

**LUIS FERNANDO ESCOBAR GUZMAN**

**Relação entre a calcificação coronariana e os parâmetros da  
microarquitetura óssea em uma comunidade de idosos da coorte**

**Sao Paulo Ageing & Health Study (SPAH)**

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

Programa de Cardiologia  
Orientador: Prof. Dr. Carlos Eduardo Rochitte  
Coorientadora: Profa. Dra. Rosa Maria Rodrigues  
Pereira

**São Paulo**

**2020**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação CIP)**

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

©reprodução autorizada pelo autor

Guzman, Luis Fernando Escobar  
Relação entre a calcificação coronariana e os  
parâmetros da microarquitetura óssea em uma  
comunidade de idosos da coorte São Paulo Ageing &  
Health Study (SPAH) / Luis Fernando Escobar Guzman.  
-- São Paulo, 2020.  
Tese (doutorado)--Faculdade de Medicina da  
Universidade de São Paulo.  
Programa de Cardiologia.  
Orientador: Carlos Eduardo Rochitte.  
Coorientadora: Rosa Maria Rodrigues Pereira.

Descritores: 1.Idoso 2.Tomografia  
computadorizada 3.Doença da artéria coronariana  
4.Cálcio 5.Desmineralização patológica óssea  
6.Densidade óssea

USP/FM/DBD-307/20

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

## NORMALIZAÇÃO ADOTADA

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

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

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

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

## **DEDICATÓRIA**

Aos meus pais, Silverio e Irene, que são minha inspiração e exemplo de vida.

A minha esposa Michele, quem eu amo e admiro, pelo apoio incondicional desde o início dessa jornada.

Minhas filhas, Melissa e Leticia pela paciência e compreensão.

Aos meus irmãos Carlos, Karina, Angela e Cristian e familiares, que sempre me apoiaram.

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus, por ter recebido essa oportunidade apesar de muitas vezes não merecê-la.

À meu orientador, Prof. Dr. Carlos Eduardo Rochitte, exemplo de genialidade e generosidade, por todo o ensinamento, paciência e compreensão.

À minhas coorientadora, Profa. Dra. Rosa Maria Rodrigues Pereira, pela confiança e aprendizado que recebi com sabedoria desde o início do projeto.

À Profa. Dra. Neuza Helena Moreira Lopes, pela excelência no ensino, apoio, gentileza e dedicação constante.

Aos pacientes, que muitas vezes, superando dificuldades participaram do projeto e sem os quais não haveria a possibilidade da realização desta tese.

À Dra. Solange de Sousa Andrade, pela confiança, pelo compartilhamento de conhecimento ao longo de todo este período.

Aos diretores da Unidade Clínica de Cardiogeriatría, Prof. Dr. Humberto Pierre, Prof. Dr. Mauricio Wajngarten e Prof. Dr. Wilson Jacob Filho, assim também aos professores assistentes pelo ensino e apoio.

À Dra. Geórgia Hermógenes Fernandes Torres, pela confiança e apoio para a realização deste projeto.

À Lenira Cipriano, pela gentileza, solidariedade e colaboração que foram essenciais para a concretização desta tese.

Aos funcionários da Unidade Clínica de Cardiogeriatría e do Serviço de Tomografia e Ressonância Cardiovascular do InCor, por sempre se prontificarem a me auxiliar.

Aos funcionários do Laboratório de Metabolismo Ósseo da Disciplina de Reumatologia da FMUSP (LIM-17), em especial a Lilian Masako Takayama, por todo apoio e atenção.

Aos membros da minha banca de qualificação, Profa. Dra. Neuza Helena Moreira Lopes, Dr. Marcio Sommer Bittencourt e Prof. Dr. Aluizio Barbosa de Carvalho pelas valiosas contribuições na construção dessa tese.

À Comissão Científica e Centro de Pesquisa Clínica do InCor e aos funcionários da Secretaria de Pós-Graduação do InCor, por todo o apoio.

À Sra. Creusa Maria Roveri Dal Bó e a Sra. Sueni Borges dos Santos, pela colaboração e gentileza. Assim também aos meus amigos, Nelson, Raul, Max e Ramon pelo apoio, amizade.

# SUMÁRIO

NORMALIZAÇÃO ADOTADA	
DEDICATÓRIA	
AGRADECIMENTOS	
SÚMARIO	
LISTA DE ABREVIATURAS	
LISTA DE SÍMBOLOS	
LISTA DE FIGURAS	
LISTA DE TABELAS	
RESUMO	
ABSTRACT	
1 INTRODUÇÃO .....	1
1.1 Mecanismo fisiopatológico .....	3
1.1.1 Fatores indutores de calcificação vascular .....	4
1.1.2 Fatores inibidores da calcificação vascular .....	12
1.2 Escore de cálcio coronariano .....	17
1.3 Densitometria mineral óssea areal (DXA) .....	18
1.4 Tomografia computadorizada quantitativa periférica de alta resolução .....	19
2 OBJETIVOS .....	21
2.1 Relação entre calcificação coronária e parâmetros da microarquitetura óssea .....	21
2.2 Escore de cálcio com a DXA e fatores associados à densidade óssea .....	21
3 MÉTODOS .....	22
3.1 População do Estudo .....	22
3.1.1 Critérios de inclusão, critérios de exclusão .....	22
3.2 Exames laboratoriais .....	24
3.3 Tomografia computadorizada de coronárias para avaliação do escore de cálcio .....	25
3.4 Tomografia computadorizada quantitativa periférica de alta resolução (HR-pQCT) .....	26
3.4.1 Parâmetros analisados .....	26
3.5 Densitometria mineral óssea (areal) .....	27
3.6 Análise estatística .....	27
4 RESULTADOS .....	29
4.1 Dados descritivos .....	29
4.2 Análise univariada .....	36
4.3 Análise multivariada .....	44
5 DISCUSSÃO .....	47
6 CONCLUSÕES .....	51

