 26,2	0,16
25(OH)vit D (ng/mL)	24,6 ± 8,3	24,9 ± 9,0	23,1 ± 8,1	0,11
Fósforo (mg/dL)	3,63 ± 0,51	3,54 ± 0,51	3,55 ± 0,60	0,22
FGF-23 (pg/mL)	40,8 (26,1-66,2)	44,7 (28,7-66,8)	50,5 (27,9-77,1)	0,37
Glicemia (mg/dL)	107 (97-137)	101 (91-116)	103 (93-119)	0,02
Proteína C reativa (mg/L)	2,6 (1,1-5,3)	2,6 (1,1-4,9)	3,3 (1,8-6,4)	0,18
Peptídeo C (ng/mL)	2,7 (1,7-3,7)	2,8 (1,8-3,7)	2,5 (2,0-3,6)	0,89
Clearance de creatinina (ml/min/1,73m²)	99,1 ± 24,2	95,5 ± 22,7	95,7 ± 26,7	0,26
Escore de Framingham (risco em 10 anos)	10 (5-20)	8 (5-16)	10 (7-20)	0,27
Escore de Agatston (HU)	89 (0-390)	30 (0-212)	44 (0-210)	0,23
Escore de Friesinger (pontos)	6 (0-10)	4 (0-8)	4 (0-9)	0,31
Escore de Gensini (pontos)	53 (47-128)	52 (47-92)	50 (46-107)	0,28

Variáveis contínuas paramétricas apresentadas como média ± DP; variáveis contínuas não-paramétricas apresentadas como mediana (intervalo interquartil).

Tabela 30 – Correlações entre o PTH e demais variáveis

	R	p
Glicose (mg/dL)	-0,105	0,07
FGF-23 (pg/mL)	0,091	0,12
Cálcio total (mg/dL)	-0,190	0,001

Tabela 31 – Análise de regressão linear multivariada *stepwise* sobre o
logPTH

Modelos	Variáveis	B	Desvio padrão	Beta	p
Modelo 1	Cálcio total (mg/dL)	-0,102	0,027	-0,218	<0,001
Modelo 2	Cálcio total (mg/dL)	-0,106	0,027	-0,227	<0,001
	Sexo (masculino)	-0,073	0,026	-0,163	0,005
Modelo 3	Cálcio total (mg/dL)	-0,110	0,026	-0,236	<0,001
	Sexo (mg/dL)	-0,080	0,026	-0,177	0,002
	Raça (brancos)	-0,063	0,026	-0,135	0,02
Modelo 4	Cálcio total (mg/dL)	-0,109	0,026	-0,235	<0,001
	Sexo (masculino)	-0,081	0,025	-0,181	0,002
	Raça (brancos)	-0,060	0,026	-0,129	0,02
	DM	-0,054	0,026	-0,117	0,04
Modelo 5	Cálcio total (mg/dL)	-0,120	0,027	-0,257	<0,001
	Sexo (masculino)	-0,081	0,025	-0,180	0,002
	Raça (brancos)	-0,062	0,026	-0,133	0,02
	DM	-0,055	0,026	-0,119	0,03
	logFGF-23	0,082	0,041	0,113	0,05

5 . Discussão

5. DISCUSSÃO

Nossos dados sugerem a presença de uma associação positiva entre fósforo sérico e doença arterial coronariana, aqui representada pela presença de calcificação coronariana e obstrução do lúmen vascular, em pacientes com função renal preservada. Além disso, encontramos uma associação negativa entre os níveis de FGF-23 sérico e o grau de obstrução coronariana.

A análise estatística da variável Escore de Agatston em grandes populações é um desafio. O excesso de pacientes com EA igual a zero é bastante freqüente nestas circunstâncias (169), o que torna a distribuição da variável muito assimétrica e impossível de ser corrigida apenas com a transformação logarítmica para análise como variável contínua. O uso de modelos com excesso de zeros é a melhor alternativa em casos como este, pois são compostos de duas partes: a predição de valores positivos (contagem) e a predição de zeros. Existem vários modelos com excesso de zeros e a escolha baseia-se no teste de Vuong, que é capaz de discriminar qual o melhor modelo para determinada situação. De acordo com este teste, a regressão binomial negativa foi o modelo indicado na nossa população.

Nas análises do modelo de regressão binomial negativa com excesso de zeros, o fósforo mostrou-se preditor negativo de EA iguais a zero após a análise multivariada. Dito em outras palavras, quanto maior o fósforo sérico, menor a chance de o paciente apresentar coronárias livres de calcificação. O

fósforo, no entanto, não apresentou associação com os valores positivos do EA na avaliação como variável contínua.

Quando a população foi dividida em duas de acordo com o EA levando-se em consideração um ponto de corte de 10HU, no entanto, a associação positiva entre fósforo sérico e calcificação coronariana foi consistente tanto na análise univariada quanto após ajustes para fatores de risco cardiovascular tradicionais, como sexo, idade, diabetes e hipertensão, e para os demais marcadores do metabolismo mineral. A opção por dividir a população estudada em dois grupos e analisar o Escore de Agatston como variável dicotômica teve duas motivações principais: a implicação prognóstica de valores de EA superiores a 10 HU e o excesso de valores iguais a zero em nossa amostra. Segundo Budoff et al (8), pacientes com EA superiores a 10 HU apresentam riscos relativos de morte progressivamente maiores quando comparados a pacientes com escores iguais a zero, o que não ocorre quando o EA é inferior a 10 HU.

O fósforo sérico é associado à calcificação vascular em pacientes com DRC em todos os estágios (171, 172). Em pacientes sem disfunção renal, esta é a primeira vez que esta associação é encontrada em um estudo transversal. Previamente, dois estudos de coorte demonstraram que o fósforo sérico mensurado no início do acompanhamento foi preditor de calcificação coronariana após um período de seguimento, mas os perfis populacionais de ambos eram distintos do nosso (111, 112). O primeiro incluiu adultos jovens e não acessou a calcificação coronariana na avaliação basal (111); já o segundo incluiu indivíduos da comunidade sem suspeita de

DAC (112). Nenhum deles avaliou outros marcadores do metabolismo mineral, como PTH ou FGF-23.

Avaliamos a obstrução coronariana de três formas: através dos escores de Gensini e Friesinger e pela divisão da população de acordo com a presença ou ausência de obstrução significativa. Os escores de Gensini e Friesinger permitem uma avaliação quantitativa da obstrução coronariana, o que não seria possível se analisássemos apenas o número de artérias acometidas. Os dois escores diferem nos pesos que atribuem às artérias coronarianas, pois o escore de Gensini pondera a importância da artéria coronária quanto a seu tamanho e importância enquanto o de Friesinger considera todos os ramos coronários iguais para efeitos de cálculo. Assim, do ponto de vista fisiopatológico, o escore de Friesinger nos parece mais interessante, posto que os efeitos de moduladores sistêmicos da aterosclerose são semelhantes em todos os vasos independentemente da relevância fisiológica de cada uma. Os dois escores são expressos em pontos e apresentaram distribuição assimétrica que foi corrigida com a logaritmização apenas no caso do escore de Gensini. Por apresentar ampla variabilidade, optamos por estudar o escore de Gensini através da divisão em tercís.

A associação entre fósforo e obstrução coronariana aparece claramente já na análise dos grupos divididos de acordo com o escore de Friesinger e permanece significativa após o ajuste multivariado. Já na análise sobre o escore de Gensini, o fósforo se torna variável significativamente preditora apenas na análise multivariada. O ajuste para

sexo altera de forma importante a relação entre fósforo e o escore de Gensini, como demonstram os modelos de regressão logística multivariada com ajuste para esta variável. Há relatos de diferenças entre os sexos quanto à associação entre fósforo e mortalidade (172) e entre fósforo e hipertrofia ventricular esquerda (173), pois estas associações foram encontradas no sexo masculino, mas não no feminino em alguns estudos (172, 173). Entretanto, não está claro qual seria o mecanismo responsável por esta divergência.

Outros autores já haviam demonstrado a associação entre o fósforo sérico e a presença de obstrução coronariana em indivíduos com função renal preservada (109, 110), mas nenhum avaliou a obstrução de forma quantitativa. É interessante observar que o fósforo também foi preditor de aterosclerose em outros sítios como as artérias carótidas (174, 175) e ainda de hipertrofia ventricular esquerda (173) na população geral. Estes resultados sugerem o envolvimento do fósforo na fisiopatologia da aterosclerose e de alterações do sistema cardiovascular por mecanismos adicionais a seus efeitos já conhecidos sobre as células musculares lisas dos vasos.

O nível sérico de fósforo é regulado por diversos hormônios como PTH, 1,25-vitamina D e FGF-23 e é possível que um ou mais destes reguladores apresentem efeitos diretos sobre o sistema cardiovascular. Níveis elevados de PTH já foram implicados na patogênese da calcificação (150) e remodelação vascular (151,152) em portadores de DRC e hiperparatireoidismo secundário. Por outro lado, dois estudos recentes

demonstraram associação positiva entre PTH e mortalidade em coortes populacionais que incluíram pacientes com disfunção renal (147, 148) e este excesso de mortalidade foi atribuído principalmente a eventos cardiovasculares (147,149). Na nossa população, por outro lado, o PTH apresentou relação inversa com o Escore de Agatston, ainda que com significância estatística limítrofe ($p=0,05$) e não houve qualquer associação entre PTH e obstrução coronariana.

