Camille Pinto Figueiredo

**Avaliação de calcificação vascular e osteoporose em
uma população de indivíduos com 65 anos ou mais
na área do Butantã**

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

Programa: Ciências Médicas

Área de Concentração: Distúrbios Genéticos de
Desenvolvimento e Metabolismo

Orientadora: Prof^a Dr^a Rosa Maria Rodrigues Pereira

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

Figueiredo, Camille Pinto

Avaliação de calcificação vascular e osteoporose em uma população de indivíduos com 65 anos ou mais na área do Butantã / Camille Pinto Figueiredo. -- São Paulo, 2011.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Programa de Ciências Médicas. Área de concentração: Distúrbios Genéticos de Desenvolvimento e Metabolismo.

Orientadora: Rosa Maria Rodrigues Pereira.

Descritores: 1.Fósforo 2.Densidade óssea 3.Calcificação vascular 4.Saúde do idoso

USP/FM/DBD-298/11

Àquele que não está presente desde os meus 15
anos, mas foi quem me deu a base que precisei
para eu alcançar meus objetivos, **meu pai**.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus e a meus pais pela vida.

Agradeço a Isa, por existir, por ter permitido que eu participasse de seus melhores e maiores momentos. Esse é um dos meus maiores orgulhos: ser sua irmã (pouca coisa mais velha).

Agradeço ao meu irmão Homero pela sempre originalidade de seus conselhos.

Agradeço aos meus professores do primário, colegial e faculdade pela formação acadêmica que tenho.

De todos os mestres que passaram na minha vida, não posso deixar de fazer um agradecimento muito especial ao Dr. João Maradei que, juntamente com toda a sua família, esteve muito presente em momentos importantes da minha vida, com muito carinho e sempre acreditando no meu sucesso.

Agradeço a muitos amigos, principalmente ao Marcos, que me ajudou muito em alguns momentos que precisei.

Agradeço à disciplina de reumatologia da FMUSP, a Prof^a Dra. Eloisa Bonfá, aos assistentes, às secretárias e a todos que trabalham nos laboratórios da disciplina pelo trabalho conjunto em prol do aprimoramento científico.

Um agradecimento especial aos que trabalham no laboratório de metabolismo ósseo, principalmente a Liliam e a Valéria, que contribuíram muito para a minha tese.

Agradeço aos meus colegas da pós-graduação, especialmente a Jaqueline, pelo trabalho que fizemos juntas.

Agradeço a Prof^a Dr^a Rosa Pereira, minha orientadora, mestre e amiga, pela confiança, pelas muitas horas de trabalho e pelos poucos e “raros” momentos que me chamou a atenção.

Por fim, agradeço a Sophia, minha filha, a princesa que apareceu na minha vida e ao Jayme por ter me dado esta princesa, por estar ao meu lado e por sempre torcer por mim; minha família! Com a certeza que estarão sempre presentes nos maiores momentos da minha vida.

“Viver é a coisa mais rara do mundo. A maioria das pessoas apenas existe”.

(Oscar Wilde)

Este trabalho recebeu financiamento da Fundação de Amparo e Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) #03/09313-0 e #04/12694-8; Conselho Nacional de Ciência e Tecnologia (CNPQ) #300559/2009-7 (RMRP), Federico Foundation (RMRP) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) (CPF, JBL).

Normalização adotada

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, vigentes no momento da publicação.

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

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

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

Sumário

Lista de abreviaturas e siglas

Lista de Tabelas e Figuras

Resumo

Summary

1	Introdução	1
2	Objetivos	7
3	Métodos.....	9
3.1	Casuística	10
3.2	Coleta de dados	11
3.3	Avaliação Laboratorial.....	14
3.4	Densidade Mineral Óssea	15
3.5	Avaliação de Fraturas Vertebrais	16
3.6	Calcificação de Aorta Abdominal	16
3.7	Análise Estatística.....	17
4	Resultados	19
5	Discussão.....	28
6	Conclusão	34
7	Referências	36

Apêndice

Artigo enviado para publicação

Lista de Abreviaturas e Siglas

DMO	Densidade Mineral Óssea
IL1	<i>Interleukin-1</i>
IL6	<i>Interleukin-6</i>
TNF α	<i>Tumor Necrosis Factor-alpha</i>
OPG	<i>Osteoprotegerin</i>
RANK	<i>Receptor activator of nuclear factor kappa-B</i>
RANK-L	<i>Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand</i>
BMP	<i>Bone morphogenetic protein</i>
MGP	<i>Matrix gla protein</i>
Runx-2	<i>Runt-related transcription factor 2</i>
25OHD	25-hidroxivitamina D
PTH	<i>Parathyroid hormone</i>
TFGe	Taxa de filtração glomerular estimada
LDL-c	<i>Low density lipoprotein cholesterol</i>
HDL-c	<i>High density lipoprotein cholesterol</i>
DXA	<i>Dual-energy X-ray absorptiometry</i>
ISCD	<i>International Society for Clinical Densitometry</i>

Lista de Tabelas e Figuras

Tabela 1.	Dados demográficos, antropométricos e clínicos da população	20
Tabela 2.	Prevalência (Intervalo de confiança de 95%) de calcificação aórtica e escore de CAA em todos os indivíduos separados por idade	21
Tabela 3.	Resumo dos dados laboratoriais, valores densitométricos e classificação de osteopenia/osteoporose de todos os indivíduos	22
Tabela 4.1:	Associação entre o escore de calcificação de aorta abdominal (escore CAA) e as variáveis antropométricas, laboratoriais e densitométricas (variáveis contínuas)	24
Tabela 4.2:	Associação entre o escore CAA e as variáveis demográficas e clínicas (variáveis binárias).....	25
Tabela 5:	Modelo de regressão linear múltipla para escore de CAA.....	26
Figura 1:	Médias e erros padrão do escore de CAA para cada categoria de fósforo sérico	27

Resumo

Figueiredo CP. *Avaliação de calcificação vascular e osteoporose em uma população de indivíduos com 65 anos ou mais na área do Butantã* [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2011. 47p.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a associação de calcificação da aorta abdominal (CAA) com marcadores do metabolismo ósseo: densidade mineral óssea (DMO), dados laboratoriais (cálcio, fósforo, 25OH-vitamina D, PTH) e clínicos em uma população brasileira de idosos. Este foi um estudo de corte transversal onde foram incluídos 815 indivíduos com idade igual ou superior a 65 anos. Os dados demográficos e de estilo de vida, bem como os parâmetros clínicos que identificam os fatores de risco para osteoporose e calcificação vascular foram obtidos por um questionário padronizado. Densidade mineral óssea (DMO) e parâmetros laboratoriais foram avaliados em todos os indivíduos. Foram realizadas radiografias de coluna lombar para a análise de calcificação da aorta abdominal nos segmentos correspondentes às vértebras L1 a L4. Para cada segmento lombar foi dada uma pontuação de 0-3 para as paredes anterior e posterior, com um escore máximo de 24 pontos (Kaupilla et al., 1997). Resultados: 63,2% dos idosos apresentavam algum grau de CAA, com um escore médio de $4,68 \pm 5,88$. Analisando as variáveis contínuas observamos que o escore de CAA foi correlacionado diretamente à idade, fósforo sérico, LDL-colesterol (LDL-C), triglicérides e inversamente ao índice de massa corpórea (IMC), DMO do colo do fêmur e DMO do fêmur total ($p < 0,05$). Em relação às variáveis binárias o escore de CAA foi associado à história de fraturas prévias por fragilidade, baixa atividade física, quedas no último ano, tabagismo atual e hipertensão arterial ($p < 0,05$). A análise de regressão linear múltipla demonstrou que o escore de CAA foi diretamente relacionado à idade ($p < 0,001$), tabagismo atual ($p < 0,001$), hipertensão arterial ($p = 0,002$), LDL-C ($p = 0,05$), triglicérides ($p = 0,002$), fósforo sérico ($p = 0,005$) e inversamente associado à DMO de fêmur total ($p < 0,001$). Um aumento no escore de CAA foi observado com a elevação dos níveis séricos de fósforo [$\leq 2,4\text{mg/dL}$: escore de CAA = 1,9 (DP: 3,9); $2,5\text{--}3,5\text{mg/dL}$: escore de CAA = 4,5 (DP: 5,6) e $> 3,5\text{mg/dL}$: escore de CAA = 5,3 (SD: 6,3) $p = 0,003$]. Este estudo demonstrou que, além dos fatores de risco clássicos para doença cardiovascular (HAS, tabagismo e lipídes), o fósforo sérico e a DMO do fêmur total foram fatores de risco adicionais ao complexo processo de calcificação vascular em idosos da comunidade.

Descritores: 1. Fósforo 2. Densidade mineral óssea 3. Calcificação vascular 4. Saúde do Idoso

Summary

Figueiredo CP. *Assessment of vascular calcification and osteoporosis in a population of individuals aged 65 years or more in Butantã* [Thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2011. 47p.

The aim of this study was to analyze abdominal aortic calcification (AAC) and its possible association with bone mineral density (BMD) as well as the clinical and laboratory data. This was a cross-sectional study conducted between 2005 to 2007, with a population-based sample of older men and women living in Brazil. Eight hundred and fifteen subjects ≥ 65 years old were studied. The risk factors for osteoporosis and cardiovascular disease, demographic data and lifestyle characteristics were collected using a standardized questionnaire. BMD was measured by DXA. Kauppila's method was used to quantify the AAC score (AACS) by spine X-rays. Laboratory analyses were also performed. AAC was observed in 63.2% of subjects with a mean AACS of 4.68 (5.88). AACS was directly correlated with age, phosphorus, LDL-cholesterol, triglycerides, and inversely correlated with body mass index, femoral neck BMD and total femur BMD ($p < 0.05$). Regarding binary variables, the AACS was associated with previous fragility fractures, current smoking, low physical activity, falls and arterial hypertension ($p < 0.05$). Multiple linear regression analysis demonstrated that the AACS was positively associated with age ($p < 0.001$), current smoking ($p < 0.001$), arterial hypertension ($p = 0.002$), LDL-C ($p = 0.05$), triglycerides ($p = 0.002$), phosphate ($p = 0.005$) and negatively associated with total femur BMD ($p < 0.001$). An increased of AACS was observed with the elevation of serum phosphorus levels [$\leq 2.4\text{mg/dL}$: AACS=1.9 (SD:3.9); $2.5\text{-}3.5\text{mg/dL}$: AACS=4.5 (SD:5.6) and $> 3.5\text{mg/dL}$: AACS=5.3 (SD:6.3), $p = 0.003$]. Our study identified serum phosphate and hip BMD as additional players in the complex process of vascular calcification outside the setting of kidney failure in community-dwelling older population and extended the previous observations of well-known risk factors for cardiovascular disease.

Descriptors: 1. Phosphate 2. Bone mineral density 3. Vascular calcification
4. Elderly healthy

1 Introdução

Osteoporose e doença cardiovascular são duas condições com alta prevalência na população idosa, sendo considerados dois dos maiores problemas em saúde pública (Becker et al., 2005). Com o crescimento da população idosa mundial este número tende a aumentar significativamente nas próximas décadas (Naves et al., 2008).

A calcificação vascular é reconhecidamente um dos fatores determinantes de doença cardiovascular (Verberckmoes et al., 2007), podendo se localizar na camada íntima dos vasos, padrão encontrado na doença aterosclerótica (Burke et al., 2000; Hunt et al., 2002), ou na média dos vasos, também chamada calcificação de Mönckeberg, achado comum na arteriosclerose observada com a idade, diabetes e em renais crônicos (Edmonds et al., 1982; Micheletti et al., 2008). Uma relação direta entre calcificação vascular e a gravidade da doença aterosclerótica tem sido descrita (Wayhs et al., 2002), com alguns estudos mostrando uma correlação positiva com aumento do risco de infarto do miocárdio (Locker et al., 1992; Iribarren et al., 2000) e com instabilidade da placa aterosclerótica (Ehara et al., 2004; Li et al., 2007).

Nas últimas décadas vários estudos mostraram que a calcificação vascular não é apenas um processo passivo e secundário à apoptose de células da parede dos vasos, mas, assim como a ossificação, é um processo

ativo de biomineralização e regulado por vários mecanismos indutores e inibidores (El-Abbadi & Giachelli, 2007).

Diversos estudos epidemiológicos sugerem uma correlação entre osteoporose e calcificação vascular (von der Recke et al., 1999; Kiel et al., 2001; Schulz et al., 2004; Tekin et al., 2008). Von der Recke, ao analisar dois grupos de mulheres saudáveis na pós-menopausa, entre 1977 e 1988, mostrou que o baixo conteúdo mineral ósseo na menopausa foi um fator de risco para o aumento da mortalidade tardia, principalmente aquela relacionada à doença cardiovascular (von der Recke et al., 1999). De maneira semelhante, o *Framingham Heart Study* demonstrou uma associação entre perda óssea e progressão da calcificação aórtica aterosclerótica em uma avaliação longitudinal de 25 anos da densidade mineral óssea (DMO) e da calcificação vascular, (Kiel et al., 2001).