7 ANEXOS .....	52
8 REFERÊNCIAS.....	69

## LISTA DE ABREVIATURAS

AAS	ácido acetilsalicílico
ABCC	proteína da subfamília C do membro
AGEs	produtos finais de glicação avançada
ANKH	proteína de anquilose progressiva
ANX	anexinas
angioTC de coronárias	angiotomografia computadorizada de coronárias
BCC	bloqueador dos canais de cálcio
BMP	proteína morfogenética óssea
BMPR	receptor de proteína morfogenética óssea
CCI	calcificação da camada íntima
CCM	calcificação da camada média
CKD-EPI	<i>Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration</i>
Ct.vBMD	densidade volumétrica cortical
CEAC	células endoteliais da aorta humana cultivadas
CI	cardiopatia isquêmica
CML	células musculares lisas
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CICr	clearance de creatinina
Ct.Th	espessura média da cortical óssea
CTX	telopectideo amino-terminal do colágeno tipo I
Ct.Po	porosidade cortical



Ct.vBMD	densidade volumétrica cortical
CV	calcificação vascular
DAC	doença arterial coronariana
DAOP	doença arterial obstrutiva periférica
DCV	doenças cardiovasculares
DLP	dislipidemia
DP	desvio padrão
DRC	doença renal crônica
DM	diabetes mellitus
DMO	densidade mineral óssea
DNA	ácido desoxirribonucleico
Dkk	proteína relacionada ao Dickkopf
DP	desvio padrão
DXA	densitometria mineral óssea areal
DRC	doença renal crônica
EC	escore de cálcio
ECG	eletrocardiograma
<i>ENPP1</i>	ecto-nucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterases 1
<i>ERK</i>	quinase regulada por sinal extracelular
ERO	espécies reativas mitocondriais de oxigênio
FA	fosfatase alcalina inespecífica dos tecidos
F-A	fetuína-A
FC	frequência cardíaca
FRC	fatores de risco cardiovascular

HDL	lipoproteína de alta densidade
HA	hidroxiapatita
HAS	hipertensão arterial sistêmica
HC-FMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HR-pQCT	Tomografia computadorizada quantitativa periférica de alta resolução
<i>HIF-1<math>\alpha</math></i>	fator induzível por hipóxia-1 $\alpha$
IAM	infarto agudo do miocárdio
IC	intervalo de confiança
IECA	inibidores da enzima de conversão da angiotensina
IL-1 $\beta$	interleucina 1 beta
IL-6	interleucina 6
IIQ	intervalo interquartil
IMC	índice de massa corporal
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
<i>JNK</i>	quinase c-Jun N-terminal
LDLox	lipoproteína de baixa densidade oxidada
<i>LRP</i>	Receptor de lipoproteína de baixa densidade
<i>MGP</i>	proteína Gla da matriz
<i>mRNA</i>	microRNA
<i>MMP</i>	metaloprotease da matriz
MSX2	MSH homeobox 2
NF- $\kappa$ B	fator-kappa B nuclear

OC	osteocalcina
OCc	osteocalcina carboxilada
OCs	osteocalcina subcarboxilada
OPG	osteoprotegerina
OMS	Organização Mundial de Saúde
OPN	osteopontina
PAS	pressão arterial sistólica
PAD	pressão arterial diastólica
PCR	proteína C-reativa
Pi	pirofosfato inorgânico
PTH	paratormônio
P1NP	propeptídeo amino-terminal do pro-colágeno tipo I
<i>RAGEs</i>	receptor para os produtos finais de glicação avançada
<i>RANK</i>	ativador de receptor do fator nuclear kappa- $\beta$
<i>RANKL</i>	ativador de receptor do fator nuclear kappa- $\beta$ ligante
RM	revascularização miocárdica cirúrgica
<i>RNA</i>	ácido ribonucleico
<i>ROC</i>	<i>receiver operating characteristics</i> (área sobre a curva)
<i>RUNX2</i>	fator de transcrição relacionado ao Runt 2
SPAH	São Paulo Ageing & Health Study
SCA	síndrome coronariana aguda
SGK1	quinase indutível por glucocorticóides
<i>SNPs</i>	polimorfismos de base única
<i>SORT1</i>	sortilina 1

SOST	esclerostina
SOX	<i>SRY-related HMG-box</i>
Tb.N	número médio das trabéculas
Tb.Th	espessura trabecular
Tb.Sp	separação trabecular
Tb.vBMD	Densidade volumétrica trabecular
<i>TGF-β</i>	fator transformador de crescimento beta
<i>TRAF</i>	fatores associados ao receptor de TNF
<i>TNF-α</i>	fator de necrose tumoral-alfa
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TNF alfa	fator de necrose tumoral alfa
Wnt	Wingless Int
25OHD	25-hidroxivitamina D

## LISTA DE SÍMBOLOS

>	maior que
<	menor que
≥	maior que ou igual a
≤	menor que ou igual a
kg/m <sup>2</sup>	quilograma por metro quadrado
mg	miligrama
mg/ml	miligrama de lodo por mililitro
mg HA/cm <sup>3</sup>	miligramas de hidroxiapatita / centímetro cúbico
n.mm <sup>2</sup>	newton/milímetro quadrado
ng/ml	nanograma por mililitro
cm	centímetro
mmHg	milímetros de mercúrio
keV	kilo-electronvolt
kVp	kilovoltagem pico
mA	miliampère
mV	milivolt
ml/s	mililitro por segundo
mm	milímetro
ms	milisegundo
mSv	milisievert
s	segundos
HU	unidade de Hounsfield

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Principais mecanismos celulares, mediadores químicos e componentes genéticos que envolvem a fisiopatologia da calcificação vascular. *Cardiol Res Pract.* 2020;2020:5169069<sup>11</sup>. ..... 3
- Figura 2** - Fluxograma dos participantes ..... 24
- Figura 3** - Distribuição do escore de cálcio..... 29