A ausência de associação entre FGF-23 e Escore de Agatston confirma o resultado encontrado pelo único estudo disponível a este respeito que incluiu apenas 64 pacientes com função renal preservada (164). Porém, ao avaliarmos os escores referentes à doença obstrutiva, verificamos uma forte associação negativa entre os níveis séricos de FGF-23 e a gravidade do acometimento coronariano. Assim, encontramos níveis mais baixos de FGF-23 nos grupos com maiores escores de Gensini e Friesinger e estas relações inversas foram robustas, pois não se alteraram após o ajuste para inúmeras variáveis. Este resultado diverge do que ocorre, por exemplo, na população com disfunção renal (159) e não há estudos prévios que tenham avaliado a possível relação entre FGF-23 e aterosclerose obstrutiva em pacientes com função renal preservada.

Este estudo não permite inferências de causalidade por seu desenho transversal, mas as associações entre fósforo, FGF-23 e doença coronariana levantam alguns questionamentos sobre o papel de cada fator estudado na patogênese de lesões vasculares. Os mecanismos fisiopatológicos pelos quais o fósforo participa no processo de calcificação

vascular são bastante claros na DRC, situação em há hiperfosfatemia e queda de inibidores da calcificação, como a fetuína. Em concentrações elevadas, o fósforo induz a transformação fenotípica das células musculares lisas da parede do vaso em células semelhantes a osteoblastos, capazes de calcificar o meio extracelular (5). Na ausência de disfunção renal, no entanto, não ocorre hiperfosfatemia e o fato de níveis séricos de fósforo considerados normais estarem associados à presença de calcificação vascular sugere que outras alterações concomitantes como diabetes e fatores possivelmente ainda desconhecidos possam atuar de forma sinérgica e exacerbar seus efeitos conhecidos sobre as células vasculares. Na nossa população, no entanto, a presença de HAS e DM, fatores que sabidamente favorecem a ocorrência de calcificação vascular, não alterou a associação entre o fósforo sérico e o Escore de Agatston.

Aterosclerose e calcificação vasculares são processos intimamente relacionados (11) e placas calcificadas apresentam maior risco de ruptura (12) e consequentemente, de ocasionar eventos clínicos. O endotélio participa diretamente do processo aterosclerótico e evidências recentes sugerem que o fósforo também altera a fisiologia endotelial (176). Células endoteliais bovinas produzem mais espécies reativas de oxigênio e menos óxido nítrico quando há excesso de fósforo no meio extracelular (176) e, em homens jovens, uma sobrecarga dietética de fósforo é capaz de causar disfunção endotelial (176). Estes resultados iniciais necessitam de confirmação, mas sugerem possíveis mecanismos que explicam parcialmente as associações encontradas neste estudo.

Em portadores de DRC, o FGF-23 sérico acumula-se precoce e progressivamente até atingir níveis muito elevados e comporta-se como marcador de gravidade da disfunção renal (76, 77). Nestes pacientes, seus níveis séricos foram associados à mortalidade (155). Este resultado foi confirmado posteriormente apenas no subgrupo de pacientes que incluiu homens com doenças cardiovasculares, mas não nos demais subgrupos (156). Aparentemente, o FGF-23 também está associado à presença de hipertrofia ventricular esquerda (157) e doença arterial coronariana (158) na vigência de doença renal crônica.

Há alguns estudos que relacionaram o FGF-23 sérico à hipertrofia ventricular esquerda (160), disfunção endotelial (161) e aterosclerose corporal total avaliada através de ressonância magnética (162) na comunidade. Recentemente, uma análise *post hoc* do estudo Heart and Soul identificou o FGF-23 como preditor de mortalidade nesta coorte (164) mesmo após a exclusão dos pacientes com clearance de creatinina reduzido. Estas evidências, no entanto, são derivadas de duas coortes (PIVUS e Heart and Soul) que incluíram também pacientes com disfunção renal, com média de idade elevada, e não excluíram pacientes em uso de suplementos que continham cálcio e vitamina D. Considerando-se estas limitações, a extrapolação de dados para a população geral se torna inviável.

Animais que não expressam *klotho* ou FGF-23 apresentam fenótipos semelhantes que incluem envelhecimento precoce e redução de sobrevida além de calcificação vascular disseminada (87 e 73) e hiperfosfatemia, que é

uma característica marcante destes modelos. Os fenótipos decorrentes destas deleções são revertidos por intervenções que normalizam os níveis séricos de fósforo, como a deleção concomitante de genes responsáveis pela expressão do cotransportador Na/PI 2a (92), do receptor de vitamina D (74) ou da 1 α -hidroxilase (93) ou ainda através da restrição de fósforo na dieta (177, 178). Em outras palavras, é provável que o excesso de fósforo seja um mediador tanto do processo de calcificação vascular disseminada quanto do processo de envelhecimento precoce nestes animais.

Em humanos, a deficiência de FGF-23 é caracterizada por hiperfosfatemia e calcinose tumoral (75). Os excessos de produção ou atividade do FGF-23, por outro lado, resultam em hipofosfatemia, osteomalácia (52) e raquitismo (53), e não há registros de aterosclerose acelerada ou aumento de eventos cardiovasculares nestes pacientes. Até o momento, não foi demonstrada a expressão da proteína klotho no tecido cardiovascular. Visto que a presença de klotho é essencial à ação tecidual do FGF-23, as evidências que associam o FGF-23 a eventos cardiovasculares na população com disfunção renal levantam algumas possibilidades. A primeira é que este, quando em níveis muito elevados como ocorre nestes pacientes seja capaz de ativar de maneira não seletiva os receptores de FGF, ainda que na ausência da expressão de klotho, e causar efeitos sobre as células vasculares ainda desconhecidos. A segunda possibilidade é que o FGF-23 seja meramente um marcador da sobrecarga dietética de fósforo, que nas fases precoces da DRC é muitas vezes subestimada e incapaz de alterar a fosforemia. Outra hipótese é que a ação

supressora de níveis elevados de FGF-23 sobre a produção de calcitriol (69) possa contribuir para o aumento da mortalidade. Nenhuma destas possibilidades foi confirmada até o momento.

Se há função renal preservada, por outro lado, os níveis de FGF-23 encontram-se dentro da faixa de referência e seriam insuficientes para ativar de forma não seletiva os receptores para FGF. Além disso, se os néfrons estão preservados, o efeito fosfatúrico do FGF-23 contribuiria para o controle dos níveis de fósforo. Considerando-se que o fósforo apresenta efeitos deletérios sobre a parede vascular, ao menos em teoria elevações do FGF-23 minimizariam a sobrecarga dietética através do aumento de sua excreção. Por todo o exposto, parece mais provável que o fósforo, e não o FGF-23, seja o efector direto das lesões vasculares e, consequentemente, mediador das associações entre alterações do metabolismo mineral e aterosclerose / calcificação coronariana na ausência de disfunção renal.

Os determinantes do fósforo sérico ainda são pouco compreendidos. O conteúdo de fósforo na dieta, por exemplo, não explica as variações dos níveis de fósforo como demonstrado por estudos populacionais (179), e na nossa análise apenas 6% de sua variabilidade pode ser explicada pelas variáveis selecionadas. Alguns polimorfismos genéticos que alteram a expressão de FGF-23 e de cotransportadores foram associados aos níveis de fósforo (180) e é provável que a capacidade individual de excreção de fósforo seja importante na regulação do balanço de fósforo. FGF-23 e Klotho são reguladores-chave da nossa habilidade de excretar fósforo, que possivelmente depende tanto da capacidade de produzir FGF-23 em

resposta a uma sobrecarga de fósforo quanto da expressão de klotho. Assim sendo, indivíduos que produzissem maior quantidade de FGF-23 em resposta ao fósforo dietético excretariam mais fósforo. A quantidade de klotho presente nos túbulos renais também parece importante por influenciar o grau de ligação do FGF-23 aos receptores locais e, conseqüentemente, a excreção de fósforo. Existe a hipótese de que o FGF-23 se ligue aos receptores do túbulo distal e promova a secreção de klotho, que agiria de forma parácrina no túbulo proximal e seria o verdadeiro efetor da ação fosfatúrica neste segmento (181, 182). O FGF-23 seria, então, um hormônio liberador de klotho (*klotho-releasing hormone*), caso esta hipótese seja confirmada. Tanto o desenvolvimento de doença arterial coronariana (96, 97, 98) quanto a longevidade (99) são afetados por polimorfismos do gene klotho e estas associações podem estar relacionadas ao envolvimento do klotho na homeostase do fósforo (181).

Encontramos uma média de fósforo sérico superior em mulheres quando comparadas aos homens. Este resultado confirma o de outros autores (172, 173, 179) e as causas desta diferença entre os sexos ainda não foram claramente estabelecidas. Em animais, o estradiol aumenta a produção de FGF-23 (183), enquanto a administração deste hormônio aumenta a excreção de fósforo em mulheres menopausadas (184). A população avaliada neste estudo é composta de mulheres cuja idade é compatível com o período da menopausa, embora este dado não tenha sido coletado de forma direta. Excluímos aquelas em terapia de reposição hormonal, e, apesar de a dosagem de estradiol sérico não ter sido realizada,

é provável que elas apresentassem níveis reduzidos deste hormônio, o que em tese poderia diminuir sua capacidade fosfatúrica.