Evidências experimentais demonstraram mecanismos fisiopatológicos coincidentes em muitas vias bioquímicas na doença osteoporótica e na calcificação vascular (Sage et al., 2010).

Há evidências de que citocinas como IL1, IL6 e TNF α estejam diretamente relacionadas ao processo aterosclerótico e à gravidade da doença (Libby, 2002), bem como células inflamatórias (macrófagos e monócitos) estão envolvidas no processo de calcificação vascular (Tintut et al., 2002). O potencial efeito da inflamação na osteoporose é semelhante; essas mesmas citocinas inflamatórias estimulam a proliferação e diferenciação dos precursores de osteoclastos (Miyaura et al., 1995), além de retardar a apoptose destas células, o que resulta no desequilíbrio entre formação e reabsorção, levando à perda de

massa óssea (Pfeilschifter et al., 2002). Estudos sugerem que o estresse oxidativo modula as funções celulares dos tecidos vascular e ósseo de maneira paradoxal: enquanto estimulam a diferenciação osteogênica das células da camada muscular lisa dos vasos, inibem a diferenciação osteoblástica no tecido ósseo (Mody et al., 2001)

Alguns mediadores do metabolismo ósseo foram associados à calcificação vascular, incluindo a via osteoprotegerina (OPG) / receptor do fator ativador nuclear kappa- β (RANK) / RANK-ligante (RANKL), proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs), proteína Gla da matriz (MGP), fetuína-A e osteopontina (Papadopouli et al., 2008; Yao et al., 2010; Tyson et al., 2003; Heiss et al., 2008; Holt et al., 2009). A BMP-2, por exemplo, é expressa em miofibroblastos e pode ter um papel no processo de calcificação da parede do vaso por estimular a expressão do Runx-2, molécula-chave na diferenciação osteoblástica. A MGP também parece estar envolvida neste processo, já que sua ação é inibir a atividade da BMP (Bostrom et al., 1993). De fato, estudos clínicos mostraram que polimorfismos de MGP foram associados a um aumento do risco de infarto do miocárdio e calcificação de artérias femorais (Herrmann et al., 2000), e concentrações séricas de MGP foram inversamente relacionadas à gravidade da calcificação coronária (Jono et al., 2004). Além disso, modelos de camundongos com deleção de MGP apresentaram calcificações arteriais extensas e letais. Esses animais também exibiram osteopenia, fraturas, baixa estatura e mineralização errática das placas de crescimento (Luo et al., 1997).

Outros modelos experimentais, com deleções de genes relacionados ao metabolismo ósseo, evidenciaram fenótipos de alterações vasculares e ósseas simultaneamente, como camundongos com deleção de OPG. (Bucay et al., 1998; Kuro-o et al., 1997). Estudos de camundongos com mutação da proteína Klotho demonstraram que estes animais desenvolviam extensa calcificação vascular e apresentavam fósforo sérico elevado em comparação àqueles sem manipulação genética (Kuro-o et al., 1997). O papel do fósforo como um importante regulador de calcificação vascular tem sido especulado, e aumento dos valores séricos deste íon é considerado um fator de risco para calcificação vascular em pacientes urêmicos (Coen et al., 2009). Na população geral, estudos correlacionam as concentrações de fósforo sérico à espessura de placas ateroscleróticas na carótida (Rubin et al., 2007), aumento de eventos cardiovasculares e mortalidade (Jorde et al., 1999; Foley et al., 2009).

A calcificação da aorta abdominal (CAA) detectada por radiografias simples da coluna lombar já foi associada a um alto risco de evento cardiovascular e mortalidade (Wilson et al., 2001; Jayalath et al., 2005).

A associação entre calcificação vascular/doença cardiovascular e DMO ainda é controversa. Baixa densidade mineral óssea já foi correlacionada à mortalidade cardiovascular na população mundial (Bauer et al., 2002) e também na população brasileira (Pinheiro et al., 2006). Outros estudos relatam que esta relação calcificação vascular e massa óssea desaparece quando ajustado para idade ou outras variáveis (Choi et al., 2009).

A maioria dos estudos de calcificação vascular foi realizada em populações específicas, como norte-americanos e descendentes europeus (Kiel et al., 2001; Schulz et al., 2004), mostrando uma clara associação com a origem étnica (Santos et al., 2006), o que dificulta uma aplicabilidade em populações miscigenadas. Outras variáveis de confusão em estudos prévios foram a inclusão de indivíduos que faziam uso de substâncias que podem influenciar o metabolismo ósseo ou lipídico (Coen et al., 2009; Bagger et al., 2006) e a não exclusão de pacientes renais crônicos (Schulz et al., 2004; Rubin et al., 2007; Wilson et al., 2001).

2 Objetivos

-
1. Avaliar a prevalência de calcificação de aorta abdominal em uma população brasileira de idosos da comunidade.
 2. Nesta mesma população avaliar a associação de calcificação da aorta abdominal (CAA) com dados clínicos e marcadores do metabolismo ósseo:
 - 2.1. Densidade mineral óssea (DMO);
 - 2.2. Dados laboratoriais: cálcio, fósforo, 25OH-vitamina D e PTH

3 Métodos

3.1 Casuística

Este é um estudo de corte transversal com base populacional (Estudo Saúde do Idoso) conduzido de Julho/2005 a Setembro/2007. Os dados completos sobre a população do estudo e os procedimentos realizados foram previamente detalhados (Lopes et al., 2010). Entre 2003 e 2005, todos os idosos com idade igual ou superior a 65 anos, residentes em 66 regiões predefinidas no bairro do Butantã, zona oeste de São Paulo, Brasil, foram identificados por visitas domiciliares e convidados a participar do estudo. Foram identificados 2266 idosos, destes, 2072 (91,4%) aceitaram participar da primeira fase do estudo. Em um seguimento de dois anos, entre 2005 e 2007, os indivíduos foram novamente identificados, com quase 100 % de sucesso (99,1%), e daqueles que estavam vivos (n=1733), 1368 concordaram em participar de nova avaliação. Foram selecionados apenas os idosos saudáveis, neste sentido, 1020 indivíduos foram entrevistados e submetidos à avaliação clínico-laboratorial na segunda fase do estudo. Dos 1020 idosos selecionados, 205 (20%) foram excluídos: 50 usavam substâncias que interferem no metabolismo ósseo, como bisfosfonatos, cálcio e vitamina D, 104 faziam uso de fármacos ou suplementos hipolipemiantes, 18 com história de neoplasia prévia nos últimos cinco anos,

15 com hiperparatireoidismo primário (cálcio sérico > 10,5 mg/dL e PTH > 65 pg/mL), 12 idosos foram considerados renais crônicos [taxa de filtração glomerular estimada (TFGe) < 15 mL/min] e 6 com artrite reumatóide. Assim, foram estudados 815 idosos no total, sendo 476 mulheres e 339 homens.

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (CAPPesq 426/06) e todos os participantes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido.

3.2 Coleta de dados

Cada indivíduo foi entrevistado por um médico e respondeu a um questionário padronizado para a obtenção de informações sobre parâmetros clínicos que identificassem fatores de risco para osteoporose/fraturas e para doença cardiovascular como: diabetes mellitus (DM), hipertensão arterial (HAS), dislipidemia, história familiar ou pessoal prévia de doença cardiovascular, fraturas prévias por fragilidade, história familiar de fratura de quadril, história de quedas no último ano, atividade física, etilismo e tabagismo atuais, uso de glicocorticóide e ingesta diária de cálcio.

Indivíduos em uso de hipoglicemiantes orais ou insulina, ou ainda com glicemia de jejum ≥ 126 mg/dL foram considerados diabéticos (*American Diabetes Association*, 2006).

Foram considerados hipertensos aqueles indivíduos com história médica de HAS, em uso de anti-hipertensivos ou com pressão arterial sistólica ≥ 140 mmHg e/ou pressão arterial diastólica ≥ 90 mmHg (BP), que foi avaliada com esfigmomanômetro padronizado com o indivíduo sentado por pelo menos 5 minutos (Chobanian et al., 2003). Foram considerados dislipidêmicos aqueles que apresentavam colesterol total > 200 mg/dL, LDL-colesterol > 100 mg/dL, triglicerídeos > 150 mg/dL ou HDL-colesterol < 50 mg/dL para mulheres e < 40 mg/dL para homens (NCEP, 2001).

Todos os participantes do estudo foram questionados sobre história prévia de doença cardiovascular como angina estável e instável, infarto do miocárdio, insuficiência cardíaca congestiva, ataque isquêmico transitório e acidente vascular cerebral (AVC). A avaliação de história familiar de doença cardiovascular incluía todas essas condições citadas além de morte por AVC ou doença coronariana (Wilson et al., 2001).

Fratura prévia por fragilidade foi definida como aquela ocorrida após os 50 anos de idade, decorrente de queda da própria altura ou trauma menor em locais típicos de fragilidade óssea tais como antebraço, punho, úmero e fêmur. Fraturas ocorridas em tornozelo, crânio, face, falanges e artelhos não foram consideradas como fraturas osteoporóticas por fragilidade (Seeley et al., 1991). Os indivíduos foram questionados sobre história de quedas (pelo menos uma queda) nos últimos 12 meses, foram considerados caidores crônicos aqueles com história de duas ou mais quedas no último ano (Schwartz AV et al., 1999).

Etilismo foi definido como a ingesta atual de três ou mais unidades de álcool/dia (Kanis et al.2005). O uso de glicocorticóide foi considerado positivo se, no momento da entrevista, o indivíduo estivesse em uso de prednisona ou equivalente na dose de 5mg/dia ou mais por pelo menos três meses consecutivos (NOF, 2003).

Um questionário quantitativo semelhante ao *National Health Interview Survey* foi utilizado para avaliar a atividade física nos indivíduos, e foi classificada de 1 a 3, sendo: 1 (baixa) quando o indivíduo não realizava nem atividades domésticas; 2 (moderada) quando o indivíduo fazia regularmente atividades domésticas e/ou caminhadas irregulares; e 3 (alta) quando o indivíduo realizava atividade física regularmente, fora de sua atividade de rotina diária, por pelo menos duas vezes na semana por 30 minutos cada vez (Fitti et al., 1997). A ingesta diária de cálcio foi estimada a partir do consumo de leite e derivados [iogurte (mL/d) e queijo (g/d)] nos últimos sete dias antes da entrevista (Angbratt & Möller, 1999).

A etnia foi definida pela cor relatada por cada participante de acordo com os seus ancestrais até a segunda geração, como validado previamente para a população brasileira (Fuchs et al., 2002). Aqueles que relataram os quatro avós brancos foram classificados como brancos. A presença de brancos e negros, ou mulatos, nos ascendentes determinava a classificação como não-branca. Na ausência de informações sobre os avós, a etnia foi determinada pela raça de seus pais. Descendentes asiáticos também foram incluídos.

A altura e o peso foram medidos por método padronizado. O índice de massa corpórea (IMC) foi calculado pelo peso em quilogramas dividido pela altura ao quadrado em metros.

3.3 Avaliação Laboratorial

Amostras de sangue foram coletadas em jejum, entre 08h00min e 10h00min da manhã, no mesmo dia em que foram realizados os exames de DXA e as radiografias simples de coluna. As amostras foram estocadas a -70°C para análise posterior.

As dosagens séricas de cálcio (ajustado de acordo com a concentração de albumina), fósforo, fosfatase alcalina, creatinina, glicose, colesterol total, HDL-c (*high density lipoprotein cholesterol*), LDL-c (*low density lipoprotein cholesterol*) e triglicerídeos foram determinadas usando métodos laboratoriais automatizados padrões. A taxa estimada de filtração glomerular (TFGe) foi calculada usando a equação de Cockcroft-Gault (Cockcroft & Gault, 1976).

A concentração sérica de 25-hidroxivitamina D (25OHD) foi determinada pela técnica de radioimunoensaio (DiaSorin, Stillwater, Minnesota, EUA) com o menor limite de detecção de 5 ng/mL. Os coeficientes de variação intra-ensaio e inter-ensaio foram de 10,5% e 17,8%, respectivamente.

A dosagem de hormônio paratireoidiano intacto (PTHi) foi realizada por ensaio imunorradiométrico (ELISA-PTH, CIS *bio international*, França), com referência de normalidade entre 11-62 pg/mL. Os coeficientes de variação intra-ensaio e interensaio foram de 2,5% e 6,1%, respectivamente.

3.4 Densidade Mineral Óssea

A densidade mineral óssea (DMO) foi mensurada por dupla absorciometria de raios-X (DXA) usando o equipamento Hologic (Hologic Inc. Bedford, Mineapolis, EUA, modelo Discovery) nas seguintes regiões: coluna lombar, colo do fêmur e fêmur total (lado direito). Na análise da coluna lombar foram excluídas as vértebras anatomicamente anormais, visualmente não acessíveis ou com uma diferença de T-score maior que 1,0 desvio padrão em relação à vértebra adjacente, como recomendado pela *International Society for Clinical Densitometry* (ISCD) (Binkley et al., 2006).