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Características antropométricas e clínicas dos 256 idosos, separados pelo sexo.....	30
<b>Tabela 2</b> - Características laboratoriais dos 256 idosos, separados pelo sexo.....	32
<b>Tabela 3</b> - Frequências absolutas e relativas dos medicamentos utilizados em 256 idosos, separados por sexo.....	34
<b>Tabela 4</b> - Características do EC, DMO e HR-pQCT dos 256 idosos, separados por sexo.....	35
<b>Tabela 5</b> - Associação do EC com as Características Clínicas em mulheres.....	36
<b>Tabela 6</b> - Associação do EC com os resultados laboratoriais em mulheres.....	37
<b>Tabela 7</b> - Associação do EC com as medicações em mulheres.....	38
<b>Tabela 8</b> - Associação do EC com as Características Clínicas em homens.....	39
<b>Tabela 9</b> - Associação do EC com os resultados laboratoriais em homens.....	40
<b>Tabela 10</b> - Associação do EC com as medicações em homens.....	41
<b>Tabela 11</b> - Densidade mineral óssea (DXA) e microarquitetura óssea (HR- pQCT) segundo o nível de EC (escore z) em mulheres.....	42
<b>Tabela 12</b> - Densidade mineral óssea (DXA) e microarquitetura óssea (HR-pQCT) segundo o nível de EC (escore z) em homens.....	43
<b>Tabela 13</b> - Modelos de regressão para medicações, densitometria óssea (DXA) e parâmetros de HR-pQCT, estratificados segundo o EC.....	44
<b>Tabela 14</b> - Modelos de regressão para densitometria óssea (DXA) e parâmetros de HR-pQCT na tíbia, estratificados segundo o EC.....	46

## RESUMO

Guzman LFE. *Relação entre a calcificação coronariana e os parâmetros da microarquitetura óssea em uma comunidade de idosos da coorte São Paulo Ageing & Health Study (SPAH)* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2020.

**Introdução:** Aterosclerose e osteoporose são doenças de alta prevalência na população geriátrica. Evidências epidemiológicas e trabalhos observacionais sugerem um vínculo fisiopatológico entre ambas. Atualmente, o escore de cálcio (EC) é o principal marcador de aterosclerose subclínica. A densitometria óssea (DXA) é o método mais utilizado para diagnosticar a osteoporose e para a avaliação do risco de fraturas, no entanto, ao redor de 60 % dos indivíduos apresentam fratura com massa óssea normal/osteopenia. Nesse sentido, a tomografia periférica de alta resolução (HR-pQCT) permite avaliar a qualidade óssea e separadamente a estrutura cortical e trabecular, e a literatura demonstra que parâmetros da HR-pQCT foram melhor preditor do risco de fratura em relação ao DXA. Não identificamos trabalhos na literatura que tenham investigado a associação entre parâmetros ósseos obtidos por HR-pQCT e calcificação arterial coronariana avaliada pelo EC em idosos. **Objetivo:** avaliar a associação entre a calcificação coronariana e a microarquitetura óssea em indivíduos maiores de 65 anos. **Métodos:** 256 idosos foram submetidos a angiotomografia computadorizada de coronárias (angioTC de coronárias) para avaliação do escore de cálcio (EC) pelo método de Agatston, tomografia computadorizada quantitativa periférica de alta resolução (HR-pQCT) de rádio e tíbia com parâmetros de escore z padronizados, DXA, e marcadores de remodelação óssea. **Resultados:** a média do EC foi 283,95. Os melhores modelos multivariados para previsão de EC incluíram parâmetros da tíbia para ambos os gêneros. Para mulheres, porosidade cortical da tíbia (Ct.Po),  $\exp \beta = 1,12$  IC 95%: 1,10-1,13,  $p < 0,001$  e densidade volumétrica cortical (Ct.vBMD)  $\exp \beta = 0,79$  IC 95%: 0,78- 0,81,  $p < 0,001$  foram preditores independentes de maior EC. Nos homens, tíbia Ct.Po,  $\exp \beta = 1,44$ , IC 95%: 1,42-1,46;  $p < 0,001$  também foi associado a maior elevação do EC. **Conclusão:** Houve associação de comprometimento ósseo cortical da tíbia, avaliada por HR-pQCT, com maior calcificação coronariana em idosos da comunidade, principalmente em mulheres.

**Descritores:** Idoso; Tomografia computadorizada; Doença da artéria coronariana; Cálcio; Desmineralização patológica óssea; Densidade óssea.



## ABSTRACT

Guzman LFE. *Relationship between coronary calcification and the parameters of bone microarchitecture in a cohort elderly community Sao Paulo Ageing & Health Study (SPAH)* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2020.

**Introduction:** Atherosclerosis and osteoporosis are diseases of high prevalence in the geriatric population. Epidemiological evidence and observational studies suggest a pathophysiological link between them. Currently, calcium score is the main marker of subclinical atherosclerosis. Areal bone mineral density determined by dual energy X-ray absorption (DXA) is the most widely used method for diagnosing osteoporosis and for fracture risk assessment, but around 60% of individuals have fractures with normal bone mass / osteopenia. In this sense, high-resolution peripheral tomography (HR-pQCT) allows bone quality to be assessed separately and cortical and trabecular structure, and the literature shows that HR-pQCT parameters were a better predictor of fracture risk compared to DXA. We did not identify studies in the literature that have investigated the association between bone parameters obtained by HR-pQCT and coronary artery calcification assessed by CE in the elderly. **Objective:** To evaluate the association between coronary calcification and bone microarchitecture in individuals older than 65 years. **Methods:** 256 elderly individuals who underwent coronary computed tomography angiography for CAC assessment by Agatston score, HR-pQCT at radius and tibia with standardized z-score parameters, DXA, and bone remodeling markers. Multinomial logistic regression and generalized linear regression model with Poisson probability distribution and logarithmic binding function was used as appropriated. **Results:** The CAC average was 283.95. The best multivariate models for CAC prediction included tibia parameters for both, women and men. For women, tibia cortical porosity (Ct.Po),  $\exp \beta = 1.12$  95% CI: 1.10-1.13,  $p < 0.001$  and cortical volumetric density (Ct.vBMD)  $\exp \beta = 0.79$  95% CI: 0.78-0.81,  $p < 0.001$  were independent predictors of higher CAC. In men, tibia Ct.Po,  $\exp \beta = 1.44$ , 95% CI: 1.42-1.46;  $p < 0.001$  was also associated with higher CAC. **Conclusion:** There was an association of cortical bone involvement of the tibia, assessed by HR-pQCT, with greater coronary calcification in the elderly in the community, especially in women.

**Descriptors:** Aged; Computed tomography; Coronary artery disease; Calcium; Pathologic bone demineralization; Bone density.