A maioria dos pacientes incluídos neste estudo apresentou deficiência de vitamina D, achado semelhante ao encontrado por Unger e cols na população paulistana (44). Apesar de resultados anteriores demonstrarem que o status de vitamina D apresenta impacto sobre a mortalidade (116, 117) e morbidade cardiovascular (118, 119), não encontramos qualquer associação entre os níveis de 25(OH)vitamina D e doença arterial coronarínica. A população comparativamente pequena em relação aos estudos populacionais citados e o fato da quase totalidade dos pacientes apresentar insuficiência desta vitamina podem ter contribuído para este resultado e impossibilitado a detecção de possíveis diferenças significativas.

É interessante notar que o cálcio total foi a única variável preditora dos níveis de FGF-23 selecionada a partir do modelo de regressão linear stepwise. Esta análise excluiu até mesmo outras variáveis que, a princípio, pareceriam mais relacionadas ao FGF-23, como PTH e P. Demonstramos em estudos anteriores que o tratamento com quelantes à base de cálcio eleva os níveis de FGF-23 quando comparado ao uso de quelantes que não contêm cálcio tanto em estágios precoces (85) quanto em fases tardias da DRC (60). A associação entre cálcio sérico e FGF-23 também já foi encontrada em pacientes com hiperparatireoidismo primário (185), embora nestes pacientes as altas concentrações de PTH possaam ser um fator confundidor. Até o momento permanece indefinido se o cálcio sérico é capaz de estimular a produção de FGF-23 ou se este atua sobre a homeostase do

cálcio. Caso a supressão do PTH causada pelo FGF-23 fosse suficiente para alterar o nível sérico de cálcio, a associação entre cálcio e FGF-23 seria inversa. Por outro lado, se o cálcio sérico aumentado suprime o PTH e este estimula a produção de FGF-23 (70, 71), a tendência também seria encontrarmos uma associação inversa entre FGF-23 e cálcio, o que não explica os resultados encontrados. No entanto, estudos recentes demonstram que o klotho aumenta a quantidade de canais TPRV5 nos túbulos distais e sua ausência provoca um defeito na reabsorção tubular de cálcio (91). Caso seja confirmado que o FGF-23 libera klotho no túbulo proximal, este seria o mecanismo pelo qual o FGF-23 influencia a homeostase do cálcio (181), mas não explica o aumento do FGF-23 causado pela administração de cálcio.

Como esperado, fatores de risco tradicionais como hipertensão, diabetes, idade, sexo masculino e história de dislipidemia apresentaram associações consistentes tanto com a calcificação quanto com a obstrução coronariana. Os achados com relação ao uso de estatinas e perfil lipídico merecem algumas considerações. O uso de estatinas foi mais freqüente nos grupos que apresentavam doença coronariana mais avançada, provavelmente em decorrência tanto do histórico de dislipidemia quanto da prevalência maior de comorbidades. Curiosamente, o perfil lipídico foi mais favorável, ou seja, tanto o colesterol total como o LDL e a apolipoproteína A se mostraram reduzidas, nos grupos mais doentes. Este resultado se deve ao uso mais intensivo de estatinas nestes pacientes, pois estas diferenças não foram significativas após o ajuste para esta variável.

O risco de eventos cardiovasculares estimado pelo escore de Framingham é calculado a partir dos fatores de risco tradicionais e do perfil lipídico. Como esperado, houve uma associação positiva entre o risco cardiovascular e a extensão de doença coronariana apesar da influência do uso de estatinas sobre os níveis de colesterol.

A despeito de estudos prévios demonstrarem o valor preditivo da proteína C reativa quanto à mortalidade e eventos cardiovasculares (186, 187, 188), há resultados conflitantes sobre a associação entre PCR e calcificação coronariana (189, 190). Não encontramos nenhuma associação entre os níveis séricos de PCR e calcificação ou obstrução coronariana, achado semelhante ao do estudo MESA, que avaliou as relações entre marcadores inflamatórios e o Escore de Agatston em mais de 6000 pacientes (190).

Este estudo possui alguns pontos fortes. A população é relativamente grande e muito homogênea em decorrência dos critérios de inclusão rígidos. Não foram incluídos pacientes com disfunção renal, o que poderia contaminar os resultados, e tampouco pacientes em uso de medicações ou suplementos que interagem com o metabolismo mineral e ósseo. É o primeiro estudo transversal a avaliar a doença arterial coronariana de forma mais completa ao quantificar tanto a calcificação quanto a obstrução luminal e também o primeiro a realizar dosagens de vários marcadores do metabolismo mineral e ósseo ao mesmo tempo. Além disso, demonstramos associações previamente desconhecidas na população com função renal

preservada. Finalmente, a análise estatística avaliou as variáveis de diversas formas, confirmando as associações de forma robusta.

Este trabalho também apresenta algumas limitações. Em primeiro lugar, o desenho transversal não permite, por sua natureza, inferências de causalidade ou temporalidade entre as variáveis estudadas. Calcificação e obstrução coronarianas são desfechos intermediários e, apesar de bons preditores de eventos cardiovasculares e mortalidade, as associações encontradas não podem ser extrapoladas para estes desfechos clínicos maiores. Em terceiro lugar, os níveis séricos de calcitriol, a excreção e ingestão de fósforo não foram quantificados. Estas variáveis poderiam auxiliar na compreensão dos mecanismos responsáveis pela homeostase do fósforo e pelas associações encontradas.

Em conclusão, o fósforo sérico é considerado um fator de risco não tradicional na população portadora de DRC e parece cada vez mais claro que isto também ocorre em indivíduos com função renal preservada. É de conhecimento geral que os hábitos alimentares contemporâneos, principalmente nos países ocidentais, incluem cada vez menos alimentos *in natura* e privilegiam o uso de alimentos processados. A adição de conservantes que contêm em sua maioria grandes quantidades de fósforo é uma das grandes causas do aumento progressivo do conteúdo deste elemento na dieta que hoje encontra-se acima do preconizado (6). Os efeitos deletérios da dieta rica em fósforo à qual nos habituamos progressivamente ainda não são totalmente conhecidos. Um estudo recente demonstrou que a ingestão de refrigerantes à base de cola em grandes quantidades reduziu a

massa óssea (191). A considerar as evidências animais, parece bastante provável que estejamos acelerando nosso processo de envelhecimento através de modificações em nosso estilo de vida.

6 . Conclusão

6. CONCLUSÃO

Este estudo avaliou 290 pacientes clinicamente estáveis com suspeita de doença arterial coronariana e clearance de creatinina superior a 60 ml/min/1,73m². Encontramos nesta população associações positivas entre o fósforo sérico e a presença de doença coronariana demonstrada tanto através da presença de calcificação mensurada através do Escore de Agatston quanto pela presença de lesões obstrutivas à cineangiocoronariografia. Também observamos uma associação negativa entre o FGF-23 sérico e a presença de doença coronariana obstrutiva. Este é o primeiro estudo a avaliar simultaneamente as relações entre marcadores bioquímicos do metabolismo mineral e as diversas formas de doença aterosclerótica. No entanto, os mecanismos fisiopatológicos que possam explicar estas associações devem ser elucidados em estudos futuros, provavelmente através da utilização de modelos experimentais.

7 . Referências Bibliográficas

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. National Center for Health Statistics/Center of Disease Control/USA - <http://www.cdc.gov/nchs/fastats/deaths.htm>.
2. DATASUS - <http://www.datasus.gov.br>.
3. Block G A, Hulbert-Shearon TE, Levin NW, Port FK. Association of serum phosphorus and calcium x phosphorus product with mortality risk in chronic hemodialysis patients: A national study. *Am J Kidney Dis*. 1998;31:607-17.
4. Dhingra R, Sullivan LM, Fox CS, Wang TJ, D'Agostino RB, Gaziano M, Vasan RS. Relations of serum phosphorus and calcium levels to the incidence of cardiovascular disease in the community. *Arch Inter Med*. 2007;167:879-85.
5. Jono S, McKee M, Shioi A, Nishizawa Y, Mori K, Morii H. Phosphate regulation of vascular smooth muscle cell calcification. *Circ Res*. 2000;87:e10-7.
6. Calvo MS, Yoangmeek PJ. Changing phosphorus content of the U.S. Diet: Potential for adverse effects on bone. *J Nutr*. 1996;126: 1168S-0S.
7. Rennenberg RJMW, Kessels AGH, Schurgers J, Engelshoven JMA, Leeuw PW, Kroon AA. Vascular calcifications as a marker of increased cardiovascular risk: A meta-analysis. *Vasc Health Risk Manag*. 2009;5:185-97.
8. Budoff MG, Shaw LJ, Liu ST, Weinstein SR, Mosler TP, Tseng PH, Flores FR, Callister TQ, Raggi P, Berman DS. Long-term prognosis associated with coronary calcification observations from a registry of 25.253 patients. *J Am Coll Cardiol*. 2007;49:1860-70.
9. Detrano R, Guerci AD, Carr JJ, Bild DE, Burke G, Folsom AR, Liu K, Shea S, Szklo M, Bluemke DA, O'Leary DH, Tracy R, Watson K, Wong ND, Kronmal RA. Coronary calcium as a predictor of coronary events in four racial or ethnic groups. *N Engl J Med*. 2008;358:1336-45.
10. Greenland P, Bonow RO, Brundage BH, Budoff MJ, Eisenberg MJ, Grundy SM, Lauer MS, Post WS, Raggi P, Redberg RF, Rodgers GP, Shaw LJ, Taylor AJ, Weintraub WS. ACCF/AHA 2007 clinical expert consensus document on coronary artery calcium scoring by computed tomography in global cardiovascular risk assessment and in evaluation of patients with chest pain: a report of the American College of Cardiology Foundation Clinical Expert Consensus Task Force (ACCF/AHA Writing Committee to Update the 2000 Expert Consensus Document on Electron-Beam Computed Tomography). *J Am Coll Cardiol*. 2007;115(3):402-26.
11. Sangiorgi G, Rumberger JA, Severson A, Edwards WD, Gregoire J, Fitzpatrick LA, Schwartz RS. Arterial calcification and not lumen stenosis is highly correlates with atherosclerotic plaque burden in humans: a histologic study of 723 coronary artery segments using nondecalcifying methodology. *J Am Coll Cardiol*. 1998;31:126-33.
12. Fitzgerald PJ, Ports TA, Yock PG. Contribution of localized calcium deposits to dissection after angioplasty. An observational study using intravascular ultrasound *Circulation*. 1992;86:64-70.
13. Agatston AS, Janowitz WR, Hildner FJ, Zusmer NR, Viamonte M Jr, Detrano R. Quantification of coronary artery calcium using ultrafast computed tomography. *J Am Coll Cardiol*. 1990;15(4):827-32.
14. Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis and coronary artery disease. *N Engl J Med* 2005;352:1685-95.