Todas as medidas de DMO foram realizadas por técnico treinado e capacitado e foram expressas em g/cm². O erro de precisão para estas medidas foi determinado de acordo com a padronização da ISCD (Sheperd et al., 2006). A variação mínima significativa (VMS), com intervalo de confiança de 95% foi 0,033 g/cm² para a coluna lombar, 0,047 g/cm² para o colo do fêmur, e 0,039 g/cm² para o fêmur total. De acordo com os critérios da ISCD, osteoporose foi definida como índice-T $\leq$ -2,5 desvios-padrão e osteopenia como índice-T $>$ -1,0 e $<$ -2,5 na coluna lombar, colo do fêmur ou fêmur total (Binkley et al., 2006).

3.5 Avaliação de Fraturas Vertebrais

A identificação de fraturas vertebrais foi realizada por decisão concomitante de dois avaliadores com experiência na área. Todas as radiografias adquiridas foram de boa qualidade para a análise das vértebras no segmento de T4 a L4. Cada vértebra desta região foi avaliada pela técnica semiquantitativa (SQ) de Genant (Genant et al., 1993) para decidir se havia alguma fratura. A concordância entre os dois radiologistas foi de 96%, com coeficiente kappa de 0,82.

As vértebras com fratura grau 1 foram consideradas normais, pois evidências sugerem que deformidades leves podem ser causadas por variações individuais ou decorrentes da remodelação vertebral normal da idade. Além disso, estudos epidemiológicos raramente definem deformidades leves como fraturas (Lopes et al., 2010), assim, neste trabalho foram consideradas apenas as fraturas grau 2 (moderadas) e grau 3 (graves).

3.6 Calcificação de Aorta Abdominal

Foram realizadas radiografias simples de coluna lombar para a avaliação de fraturas vertebrais e também para quantificar a calcificação da aorta abdominal (CAA). Utilizamos o escore de calcificação da aorta abdominal segundo Kauppila. O segmento da aorta abdominal localizado de L1 a L4 foi subdividido em paredes anterior e posterior e a extensão

longitudinal do vaso numerada de 1 a 4 de acordo com a vértebra adjacente. Cada segmento, anterior e posterior, recebeu uma pontuação de 0 a 3 de acordo com a extensão longitudinal da placa calcificada, onde 0 significa ausência de calcificação, 1 representa pequeno depósito calcificado na parede longitudinal da aorta, mas que ocupa menos que um terço de toda a parede, 2 indica que um terço ou mais, mas menos que dois terços da parede da aorta está comprometida, e 3 significa que dois terços ou mais de toda a extensão da parede do vaso está calcificada. O escore mínimo de calcificação é zero e o máximo é de 24 pontos (Kauppila et al., 1997). A reprodutibilidade intraobservador e interobservador foi 95% e 92%, respectivamente, com coeficiente kappa de 0,83.

3.7 Análise Estatística

Os resultados foram expressos em médias (desvio padrão) ou porcentagens. A normalidade das variáveis foi testada usando histogramas e o teste de Kolmogorov-Smirnov. As variáveis dislipidemia, DM, HAS, evento cardiovascular prévio, história familiar de doença cardiovascular, história prévia de fratura por fragilidade, história familiar de fratura do quadril, tabagismo atual, uso de glicocorticoide e história de queda no último ano foram avaliadas como variáveis binárias. Foram calculadas as correlações de Pearson entre o escore de CAA e as medidas numéricas como: idade, peso, altura, IMC, variáveis laboratoriais e densitométricas. Para as medidas

de atividade física, tabagismo, etilismo e demais variáveis qualitativas foram utilizados testes Mann-Whitney para comparar o escore de CAA entre as categorias que apresentavam apenas dois níveis, para aquelas com mais de dois níveis foram utilizados testes Kruskal-Wallis.

Foram utilizados modelos de regressão linear múltipla para identificar fatores que poderiam estar independentemente associados à CAA. Apenas as variáveis com associação significativa ($p < 0,05$) na análise univariada foram incluídas nos modelos de regressão linear. Devido à colinearidade existente entre os locais avaliados de DMO, eles foram acrescentados sequencialmente à análise de regressão, e o melhor modelo foi então selecionado. A adequação do modelo final exigida para a regressão linear foi analisada através da distribuição de resíduos padronizados.

A variável fósforo permaneceu no modelo final de regressão, motivo pelo qual foi realizada análise separada desta com a variável dependente (CAA). As concentrações séricas de fósforo foram divididas em três categorias (≤ 2.4 , $2.5-3.5$ e > 3.5) e correlacionadas à média do escore de CAA usando testes Kruskal-Wallis. Todas as análises foram obtidas usando o programa SPSS (versão 15.0).

4 Resultados

Os dados demográficos, antropométricos e características clínicas dos indivíduos estudados são mostrados na Tabela 1. Em relação aos fatores de risco cardiovascular, 21,2% eram diabéticos, 72,5% dislipidêmicos, 63,5% hipertensos, 11,5% tinham história de evento cardiovascular prévio (25,5% angina estável ou instável, 23,4% infarto do miocárdio e 51,1% ataque isquêmico transitório ou acidente vascular cerebral) e 19,6% apresentavam história familiar de evento cardiovascular (Tabela 1).

Tabela 1. Dados demográficos, antropométricos e clínicos da população

	Total (N= 815)
Idade, anos	73,0 (5,2)
Sexo feminino, %	58,4
Raça, %	
Brancos	66,6
Não-brancos	31,4
Asiáticos	2
Altura, cm	155,3 (9,0)
Peso, kg	67,2 (13,1)
IMC, kg/m²	27,9 (4,9)
Ingesta de cálcio, mg	420 (292)
Baixa atividade física, %	10,4
Tabagismo atual, %	12,3
Uso atual de glicocorticoide, %	1,3
Etilismo, %	3,5
História prévia de fratura, %	13
História familiar de fratura, %	26,3
História de quedas, %	32,9
Diabetes Mellitus, %	21,2
Dislipidemia, %	72,5
Hipertensão arterial, %	63,5
Evento cardiovascular (ECV), %	11,5
Evento cardiovascular familiar, %	19,6

Os valores são expressos em médias (DP) ou porcentagens.

Calcificação da aorta abdominal foi observada em 63,2% (IC 95%, 59,9-66,5) desta população de idosos, e essa taxa aumentou com a idade [57,7% (65-69 anos); 63,2% (70-79 anos); 77,8% (>80 anos)], com significância estatística apenas entre o primeiro e o terceiro tercis de idade ($p=0,001$). A média do escore de CAA foi de 4,68 (5,88) (Tabela 2), com escores mais elevados (CAA >6) em indivíduos mais velhos: 65-69 anos (20,5%); 70-79 anos (27,5%) e acima de 80 anos (44,2%) (Tabela 2).

Tabela 2. Prevalência (Intervalo de confiança de 95%) de calcificação aórtica e escore de CAA em todos os indivíduos separados por idade

	Calcificação Aórtica % (IC 95%)	p	Escore de Calcificação (0-24 pontos)			p
			0-2, n (%)	3-6, n (%)	>6, n (%)	
65-69 anos	57,7 (51,7-63,8)	0,002	151 (58,5)	54 (20,9)	53 (20,5)	<0,001
70-79 anos	63,2 (58,8-67,6)		238 (51,5)	97 (21,0)	127 (27,5)	
≥ 80 anos	77,8 (69,6-86,2)		33 (34,7)	20 (21,1)	42 (44,2)	
Total	63,2 (59,9-66,5)		422 (51,8)	171 (21)	222 (27,2)	

Os valores são expressos em porcentagens (IC 95%) ou nº de indivíduos (%).

Os dados laboratoriais são mostrados na Tabela 3. As médias dos valores séricos do cálcio, fósforo, produto cálcio-fósforo, PTHi e fosfatase alcalina estavam dentro dos limites considerados normais.

Tabela 3. Resumo dos dados laboratoriais, valores densitométricos e classificação de osteopenia/osteoporose de todos os indivíduos

	Total N= 815
Cálcio, mg/dL	9,4 (0,5)
Fósforo, mg/dL	3,35 (0,55)
Produto cálcio-fósforo, mg²/dL²	31,4 (5,3)
25 OHD, ng/mL	19,5 (9,3)
Deficiência 25OHD (≤ 10 ng/mL), %	15,3
Insuficiência 25OHD (10,1-30 ng/mL), %	71,9
Normal 25OHD (> 30 ng/mL), %	12,8
PTH, pg/dL	40,2 (20,5)
Fosfatase alcalina, U/L	185,9 (63,2)
Creatinina, mg/dL	1,0 (0,2)
TFGe, mL/min	58,2 (18,4)
Colesterol Total, mg/dL	208,0 (43)
LDL-C, mg/dL	124,5 (34,7)
HDL-C, mg/dL	56,4 (13,9)
Triglicérides, mg/dL	139,3 (100,2)
Glicemia, mg/dL	117,4 (45,7)
Albumina, g/dL	4,4 (0,8)
TSH, mcUI/mL	2,7 (3,4)
T4-livre, ng/dL	1,4 (0,3)
Osteopenia, %	40,1
Osteoporose, %	46,1
Coluna Lombar DMO, g/cm²	0,905 (0,204)
Coluna Lombar Índice-T	-1,74 (1,80)
Colo do Fêmur DMO, g/cm²	0,695 (0,139)
Colo do Fêmur Índice-T	-1,72 (1,05)
Fêmur Total DMO, g/cm²	0,844 (0,158)
Fêmur Total Índice-T	-1,18 (1,05)

Os valores são expressos em médias (DP) ou porcentagens.

As concentrações séricas de 25OHD foram baixas, com uma média de 19,5 ng/mL, sendo que apenas 12,8% da população estudada apresentava dosagens séricas de 25OHD acima de 30 ng/mL. A média da TFGe foi 58,2 mL/min, mas a média da creatinina sérica estava dentro da

normalidade (1.0 mg/dL). O valor médio do colesterol total foi 208,0 (43,0) mg/dL, enquanto os valores médios das demais frações de lipoproteínas estavam dentro do normal. A média da glicemia sérica também estava pouco acima do normal. Os valores séricos médios de albumina, TSH e T4 livre estavam normais.

Utilizando os critérios da ISCD encontramos osteopenia em 40,1% (mulheres: 47,4% e homens: 52,6%), osteoporose em 46,1% (mulheres: 71,3% e homens: 28,7%) e 13,8% foram considerados normais (mulheres: 47,3% e homens: 52,7%). Os dados da densidade mineral óssea e T-score da coluna lombar, colo do fêmur e fêmur total são encontrados na Tabela 3.

No que concerne a fraturas osteoporóticas, 13% relataram fraturas prévias por fragilidade e fraturas vertebrais foram observadas em 13% da população estudada. História familiar de fratura de quadril foi evidenciada em 7,0% dos indivíduos.

O escore de CAA foi diretamente correlacionado à idade ($r=0,21$, $p<0,001$), fósforo sérico ($r=0,13$, $p<0,001$), LDL-c ($r=0,10$, $p=0,006$), e triglicerídeos ($r=0,07$, $p=0,04$) e foi inversamente correlacionado ao IMC ($r=-0,07$, $p=0,03$), DMO do colo do fêmur ($r=-0,14$, $p<0,001$) e DMO do fêmur total ($r=-0,16$, $p<0,001$). Em relação às variáveis binárias o escore de CAA foi significativamente associado à fratura prévia por fragilidade ($p=0,004$), tabagismo atual ($p=0,002$), baixa atividade física ($p=0,03$), história de queda ($p=0,007$) e hipertensão arterial ($p=0,001$) (Tabelas 4.1 e 4.2). Não houve associação entre o escore de CAA e fraturas vertebrais.

Tabela 4.1: Associação entre o escore de calcificação de aorta abdominal (escore CAA) e as variáveis antropométricas, laboratoriais e densitométricas (variáveis contínuas)

Variáveis Contínuas	Escore CAA Correlação de Pearson	P
Idade, anos	0,21	<0,001 [♦]
IMC, kg/m ²	-0,07	0,03 [♦]
Cálcio, mg/dL	0,06	0,114
Fósforo, mg/dL	0,13	<0,001 [♦]
PTH, pg/dL	0,03	0,352
25-OHD, ng/mL	-0,002	0,948
LDL-colesterol, mg/dL	0,10	0,006 [♦]
Triglicérides, mg/dL	0,07	0,04 [♦]
Colo de fêmur DMO, g/cm ²	-0,14	<0,001 [♦]
Colo de fêmur Índice-T	-0,10	0,003 [♦]
Fêmur total DMO, g/cm ²	-0,16	<0,001 [♦]
Fêmur total Índice-T	-0,13	<0,001 [♦]

Os valores são expressos como r.