## 1 INTRODUÇÃO

O envelhecimento da população nos países em desenvolvimento como o Brasil apresenta ritmo mais acelerado que nos países do primeiro mundo. Dados do IBGE estimam que em 2050 a população de indivíduos com idade maior que 50 anos superará a população de jovens com idade menor de 14 anos<sup>1</sup>.

A doença cardiovascular é a principal causa de morte no Brasil, e afeta aproximadamente 286 para cada 100 mil brasileiros entre homens e mulheres, sendo responsável por mais de 28% das causas de óbito. Segundo dados da Organização Mundial da Saúde, a prevalência de doenças cardiovasculares (DCV) permanece alta, 7,4% para homens e 5,3% para mulheres, devido à maior prevalência de fatores de risco cardiovascular (FRC) e envelhecimento<sup>2</sup>.

A osteoporose (OP) é uma doença metabólica que faz parte do processo de envelhecimento e é mais comum entre mulheres do que em homens. Nelas, a causa mais comum é a diminuição na produção de estrógeno depois da menopausa, fato este também ligado à fisiopatologia da aterosclerose vascular no sexo feminino<sup>3</sup>.

Assim como os desfechos da aterosclerose, a osteoporose e sua principal consequência, a fratura, é um grave problema de saúde pública. Estima-se que uma em cada duas mulheres e um em cada cinco homens acima de 65 anos de idade apresentarão pelo menos uma fratura, mais frequentemente na coluna, no quadril e punho, relacionada a osteoporose em algum momento da vida<sup>4</sup>.

Existe maior prevalência de doença aterosclerótica e osteoporose entre os idosos e evidências recentes sugerem uma relação inversa entre as duas patologias. Dados da literatura demonstram que a perda óssea está associada à gravidade da doença cardiovascular no momento do diagnóstico e o grau de calcificação vascular (CV) foi um importante preditor de perda óssea, fraturas vertebrais e não vertebrais<sup>5</sup>.

Histologicamente, segundo o nível da DCV podem ser distinguidas: calcificação da camada íntima (CCI) e a calcificação da camada média (CCM).

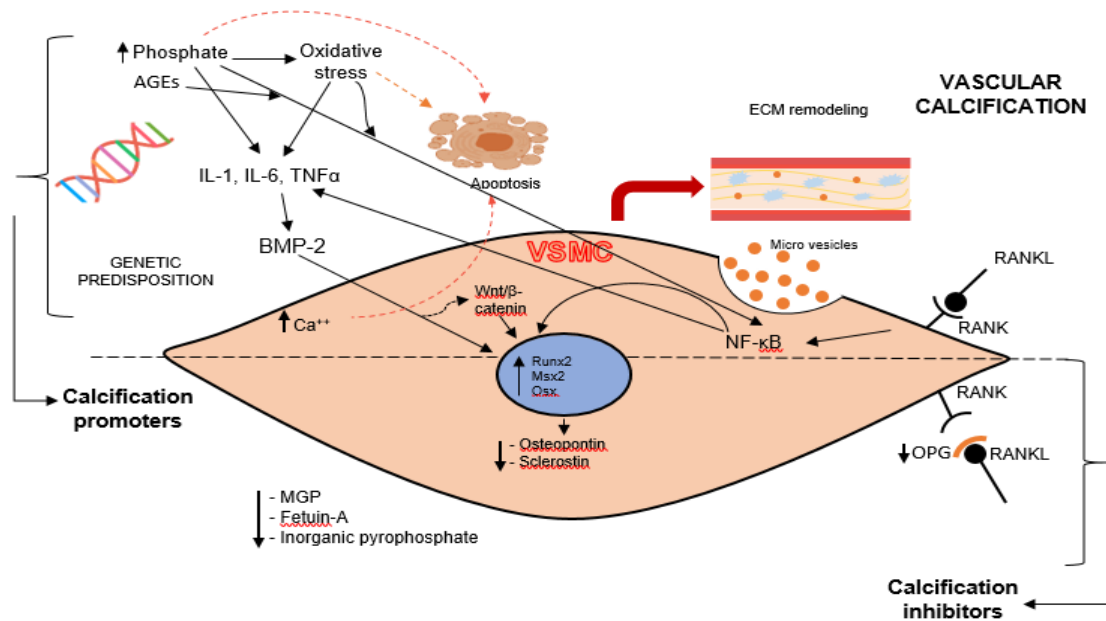
A CCI está associada à formação de placas ateroscleróticas compreendendo capa fibrosa, núcleo necrótico / lipídico, cristais de colesterol, células inflamatórias propensas à erosão, ruptura e obstrução do fluxo sanguíneo, perfusão reduzida de órgãos e síndromes isquêmicas<sup>6,7</sup>.

A CCM, também chamada de calcificação de Mönckeberg, representa a deposição patológica de cálcio e fosfato na camada medial das artérias. Essa calcificação vascular é considerada menos associada à inflamação. Pode causar rigidez da parede vascular, induzir alterações nas propriedades hemodinâmicas arteriais e resultar em maior probabilidade de desenvolver hipertensão arterial e hipertrofia do ventrículo esquerdo com consequente aumento de risco de eventos cardiovasculares<sup>6,7</sup>.

A CV e OP compartilham também fatores de risco como diabetes, hipertensão arterial, doença renal crônica, dislipidemia e menopausa<sup>3,8</sup>.

## 1.1 Mecanismo fisiopatológico

No passado, considerava-se a CV, consequência de um processo degenerativo passivo, e recentes estudos sugerem a existência de um mecanismo fisiopatológico complexo ainda em elucidação que envolve inflamação, oxidação e liberação de mediadores químicos. Este mediador promove ou inibe a diferenciação de células musculares lisas (CML) em células osteo/condroblásticas. Há também evidências de fatores genéticos envolvidos nesse processo<sup>9, 10</sup> (Figura 1).



AGEs: advanced glycation end products, VSMC: Vascular Smooth Muscle Cell, BMP: Bone Morphogenetic Protein, Runx2: Runt-related Transcription Factor 2, Msx2: Msh Homeobox 2, IL-1: Interleukin-1, IL-6: Interleukin-6, TNFα: Tumor Necrosis Factor Alpha, NF-κB: Nuclear Factor Kappa-Light-Chain-Enhancer of Activated B Cells, RANK: Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa-B, RANKL: Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa-B Ligand, ECM: Extracellular Matrix, OPG: Osteoprotegerin, MGP: Matrix Gla Protein

**Figura 1** - Principais mecanismos celulares, mediadores químicos e componentes genéticos que envolvem a fisiopatologia da calcificação vascular. *Cardiol Res Pract.* 2020;2020:5169069<sup>11</sup>.