15. Shao JS, Cheng SL, Sadhu J, Towler DA. Inflammation and the osteogenic regulation of vascular calcification: a review and perspective. *Hypertension* 2010;55:579-92.
16. Levin A, Li YC. Vitamin D and its analogues: do they protect against cardiovascular disease in patients with kidney disease? *Kidney Int.* 2005;68:1973-81.
17. Abedin M, Tintut Y, Demer LL. Vascular calcification mechanisms and clinical ramifications. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004;24:1161-70.
18. Sage AP, Tintut Y, Demer KK. Regulatory mechanisms in vascular calcification. *Nat. Rev. Cardiol.* 2010;7:528-36.
19. El-Abbadi M, Giachelli CM. Mechanisms of vascular calcification. *Adv Chron Kidney Dis.* 2007;14(1):54-66.
20. Vattikuti R, Towler DA. Osteogenic regulation of vascular calcification: an early perspective. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2004;286:E686-E696.
21. Giachelli CM, Speer MY, Li X, Rajachar RM, Yang H. Regulation of vascular calcifications. Roles of phosphate and osteopontin. *Circ Res.* 2005;96:717-22.
22. Collin-Osdoby P. Regulation of vascular calcification by osteoclast regulatory factors RANKL and osteoprotegerin. *Circ Res.* 2004;95:1046-57.
23. Bucay N, Sarosi I, Dunstan CR, Morony S, Tarpley J, Capparelli C, Scully S, Tan HL, Xu W, Lacey DL, Boyle WJ, Simonet WS. Osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. *Genes Dev.* 1998;12(9):1260-8.
24. Rhee EJ, Lee WH, Kim SY, Kim BJ, Sung JC, Kim BS, Kang JH, Oh KW, Oh ES, Baek KH, Kang MI, Woo HY, Park HS, Kim SW, Lee MH, Park JR: Relationship of serum osteoprotegerin levels with coronary artery disease severity, left ventricular hypertrophy and C-reactive protein *Clinical Science* 2005;108:237-243.
25. Guldiken B, Guldiken S, Turgut B, Turgut N, Demirc M, Celik Y, Arianb E, Tugrul A. Serum osteoprotegerin levels in patients with acute atherothrombotic stroke and lacunar infarct. *Thromb Res.* 2007;120(4):511-6.
26. Nitta K, Akiba T, Uchida K, Kawashima A, Yumura W, Kabaya T, Nihei H. The progression of vascular calcification and serum osteoprotegerin levels in patients on long-term hemodialysis. *Am J Kidney Dis.* 2003;42:303-9.
27. Higgins CL, Marvel SA, Morrisett JD. Quantification of Calcification in Atherosclerotic Lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25:1567-76.
28. Johnson RC, Leopold JA, Loscalzo J. Vascular calcification: pathobiological mechanisms and clinical implications. *Circ Res.* 2006;99(10):1044-59.
29. Rumberger JA, Simons DB, Fitzpatrick LA, Sheedy PF, Schwartz RS. Coronary artery calcium area by Electron-Beam Computed Tomography and coronary atherosclerotic plaque area: a histopathologic correlative study. *Circulation.* 1995;92:2157-62.
30. He ZX, Hedrick TD, Pratt CM, Verani MS, Aquino V, Roberts R, Mahmarian JJ. Severity of coronary artery calcification by Electron Beam Computed Tomography predicts silent myocardial ischemia. *Circulation.* 2000;101:244-51.
31. Budoff MJ, Georgiou D, Brody A. Ultrafast computed tomography as a diagnostic modality in the detection of coronary artery disease: A multicenter study. *Circulation.* 1996;93:898-9.
32. Rosário MA, Lima JJ, Parga JR, Avila LF, Gowdak LH, Lemos PA, Rochitte CE. Coronary calcium score as predictor of stenosis and events in pretransplant renal chronic failure. *Arq Bras Cardiol.* 2010;94(2):236-43.

33. Ho JS, Fitzgerald SJ, Stolfus LL, Wade WA, Reinhardt DB, Barlow CE, Cannaday JJ. Relation of a coronary artery calcium score higher than 400 to coronary stenoses detected using multidetector computed tomography and to traditional cardiovascular risk factors. *Am J Cardiol*. 2008;101(10):1444-7.
34. Zatz R. *Fisiopatologia renal*. 2a ed. São Paulo: Atheneu; 2002.
35. American Society for Bone and Mineral Research. *Primer on metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism*. 6th ed. Washington (DC): ASBMR; 2006.
36. D'Amour P. Circulating PTH molecular forms: What we know and what we don't. *Kidney Int*. 2006;70:S29-33.
37. Krajinski T, Bjorklund P, Marsell R, Ljunggren O, Akerstrom G, Jonsson KB, Westin G, Larsson TE. Fibroblast growth factor-23 regulates parathyroid hormone and 1 α -hydroxylase expression in cultures bovine parathyroid cells. *J Endocrinol*. 2007;195:125-31.
38. Bem-Dov IZ, Galitzer H, Lavi-Moshayoff V, Goet R, Kuro-o M, Mohamadi M, Sirkis R, Naveh-Many T, Silver J. The parathyroid is a target organ for FGF-23 in rats. *J Clin Invest*. 2007;117:4003-8.
39. Komaba H, Fukagawa M. FGF-23 parathyroid interaction: implications in chronic kidney disease. *Kidney Int*. 2010;77:292-8.
40. Holick MF. Vitamin D deficiency. *N Engl J Med*. 2007;357:266-81.
41. Dusso AS, Brown AJ, Slatopolsky E. Vitamin D. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2005;289:8-28.
42. Saito H, Maeda A, Ohtomo S, Hirata M, Kusano K, Kato S, Ogata E, Segawa H, Miyamoto K, Fukushima. Circulating FGF-23 is regulated by 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ and phosphorus *in Vivo*. *J Biol Chem*. 2005;280(4):2543-9.
43. Yetley EA. Assessing the vitamin D status of the US population. *Am J Clin Nutr*. 2008;88:558S-64S.
44. Unger MD, Cuppari L, Titan SM, Magalhães MC, Sasaki AL, Dos Reis LM, Jorgetti V, Moysés RM. Vitamin D status in a sunny country: Where has the sun gone? *Clin Nutr*. 2010; Dec;29(6):784-8.
45. Verstuyf A, Carmeliet G, Bouillon R, Mathieu C. Vitamin D: a pleiotropic hormone. *Kidney Int*. 2010;78(2):140-5.
46. Yin L, Grandi N, Raum E, Haug U, Arndt V, Brenner H. Meta-analysis: longitudinal studies of serum vitamin D and colorectal cancer risk. *Aliment Pharmacol Ther*. 2009;30(2):113-25.
47. Bertone-Johnson ER, Chen WY, Holick MF, Hollis BW, Colditz GA, Willett WC, Hankinson SE. Plasma 25-hydroxyvitamin D and 1,25-dihydroxyvitamin D and risk of breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2005;14(8):1991-7.
48. Travis RC, Crowe FL, Allen NE, Appleby PN, Roddam AW, Tjønneland A, Olsen A, Linseisen J, Kaaks R, Boeing H, Kröger J, Trichopoulou A, Dilis V, Trichopoulos D, Vineis P, Palli D, Tumino R, Sieri S, Bueno-de-Mesquita HB, van Duynhoven FJ, Chirlaque MD, Barricarte A, Larrañaga N, González CA, Argüelles MV, Sánchez MJ, Stattin P, Hallmans G, Khaw KT, Bingham S, Rinaldi S, Slimani N, Jenab M, Riboli E, Key TJ. Serum vitamin D and risk of prostate cancer in a case-control analysis nested within the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC). *Am J Epidemiol*. 2009;169(10):1223-32.
49. Takiishi T, Gysemans C, Bouillon R, Mathieu C. Vitamin D and diabetes. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2010;39(2):419-46.