[♦] $P < 0,05$

Tabela 4.2: Associação entre o escore CAA e as variáveis demográficas e clínicas (variáveis binárias)

Variáveis Binárias	Escore CAA Média (DP)	P
Raça **		
Branços	5,2 (6,1)	0,001 [♦]
Não-branços	3,7 (5,4)	
Asiáticos	3,5 (4,5)	
Baixa atividade física *		
Não	4,5 (5,8)	0,03 [♦]
Sim	5,9 (6,4)	
Fratura prévia fragilidade *		
Não	4,4 (5,7)	0,004 [♦]
Sim	6,1 (6,5)	
Quedas *		
Não	4,3 (5,6)	0,007 [♦]
Sim	5,5 (6,3)	
Tabagismo atual *		
Não	4,5 (5,8)	0,002 [♦]
Sim	6,3 (6,2)	
Hipertensão Arterial *		
Não	3,8 (5,2)	0,001 [♦]
Sim	5,2 (6,2)	
Diabetes Mellitus *		
Não	4,6 (5,8)	0,498
Sim	4,9 (6,1)	
Evento Cardiovascular *		
Não	4,6 (5,8)	0,244
Sim	5,4 (6,5)	

Os valores são expressos como médias (DP).

* Testes Mann-Whitney, ** Kruskal-Wallis.

[♦] $P < 0,05$.

Na análise de regressão linear múltipla da população foram incluídas as variáveis que se mostraram significantes na análise univariada (idade, IMC, atividade física, fratura prévia por fragilidade, história de queda, tabagismo atual, hipertensão arterial, fósforo sérico, LDL-c, triglicerídeos), a DMO e o Índice-T do colo do fêmur e fêmur total foram analisados separadamente. O melhor modelo de regressão linear múltipla mostrou que o escore de CAA foi diretamente relacionado à idade ($p<0,001$), tabagismo atual ($p<0,001$), hipertensão arterial ($p=0,002$), fósforo sérico ($p=0,005$), LDL-c ($p=0,05$), triglicerídeos ($p=0,002$) e foi inversamente associado à DMO do fêmur total ($p<0,001$) nesta população (Tabela 5). Foi realizada a distribuição de resíduos para a adequação do modelo final de regressão linear.

Tabela 5: Modelo de regressão linear múltipla para escore de CAA.

Variáveis	Coeficiente	Erro Padrão	P	R ²
Fósforo	1.06	0.37	0.004	0.113
DMO Fêmur total (x10)	-0.42	1.35	0.002	

O modelo foi ajustado para idade, tabagismo atual, HAS, creatinina, triglicérides e LDL-c.

O fósforo sérico foi dividido em categorias e analisado com as médias do escore de CAA (Figura 1). Um aumento no escore de CAA foi observado com a elevação dos valores séricos de fósforo [$\leq 2,4$ mg/dL: escore de CAA = 1,9 (DP: 3,9); 2,5-3,5 mg/dL: escore de CAA = 4,5 (DP: 5,6) e $>3,5$ mg/dL: escore de CAA = 5,3 (DP: 6,3), $p=0,003$] (Figura 1).

Figura 1: Médias e erros padrão do escore de CAA para cada categoria de fósforo sérico

Além disso, as concentrações séricas de fósforo foram significativamente elevadas nos indivíduos com história prévia de fratura por fragilidade comparados àqueles sem fraturas [3,5 (0,41) vs. 3,32 (0,53), $p < 0,001$].

5 Discussão

Este estudo mostrou que maiores valores de fósforo sérico e baixa DMO do quadril foram importantes fatores de risco para a calcificação da aorta abdominal em idosos da comunidade.

Este é o primeiro estudo epidemiológico que analisou a CAA em brasileiros, uma população miscigenada, ampliando resultados prévios em caucasianos e em outras populações de etnias específicas (Choi et al., 2009; Hmamouchi et al., 2009). As vantagens deste estudo incluem uma bem caracterizada amostra de idosos, diferentemente de outros estudos que avaliaram adultos jovens (Foley et al., 2009) e indivíduos de meia idade (Choi et al., 2009). A exclusão de indivíduos em uso de substâncias que afetam o metabolismo ósseo ou lipídico evitou a análise de dados influenciados pelo efeito protetor desses fármacos. Várias evidências *in vivo* e *in vitro* sugerem efeitos anabólicos das estatinas no metabolismo ósseo (Tanq et al., 2008), assim como a sinvastatina já mostrou reduzir calcificação vascular de coronárias e de aorta abdominal (Terry et al., 2007). Além disso, indivíduos com outras importantes variáveis de confusão na avaliação de CAA, como insuficiência renal crônica e hiperparatireoidismo, também foram excluídos (Coen et al., 2009). Em estudos anteriores, a inclusão de indivíduos com essas condições impossibilita uma análise mais fidedigna dos resultados encontrados (Rubin et al., 2007; Wang et al., 2010).

Neste estudo a calcificação da aorta foi avaliada por radiografias convencionais de coluna lombar, uma metodologia mais simples e amplamente utilizada. Atualmente há técnicas mais precisas e modernas como tomografia computadorizada helicoidal ou com feixe de elétrons (*electron beam*), no entanto, são exames pouco acessíveis na prática clínica e a sua reprodutibilidade não tem sido demonstrada (Jayalath et al., 2005). Além disso, a avaliação quantitativa de CAA tem uma sensibilidade muito maior àquelas avaliações que determinam apenas ausência ou presença de placas calcificadas em radiografias simples convencionais (Jayalath et al., 2005; Frye et al., 1992).

Alguns bem estabelecidos fatores de risco para doença cardiovascular (Fruchart et al., 2004), como altas concentrações séricas de triglicerídeos e LDL-c, além de tabagismo atual, também mostraram ser fatores de risco independentes relacionados à CAA neste estudo.

Osteoporose e calcificação vascular, duas condições diretamente relacionadas à senilidade, possuem fatores patogênicos em comum (Yao et al., 2010; Tyson et al., 2003; Heiss et al., 2008; Holt et al., 2009; Bostrom et al., 1993; Herrmann et al., 2000; Jono et al., 2004; Luo et al., 1997; Bucay et al., 1998; Kuro-o et al., 1997). A presença de proteínas ósseas como osteopontina, osteocalcina e BMP em lesões calcificadas reforça o papel osteogênico no processo de calcificação vascular (Yao et al., 2010; Tyson et al., 2003; Luo et al., 1997). Substâncias inibidoras da mineralização como MGP e osteopontina foram encontradas em células da parede vascular, e a perda da função inibitória destas substâncias pode desencadear o processo de calcificação vascular (Yao et al., 2010; Holt et al., 2009).

A elevação do fósforo sérico poderia levar à formação de cristais pelo depósito de apatita, o que exacerbaria a calcificação vascular iniciada pelos mecanismos anteriormente descritos (Sage et al., 2010). De fato, em renais crônicos, o fósforo sérico está associado à calcificação vascular (Coen et al., 2009), e estudos experimentais *in vitro* demonstraram que a hiperfosfatemia aumenta a expressão de genes osteocondrogênicos em células da musculatura lisa dos vasos. Com relação a esses resultados, é relevante comentar que a população brasileira apresenta alta ingestão de fósforo na dieta (Pinheiro et al., 2009), e esta ingestão crônica poderia influenciar os achados de calcificação vascular observados nos idosos da comunidade neste estudo.

Um estudo recente demonstrou uma associação entre maiores concentrações séricas de fósforo, ainda que dentro dos limites de normalidade, e calcificação valvular e anular aórticas, também sugerindo que o fósforo sérico seja um fator de risco para calcificação, neste estudo para doença da valva aórtica calcificada (Linefsky et al., 2011).

Adicionalmente, encontramos uma associação entre maiores valores de fósforo sérico e fratura prévia por fragilidade. Esta associação tem sido descrita em indivíduos com falência renal (Jadoul et al., 2006; Block et al., 2004) e uma dieta rica em fósforo foi associada a fraturas por fragilidade na população brasileira (Pinheiro et al., 2009).

A relação entre CAA e história prévia de fraturas por fragilidade observada em nosso estudo na análise univariada, ainda é controversa na literatura. Schulz (2004) demonstrou alto risco de fratura por fragilidade na

região de coluna lombar e quadril em indivíduos com calcificação de aorta, comparados àqueles sem esta complicação (Schulz et al., 2004). Uma associação apenas com fraturas de quadril foi descrita por Bagger (2006) (Bagger et al., 2006). Entretanto, no estudo de Framingham não foi evidenciado qualquer associação entre CAA e fraturas por fragilidade (Samelson et al., 2007). A presença de quedas nesta população pode ser um fator de confusão, já que os reflexos em indivíduos idosos são mais reduzidos, especialmente naqueles com alterações cardiovasculares como arritmias e hipotensão (Szulc et al., 2008).

Neste estudo a calcificação vascular foi associada à DMO de quadril (colo de fêmur e fêmur total) e o melhor modelo foi aquele que incluiu os valores de fêmur total. Alguns elementos que determinam imagens superpostas na densitometria podem explicar a ausência de associação entre DMO de coluna lombar e CAA. Além da própria calcificação da aorta abdominal, a existência de doença degenerativa na coluna lombar (osteoartrite), achado muito comum em idosos, pode superestimar os resultados da DMO lombar (Muraki et al., 2004).

Segundo a literatura, a média do escore de CAA observada no nosso estudo (4,68) pode estar associada a um alto risco de mortalidade. Tem sido demonstrado que escores de CAA acima de 2 implicam em um aumento do risco de morte, e escores de 3 a 6 praticamente dobram este risco (Szulc et al., 2008). Além disso, quando avaliamos os coeficientes β da análise de regressão linear, podemos observar que a presença de tabagismo atual acrescido à hipertensão arterial e à elevação de 1 mg/dL do fósforo sérico,

aumentam o escore de calcificação em 4,53 pontos, reforçando a relevância clínica dos achados deste estudo.

Por ser um corte transversal este estudo tem limitações, e não permite fazer uma avaliação causa-efeito entre a calcificação vascular e os fatores de risco encontrados.

6 Conclusão

A prevalência de calcificação de aorta abdominal na população estudada de idosos da comunidade foi de 63,2%.

Dentre os marcadores de metabolismo ósseo estudados, fósforo e densidade mineral óssea foram associados à calcificação de aorta abdominal. Maiores valores de fósforo sérico e baixa DMO de fêmur foram fatores de risco independentes associados à CAA.

Estes resultados reforçam a importância de pesquisas que identifiquem medidas preventivas e terapêuticas que poderiam, simultaneamente, reduzir e modificar esses fatores de risco em indivíduos idosos.

7 Referências

American Diabetes Association: Diabetes Care (2006) 29(suppl 1):s43-s48

Angbratt M & Möller M (1999) Questionnaire about calcium intake: can we trust the answers? *Osteoporos Int* 9:220-5

Bagger YZ, Rasmussen HB, Alexandersen P, Werge T, Christiansen C, Tankó LB, PERF study group (2006) Links between cardiovascular disease and osteoporosis in postmenopausal women: serum lipids or atherosclerosis per se? *Osteoporos Int* 18(4):505-12

Bauer DC, Palermo L, Black D, Cauley JA; Study of Osteoporotic Fractures Research Group: Universities of California (San Francisco), Pittsburgh, Minnesota (Minneapolis), and Kaiser Center for Health Research, Portland (2002) Quantitative ultrasound and mortality: a prospective study. *Osteoporos Int* 13(8):606-12

Becker C, Crow S, Toman J, Lipton C, McMahon DJ, Macaulay W, Siris E (2005) Characteristics of elderly patients admitted to an urban tertiary care hospital with osteoporotic fractures: correlations with risk factors, fracture type, gender and ethnicity. *Osteoporos Int* 8:1-7

Binkley N, Bilezikian JP, Kendler DL, Leib ES, Lewiecki EM, Petak SM; International Society for Clinical Densitometry (2006) Official Positions of the International Society for Clinical Densitometry and Executive Summary of the 2005 Position Development Conference. *J Clin Densitom* 9(1):4-14

Block GA, Klassen PS, Lazarus JM, Ofsthun N, Lowrie EG, Chertow GM (2004) Mineral metabolism, mortality, and morbidity in maintenance hemodialysis. *J Am Soc Nephrol* 15:2208–18

Bostrom K, Watson KE, Horn S, Wortham C, Herman IM, Demer LL (1993) Bone morphogenetic protein expression in human atherosclerotic lesions. *J Clin Invest* 91:1800-09

Bucay N, Sarosi I, Dunstan CR, Morony S, Tarpley J, Capparelli C, Scully S, Tan HL, Xu W, Lacey DL, Boyle WJ, Simonet WS (1998) Osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. *Genes Dev* 12:1260-68

Burke AP, Taylor A, Farb A, Malcom GT, Virmani R (2000) Coronary calcification: insights from sudden coronary death victims. *Z Kardiol* 89(Suppl 2):49-53

Chobanian AV, Bakris GL, Black HR, Cushman WC, Green LA, Izzo JL Jr, Jones DW, Materson BJ, Oparil S, Wright JT Jr, Roccella EJ; National Heart, Lung, and Blood Institute Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure; National High Blood Pressure Education Program Coordinating Committee (2003) The seventh report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation and Treatment of high blood pressure: the JNC 7 report. *JAMA* 289:2560-72