## **1.1.1 Fatores indutores de calcificação vascular**

### **1.1.1.1 Inflamação, estresse oxidativo e lipídios**

Reconhece-se que a CV está associada a um estado inflamatório crônico e de baixo grau, exacerbado por condições não vasculares, como alterações metabólicas, doenças auto-imunes, fatores ambientais (poluição), câncer e obesidade<sup>12-15</sup>.

Esse processo inflamatório esteve relacionado ao aumento dos níveis séricos de fator de necrose tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ), interleucina 1 beta (IL-1 $\beta$ ), promovem a estimulação da atividade da fosfatase alcalina inespecífica dos tecidos (FA), enzima que hidrolisa os íons pirofosfato, que são potentes inibidores da mineralização e, portanto, podem induzir calcificação independentemente do principal mediador de osteoblastogênese, o fator de transcrição relacionado ao Runt 2 (RUNX2), nas CML<sup>12, 16</sup>. Além disso, a interleucina 6 (IL-6) foi significativamente associada à calcificação da artéria coronária e à mortalidade cardiovascular em pacientes com insuficiência renal<sup>17</sup>.

Estudos relataram que o aumento do estresse oxidativo está relacionado à CV in vitro. Recentemente, Zhao et al.<sup>18</sup> mostraram que as espécies reativas mitocondriais de oxigênio (ERO) são essenciais para a troca do fenótipo das CML, de uma forma contrátil para outra osteogênica.

As proteínas pró-inflamatórias incluem a proteína C-reativa (PCR) sintetizada durante os processos inflamatórios principalmente pelos hepatócitos. Além disso, eles são expressos por outros tipos de células, incluindo produção local em tecido vascular pelas CML<sup>19</sup>. Um estudo in vitro revelou que o PCR induz o estresse oxidativo celular e ativa as vias de

sinalização intracelular pro-calcificantes que promovem a transdiferenciação osteo-condrogênica das CML in vitro pelo aumento da expressão de FA e da atividade do fragmento Fc da enzima do receptor de IgG IIa<sup>20</sup>.

A lipoproteína de baixa densidade oxidada (LDLox) desempenha um papel crucial no desenvolvimento de CV. O mecanismo sugerido é a redução da produção de prostaciclina e redução da expressão da cicloxigenase induzida pelo aumento sustentado do cálcio intracelular. Essas alterações levam à ruptura da integridade da monocamada de glicocálice que causa apoptose das células endoteliais e o processo inflamatório<sup>21</sup>.

A lipoproteína de alta densidade (HDL), desempenha um papel protetor na aterosclerose, participando do processo conhecido como transporte reverso de colesterol. Nesse processo, acredita-se que a existência de propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes, provavelmente dependentes das proteínas, transportadas na partícula HDL, como a enzima paraoxonase e a redução de citocinas com conseqüente atenuação da diferenciação osteogênica induzida pela LDLox nas células vasculares<sup>22</sup>. No entanto, foi observado que pacientes com doença arterial coronariana estabelecida podem ter produção disfuncional de HDL causada pela modificação da apoA pós-transcricional ou pela redução da produção de HDL induzida por microRNAs<sup>23</sup>.

#### **1.1.1.2 Vesículas extracelulares: Exossomas**

As vesículas extracelulares são derivadas de diferentes tipos de células e classificadas em 3 classes por origem e tamanho: (1) microvesículas (100 – 500 nm), que se originam de evaginações da membrana celular, (2)

exossomos (40–100 nm), que possuem a origem das organelas intracelulares e (3) corpos apoptóticos ( $\pm 1.000$  nm), que são gerados durante a morte celular programada<sup>24</sup>.

Sugere-se que, durante a diferenciação osteocondrogênica celular, os exossomas são liberados pelo CML a partir de corpos multivesiculares intracelulares induzidos pela produção de esfingomielina fosfodiesterase 3 em resposta ao estresse ambiental do cálcio<sup>25</sup>. A proteína serina codificada pelo gene sortilina 1 (SORT1) também está associada à calcificação vascular. Foi localizado em humanos e ateromas de camundongos, promovendo in vitro a formação de microcalcificações e vesículas extracelulares estimulando a liberação da FA<sup>26</sup>.

Outros fatores associados à formação de exossomas são as anexinas (Anx) 6 no CML e Anx 5 nos macrófagos que compreendem uma classe de proteínas dependentes de cálcio que mediam os processos celulares como exocitose e endocitose. Eles também participam na regulação da inflamação, coagulação e fibrinólise<sup>27-29</sup>.

### ***1.1.1.3 Fator de Transcrição Relacionado ao Runt 2 (Runx2)***

O RUNX2 é o principal fator de transcrição na calcificação vascular, e sua atividade está sujeita a regulação por eventos de fosforilação mediados por quinases e por translocação nuclear, capacidade de ligação ao ácido desoxirribonucleico (DNA) e interação com cofatores transcricionais. Runx2 regula a expressão de genes relacionados a osteoblastos, como osterix,

ativador de receptor do fator nuclear kappa- $\beta$  ligante (RANKL) e colágeno tipo I<sup>30-33</sup>.

Tang et al.<sup>34</sup> mostraram que as células isoladas da camada média da parede do vaso são expressas por ação dos marcadores SRY-related HMG-box (Sox) 17, Sox10, S100 $\beta$  e polipeptídeo de filamento de meio neural e diferenciadas em células do tipo CML e posteriormente em células osteoblásticas. Em um modelo animal, com camundongos SM22-Cre com Runx2 exon 8 floxed, foi observada a inibição do RANKL. O RANKL está associado à diminuição da infiltração de macrófagos e formação de células semelhantes a osteoclastos na parede aórtica<sup>35</sup>. No entanto, em outro trabalho com ratos knockout Runx2, não foi observada redução na expressão de RANKL, nem infiltração de macrófagos ou tamanho da lesão aterosclerótica em comparação ao grupo controle. Em vez disso, foi encontrada uma diminuição na mineralização da lesão, além da expressão substancialmente diminuída de osteocalcina, FA e maturação de condrócitos<sup>36</sup>.