50. Ascherio A, Munger KL, Simon KC. Vitamin D and multiple sclerosis. *Lancet Neurol.* 2010;9(6):599-612.
51. Nagpal S, Na S, Rathnachalam R. Noncalcemic actions of vitamin D receptor ligands. *Endocr Rev.* 2005;26(5):662-87.
52. Shimada T, Mizutani S, Muto T, Yoneya T, Hino R, Takeda S, Takeuchi Y, Fujita T, Fukumoto S, Yamashita T. Cloning and characterization of FGF-23 as a causative factor of tumor-induced osteomalacia. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001;98: 6500-5.
53. ADHR Consortium. Autosomal dominant hypophosphataemic rickets is associated with mutations in FGF-23. The ADHR Consortium. *Nat Genet.* 2000;26: 345-8.
54. Sommer S, Berndt T, Craig T, Kumar R. The phosphatonins and the regulation of phosphate transport and vitamin D metabolism. *J. Steroid Biochem Mol Biol.* 2007; 103(3-5):497-503.
55. Berndt TJ, Schiavi S, Kumar R. "Phosphatonins" and the regulation of phosphorus homeostasis. *Am J Physiol Renal Physiol* 2005;289: F1170-F1182.
56. Mirams M, Robinson BG, Mason RS, Nelson AE. Bone as a source of FGF-23: regulation by phosphate? *Bone.* 2004;35:1192-9.
57. Saito H, Maeda A, Ohtomo S, Hirata M, Kusano K, Kato S, Ogata E, Segawa H, Miyamoto K, Fukushima N. Circulating FGF-23 is regulated by 1,25-dihydroxyvitamin D3 and phosphorus *in vivo*. *J Biol Chem.* 2005;280(4):2543-9.
58. Kolek OI, Hines ER, Jones MD, LeSueur LK, Lipko MA, Kiela PR, Collins JF, Haussler MR, Ghishan FK. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 upregulates FGF-23 gene expression in bone: the final link in a renal-gastrointestinal-skeletal axis that controls phosphate transport. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2005;289:G1036-42.
59. Nishi H, Nii-Kono T, Nakanishi S, Yamazaki Y, Yamashita T, Fukumoto S, Ikeda K, Fujimori A, Fukagawa M. Intravenous calcitriol therapy increases serum concentrations of fibroblast growth factor-23 in dialysis patients with secondary hyperparathyroidism. *Nephron Clin Pract.* 2005;101:c94-9.
60. Cancela AL, Oliveira RB, Gracioli FG, Dos Reis LM, Barreto F, Barreto DV, Cuppari L, Jorgetti V, Carvalho AB, Canziani ME, Moysés RM. Fibroblast Growth Factor 23 in Hemodialysis Patients: Effects of Phosphate Binder, Calcitriol and Calcium Concentration in the Dialysate. *Nephron Clin Pract.* 2010;117(1):74-82.
61. Saito H, Maeda A, Ohtomo S, Hirata M, Kusano K, Kato S, Ogata E, Segawa H, Miyamoto K, Fukushima N. Circulating FGF-23 is regulated by 1,25-dihydroxyvitamin D3 and phosphorus *in vivo*. *J Biol Chem.* 2005;280(4):2543-9.
62. Perwad F, Azam N, Zhang MYH, Yamashita T, Tenenhouse HS, Portale AA. Dietary and serum phosphorus regulate fibroblast growth factor 23 expression and 1,25-Dihydroxyvitamin D metabolism in mice. *Endocrinology.* 2005;146(12):5358-64.
63. Nagano N, Miyata S, Abe M, Kobayashi N, Wakita S, Yamashita T, Wada M. Effect of manipulating serum phosphorus with phosphate binder on circulating PTH and FGF-23 in renal failure rats. *Kidney Int.* 2006;69:531-7.
64. Nishida Y, Taketani Y, Yamanaka-Okumura H, Imamura F, Taniguchi A, Sato T, Shuto E, Nashiki K, Arai H, Yamamoto H, Takeda E. Acute effect of oral phosphate loading on serum fibroblast growth factor 23 levels in healthy men. *Kidney Int.* 2006;70:2141-7.
65. Burnett SAM, Gunawardene SC, Bringham FR, Jüppner H, Lee H, Finkelstein JS. Regulation of C-terminal and intact FGF-23 by dietary phosphate in men and women. *J Bone Miner Res.* 2006;21(8):1187-96.

66. Urakawa I, Yamazaki Y, Shimada T, Iijima K, Hasegawa H, Okawa K, Fujita T, Fukumoto S, Yamashita T. Klotho converts canonical FGF receptor into a specific receptor for FGF-23. *Nature*. 2006;444(7):770-4.
67. Baum M, Schiavi S, Dwarakanath V, Quigley R. Effect of fibroblast growth factor-23 on phosphate transport in proximal tubules. *Kidney Int*. 2005;68:1148-53.
68. Yamashita T, Konishi M, Miyake A, Inui K, Itoh N. Fibroblast growth factor (FGF)-23 inhibits renal phosphate reabsorption by activation of the mitogen-activated protein kinase pathway. *J Biol Chem*. 2002;277(31):28265-70.
69. Shimada T, Yamazaki Y, Takahashi M, Hasegawa H, Urakawa I, Oshima T, Ono K, Kakitani M, Tomizuka K, Fukumoto S, Yamashita T. Vitamin D receptor-independent FGF-23 actions in regulating phosphate and vitamin D metabolism. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2005;289: F1088-95.
70. Neves K, Gracioli F, Reis L, Schiavi S, Jorgetti V, Moysés R. Parathormone and phosphorus have independent effects on FGF-23 serum levels in experimental CKD [abstract] *ERA-EDTA Congress 2007 – Barcelona, Spain*.
71. Lavi-Moshayoff V, Wasserman G, Meir T, Silver J, Naveh-Many T. PTH increases FGF-23 gene expression and mediates the high-FGF-23 levels of experimental kidney failure: a bone parathyroid feedback loop. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2010;299(4):F882-9.
72. Bergwitz C, Juppner H. regulation of phosphate homeostasis by PTH, vitamin D and FGF-23. *Annu Rev Med*. 2010;61:91-104.
73. Shimada T, Kakitani M, Yamazaki Y, Hasegawa H, Takeuchi Y, Fujita T, Fukumoto S, Tomizuka K, Yamashita T. Targeted ablation of FGF-23 demonstrates an essential physiological role of FGF-23 in phosphate and vitamin D metabolism. *J Clin Invest*. 2004;113:561-8.
74. Hesse M, Fröhlich LF, Zeitz U, Lanske B, Erben RG. Ablation of vitamin D signaling rescues bone, mineral, and glucose homeostasis in FGF-23 deficient mice. *Matrix Biol*. 2007;26:75-84.
75. Benet-Pagès A, Orlik P, Strom TM, Lorenz-Depiereux B. An FGF-23 missense mutation causes familial tumoral calcinosis with hyperphosphatemia. *Hum Mol Genet*. 2005;14(3):385-90.
76. Ix JH, Shlipak MG, Wassel CL, Whooley MA. Fibroblast growth factor-23 and early decrements in kidney function:the Heart and Soul Study. *Nephrol Dial Transplant*. 2010;25(3):993-7.
77. Gutierrez O, Isakova T, Rhee E, Shah A, Holmes J, Collierone G, Juppner H, Wolf M. Fibroblast growth factor-23 mitigates hyperphosphatemia but accentuates calcitriol deficiency in chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol*. 2005;16:2205-15.
78. Imanishi Y, Inaba M, Nakatsuka K, Nagasue K, Okuno S, Yoshihara A, Miura M, Miyauchi A, Kobayashi K, Miki T, Shoji T, Ishimura E, Nishizawa Y. FGF-23 in patients with end-stage renal disease on hemodialysis. *Kidney Int*. 2004;65:1943-6.
79. Shigematsu T, Kazama JJ, Yamashita T, Fukumoto S, Hosoya T, Gejyo F, Fukagawa M. Possible involvement of circulating fibroblast growth factor 23 in the development of secondary hyperparathyroidism associated with renal insufficiency. *Am J Kidney Dis*. 2004;44:250-6.
80. Gutiérrez OM. Fibroblast growth factor 23 and disordered vitamin D metabolism in chronic kidney disease: updating the "trade-off" hypothesis. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2010;5(9):1710-6.
81. Fukagawa M, Nakanishi S, Fujii H, Hamada Y, Abe T. Regulation of parathyroid function in chronic kidney disease (CKD). *Clin Exp Nephrol*. 2006;10:175-9.