Choi SH, An JH, Lim S, Koo BK, Park SE, Chang HJ, Choi SI, Park YJ, Park KS, Jang HC, Shin CS (2009) Lower bone mineral density is associated with higher coronary calcification and coronary plaque burdens by multidetector row coronary computed tomography in pre- and postmenopausal women. *Clin Endocrinol* 71:644-51

Cockcroft DW, Gault MH (1976) Prediction of creatinine clearance from serum creatinine. *Nephron* 16:31-41

Coen G, Ballanti P, Mantella D, Manni M, Lippi B, Pierantozzi A, Di Giulio S, Pellegrino L, Romagnoli A, Simonetti G, Splendiani G (2009) Bone turnover, osteopenia and vascular calcifications in hemodialysis patients. *Am J Nephrol* 29:145-52

Edmonds ME, Morrison N, Laws JW, Watkins PJ (1982) Medial arterial calcification and diabetic neuropathy. *Br Med J (Clin Res Ed)* 284:928-30

Ehara S, Kobayashi Y, Yoshiyama M, Shimada K, Shimada Y, Fukuda D, Nakamura Y, Yamashita H, Yamagishi H, Takeuchi K, Naruko T, Haze K, Becker AE, Yoshikawa J, Ueda M (2004) Spotty calcification typifies the culprit plaque in patients with acute myocardial infarction: an intravascular ultrasound study. *Circulation* 110(22):3424-29

El-Abbadi M, Giachelli C (2007) Mechanisms of vascular calcification. *Adv Chronic Kidney Dis* 14:54-66

Fitti JE, Kovar M (1997) The supplement on aging to the 1984 national health interview survey. *Vital Health Stat* 1:1-115

Foley RN, Collins AJ, Ishani A, Kalra PA (2009) Calcium-phosphate levels and cardiovascular disease in community-dwelling adults: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *Am Heart J* 156:556-63

Fruchart JC, Nierman M, Stroes E, Kastelein J, Duriez P (2004) New risk factors for atherosclerosis and patient risk assessment. *Circulation* 109(23):III_15-19

Frye MA, Melton LJ 3rd, Bryant SC, Fitzpatrick LA, Wahner HW, Schwartz RS, Riggs BL (1992) Osteoporosis and calcification of the aorta. *Bone Miner.* 19(2):185-94

Fuchs SC, Guimarães SM, Sortica C, Wainberg F, Dias KO, Ughini M, Castro JA, Fuchs FD (2002) Reliability of race assessment based on the race of the ascendants: a cross-sectional study. *BMC Public Health* 2:1-5

Genant HK, Wu CY, van Kujik C, Nevitt MC (1993) Vertebral fracture assessment using a semiquantitative technique. *J Bone Miner Res* 8:1137-48

Giachelli CM (2004) Vascular calcification mechanisms. *J Am Soc Nephrol* 15:2959-64

Hunt JL, Fairman R, Mitchell ME, Carpenter JP, Golden M, Khalapyan T (2002) Bone formation in carotid plaques: a clinicopathological study. *Stroke* 33:1214-9

Heiss A, Eckert T, Aretz A, Richtering W, van Dorp W, Schäfer C, Jähnen-Dechent W (2008) Hierarchical role of fetuin-A and acidic serum proteins in the formation and stabilization of calcium phosphate particles. *J Biol Chem* 283(21):14815-25

Herrmann SM, Whatling C, Brand E, Nicaud V, Gariepy J, Simon A, Evans A, Ruidavets JB, Arveiler D, Luc G, Tiret L, Henney A, Cambien F (2000) Polymorphisms of the human matrix gla protein (MGP) gene, vascular calcification, and myocardial infarction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20:2386-93

Hmamouchi I, Allali F, Khazzani H, Bennani L, El Mansouri L, Ichchou L, Cherkaoui M, Abouqal R, Hajjaj-Hassouni N (2009) Low bone mineral density is related to atherosclerosis in postmenopausal Moroccan women. *BMC Public Health* 9:388-95

Holt C, Sorensen ES, Clegg RA (2009) Role of calcium phosphate nanoclusters in the control of calcification. *FEBS J* 276(8):2308-23

Iribarren C, Sidney S, Sternfeld B, Browner WS (2000) Calcification of the aortic arch: risk factors and association with coronary heart disease, stroke, and peripheral vascular disease. *JAMA* 283(21):2810-15

Jadoul M, Albert JM, Akiba T, Akizawa T, Arab L, Bragg-Gresham JL, Mason N, Prutz KG, Young EW, Pisoni RL (2006) Incidence and risk factors for hip or other bone fractures among hemodialysis patients in the Dialysis Outcomes and Practice Patterns Study. *Kidney Int* 70:1358–66

Jayalath RW, Mangan SH, Golledge J (2005) Aortic calcification. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 30:476-88

Jono S, Ikari Y, Vermeer C, Dissel P, Hasegawa K, Shioi A, Taniwaki H, Kizu A, Nishizawa Y, Saito S (2004) Matrix Gla protein is associated with coronary artery calcification as assessed by electron-beam computed tomography. *Thromb Haemost* 91:790-4

Jorde R, Sundsfjord J, Fitzgerald P, Bonna KH (1999) Serum calcium and cardiovascular risk factors and diseases: the Tromso study. *Hypertension* 34:484-90

Kauppila LI, Polak JF, Cupples LA, Hannan MT, Kiel DP, Wilson PW (1997) New indices to classify location, severity and progression of calcific lesions in the abdominal aorta: a 25-year follow-up study. *Atherosclerosis* 132:245-50

Kanis JA, Johansson H, Johnell O, Oden A, De Laet C, Eisman JA, Pols H, Tenenhouse A (2005) Alcohol intake as a risk factor for fracture. *Osteoporos Int* 16(7):737-42

Kiel DP, Kauppila LI, Cupples LA, Hannan MT, O'Donnell CJ, Wilson PW (2001) Bone loss and the progression of abdominal aortic calcification over a 25 year period: the Framingham Heart Study. *Calcif Tissue Int* 68:271-6

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 YI (1997) Mutation of the mouse *klotho* gene leads to a syndrome resembling ageing. *Nature* 390:45-51

Li ZY, Howarth S, Tang T, Graves M, U-King-Im J, Gillard JH (2007) Does calcium deposition play a role in the stability of atheroma? Location may be the key. *Cerebrovasc Dis* 24(5):452-9

Libby, P (2002) Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 420(6917):868-74

Linefsky JP, O'Brien KD, Katz R, de Boer IH, Barasch E, Jenny NS, Siscovick DS, Kestenbaum B (2011) Association of serum phosphate levels with aortic valve sclerosis and annular calcification: the cardiovascular healthy study. *J Am Coll Cardiol* 58(3):291-7

Locker TH, Schwartz RS, Cotta CW, Hickman JR Jr (1992) Fluoroscopic coronary artery calcification and associated coronary disease in asymptomatic young men. *J Am Coll Cardiol* 19(6):1167-72

Lopes JB, Danilevicius CF, Takayama L, Caparbo VF, Menezes PR, Scazufca M, Kuroishi ME, Pereira RM (2011) Prevalence and risk factors of radiographic vertebral fracture in Brazilian community-dwelling elderly. *Osteopor Int*;22(2):711-9

Luo G, Ducky P, McKee MD, Pinero GJ, Loyer E, Behringer RR, Karsenty G (1997) Spontaneous calcification of arteries and cartilage in mice lacking matrix GLA protein. *Nature* 386:78-81

Micheletti RG, Fishbein GA, Currier JS, Fishbein MC (2008) Monckeberg sclerosis revisited: a clarification of the histologic definition of Monckeberg sclerosis. *Arch Pathol Lab Med* 132:43-7

Miyaura C, Kusano K, Masuzawa T, Chaki O, Onoe Y, Aoyagi M, Sasaki T, Tamura T, Koishihara Y, Ohsugi Y, Suda T (1995) Endogenous bone-resorbing factors in estrogen deficiency: cooperative effects of IL-1 and IL-6. *J Bone Miner Res* 10(9):1365-73

Mody N, Parhami F, Sarafian TA, Demer LL (2001) Oxidative stress modulates osteoblastic differentiation of vascular and bone cells. *Free Radic Biol Med* 31(4):509-19

Muraki S, Yamamoto S, Ishibashi H, Horiuchi T, Hosoi T, Orimo H, Nakamura K (2004) Impact of degenerative spinal diseases on bone mineral density of the lumbar spine in elderly women. *Osteoporos Int* 15: 724-8

Naves M, Rodríguez-García M, Díaz-López JB, Gómez-Alonso C, Cannata-Andía JB (2008) Progression of vascular calcifications is associated with greater bone loss increased bone fractures. *Osteoporos Int* 19:1161-6

NCEP - Third Report of the National Cholesterol Education Program. Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) (2001) *JAMA* 285(19):2486-97

National Osteoporosis Foundation (NOF) (2003) Physician's guide to prevention and treatment of osteoporosis. 2nd ed. Washington, D.C.: National Osteoporosis Foundation

Papadopouli AE, Klonaris CN, Theocharis SE (2008) Role of OPG/RANKL/RANK axis on the vasculature. *Histol Histopathol* 23(4):497-506

Pfeilschifter J, Koditz R, Pfohl M, Schatz H (2002) Changes in proinflammatory cytokine activity after menopause. *Endocr Rev* 23(1):90-119

Pinheiro MM, Castro CM, Szejnfeld VL (2006) Low femoral bone mineral density and quantitative ultrasound are risk factors for new osteoporotic fracture and total and cardiovascular mortality: a 5-year population-based study of Brazilian elderly women. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 61(2):196-203

Pinheiro MM, Schuch NJ, Genaro PS, Ciconelli RM, Ferraz MB, Martini LA (2009) Nutrient intakes related to osteoporotic fractures in men and women – the Brazilian Osteoporosis Study (BRAZOS). *Nutr J* 8:6-8

Rubin MR, Rundek T, McMahon DJ, Lee HS, Sacco RL, Silverberg SJ (2007) Carotid artery plaque thickness is associated with increased serum calcium levels: the Northern Manhattan study. *Atherosclerosis* 194:426-32

Sage AP, Tintut Y, Demer LL (2010) Regulatory mechanisms in vascular calcification. *Nat Rev Cardiol* 7(9):528-36

Samelson EJ, Cupples LA, Broe KE, Hannan MT, O'Donnell CJ, Kiel DP (2007) Vascular calcification in middle age and long-term risk of hip fracture: the Framingham Study. *J Bone Miner Res* 22(9):1449-54

Santos RD, Nasir K, Rumberger JA, Budoff MJ, Braunstein JB, Meneghelo R, Barreiros M, Pereirinha A, Carvalho JA, Blumenthal RS, Raggi P (2006) Difference in atherosclerosis burden in different nations and continents assessed by coronary artery calcium. *Atherosclerosis* 187:378-84

Schulz E, Arfai K, Liu X, Sayre J, Gilsanz V (2004) Aortic calcification and the risk of osteoporosis and fractures. *J Clin Endocrinol Metab* 89(9):4246-53

Schwartz AV, Villa ML, Prill M, Kelsey JA, Galinus JA, Delay RR, Nevitt MC, Bloch DA, Marcus R, Kelsey JL (1999) Falls in older Mexican - American women. *J Am Geriatr Soc* 47:1371-8

Seeley DG, Browner WS, Nevitt MC, Genant HK, Scott JC, Cummings SR (1991) Which fractures are associated with low appendicular bone mass in elderly women? The study of Osteoporotic Fractures Research Group. *Ann Int Med* 115:837-42

Shepherd JA, Lu Y, Wilson K, Fuerst T, Genant H, Hangartner TN, Wilson C, Hans D, Leib ES; International Society for Clinical Densitometry Committee on Standards of Bone Measurement (2006) Cross-calibration and minimum precision standards for dual-energy x-ray absorptiometry: the 2005 ISCD official positions. *J Clin Densitom* 9:31-6

Szulc P, Kiel DP, Delmas PD (2008) Calcifications in the abdominal aorta predict fractures in men: MINOS study. *J Bone Miner Res* 23(1):95-102

Tanq QO, Tran GT, Gamie Z, Graham S, Tsialogiannis E, Tsiridis E, Linder T, Tsiridis E (2008) Statins: under investigation for increasing bone mineral density and augmenting fracture healing. *Expert Opin Investig Drugs* 17(10):1435-63

Tekin GO, Kekilli E, Yagmur J, Uckan A, Yagmur C, Aksoy Y, Turhan H, Yetkin E (2008) Evaluation of cardiovascular risk factors and bone mineral density in postmenopausal women undergoing coronary angiography. *Int J Cardiol* 131(1):66-9

Terry JG, Carr JJ, Kouba EO, Davis DH, Menon L, Bender K, Chandler ET, Morgan T, Crouse JR 3rd (2007) Effect of simvastatin (80 mg) on coronary and abdominal aortic arterial calcium (from the coronary artery calcification treatment with zocor [CATZ] study). *Am J Cardiol* 99(12):1714-7