#### **1.1.1.4 Proteínas Morfogenéticas Ósseas (BMPs)**

As BMPs são um grupo de proteínas expressas por miofibroblastos e pertencem à família do fator transformador de crescimento beta (TGF- $\beta$ ). As BMPs são conhecidas por seus papéis importantes durante a embriogênese e na manutenção e reparo de ossos e outros tecidos em adultos. O mais conhecido é o BMP2, que possui atividades osteogênicas relacionadas ao estresse oxidativo, inflamação e hiperglicemia<sup>37</sup>. O mecanismo de estimulação seria mediado pela expressão de Runx2 e pela indução de apoptose de células



do músculo liso vascular, um evento que inicia a calcificação vascular<sup>38</sup>. As BMPs também se ligam aos receptores de serina-treonina-quinase tipo II e tipo I (receptor de proteína morfogenética óssea-IA (BMPR-IA), BMPR-IB, quinase-2 do tipo receptor de ativina (ALK-2) e ALK1) para formar complexos que regulam a fosforilação de Smad1 / 5/8 e depois se combina com a proteína Smad4. Juntos, translocam-se para o núcleo onde estão envolvidos na transcrição de genes relacionados à diferenciação de osteoblastos, incluindo ERK (quinase regulada por sinal extracelular) e JNK (quinase c-Jun N-terminal)<sup>39</sup>.

Ao contrário do BMP2, o BMP 7 teve uma ação citoprotetora para distúrbios proliferativos vasculares. Em uma aorta coronária, carótida e abdominal em uma coorte enriquecida com diabetes com 920 indivíduos, os polimorfismos de base única (SNPs) rs6127984, rs6123674 e rs6123678 do BMP7 foram associados independentemente à menor CV<sup>40</sup>. Essa ação antagonista pode ser mediada pela existência de receptores específicos, como a endoglin (um receptor de TGF tipo III), que se liga ao BMP-2 e não ao BMP-7<sup>38</sup>.

#### **1.1.1.5 Osteocalcina (OC)**

OC são proteínas dependentes de vitamina K, expressas por pré-osteoclastos e osteoclastos. A OC total inclui tanto a osteocalcina carboxilada (OCc), que possui alta afinidade pela hidroxiapatita, localizada predominantemente na matriz óssea, quanto a osteocalcina subcarboxilada (Ocs), que representa entre 40 e 60% da osteocalcina circulante total. Essa

proteína foi recentemente associada a distúrbios metabólicos e cardiovasculares<sup>41, 42</sup>. O papel da OC na CV é controverso. Em um estudo recente, os níveis de interferon- $\gamma$  e fator de necrose tumoral- $\alpha$ , foram utilizados para avaliar os efeitos agudos (24 horas) e crônicos (144 horas) de Ocs em células endoteliais da aorta humana cultivadas (CEAC) e em CML. A Ocs não afetou a produção de citocinas inflamatórias, nem as vias de sinalização inflamatória nas CML ou CEAC<sup>43</sup>. Em outro estudo, Saad et al.<sup>42</sup> observaram em pacientes idosos com síndrome metabólica que os níveis séricos de OC estavam negativamente correlacionados com aterosclerose carotídea. No entanto, outros trabalhos sugerem a ideia oposta.

Um modelo com camundongos C57BL/6 revelou que na calcificação da aorta torácica foi correlacionada com o aumento da expressão de OC<sup>44</sup>. Sugere-se que o mecanismo pelo qual o OC promove a diferenciação e a mineralização do SMC seja mediado pela produção de Sox9, Runx2, colágeno tipo X e proteoglicanos e estimulando o metabolismo da glicose em células vasculares através do fator indutível por hipóxia 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ )<sup>45</sup>. Além disso, Flammer et al.<sup>46</sup> mostraram que altos níveis de CO estavam fortemente associados à DAC instável.

#### ***1.1.1.6 Ativador Receptor do Fator Nuclear Kappa-B / Ativador Receptor do Fator Nuclear Ligante Kappa-B (RANK / RANKL)***

Evidências crescentes sugerem que o binômio RANK / RANKL pode ser um ator importante na calcificação vascular. RANK está presente em placas ateroscleróticas e doenças cardíacas valvares. É uma proteína de membrana

do tipo I expressa na superfície dos osteoclastos e está envolvida na sua ativação mediante a ligação ao ligante (RANKL). O RANKL é uma proteína transmembrana, mas uma forma solúvel (RANKL solúvel é sRANKL) também circula no sangue. O RANKL se liga como um homotrímero ao RANK nas células alvo<sup>47, 48</sup>.

Foi demonstrado que o RANKL estimula a calcificação vascular pela ligação ao RANK através da via alternativa, fator nuclear-Kappa B (NF-κB). Também foi indicado que RANK promoveu indiretamente a calcificação das células do músculo liso vascular, aumenta a atividade procalcificante parácrina dos macrófagos. Isso é alcançado através da liberação da ligação de IL6 e TNF-α dos fatores associados ao receptor de TNF (TRAFs 2, 5 e 6) a locais específicos no domínio citoplasmático de RANK<sup>47, 48</sup>.

#### **1.1.1.7 Fator nuclear-Kappa B (NF-κB)**

O fator-kappa B nuclear (NF-κB) é uma proteína essencial para a proliferação e migração celular. O aumento da expressão de NF-κB na CV é mediado por múltiplos fatores, sendo o principal o TNFα, que diminui a expressão do homólogo da proteína da anquilose, esta é uma proteína transmembrana que controla o efluxo de células de pirofosfato<sup>49</sup>. Voelkl et al. mostraram que in vitro e em modelo animal sob condições de calcificação, a quinase indutível por glucocorticóides (SGK1) são poderosos reguladores da atividade de NF-κB<sup>50</sup>. Estudos também mostraram que os produtos finais de glicação avançada (AGEs) e seus receptores (RAGEs) estão envolvidos nesse processo<sup>51, 52</sup>.