82. Canalejo R, Canalejo A, Martinez-Moreno JM, Rodriguez-Ortiz ME, Estepa JC, Mendoza FJ, Munoz-Castaneda JR, Shalhoub V, Almaden Y, Rodriguez M. FGF-23 fails to inhibit uremic parathyroid glands. *J Am Soc Nephrol*. 2010;21:1125–35.
83. Nakanishi S, Kazama JJ, Nii-Komo T, Omori K, Yamashita T, Fukumoto S, Gejyo S, Shigematsu T, Fukagawa M. Serum Fibroblast Growth Factor-23 levels predict the future refractory hyperparathyroidism in dialysis patients. *Kidney Int*. 2005;67:1171-8.
84. Kazama JJ, Sato F, Omori K, Hama H, Yamamoto S, Maruyama H, Narita I, Yamashita T, Fukumoto S, Gejyo S, Fukagawa M. Pretreatment serum FGF-23 levels predict the efficacy of calcitriol therapy in dialysis patients. *Kidney Int*. 2005;67:1120-5.
85. Oliveira RB, Cancela AL, Gracioli FG, Dos Reis LM, Draibe SA, Cuppari L, Carvalho AB, Jorgetti V, Canziani ME, Moysés RM. Early control of PTH and FGF-23 in normophosphatemic CKD patients: a new target in CKD-MBD therapy? *Clin J Am Soc Nephrol*. 2010;5(2):286-91.
86. Ito N, Fukumoto S, Takeuchi Y, Yasuda T, Hasegawa Y, Takemoto F, Tajima T, Dobashi K, Yamazaki Y, Yamashita T, Fujita T. Comparison of two assays for fibroblast growth factor (FGF)-23. *J Bone Miner Metab*. 2005;23:435–40.
87. Kuro-o M, Matsumura Y, Aizawa H, Kawaguchi H, Suga T, Utsugi T, Ohyama Y, Kurabayashi M, Kaname T, Kume E, Iwasaki H, Iida A, Shiraki-Iida T, Nishikawa S, Nagai R, Nabeshima Y. Mutation of the mouse *klotho* gene leads to a syndrome resembling ageing. *Nature*. 1997;390:45–51.
88. Kurosu H, Yamamoto M, Clark JD, Pastor JV, Nandi A, Gurnani P, McGuinness OP, Chikuda H, Yamaguchi M, Kawaguchi H, Shimomura I, Takayama Y, Herz J, Kahn CR, Rosenblatt KP, Kuro-o M. Suppression of aging on mice by the hormone *Klotho*. *Science*. 2005;309:1829-33.
89. Kurosu H, Kuro-o M. The *Klotho* gene family as a regulator of endocrine fibroblast growth factors. *Mol Cell Endocrinol*. 2009;299:72-8.
90. Tsujikawa, H., Kurotaki, Y., Fujimori, T., Fukuda, K., Nabeshima, Y. *Klotho*, a gene related to a syndrome resembling human premature aging, functions in a negative regulatory circuit of vitamin D endocrine system. *Mol. Endocrinol*. 2007;17:2393-403.
91. Alexander RT, Woudenberg-Vrenken TEE, Buurman J, Dijkman H, Eerden BJ, Leeuwen JP, Bindels RJ, Hoenderop JG. *Klotho* prevents renal calcium loss. *J Am Soc Nephrol*. 2009;20: 2371-9.
92. Ohnishi M, Razzaque MS. Dietary and genetic evidence for phosphate toxicity accelerating mammalian aging *FASEB J*. 2010;24:3562–71.
93. Ohnishi M, Nakatani T, Lanske B, Razzaque MS. Reversal of mineral ion homeostasis and soft-tissue calcification of *klotho* knockout mice by deletion of vitamin D 1 α -hydroxylase. *Kidney Int*. 2009;75:1166–72.
94. Tsezou A, Furuichi T, Satra M, Makrythanasis P, Ikegawa S, Malizo KN. Association of *Klotho* gene polymorphisms with knee osteoarthritis in greek population. *J Orthop Res*. 2008;26(11):1466-70.
95. Shimoyama Y, Nishio K, Hamajima N, Niwa T. *Klotho* gene polymorphisms G-395A and C1818T are associated with lipid and glucose metabolism, bone mineral density and systolic blood pressure in Japanese healthy subjects. *Clin Chim Acta* 2009; 406(1-2):134-8.
96. Arking DE, Becker DM, Yanek LR, Fallin D, Judge DP, Moy TF, Becker LC, Dietz HC. *Klotho* allele status and the risk of early-onset occult coronary artery disease. *Am J Hum Genet*. 2003;72:1154-61.

97. Jo S, Kim SG, Choi YG, Joo NR, Cho GY, Choi SR, Kim EJ, Kim HS, Kim HJ, Rhim CY. Klotho gene polymorphism is associated with coronary artery stenosis but not with coronary calcification in a Korean population. *In Heart J* 2009;50:23-32.
98. Imamura A, Okumura K, Ogawa Y, Murakami R, Torigoe M, Numaguchi Y, Murohara T. Klotho gene polymorphism may be a genetic risk factor for atherosclerotic coronary artery disease but not for vasospastic angina in Japanese. *Clin Chim Acta*. 2006;371: 66–70.
99. Arking DE, Atzmon G, Arking A, Barzilai N, Dietz HC. Association between a functional variant of the Klotho gene and high-density lipoprotein cholesterol, blood pressure, stroke, and longevity. *Circ Res*. 2005;96:412-8.
100. Shimoyama Y, Taki K, Mitsuda Y, Tsuruta Y, Hamajima N, Niwa T. KLOTHO Gene polymorphisms G-395A and C1818T are associated with Low-Density Lipoprotein cholesterol and uric acid in Japanese hemodialysis patients. *Am J Nephrol* 2009;30:383–8.
101. Friedman DJ, Afkarian M, Tamez H, Bhan I, Isakova T, Wolf M, Ankers E, Ye J, Tonelli M, Zoccali C, Kuro-o M, Moe O, Karumanchi A, Thadhani R. Klotho variants and chronic hemodialysis mortality. *J Bone Miner Res*. 2009;24(11):1847-55.
102. Peacock M. Calcium metabolism in health and disease. *Clin J Am Soc Nephrol* 2010;5: S23–S30.
103. Tentori F, Blayney MJ, Albert JM, Gillespie BW, Kerr PG, Bommer J, Young EW, Akizawa T, Akiba T, Pisoni RL, Robinson BM, Port FK. Mortality Risk for Dialysis Patients With Different Levels of Serum Calcium, Phosphorus, and PTH: The Dialysis Outcomes and Practice Patterns Study (DOPPS). *Am J Kidney Dis*. 2008;52(3):519-30.
104. Jung HH, Kim SW, Han H: Inflammation, mineral metabolism and progressive coronary artery calcification in patients on haemodialysis *Nephrol Dial Transplant* 2006;21:1915-20.
105. Adeney KL, Siscovick DS, Ix JH, Seliger SL, Shlipak MG, Jenny NS, Kestenbaum BR. Association of serum phosphate with vascular and valvular calcification in moderate CKD. *J Am Soc Nephrol*. 2009;20:381-7.
106. Tonelli M, Sacks F, Pfeffer M, Gao Z, Curhan G. Relation between serum phosphate level and cardiovascular event rate in people with coronary disease. *Circulation*. 2005;112;2627-33.
107. Giachelli CM, Jono S, Shioi A, Nishizawa Y, Mori K, Morii H. Vascular calcification and inorganic phosphate. *Am J Kidney Dis*. 2001;38(Suppl 1):S34–S37.
108. Giachelli CM. Vascular calcification: in vitro evidence for the role of inorganic phosphate. *J Am Soc Nephrol*. 2003;14:S300–4.
109. Narang R, Ridout D, Nonis C, Kooner JS. Serum calcium, phosphorus and albumin levels in relation to the angiographic severity of coronary artery disease. *Int J Cardiol*. 1997;60:73–9.
110. Rasouli M, Kiasari AM. Serum calcium and phosphorus associate with the occurrence and severity of angiographically documented coronary heart disease, possibly through correlation with atherogenic (apo)lipoproteins. *Clin Chem Lab Med*. 2006;44(1):43–50.
111. Foley RJ, Collins AJ, Herzog CA, Ishani A, Kalra FA. Serum phosphorus levels associate with coronary atherosclerosis in young adults. *J Am Soc Nephrol*. 2009;20: 397–404.
112. Tuttle KR, Short RA. Longitudinal relationships among coronary artery calcification, serum phosphorus and kidney function. *Clin J Am Soc Nephrol* 2009;4:1968–73.

113. Amann K, Ritz E, Wiest G, Klaus G, Mall G: A role of parathyroid hormone for the activation of cardiac fibroblasts in uremia. *J Am Soc Nephrol* 1994;4:1814-9.
114. Jono S, Nishizawa Y, Shioi A, Morii H: Parathyroid Hormone–Related Peptide as a Local Regulator of Vascular Calcification: Its Inhibitory Action on In Vitro Calcification by Bovine Vascular Smooth Muscle Cells *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 1997;17:1135-42.
115. Giachelli CM. Vascular calcification: in vitro evidence for the role of inorganic phosphate. *J Am Soc Nephrol*. 2003;14:S300–S304.
116. Dobnig H, Pilz S, Scharnagl H, Renner W, Seelhorst U, Wellnitz B, Kinkeldei J, Boehm BO, Weihrauch G, Maerz W. 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(12):1340-9.
117. Michaelsson K, Baron JA, Snellman G, Gedeberg R, Byberg L, Sundstrom J, Berglund L, Arnlov J, Hellman P, Blomhoff r, Wolk A, Garmo H, Holmberg L, Melhus H. Plasma vitamin D and mortality in older men: a community-based prospective cohort study. *Am J Clin Nutr*.2010;92(4):841-8.
118. 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.
119. Grandi NC, Breitling LP, Brenner H. Vitamin D and cardiovascular disease: Systematic review and meta-analysis of prospective studies. *Prev Med*. 2010;51(3-4):228-33.
120. Wu-Wong R, Nakane M, Ma J, Ruan X, Kroeger PE: Effects of Vitamin D analogs on gene expression profiling in human coronary artery smooth muscle cells *Atherosclerosis* 2006;186:20–8.
121. Tarcin O, Yavuz DG, Ozben B, Telli A, Ogunc AV, Toprak A, Yazici D, Sancak S, Deyneli O, Akalin S. Effect of vitamin D deficiency and replacement on endothelial function on asymptomatic subjects. *J Clin Endocrinol Metab*. 2009;94(10):4023-30.
122. Zhou C, Lu F, Cao K, Xu D, Goltzman D, Miao D. 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.
123. Li YC, Kong J, Wei M, Chen ZF, Liu SQ, Cao LP: 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ is a negative endocrine regulator of the renin-angiotensin system *J Clin Invest*. 2002.10(2):229-38.
124. 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(3-5):533-7.
125. Park CW, Oh YS, Shin YS: Intravenous calcitriol regresses myocardial hypertrophy in hemodialysis patients with secondary hyperparathyroidism *Am J Kidney Dis* 1999;33:73–81.
126. Cade C, Norman AW. Vitamin D3 improves impaired glucose tolerance and insulin secretion in the vitamin D-deficient rat in vivo. *Endocrinology*. 1986 ;119:84–90.
127. Liu S, Song Y, Ford ES, Manson JE, Buring JE, Ridker PM. Dietary calcium, vitamin D, and the prevalence of metabolic syndrome in middle-aged and older U.S. women. *Diabetes Care* 2005;28:2926-32.
128. Mathieu C, Gysemans C, Giulietti A, Bouillon R. Vitamin D and diabetes. *Diabetologia*. 2005;48:1247–57.