Tintut Y, Patel J, Territo M, Saini T, Parhami F, Demer LL (2002) Monocyte/macrophage regulation of vascular calcification in vitro. *Circulation* 105(5):650-5

Tyson KL, Reynolds JL, McNair R, Zhang Q, Weissberg PL, Shanahan CM (2003) Osteo/chondrocytic transcription factors and their target genes exhibit distinct patterns of expression in human arterial calcification. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23(3):489-94

Verberckmoes SC, Persy V, Behets GJ, Neven E, Hufkens A, Zebger-Gong H, Müller D, Haffner D, Querfeld U, Bohic S, De Broe ME, D'Haese PC (2007) Uremia-related vascular calcification: more than apatite deposition. *Kidney Int* 71:298-303

von der Recke P, Hansen MA, Hassager C (1999) The association between low bone mass at the menopause and cardiovascular mortality. *Am J Med* 106:273-8

Wang TK, Bolland MJ, Pelt NC, Horne AM, Mason BH, Ames RW, Grey AB, Ruygrok PN, Gamble GD, Reid IR (2010) Relationships between vascular calcification, calcium metabolism, bone density and fractures. *J Bone Miner Res* 12:2501-9

Wayhs R, Zelinger A, Raggi P (2002) High coronary artery calcium scores pose an extremely elevated risk for hard events. *J Am Coll Cardiol* 39:225-30

Wilson PWF, Kauppila LI, O'Donnell CJ, Kiel DP, Hannan M, Polak JM, Cupples LA (2001) Abdominal aortic calcific deposits are an important predictor of vascular morbidity and mortality. *Circulation* 103:1529-34

Yao Y, Bennett BJ, Wang X, Rosenfeld ME, Giachelli C, Lusis AJ, Boström AI (2010) Inhibition of bone morphogenetic proteins protects against atherosclerosis and vascular calcification. *Circ Res* 107(4):485-94

Apêndice

ARTIGO ENVIADO PARA PUBLICAÇÃO

Serum phosphate and hip BMD: additional factors in vascular calcification in community-dwelling older population

Camille P. Figueiredo¹, Jaqueline B. Lopes¹, Valeria F. Caparbo¹, Liliam Takayama¹, Márcia E. Kuroishi², Ilka R. S. de Oliveira², Paulo R. Menezes³, Márcia Scazufca⁴, Eloisa Bonfá¹, Rosa M. R. Pereira¹.

¹Bone Metabolism Laboratory, Rheumatology Division, ²Radiology Division of Hospital Universitario, ³Department of Preventive Medicine, and

⁴Departament of Psychiatry, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil

Funding

FAPESP: #03/09313-0 and #04/12694-8

CNPQ: #305691/2006-6; #300559/2009-7 (RMRP)

CAPES: CPF and JBL

Corresponding author:

Rosa M R Pereira

Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Reumatologia

Av. Dr. Arnaldo, 455, 3º andar, sala 3105

São Paulo, SP, 01246-903, Brazil

Telephone: +55-11-30617213

Fax: +55-11-30617490

E-mail: rosamariarp@yahoo.com

ABSTRACT

OBJECTIVE: To analyze abdominal aortic calcification (AAC) and its possible association with bone mineral density (BMD) as well as the clinical and laboratory data.

DESIGN: Cross-sectional

SETTING: Population-based sample of older men and women living in Brazil, 2005 to 2007.

PARTICIPANTS: Eight hundred and fifteen subjects ≥ 65 years old.

MEASUREMENTS: The risk factors for osteoporosis and cardiovascular disease, demographic data and lifestyle characteristics were collected using a standardized questionnaire. BMD was measured by DXA. Kauppila's method was used to quantify the AAC score (AACS) by spine X-rays. Laboratory analyses were also performed.

RESULTS: AAC was observed in 63.2% of subjects with a mean AACS of 4.68 (5.88). AACS was directly correlated with age, phosphorus, LDL-cholesterol, triglycerides, and inversely correlated with body mass index, femoral neck BMD and total femur BMD ($p < 0.05$). Regarding binary variables, the AACS was associated with previous fragility fractures, current smoking, low physical activity, falls and arterial hypertension ($p < 0.05$). Multiple linear regression analysis demonstrated that the AACS was positively associated with age ($p < 0.001$), current smoking ($p < 0.001$), arterial hypertension ($p = 0.002$), LDL-C ($p = 0.05$), triglycerides ($p = 0.002$), phosphate ($p = 0.005$) and negatively associated with total femur BMD ($p < 0.001$). An

increased of AACCS was observed with the elevation of serum phosphorus levels [$\leq 2.4\text{mg/dL}$: AACCS=1.9 (SD:3.9); $2.5\text{-}3.5\text{mg/dL}$: AACCS=4.5 (SD:5.6) and $> 3.5\text{mg/dL}$: AACCS=5.3 (SD:6.3), $p=0.003$].

CONCLUSIONS: Our study identified serum phosphate and hip BMD as additional players in the complex process of vascular calcification outside the setting of kidney failure in community-dwelling older population and extended the previous observations of well-known risk factors for cardiovascular disease.

Key words: phosphate; bone mineral density; vascular calcification; community

INTRODUCTION

Osteoporosis and atherosclerosis are common age-related conditions that account for two major worldwide public health problems (1). As life expectancy continues to increase, the prevalence of these two processes will raise accordingly (2). A direct relationship between vascular calcification and the severity of atherosclerotic disease has been reported (3).

Several epidemiological and clinical studies suggest a link between osteoporosis and vascular calcification (4-6). Von der Recke et al. analyzing two groups of healthy post-menopausal women who were followed between 1977 and 1988 showed that low bone mineral content at menopause was a risk factor for increased mortality in later life, especially from mortality related to cardiovascular disease (4). Longitudinal analysis of bone mineral density (BMD) and vascular calcification over a 25-year period in the Framingham Heart Study demonstrated an association between bone loss and the progression of atherosclerotic aortic calcification in women (5).

Experimental evidence also showed that some of the pathophysiological mechanisms underlying osteoporosis and vascular calcification seems to coincide in many biochemical pathways (7). Some mediators of bone mineral metabolism have also been associated with vascular calcification, including the osteoprotegerin (OPG)/ receptor activator of nuclear factor kappa B (RANK)/RANK-ligand (RANKL) axis, bone morphogenetic proteins (BMP), matrix Gla protein (MGP), fetuin-A and osteopontin (8-12). The BMP-2, for example, is expressed in myofibroblasts and may play a role in the vessel wall calcification by stimulating the

expression of Runx-2, a key molecule in osteoblastic differentiation. MGP seems to be involved in these processes since MGP inhibits BMP activity (13). In fact, clinical studies showed that MGP polymorphisms were associated with an increased risk of myocardial infarction and vascular calcification of femoral arteries (14) and serum MGP levels are inversely correlated with the severity of coronary artery calcification (15). Moreover, experimental studies on MGP knockout mice have shown the formation of extensive and lethal arterial calcifications. These animals also presented osteopenia, fractures, short stature, and erratic mineralization of the growth plates (16).

Furthermore, knockout mouse models with targeted deletion of others bone-related genes yielded a combined skeletal and vascular phenotype, like OPG knockout mice and the mouse models with Klotho protein mutations (17-18). The klotho mutant mouse develops extensive vascular calcifications and has higher serum phosphate levels than those of wild-type mice (18). High serum phosphate in uremic patients is a risk factor for vascular calcifications (19). Thus, it has been hypothesized that serum phosphate is an additional important regulator of vascular calcification. The few available studies in humans suggest that serum phosphate may be linked to increased carotid artery plaque thickness (20), increased cardiovascular events and mortality in the general population (21-22).

Abdominal aortic calcification (AAC) detected on spinal X-rays has been associated with a higher risk of cardiovascular events and death (23-24). The association between AAC and BMD is controversial since the

reported inverse relationship did not persist after adjustments for age or other covariates (25).

Importantly, most of the vascular calcification studies have been conducted in patients of North American or European descent (5-6), and a clear association with ethnic background has been reported (26) precluding a definitive conclusions to be applied to miscegenated populations. Other possible confounding variables in previous studies are selection bias of referral for clinical testing (19, 27) and the inclusion of uremic patients (6, 20, 23).

Therefore, the aim of this study was to evaluate AAC and its possible association with BMD, clinical and laboratory data in a well-characterized Brazilian older community-dwelling population.

METHODS

Subjects

This study was based on data from the São Paulo Aging & Health Study (SPAH). Full details regarding the study population and the assessments and procedures have been previously reported (28). Briefly, between 2003 and 2005, all persons aged 65 years and older who were residents of 66 predefined census sectors in the West region of the city of São Paulo, Brazil, known as Butantã, were identified through door-to-door household visits within the census sector boundaries and invited to participate in the study. Of 2266 eligible individuals, 2072 (91.4%) agreed to participate in the first phase of the study. Over a two-year follow-up period between 2005 and 2007, the participants were followed (with a 99.1% success rate), and of those who were alive (n=1733), 1368 agreed to undergo follow-up assessments. In the present investigation, only well-functioning persons were recruited, and 1020 participants were interviewed and examined in the second phase of the SPAH. Of the 1020 participants, 205 (20%) were excluded for the following reasons: 50 were using drugs or supplements that affected bone metabolism (including bisphosphonates, vitamin D and calcium), 104 were using lipid-lowering drugs or supplements, 18 had a history of previous cancer (< 5 years), 15 had primary hyperparathyroidism (serum calcium > 10.5 mg/dL and PTH > 65 pg/mL), 12 had kidney failure [estimated glomerular filtration rate (eGFR) < 15 mL/min]

and 6 had rheumatoid arthritis. Of the remaining 815 participants, 476 were women, and 339 were men.

This study was approved by the local ethics committee, and all the participants provided written informed consent.

Data collection and assessments

Each subject was interviewed by a doctor and responded to a standardized questionnaire to obtain information on the putative risk factors for cardiovascular disease and osteoporosis/fractures; these risk factors included the following: the presence of diabetes mellitus (DM), arterial hypertension, or dyslipoproteinemia; a previous history or family history of cardiovascular disease; lifestyle; previous fragility fractures; a family history of hip fracture; a history of falls during the last year; levels of physical activity; current alcohol use and smoking habits; glucocorticoid use and daily calcium intake.

Participants taking oral hypoglycemic agents or insulin or those with fasting blood glucose levels ≥ 126 mg/dL were considered to be diabetic (29).

Hypertension was defined as a medical history of hypertension, the use of anti-hypertensive medications or a systolic blood pressure > 140 mmHg and/or a diastolic blood pressure > 90 mmHg (BP) that was measured with a standard sphygmomanometer with the subject sitting for at least 5 minutes (30). Individuals with the following lipoprotein levels were identified as dyslipidemics: total cholesterol > 200 mg/dL, LDL cholesterol > 100 mg/dL,

triglycerides > 150 mg/dL or HDL cholesterol < 50 mg/dL for women and < 40 mg/dL for men (31).

All study subjects were interviewed regarding previous history of cardiovascular disease that included angina pectoris, unstable angina pectoris, myocardial infarction, congestive heart failure, transient ischemic attack and stroke. The screening for a family history of cardiovascular disease included these conditions in addition to stroke death and coronary disease death (23).

A previous fragility fracture was recorded for individuals who had experienced a fall from a standing height or less after 50 years of age and involved sites that are characteristic of bone fragility (for example, the ribs, forearm, humerus, and femur). Fractures of the face, skull, ankle, elbow and finger were not considered in this analysis (28). Individuals were questioned about their history of falls during the last year (at least one fall was considered to be positive).

An individual was deemed to be an alcohol user when current intake exceeded three units of alcohol per day. Glucocorticoid use was defined as prednisone treatment of more than 5 mg/day for 3 or more consecutive months.

A quantitative questionnaire resembling the National Health Interview Survey was also used to evaluate the physical activity of the subjects, and the results were expressed as a score ranging from 1 to 3. A score of 3 was assigned to subjects who exercised regularly (high physical activity); 2 was assigned to subjects who did not exercise regularly but participated in daily activities, such as housework, gardening, climbing or descending stairs, or

walking to work or to the bus stop (moderate physical activity); and 1 was assigned to subjects who did not participate in any of the aforementioned activities on a daily basis (low physical activity) (32). Total calcium intake was obtained when individuals were asked to quantify their consumption of milk or yogurt (mL/d) and cheese (g/d) during the 7 days prior to the interview.

Race was defined based on the self-reported race of second-generation ancestors, which is an approach that was previously used in Brazilian populations (33).

Height and weight were measured using standard clinical methods. Body mass index (BMI) was calculated as weight (kg) / height (m²).

Laboratory evaluation

Blood samples were collected under fasting conditions (between 8 and 10 a.m.) on the same day that the DXA and abdominal X-rays were obtained, and the samples were stored at -70°C for later analysis.

The serum concentrations of calcium (adjusted for the albumin concentration), phosphorus, alkaline phosphatase, creatinine, glucose, total cholesterol, HDL-cholesterol (high density lipoprotein), LDL-cholesterol (low density lipoprotein), and triglycerides were determined using standard automated laboratory methods. The estimated glomerular filtration rate (eGFR) was calculated using the Cockcroft-Gault equation (34).