NF- $\kappa$ B é uma proteína de ligação ao DNA que contribui para o processo de calcificação vascular por múltiplos mecanismos. Ele desencadeia a transcrição de TNF $\alpha$ , IL1 $\beta$  e IL6, permite a ação da via RANKL / RANK e pode modular a cascata pró-inflamatória nas CML, quando associada à via de sinalização WNT /  $\beta$ -catenina em resposta à hiperfosfatemia. Também promove a calcificação das CML pela expressão da MSH homeobox 2 (MSX2) e, conseqüentemente, da Runx2. Além disso, aumenta a expressão de tristetraprolina, uma proteína de RNA desestabilizante, e reduz o microRNA (mRNA) de ANKH, diminuindo os níveis de pirofosfato no espaço extracelular<sup>53, 54</sup>.

#### **1.1.1.8 Via de sinalização canônica Wnt/ $\beta$ catenina**

A via Wnt/ $\beta$  catenina está envolvida em uma variedade de processos fisiológicos, incluindo diferenciação de tecidos/órgãos, morfogênese e em muitos aspectos no desenvolvimento e progressão de lesões vasculares. Essa lesão vascular inclui disfunção endotelial, ativação de macrófagos, proliferação e migração celular de músculo liso vascular. Nos adultos, essas glicoproteínas participam dos principais processos de desenvolvimento e fisiológicos, incluindo proliferação celular, diferenciação, migração e apoptose<sup>55, 56</sup>.

A ativação desta via é mediada pela ligação das proteínas Wnt do meio extracelular a duas proteínas transmembrana: a proteína Frizzled, atuando como receptor, e as proteínas relacionadas ao receptor de lipoproteínas de baixa densidade 5 ou 6 (LRP 5/6), atuando como co-receptores <sup>57</sup>. Está estabelecido que esse caminho é essencial para a diferenciação das CML<sup>58</sup>.

A liberação de Wnt/ $\beta$ -catenina é aumentada pela ação de diferentes mecanismos<sup>30</sup>. Podemos mencionar que Msx2 suprime o antagonista, a proteína 1 relacionada ao Dickkopf (Dkk1), que interage com os co-receptores LRP5 / 6<sup>59</sup>. Também age estimulando a produção de Runx2, o principal fator CV e, conseqüentemente, o fator de transcrição Sp7 (osterix) durante a hiperfosfatemia<sup>60</sup>. Além disso, participa da CV pela indução de metaloprotease da matriz (MMP) 2 e MMP9 em CML e, portanto, desempenha um papel crucial na progressão desse fenômeno<sup>61</sup>.

## **1.1.2 Fatores inibidores da calcificação vascular**

### ***1.1.2.1 Pirofosfato Inorgânico***

O pirofosfato inorgânico (Pi) é o principal inibidor de calcificação conhecido encontrado no espaço extracelular<sup>62</sup>. O Pi é produzido em CML e transportado do ambiente intracelular para o extracelular pela proteína de anquilose progressiva (ANKH)<sup>30</sup>. Também é produzido no fígado através da proteína da subfamília C do membro 6 (ABCC6) da ligação ao ATP<sup>63</sup>.

O Pi é hidrolisado pelo ecto-nucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterases 1 (ENPP1) e pela FA inespecífica do tecido local, e promove a CV<sup>64, 65</sup>. Alto fosfato extracelular, que está frequentemente presente na DRC, diabetes e calcificação aórtica, reduz a produção de Pi e aumenta a expressão de ENPP1 e FA, induzindo apoptose das CML<sup>30</sup>. Entretanto, em outro trabalho, foi observado em modelos experimentais que a síntese de Pi aumenta nas CML

durante a calcificação induzida por fosfato devido à regulação compensatória do metabolismo extracelular do  $Pi^{62}$ .

### **1.1.2.2 Proteína Gla da matriz (MGP)**

A MGP é uma proteína fosforilada e carboxilada pela vitamina K sintetizada em vários tipos celulares (mesenquimal, vascular e condrócitos). A expressão do gene MGP pode ser regulada por vários mecanismos que têm o potencial de se tornar biomarcadores genômicos para a predição da progressão da CV<sup>66, 67</sup>.

O MGP atua como um potente inibidor da VC. O mecanismo de ação inclui a inibição direta da precipitação de fosfato de cálcio, a formação de vesículas da matriz, a formação de corpos apoptóticos e a diferenciação de CML<sup>55</sup>. A ação específica do MGP pode estar relacionada à inibição funcional da BMP 2 e BMP-4, que possuem uma estrutura semelhante<sup>67, 68</sup>.

### **1.1.2.3 Fetuina-A (F-A)**

Fortes evidências indicam que as CML vascular humanas expostas a alterações na concentração extracelular de cálcio e fósforo sofrem diferenciação fenotípica, levando à calcificação, especialmente na doença renal crônica (DRC)<sup>62, 69</sup>.

F-A é uma glicoproteína plasmática, que em adultos é sintetizada pelo fígado, é um inibidor circulante da calcificação proteica, capaz de se ligar a 100 íons  $Ca^{2+}$  por molécula. Quando a F-A é exposta a altas concentrações de

cálcio e fosfato, as moléculas se fundem para formar as partículas primárias de calciproteína que contêm fosfato de cálcio amorfo com um diâmetro de 50 a 100 nm, e a F-A mantém essas partículas em solução e evita que elas precipitem<sup>52, 70</sup>.

Estudos observacionais mostraram que a redução sérica de F-A foi associada a maior mortalidade geral e CV em pacientes com DRC<sup>70, 71</sup>. Camundongos deficientes em F-A apresentaram calcificação dos tecidos moles quando tratados com dietas enriquecidas com vitamina D ou fósforo. Em um estudo com indivíduos sem diabetes e sem disfunção renal submetidos à cateterismo cardíaco, a análise de regressão logística multivariada revelou que os níveis de F-A estavam inversamente correlacionados com a presença de calcificação coronariana (OR: 0,54, IC 95%, P = 0,025). Da mesma forma, baixos níveis séricos de F-A foram associados a uma maior gravidade de DC em uma grande população multiétnica sem DCV clínica, independentemente dos fatores de risco CV tradicionais, sexo, etnia e função renal<sup>72, 73</sup>.