129. Scragg R, Sowers M, Bell C. Serum 25-hydroxyvitamin D, diabetes, and ethnicity in the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Diabetes Care*. 2004;27:2813–8.
130. Reis JP, von Mühlen D, Miller ER, Michos ED, Appel LJ. Vitamin D status and cardiometabolic risk factors in the United States adolescent population. *Pediatrics*. 2009;124(3):e371-9.
131. Pilz S, Tomaschitz A, Ritz E, Pieber TR, Vitamin D status and arterial hypertension: a systematic review. *Nat Rev Cardiol*. 2009;6(10):621-30.
132. Bennani-Kabchi N, Kehel L, El Bouayadi F, Fdhil H, Amarti A, Saidi A, Marquie G. New model of atherosclerosis in insulin resistant sand rats: hypercholesterolemia combined with D₂ vitamin. *Atherosclerosis*. 2000;150:55–61.
133. Jono S, Nishizawa Y, Shioi A, Morii H: 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ Increases In Vitro Vascular Calcification by Modulating Secretion of Endogenous Parathyroid Hormone-Related Peptide *Circulation*. 1999;98:1302-6.
134. Zittermann A, Koerfer R. Protective and toxic effects of vitamin D on vascular calcification: clinical implications. *Mol Aspects Med*. 2008;29(6):423-32.
135. Levin A, Li YC. Vitamin D and its analogues: do they protect against cardiovascular disease in patients with kidney disease? *Kidney Int*. 2005;68:1973 -81.
136. Watson KE, Abrolat ML, Malone LL, Hoeg JM, Doherty T, Detrano R, Demer LL. Active serum vitamin D levels are inversely correlated with coronary calcification. *Circulation*. 2007;96:1755-60.
137. Doherty TM, Tang W, Dascalos S, Watson KE, Demer LL, Shavelle RM, Detrano RC. Ethnic origin and serum levels of 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ are independent predictors of coronary calcium mass measured by Electron-Beam Computed Tomography. *Circulation*. 1997;96:1477-81.
138. Arad Y, Spadaro LA, Roth M, Scordo J, Goodman K, Sherman S, Lerner G, Newstein D, Guerci AD. Serum concentration of calcium, 1,25 vitamin D and parathyroid hormone are not correlated with coronary calcifications. An electron beam computed tomography study. *Coron Artery Dis*. 1998;9(8):513-8.
139. Tentori F, Hunt WC, Stidley CA, Rohrscheib MR, Bedrick EJ, Meyer KB, Johnson HK, Zager PG. Mortality risk among hemodialysis patients receiving different vitamin D analogs. *Kidney Int*. 2006;70:1858-65.
140. Shoji T, Shinohara K, Kimoto E, Emoto M, Tahara H, Koyama H, Inaba M, Fukumoto S, Ishimura E, Miki T, Tabata T, Nishizawa Y. Lower risk for cardiovascular mortality in oral 1αhydroxyvitamin D₃ users in a haemodialysis population. *Nephrol Dial Transplant*. 2004;19:179-84.
141. Teng M, Wolf M, Ofsthun MN, Lazarus JM, Hernán MA, Camargo Jr, CA, Thadhani R. Activated injectable vitamin D and hemodialysis survival: a historical cohort study. *J Am Soc Nephrol*. 2005;16:1115-25.
142. Wolf M, Shah A, Gutierrez O, Ankers F, Monroy M, Tamez H, Steele D, Chang Y, Camargo Jr. CA, Tonelli M, Thadhani R. Vitamin D levels and early mortality among incident hemodialysis patients. *Kidney Int*. 2007;72:1004–13.
143. Hsia J, Heiss G, Ren H, Allison M, Dolan NC, Greenland P, Heckbert SR, Johnson KC, Manson JE, Sidney S, Trevisan M. Calcium/Vitamin D supplementation and cardiovascular events. *Circulation*. 2007;115:846-54.
144. Lundgren E, Lind L, Palmer M et al. Increased cardiovascular mortality and normalized serum calcium in patients with mild hypercalcemia followed up for 25 years. *Surgery* 2001;130:978–85.

145. Palmer M, Adami HO, Bergstrom R et al. Mortality after surgery for primary hyperparathyroidism: a follow-up of 441 patients operated on from 1956 to 1979. *Surgery* 1987;102:1–7.
146. Block GA, Klassen PS, Lazarus JM, Ofsthun N, Lowrie EG, Chertow GM. Mineral metabolism, mortality, and morbidity in maintenance hemodialysis. *J Am Soc Nephrol*. 2004;8:2208-18.
147. Hagström E, Hellman P, Larsson TE, Ingelsson E, Berglund L, Sundström J, Melhus H, Held C, Lind L, Michaëlsson K, Arnlöv J. Plasma parathyroid hormone and the risk of cardiovascular mortality in the community. *Circulation*. 2009;119(21):2765-71.
148. Cawthon PM, Parimi N, Barrett-Connor E, Laughlin GA, Ensrud KE, Hoffman AR, Shikany JM, Cauley JA, Lane NE, Bauer DC, Orwoll ES, Cummings SR; Osteoporotic Fractures in Men (MrOS) Research Group. Serum 25-hydroxyvitamin D, parathyroid hormone, and mortality in older men. *J Clin Endocrinol Metab*. 2010;95(10):4625-34.
149. Pilz S, Tomaschitz A, Drechsler C, Ritz E, Boehm BO, Grammer TB, März W. Parathyroid hormone level is associated with mortality and cardiovascular events in patients undergoing coronary angiography. *Eur Heart J*. 2010;31(13):1591-8.
150. Neves KR, Gracioli FG, Reis LM, Gracioli RG, Neves CL, Magalhães AO, Custódio MR, Batista DG, Jorgetti V, Moysés RMA. Vascular calcification: Contribution of parathyroid hormone in renal failure. *Kidney Int*. 2007;71:1262–70.
151. Perkovic V, Hewitson TD, Kelynack KJ, Martic M, Tait MG, Becker GJ. Parathyroid hormone has a prosclerotic effect on vascular smooth muscle cells. *Kidney Blood Press Res*. 2003;26:27–33.
152. Rashid G, Bernheim J, Green J, Benchetrit S. Parathyroid hormone stimulates endothelial expression of atherosclerotic parameters through protein kinase pathways. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2007;292:F1215–8.
153. Saleh FN, Schirmer H, Sundsfjord J, Jorde R. Parathyroid hormone and left ventricular hypertrophy. *Eur Heart J*. 2003;24:2054–60.
154. Schluter KD, Millar BC, McDermott BJ, Piper HM. Regulation of protein synthesis and degradation in adult ventricular cardiomyocytes. *Am J Physiol*. 1995;269:C1347–55.
155. Gutiérrez OM, Mannstadt M, Isakova T, Rauh-Hain JA, Tamez H, Shah A, Smith K, Lee H, Thadhani R, Jüppner H, Wolf M. Fibroblast Growth Factor 23 and mortality among patients undergoing hemodialysis. *N Engl J Med*. 2008;359:584-92.
156. Olauson H, Qureshi AR, Miyamoto T, Barany P, Heimbürger O, Lindholm B, Stenvinkel P, Larsson TE. Relation between serum fibroblast growth factor-23 level and mortality in incident dialysis patients: are gender and cardiovascular disease confounding the relationship? *Nephrol Dial Transplant*. 2010;;25(9):3033-8.
157. Gutiérrez OM, Januzzi JL, Isakova T, Laliberte K, Smith K, Collierone G, Sarwar A, Hoffmann U, Coglianese E, Christenson R, Wang TJ, Filippi C, Wolf M. Fibroblast Growth Factor-23 and left ventricular hypertrophy in chronic kidney disease. *Circulation*. 2009;119(19): 2545-52.
158. Canziani ME, Tomiyama C, Higa A, Draibe SA, Carvalho AB. Fibroblast growth factor 23 in chronic kidney disease: bridging the gap between bone mineral metabolism and left ventricular hypertrophy. *Blood Purif*. 2011;31(1-3):26-32.
159. Kanbay M, Nicoleta M, Selcoki Y, Ikizek M, Aydin M, Eryonucu B, Duranay M, Akcay A, Armutcu F, Covic A. Fibroblast Growth Factor 23 and Fetuin A are independent predictors for the coronary artery disease extent in mild chronic kidney disease. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2010;5(10):1780-6.