The serum concentration of 25-hydroxyvitamin D (25OHD) was measured using a radioimmunoassay technique (DiaSorin, Stillwater, MN, USA) with a lower detection limit of 5 ng/mL. The intra and inter-assay

variation coefficients in our laboratory were 10.5% and 17.8%, respectively. Intact parathyroid hormone (iPTH) serum concentrations were measured by immunoradiometric assay (ELISA-PTH, CIS bio international, France), with reference variations of 11-65 pg/mL.

Bone mineral density

Bone mineral density (BMD) was measured by dual X-ray absorptiometry (DXA) using Hologic densitometry equipment (Hologic Inc. Bedford, MA, USA, Discovery model) at the following sites: lumbar spine, femoral neck, and total femur. All BMD measurements were performed by the same experienced technologist. Precision error for BMD measurements was determined based on standard International Society for Clinical Densitometry (ISCD) protocols (35). The least significant change (LSC) with 95% confidence was calculated to be 0.033 g/cm² at the lumbar spine, 0.047 g/cm² at the femoral neck, and 0.039 g/cm² for the total femur. According to International Society for Clinical Densitometry (ISCD) criteria, osteoporosis was defined as a BMD T-score $\leq$ -2.5 standard deviations (S.D.) and osteopenia as a BMD $>$ -1.0 T-score $<$ -2.5 at lumbar spine or at femoral neck or at total femur.

Assessment of Vertebral Fractures

The identification of vertebral fractures was simultaneously performed by two readers who were each experienced at this task. The readers evaluated each T4-L4 vertebral image to determine whether it contained a

fracture. Vertebral fracture was classified using a Genant semiquantitative (SQ) approach (36).

Grade 1 vertebral deformities were considered to be normal vertebrae because evidence suggests that mild deformities are caused by either normal variations or are the result of vertebral remodeling with age, and epidemiological studies rarely characterize mild deformities as “fractures”; therefore, only grade 2 (moderate) or grade 3 (severe) vertebral deformities were classified as fractures (28).

Aortic Calcification

The lateral lumbar spine radiographs were acquired to assess vertebral fractures and to quantify aortic calcification, as previously described (37). Briefly, the abdominal aortic calcium deposits index developed to grade the severity of the calcification in the aorta at the level of the first through the fourth lumbar vertebra was used. Calcific deposits were considered to be present if the densities were visible in an area that was parallel to the lumbar spine and anterior to the lower part of the spine. These calcific densities were graded on a 0 to 3 scale at each lumbar vertebrae segment: 0 denoted no aortic calcific deposits; 1 denoted small scattered calcific deposits that occupied less than one-third of the longitudinal wall of the aorta; 2 indicated that one-third or more but less than two-thirds of the longitudinal wall of the aorta was calcified; and 3 indicated that two-thirds or more of the longitudinal wall of the aorta was calcified (37).

A separate score was determined for the anterior and posterior aorta, and the values were summed across the 4 vertebrae resulting in an abdominal aortic calcium score (AACS) that ranged from 0 to 24 points.

Statistical Analysis

Results were expressed as means (standard deviation) or percentages. Diabetes mellitus, arterial hypertension, dyslipoproteinemia, previous cardiovascular event, a family history of cardiovascular disease, a previous fragility fracture, a family history of hip fracture, current tobacco use, glucocorticoid use, chronic faller and back pain were measured as binary variables.

The AACS was correlated with the clinical, laboratorial and densitometry variables using Pearson correlation and Mann-Whitney or Kruskal-Wallis or t-test analysis. Multiple linear regression models were used to identify factors that were independently associated with abdominal aortic calcification. Only the variables that were significantly ($p < 0.05$) associated with abdominal aortic calcification in the univariate analysis were included in the final analysis. Because colinearity existed between BMD sites, they were sequentially added to the regression analysis, and the best model was selected. The adequacy of the final model to the assumptions required for linear regression was examined through standard residuals distribution. The phosphorus was divided into three categories (≤ 2.4 , 2.5-3.5 and > 3.5) and observed the increase in the AACS plotting means in each category and comparing AACS between categories using Kruskal-Wallis's test. All analyses were performed using the SPSS (version 15.0) software.

RESULTS

The demographic, anthropometric and clinical characteristics of these older subjects are shown in Table 1. In terms of cardiovascular risk factors, 21.2% had diabetes, 72.5% had dyslipidemia, 63.5% had arterial hypertension, 11.5% had cardiovascular events (25.5% had angina pectoris or unstable angina pectoris; 23.4% myocardial infarction and 51.1% transient ischemic attack or stroke) and 19.6% had a family history of cardiovascular events (Table 1).

Abdominal aortic calcification was observed in 63.2% (95% CI, 59.9-66.5) of this older community population, and this rate increased with age [57.7% (65-69 yrs); 63.2% (70-79 yrs); 77.8% (>80 yrs)] with a statistical significance between the first and the third tertile of age (third age) only ($p=0.001$) (Table 2). The mean calcification score was 4.68 (5.88), with higher scores (AACS > 6) in older old persons: 65 - 69 years, (20.5%); 70 - 79 years (27.5%) and over 80 years (44.2%) (Table 2).

The laboratory data are shown in Table 3. The mean serum values of calcium, phosphorus, calcium-phosphorus product, PTH and alkaline phosphatase were within the normal range. In contrast, 25OHD levels were low, with a mean level of 19.5ng/mL, and only 12.8% of the study population presented with 25OHD levels above 30 ng/mL. The mean estimated GFR (eGFR) was 58.2 mL/min, and the mean serum creatinine was within the normal range. The mean total cholesterol level was 208.0 mg/dL, whereas the mean values of the other lipoprotein fractions were within the normal

range. The mean glycemia level was also above the normal range. Albumin, TSH and free T4 levels were normal.

Using the ISCD classification, we determined that 40.1% had osteopenia (Female: 47.4% and Male: 52.6%), 46.1% osteoporosis (Female: 71.3% and Male: 28.7%) and 13.8% had normal bone mineral densities (Female: 47.3% and Male: 52.7%). Bone mineral density and T-scores in lumbar spine (L1-L4) femoral neck and total femur are shown in Table 3.

Regarding osteoporotic fractures, 13% reported previous fragility fractures, and the main fracture sites were distal forearm (43.6%), humerus (14.5%), ribs (8.2%) and femur (7.3%). The radiographic vertebral fractures were observed in 13% of the studied population. The family history of hip fracture was found in 7.0% of subjects.

Pearson's correlation showed that AACS was directly correlated with age ($r=0.21$, $p<0.001$), phosphorus ($r=0.13$, $p<0.001$), LDL-cholesterol ($r=0.10$, $p=0.006$), and triglycerides ($r=0.07$, $p=0.04$) and was inversely correlated with BMI ($r=-0.07$, $p=0.03$), femoral neck BMD ($r=-0.14$, $p<0.001$), femoral neck T-score ($r=-0.10$, $p=0.003$), total femur BMD ($r=-0.16$, $p<0.001$) and total femur T-score ($r=-0.13$, $p<0.001$). In terms of the binary variables, after Mann-Whitney, Kruskal-Wallis or t-test analysis, the AACS was significantly associated with previous fragility fractures ($p=0.004$), current smoking ($p=0.002$), low physical activity levels ($p=0.03$), history of falls ($p=0.007$) and arterial hypertension ($p=0.001$). There was no correlation between AACS and radiographic vertebral fractures

Multiple linear regression analysis was performed using parameters that showed statistical significance in the univariate analysis (age, BMI, previous fragility fracture, current smoking, physical activity, history of falls, arterial hypertension, phosphorus, LDL-cholesterol, triglycerides) and BMD or T-scores of the femoral neck and of the total femur were analyzed separately to the regression analysis. The best multiple linear regression model revealed that AACS was positively associated with age ($p<0.001$), current smoking ($p<0.001$), arterial hypertension ($p=0.002$), phosphorus ($p=0.005$), LDL-C ($p=0.05$), triglycerides ($p=0.002$) and was negatively associated with total femur BMD ($p<0.001$) in the elderly community-dwelling population (Table 4). The assumptions required for linear regression models were fitted at final model.

The phosphorus was divided into categories and plotted the means of the AACS (Figure 1). An increased of AACS was observed with the elevation of serum phosphorus levels [≤ 2.4 mg/dL: AACS= 1.9 (SD: 3.9); 2.5-3.5 mg/dL: AACS= 4.5 (SD: 5.6) and > 3.5 mg/dL: AACS= 5.3 (SD: 6.3), $p=0.003$] (Fig.1).

Moreover, serum phosphorus levels were significant elevated in elderly individuals with history of previous fragility fractures compared to those without fractures [3.50 (0.41) vs. 3.32 (0.53), $P<0.001$].

DISCUSSION

This study identified higher serum phosphate levels and lower hip BMD as important factors in the process of abdominal aortic calcification in an older community-dwelling population.

This is the first epidemiological study in a Brazilian population that analyze AAC in a miscegenated population, confirming and extending previous data based on Caucasian or specific ethnic populations (25, 38). The advantages of this study include a well-characterized sample of older subjects in contrast to other reports that involved young adults (22) and middle-aged persons (25). Of note, the exclusion of patients who were on drugs that affect the lipid profile and bone metabolism was essential to avoid the known protective effect of these drugs. Moreover, other relevant confounding variables implicated in AAC, such as kidney failure and hyperparathyroidism, were also excluded from this study (19). The inclusion of patients with these chronic conditions in previous reports prevents definitive conclusions to be drawn from their findings (20, 39).

In our study, aortic calcification was evaluated using X-rays, which is a less sensitive but widely-used technique for analyzing vascular calcification. Currently, new and more precise techniques, such as electron beam or helical computed tomography imaging, are available, but they are less accessible in our clinical practice, and standardized protocols have not yet been established for aortic calcification measurements using these techniques. These new techniques vary widely and reliable reproducibility has not yet been demonstrated (24). The X-ray quantitative measurement has a markedly

increased sensitivity compared to the determination of the presence or absence of calcified plaques on conventional X-ray readings (24).

The well-established risk factors for cardiovascular disease (40), which include elevated triglycerides and LDL-cholesterol as well as current smoking, were also found to be independent parameters that were associated with aortic calcification in the present study.

Osteoporosis and atherosclerosis, two age-dependent conditions, have common underlying pathogenic factors (9-18). Moreover, the presence of bone proteins, such as osteopontin, osteocalcin and BMP, in calcified lesions reinforces the role of osteogenic vascular calcification in this process (9, 10, 16). Inhibitors of mineralization were found in cells of the vascular wall, and loss of inhibitor function was shown to trigger vascular calcification (9, 12).

Additionally, the elevation of serum phosphate could lead to the formation of crystals by the deposition of apatite, which exacerbates the vascular calcification that is initiated by the mechanisms described above (7). Indeed, in chronic kidney failure, serum phosphate is associated with vascular calcification (19), and *in vitro* experiments demonstrated that hyperphosphatemia increases osteochondrogenic gene expression in smooth muscle cells. In light of these findings, it may be relevant that the Brazilian population has been reported to have an elevated phosphorus intake (41), and this chronic ingestion may account for the vascular calcification observed in the community-dwelling subjects in our study.

In our study we found an association between previous fragility fracture and higher serum phosphate levels. This association has been described in

individuals with renal failure (42-43). Moreover, high phosphorus intake was also associated with fragility fractures in the Brazilian population (41).

Based on the univariate analysis, the observed association between AAC and previous fragility fractures is still controversial. In this regard, Schulz et al. (6) reported a higher risk of hip and lumbar fragility fractures in subjects with aortic calcification compared to those without this complication, whereas an association with hip fractures was only reported by Bagger et al. (27). In the Framingham Study, no relationship between ACC and fractures was demonstrated (44). Falls may be a confounding variable in this population because the reflexes of older subjects can be reduced, particularly in those with cardiovascular conditions, such as arrhythmias and hypotension (45).

AAC was associated solely with hip BMD (femoral neck or total femur) and the best model was one that included total femur. The explanation for the absence of association between lumbar BMD and vascular calcification may be due to methodological limitations of the DXA technique related to superimpose artifact of both vascular calcifications and osteoarthritic osteophytes, widely found in older subjects.

Of note, it has been demonstrated in the literature that scores values of abdominal aortic calcification over 2 implies in an increased risk of death and a score of 3-6 AAC doubled the mortality risk (45). The mean AAC score value (4.68) observed in the present study is within this high risk group. Moreover, the presence of current smoking plus arterial hypertension plus elevation of serum phosphorus by 1 mg/dL, increased the score calcification by 4.53, reinforcing the clinical relevance of our finding.

The main limitation of this study is its cross-sectional design, which does not allow the evaluation of a causal relationship between vascular calcification and the risk factors.

In conclusion, we have identified that higher serum phosphate levels and lower hip BMD are independent bone variables that are associated with vascular calcification, supporting the search for effective prevention and treatment strategies that may simultaneously reduce these modifiable risk factors in older subjects.

REFERENCES

- 1) Becker C, Crow S, Toman J, et al. Characteristics of elderly patients admitted to an urban tertiary care hospital with osteoporotic fractures: correlations with risk factors, fracture type, gender and ethnicity. *Osteoporos Int* 2005;8:1-7.
- 2) Naves M, Rodríguez-García M, Díaz-López JB, et al. Progression of vascular calcifications is associated with greater bone loss increased bone fractures. *Osteoporos Int* 2008;19:1161-1166.
- 3) Wayhs R, Zelinger A, Raggi P. High coronary artery calcium scores pose an extremely elevated risk for hard events. *J Am Coll Cardiol* 2002;39:225-230.
- 4) von der Recke P, Hansen MA, Hassager C. The association between low bone mass at the menopause and cardiovascular mortality. *Am J Med* 1999;106:273-278.
- 5) Kiel DP, Kauppila LI, Cupples LA, et al. Bone loss and the progression of abdominal aortic calcification over a 25 year period: the Framingham Heart Study. *Calcif Tissue Int* 2001;68:271-276.
- 6) Schulz E, Arfai K, Liu X, et al. Aortic calcification and the risk of osteoporosis and fractures. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89(9):4246-4253.
- 7) Sage AP, Tintut Y, Demer LL. Regulatory mechanisms in vascular calcification. *Nat Rev Cardiol* 2010;7(9):528-536.

- 8) Papadopouli AE, Klonaris CN, Theocharis SE. Role of OPG/RANKL/RANK axis on the vasculature. *Histol Histopathol* 2008;23(4):497-506.
- 9) Yao Y, Bennett BJ, Wang X, et al. Inhibition of bone morphogenetic proteins protects against atherosclerosis and vascular calcification. *Circ Res* 2010;107(4):485-494.
- 10) Tyson KL, Reynolds JL, McNair R, et al. Osteo/chondrocytic transcription factors and their target genes exhibit distinct patterns of expression in human arterial calcification. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23(3):489-494.
- 11) Heiss A, Eckert T, Aretz A, et al. Hierarchical role of fetuin-A and acidic serum proteins in the formation and stabilization of calcium phosphate particles. *J Biol Chem* 2008;283(21):14815-14825.
- 12) Holt C, Sorensen ES, Clegg RA. Role of calcium phosphate nanoclusters in the control of calcification. *FEBS J* 2009;276(8):2308-2323.
- 13) Bostrom K, Watson KE, Horn S, et al. Bone morphogenetic protein expression in human atherosclerotic lesions. *J Clin Invest* 1993;91:1800-1809.
- 14) Herrmann SM, Whatling C, Brand E, et al. Polymorphisms of the human matrix gla protein (MGP) gene, vascular calcification, and myocardial infarction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:2386-2393.

- 15) Jono S, Ikari Y, Vermeer C, et al. Matrix Gla protein is associated with coronary artery calcification as assessed by electron-beam computed tomography. *Thromb Haemost* 2004;91:790-794.
- 16) Luo G, Ducy P, McKee MD, et al. Spontaneous calcification of arteries and cartilage in mice lacking matrix GLA protein. *Nature* 1997;386:78-81.
- 17) Bucay N, Sarosi I, Dunstan CR, et al. Osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. *Genes Dev* 1998;12:1260-1268.
- 18) Kuro-o M, Matsumura Y, Aizawa H, et al. Mutation of the mouse *klotho* gene leads to a syndrome resembling ageing. *Nature* 1997;390:45-51.
- 19) Coen G, Ballanti P, Mantella D, et al. Bone turnover, osteopenia and vascular calcifications in hemodialysis patients. *Am J Nephrol* 2009;29:145-152.
- 20) Rubin MR, Rundek T, McMahon DJ, et al. Carotid artery plaque thickness is associated with increased serum calcium levels: the Northern Manhattan study. *Atherosclerosis* 2007;194:426-432.
- 21) Jorde R, Sundsfjord J, Fitzgerald P, et al. Serum calcium and cardiovascular risk factors and diseases: the Tromso study. *Hypertension* 1999;34:484-490.
- 22) Foley RN, Collins AJ, Ishani A, et al. Calcium-phosphate levels and cardiovascular disease in community-dwelling adults: the

- Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *Am Heart J* 2009;156:556-563.
- 23) Wilson PWF, Kauppila LI, O'Donnell CJ, et al. Abdominal aortic calcific deposits are an important predictor of vascular morbidity and mortality. *Circulation* 2001;103:1529-1534.
- 24) Jayalath RW, Mangan SH, Golledge J. Aortic calcification. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2005;30:476-88.
- 25) Choi SH, An JH, Lim S, et al. Lower bone mineral density is associated with higher coronary calcification and coronary plaque burdens by multidetector row coronary computed tomography in pre- and postmenopausal women. *Clin Endocrinol* 2009;71:644-651.
- 26) Santos RD, Nasir K, Rumberger JA, et al. Difference in atherosclerosis burden in different nations and continents assessed by coronary artery calcium. *Atherosclerosis* 2006;187:378-84.
- 27) Bagger YZ, Rasmussen HB, Alexandersen P, et al; PERF study group. Links between cardiovascular disease and osteoporosis in postmenopausal women: serum lipids or atherosclerosis per se? *Osteoporos Int* 2006;18(4):505-512.
- 28) Lopes JB, Danilevicius CF, Takayama L, et al. Prevalence and risk factors of radiographic vertebral fracture in Brazilian community-dwelling elderly. *Osteopor Int* 2011;22(2):711-719.
- 29) American Diabetes Association. *Diabetes Care* 2006;29 Suppl 1:S43-S48.

- 30) Chobanian AV, Bakris GL, Black HR, et al. The seventh report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation and Treatment of high blood pressure: the JNC 7 report. JAMA 2003;289:2560-2572.
- 31) Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP). Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report. Circulation 2002;106(25):3143-3423.
- 32) Fitti JE, Kovar M. The supplement on aging to the 1984 national health interview survey. Vital Health Stat 1997;1:1-115.
- 33) Fuchs SC, Guimarães SM, Sortica C, et al. Reliability of race assessment based on the race of the ascendants: a cross-sectional study. BMC Public Health 2002;2:1-5.
- 34) Cockcroft DW, Gault MH. Prediction of creatinine clearance from serum creatinine. Nephron 1976;16:31-41.
- 35) Sheperd JA, Lu Y, Wilson K, et al. Cross-calibration and minimum precision standards for dual-energy x-ray absorptiometry: the 2005 ISCD official positions. J Clin Densitom 2006;9:31-36.
- 36) Genant HK, Wu CY, van Kujik C, et al. Vertebral fracture assessment using a semiquantitative technique. J Bone Miner Res 1993;8:1137-1148.
- 37) Kauppila LI, Polak JF, Cupples LA, et al. New indices to classify location, severity and progression of calcific lesions in the abdominal aorta: a 25-year follow-up study. Atherosclerosis 1997;132:245-250.

- 38) Hmamouchi I, Allali F, Khazzani H, et al. Low bone mineral density is related to atherosclerosis in postmenopausal Moroccan women. *BMC Public Health* 2009;9:388-395.
- 39) Wang TK, Bolland MJ, Pelt NC, et al. Relationships between vascular calcification, calcium metabolism, bone density and fractures. *J Bone Miner Res* 2010;12:2501-2509.
- 40) Fruchart JC, Nierman M, Stroes E, et al. New risk factors for atherosclerosis and patient risk assessment. *Circulation* 2004;109(23):III-15_III-19.
- 41) Pinheiro MM, Schuch NJ, Genaro PS, et al. Nutrient intakes related to osteoporotic fractures in men and women – the Brazilian Osteoporosis Study (BRAZOS). *Nutr J* 2009;8:6-8.
- 42) Jadoul M, Albert JM, Akiba T, et al. Incidence and risk factors for hip or other bone fractures among hemodialysis patients in the Dialysis Outcomes and Practice Patterns Study. *Kidney Int* 2006;70:1358–1366.
- 43) Block GA, Klassen PS, Lazarus JM, et al. Mineral metabolism, mortality, and morbidity in maintenance hemodialysis. *J Am Soc Nephrol* 2004;15:2208–2218.
- 44) Samelson EJ, Cupples LA, Broe KE, et al. Vascular calcification in middle age and long-term risk of hip fracture: the Framingham Study. *J Bone Miner Res* 2007;22(9):1449-1454.
- 45) Szulc P, Kiel DP, Delmas PD. Calcifications in the abdominal aorta predict fractures in men: MINOS study. *J Bone Miner Res* 2008;23(1):95-102.

Table 1. Demographic, anthropometric and clinical characteristics of all of the studied subjects.

	Total (N= 815)
Age, years	73.0 (5.2)
Female gender, %	58.4
Race, %	
White	66.6
non white	31.4
Asiatic	2
Height, cm	155.3 (9.0)
Weight, kg	67.2 (13.1)
BMI, kg/m²	27.9 (4.9)
Current smoking, %	12.3
Glucocorticoid current use, %	1.3
Alcohol, %	3.5
Calcium intake, mg	420 (292)
Low physical activity, %	10.4
History of Falls, %	32.9
Diabetes Mellitus, %	21.2
Dyslipidemia, %	72.5
Arterial Hypertension, %	63.5
Cardiovascular (CV) Event, %	11.5
Family CV Event, %	19.6

The values are expressed as mean (SD) or percentage.

Table 2. Prevalence (95% confidence interval) of aortic calcification and abdominal aortic calcification score (AACS) in all subjects classified by age.

	Aortic Calcification % (95% CI)	p	Calcification Score (0-24 points)			p
			0-2, n (%)	3-6, n (%)	>6, n (%)	
65-69 years	57.7 (51.7- 63.8)	0.002	151 (58.5)	54 (20.9)	53 (20.5)	<0.001
70-79 years	63.2 (58.8- 67.6)		238 (51.5)	97 (21.0)	127 (27.5)	
≥ 80 years	77.8 (69.6- 86.2)		33 (34.7)	20 (21.1)	42 (44.2)	
Total	63.2 (59.9- 66.5)		422 (51.8)	171 (21)	222 (27.2)	

The values are expressed as percentages (95% CI) or number of subjects (%).

Table 3. Summary of the laboratory data, bone densitometry values and osteopenia/osteoporosis classification from all of the studied subjects.

	Total N= 815
Calcium, mg/dL	9.4 (0.5)
Phosphorus, mg/dL	3.35 (0.55)
Calcium-phosphorus product, mg²/dL²	31.4 (5.3)
PTH, pg/dL	40.2 (20.5)
Alkaline phosphatase, U/L	185.9 (63.2)
25 OHD, ng/mL	19.5 (9.3)
Deficiency 25OHD (≤ 10 ng/mL), %	15.3
Insufficiency 25OHD (10.1-30 ng/mL), %	71.9
Normal 25OHD (> 30 ng/mL), %	12.8
Creatinine, mg/dL	1.0 (0.2)
eGFR, mL/min	58.2 (18.4)
Total Cholesterol, mg/dL	208.0 (43)
LDL-C, mg/dL	124.5 (34.7)
HDL-C, mg/dL	56.4 (13.9)
Triglycerides, mg/dL	139.3 (100.2)
Glycemia, mg/dL	117.4 (45.7)
Albumin, g/dL	4.4 (0.8)
TSH, mcUI/mL	2.7 (3.4)
Free T4, ng/dL	1.4 (0.3)
Osteopenia, %	40.1
Osteoporosis, %	46.1
L1-L4 BMD, g/cm²	0.905 (0.204)
L1-L4 T-score	-1.74 (1.80)
Femoral neck BMD, g/cm²	0.695 (0.139)
Femoral neck T-score	-1.72 (1.05)
Total femur BMD, g/cm²	0.844 (0.158)
Total femur T-score	-1.18 (1.05)

The values are expressed as mean (SD) or percentage.

Table 4: Regression fitted model for AACS.

Variable	Coefficient	Standard Error	t Value	P	R ²
Phosphorus	1.06	0.37	2.88	0.004	0.113
Total femur BMD (x10)	-0.42	1.35	-3.07	0.002	

The fitted model was adjusted by age, tryglicerides, current smoking, arterial hypertension and LDL-cholesterol

Figure 1: AACS means and standard errors in each serum phosphorus categories levels.

ACKNOWLEDGMENTS

Conflit of Interest: None

Author Contributions:

Study concept and design: RMR Pereira.

Assist in subject recruitment: PR Menezes, M Scazufca.

Acquisition of subject and data: CP Figueiredo, JB Lopes.

Laboratorial and densitometric data: L Takayama, V F Caparbo.

Radiologic data: ME Kuroishi, IRS Oliveira.

Analysis and interpretation of data: CP Figueiredo, RMR Pereira.

Preparation of manuscript: CP Figueiredo, E Bonfa, RMR Pereira.

Sponsor's Role:

FAPESP grant was used to:

- buy a densitometry (Hologic)
- pay the radiographic and laboratorial exams
- remuneration of technicians
- pay the transportation and snacks for older subjects

CNPQ grant was used to:

- support the main investigator

CAPES grant was used to:

- support the first and second authors