160. Inaba M, Okuno S, Imanishi Y, Yamada S, Shioi A, Yamakawa T, Ishimura E, Nishizawa Y. Role of fibroblast growth factor-23 in peripheral vascular calcification in non-diabetic and diabetic hemodialysis patients. *Osteoporos Int.* 2006;17:1506–13.
161. Mirza MA, Larsson A, Melhus H, Lind L, Larsson TE. Serum intact FGF-23 associate with left ventricular mass, hypertrophy and geometry in an elderly population. *Atherosclerosis.* 2009;207:546-51.
162. Mirza MA, Larsson A, Lind L, Larsson TE. Circulating fibroblast growth factor-23 is associated with vascular dysfunction in the community. *Atherosclerosis.* 2009;205:385-90.
163. Mirza MA, Hansen T, Johansson L, Ahlstrom H, Larsson A, Lind L, Larsson TE. Relationship between circulating FGF-23 and total body atherosclerosis in the community. *Nephrol Dial Transplant.* 2009;24:3125-31.
164. Roos M, Lutz J, Salmhofer H, Lupp A, Knäuper A, Braun S, Martinof S, Schömig A, Heemann U, Kastrati A, Hausleiter J. Relation between plasma fibroblast growth factor-23, serum fetuin-A levels and coronary artery calcification evaluated by multislice computed tomography in patients with normal kidney function. *Clin Endocrinology.* 2008;68(4):660-5.
165. Parker BD, Schurgers LJ, Brandenburg VM, Christenson RH, Vermeer C, Ketteler M, Shlipak MG, Whooley MA, Ix JH. The associations of Fibroblast Growth Factor 23 and uncarboxylated Matrix Gla Protein with mortality in coronary artery disease: The Heart and Soul Study. *Ann Intern Med.* 2010;152:640-8.
166. Larsson TE. The role of FGF-23 in CKD-MBD and cardiovascular disease: friend or foe? *Nephrol Dial Transplant.* 2010;25:1376-81.
167. Friesinger GC, Page EE, Ross RS. Prognostic significance of coronary arteriography. *Trans Assoc Am Physicians.* 1970;83:78-89.
168. Gensini, G. *Coronary arteriography.* Futura Pub. Co.: Mount Kisco, NY, USA; 1975.
169. Ma S, Liu A, Carr J, Post W, Kronmal R. Statistical Modeling of Agatston Score in Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA). *PLoS ONE.* 2010; 5(8):e12036.
170. Goodman WG, Goldin J, Kuizon BD, Yoon C, Gales B, Sider D, Wang Y, Chung J, Emerick A, Greaser L, Elashoff RM, Salusky IB. Coronary artery calcification in young adults with end-stage renal disease who are undergoing dialysis. *N Engl J Med.* 2000; 342(20):1478-1483.
171. Adeney, KL, Siscovick DS, Ix JH, Seliger SL, Shlipak MG, Jenny NS, Kestenbaum BR. Association of serum phosphate with vascular and valvular calcification in moderate CKD. *J Am Soc Nephrol.* 2009; 20: 381–387.
172. Onufrak SJ, Bellasi A, Cardarelli F, Vaccarino V, Muntner P, Shaw LJ, Raggi P. Investigation of gender heterogeneity in the associations of serum phosphorus with Incident coronary artery disease and all-cause mortality. *Am J Epidemiol.* 2009; 169: 67–77.
173. Saab G, Whooley MA, Schiller NB, Ix JH. Association of serum phosphorus with left ventricular mass in men and women with stable cardiovascular disease: data from the Heart and Soul Study. *Am J Kidney Dis.* 2010; 56: 496-505.
174. Onufrak SJ, Bellasi A, Shaw LJ, Herzog CA, Cardarelli F, Wilson PW, Vaccarino V, Raggi P. Phosphorus levels are associated with subclinical atherosclerosis in the general population. *Atherosclerosis.* 2008; 199(2): 424-31.

175. Ruan L, Chen W, Srinivasan SR, Xu J, Toprak A, Berenson GS. Relation of serum phosphorus levels to carotid intima-media thickness in asymptomatic young adults (from the Bogalusa Heart Study). *Am J Cardiol.* 2010; 106(6):793-7.
176. Shuto E, Taketani Y, Tanaka R, Isshiki M, Sato M, Nashiki K, Amo K, Yamamoto H, Higashi Y, Nakaya Y, Takeda E. Dietary phosphorus acutely impairs endothelial function. *J Am Soc Nephrol.* 2009; 20(7):1504-12.
177. Morishita K, Shirai A, Kubota M, Katakura Y, Nabeshima Y, Takeshige K, Kamiya T. The progression of aging in klotho mutant mice can be modified by dietary phosphorus and zinc. *J Nutr.* 2001; 131: 3182-3188.
178. Stubbs JR, Liu S, Tang W, Zhou J, Wang Y, Yao X, Quarles LD. Role of hyperphosphatemia and 1,25-dihydroxyvitamin D in vascular calcification and mortality in fibroblastic growth factor 23 null mice. *J Am Soc Nephrol.* 2007; 18: 2116-2124.
179. De Boer IH, Rue TC, Kestenbaum B. Serum phosphorus concentrations in the Third National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III). *Am J Kidney Dis.* 2009; 53(3): 399-407.
180. Kestenbaum B, Glazer NL, Köttgen A, Felix JF, Hwang SJ, Liu Y, Lohman K, Kritchevsky SB, Hausman DB, Petersen AK, Gieger C, Ried JS, Meitinger T, Strom TM, Wichmann HE, Campbell H, Hayward C, Rudan I, de Boer IH, Psaty BM, Rice KM, Chen YD, Li M, Arking DE, Boerwinkle E, Coresh J, Yang Q, Levy D, van Rooij FJ, Dehghan A, Rivadeneira F, Uitterlinden AG, Hofman A, van Duijn CM, Shlipak MG, Kao WH, Witteman JC, Siscovick DS, Fox CS. Common genetic variants associate with serum phosphorus concentration. *J Am Soc Nephrol.* 2010; 21: 1223-32.
181. John GB, Cheng CY, Kuro-o M. Role of klotho in aging, phosphate metabolism, and CKD. *Am J Kidney Dis.* 2011; Apr 14 [Epub ahead of print].
182. Hu MC, Shi M, Zhang J, Pastor J, Nakatani T, Lanske B, Razzaque MS, Rosenblatt KP, Baum MG, Kuro-o M, Moe OW. Klotho: a novel phosphaturic substance acting as an autocrine enzyme in the renal proximal tubule. *FASEB J.* 2010; 24(9): 3438-50.
183. Carrillo-Lopez N, Roman-Garcia P, Rodriguez-Rebollar A, Fernandez-Martin JL, Naves-Diaz M, Cannata-Andia JB. Indirect regulation of PTH by estrogens may require FGF-23. *J Am Soc Nephrol* 2009; 20(9):2009-2017.
184. Castelo-Branco C, Martínez de Osaba M, Pons F, González-Merlo J. The effect of hormone replacement therapy on postmenopausal bone loss. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 1992; 2(44): 131-136.
185. Kobayashi K, Imanishi Y, Miyauchi A, Onoda N, Kawata T, Tahara H, Goto H, Miki T, Ishimura E, Sugimoto T, Ishikawa T, Inaba M, Nishizawa Y. Regulation of plasma fibroblast growth factor 23 by calcium in primary hyperparathyroidism. *Eur J Endocrinol.* 2006; 154(1): 93-99.
186. Makita S, Nakamura M, Satoh K, Tanaka F, Onoda T, Kawamura K, Ohsawa M, Tanno K, Itai K, Sakata K, Okayama A, Terayama Y, Yoshida Y, Ogawa A. Serum C-reactive protein levels can be used to predict future ischemic stroke and mortality in Japanese men from the general population. *Atherosclerosis.* 2009; 204(1):234-8.

-
187. Zethelius B, Berglund L, Sundström J, Ingelsson E, Basu S, Larsson A, Venge P, Arnlov J. Use of multiple biomarkers to improve the prediction of death from cardiovascular causes. *N Engl J Med*. 2008; 358(20):2107-16.
188. Kistorp C, Raymond I, Pedersen F, Gustafsson F, Faber J, Hildebrandt P. N-terminal pro-brain natriuretic peptide, C-reactive protein, and urinary albumin levels as predictors of mortality and cardiovascular events in older adults. *JAMA*. 2005 Apr 6;293(13):1609-16.
189. Rubin J, Chang HJ, Nasir K, Blumenthal RS, Blaha MJ, Choi EK, Chang SA, Yoon YE, Chun EJ, Choi SI, Agatston AS, Rivera JJ. Association between high-sensitivity C-reactive protein and coronary plaque subtypes assessed by 64-slice coronary computed tomography angiography in an asymptomatic population. *Circ Cardiovasc Imaging*. 2011; 4(3):201-9.
190. Jenny NS, Brown ER, Detrano R, Folsom AR, Saad MF, Shea S, Szklo M, Herrington DM, Jacobs DR Jr. Associations of inflammatory markers with coronary artery calcification: results from the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 2010; 209(1):226-9.
191. Tucker KL, Morita K, Qiao N, Hannan MT, Cupples LA, Kiel DP. Colas, but not other carbonated beverages, are associated with low bone mineral density in older women: The Framingham Osteoporosis Study. *Am J Clin Nutr*. 2006; 84(4): 936-42.