#### **1.1.2.4 Osteoprotegerina (OPG)**

OPG é uma citocina produzida na medula óssea derivada de células estromais. Ele atua na remodelação óssea, inibindo a ligação do RANK ao RANKL na superfície dos osteoclastos e linfócitos T<sup>74</sup>. O papel da OPG na calcificação vascular não está completamente definido.

Uma ação protetora foi proposta para a evolução acelerada da aterosclerose em camundongos knockout para OPG<sup>75</sup>. No entanto, outro estudo mostrou que um alto nível de OPG foi associado a um escore moderado

de cálcio em indivíduos diabéticos<sup>76</sup>. Os resultados sugerem que o OPG pode ser usado como marcador de doença, foi observado aumento dos níveis dessa proteína como resposta compensatória à perda de massa óssea e dano vascular<sup>77</sup>.

Em um estudo prospectivo de 130 pacientes, Pessaro et al. mostraram que níveis elevados de RANKL estavam associados à doença coronariana (OR 1,75 (IC 95% 1,04-2,94, P = 0,035)<sup>78</sup>. Recentemente, Choe et al.<sup>79</sup> analisaram variações genéticas usando SNPs representativos de OPG (rs2073618), RANK (rs1805034), e RANKL (rs2073618) e investigaram a associação com instabilidade da placa aterosclerótica avaliada por cateterismo cardíaco. Verificou-se que o genótipo não TT do rs9594782 RANKL *SNP* era um fator de risco independente para a ocorrência de síndrome coronariana aguda.

#### **1.1.2.5 Proteínas relacionadas ao Dickkopf (Dkk)**

Os membros do Dkk incluem Dkk 1, 2, 3 e 4, entre os quais apenas o Dkk 1 é considerado inibidor da via canônica Wnt / B-catenina, bloqueando sua interação com os co-receptores LRP 5 / 6 <sup>80</sup>. Estudos mostraram que Dkk-1 atenua a expressão de Runx2, que é um alvo canônico de Wnt e um importante fator de transcrição para a transdiferenciação osteogênica das CML (60). Foi sugerido que altos níveis de Dkk-1 podem contribuir para a formação de placa instável, inibindo a deposição de calcificações protetoras difusas, além de influenciar a composição celular da placa<sup>81</sup>.

Alguns estudos relacionaram níveis séricos elevados de Dkk1 e a presença de CV por EC<sup>82</sup>. Os níveis de Dkk-1 também foram



independentemente associados a um composto de morte cardiovascular, infarto do miocárdio ou acidente vascular cerebral e apenas à morte cardiovascular<sup>83</sup>. Fang et al.<sup>68</sup> mostraram, em camundongos diabéticos, com doença renal induzida, que a combinação de neutralização de Dkk1 e redução de fosfato urinário por um ligante de fosfato era suficiente para diminuir a CV.

#### **1.1.2.6 Esclerostina**

A proteína que foi descoberta em estudos genéticos de displasias ósseas esclerosantes raras em humanos é codificada pelo gene SOST<sup>84</sup>. É uma glicoproteína de 190 aminoácidos, um membro das proteínas DAN. Sua estrutura consiste em quatro ligações diferentes de cisteína sintetizadas por osteócitos, com sua expressão gênica também produzida nos rins, fígado, placenta e cartilagem. Liga-se ao LRP 5 e 6 dos osteoblastos, inibindo a via Wnt, que é um grupo de proteínas que funcionam como sinalização genética da proliferação celular e aumento da atividade osteoblástica e com atividade antagônica à BMP no osso<sup>84</sup>.

In vitro, a esclerostina foi expressa no processo de calcificação das células do músculo liso vascular<sup>77</sup>. Recentemente, Nguyen-Yamamoto et al.<sup>85</sup> mostraram em um estudo modelo de camundongos que a esclerostina inibe a CV, por meio da supressão da produção de BMP2.

Níveis séricos elevados dessa proteína em indivíduos com doença renal crônica foram associados a uma menor taxa de mortalidade, o que leva à hipótese de que a elevação da esclerostina esteja relacionada à função protetora contra a CV<sup>86</sup>.

### **1.1.2.7 Osteopontina (OPN)**

O papel da OPN na calcificação vascular ainda é controverso. É uma proteína que atua ligando-se aos osteoclastos através da integrina avB3 e estimula a atividade reabsortiva do cálcio. Foi encontrado em tecido vascular calcificado. Em um modelo experimental, a proteína inibe a mineralização das células do músculo liso vascular pela ligação direta aos cristais de cálcio<sup>87, 88</sup>. No entanto, em um estudo de Benezin et al.<sup>89</sup>, 126 indivíduos com DM tipo 2 e doença arterial coronariana assintomática, conforme determinado pelo EC, o OPN foi um preditor independente de calcificação coronariana (OR = 3,23, IC 95% = 1,09–5,20; P = 0,044).

## **1.2 Escore de cálcio coronariano**

O principal marcador de aterosclerose subclínica disponível no momento é o escore de cálcio coronariano (EC), que quantifica a calcificação coronariana, um marcador da aterosclerose nessas artérias. A tomografia computadorizada para aferir EC possui elevada acurácia para a quantificação da calcificação coronária<sup>90</sup>. Este exame, quando elevado, indica alto risco de eventos cardiovasculares em 2-5 anos. Constituindo-se em preditor independente de desfechos cardíacos, sendo inclusive, melhor do que os outros fatores de risco combinados e o escore que individualiza a carga aterosclerótica pelo grupo étnico, etário e de gênero<sup>91</sup>. A presença de escore

de cálcio zero, entretanto, não exclui a probabilidade de presença de doença arterial coronariana (DAC)<sup>92</sup>.

São realizadas imagens do coração em cortes transversais (geralmente de 3 mm de espessura) sincronizadas ao ECG, com baixa dose de radiação e sem a utilização de contraste iodado. Este procedimento se baseia no grau de atenuação dos raios X nas áreas dos depósitos na parede das artérias<sup>93</sup>

A avaliação do EC tem maior benefício para os indivíduos considerados de risco intermediário por reclassificá-los como de maior ou menor risco<sup>94</sup>.

### **1.3 Densitometria mineral óssea areal (DXA)**

A DXA é um método rápido, reproduzível é realizado com uma dose baixa de radiação, atualmente é o exame mais usado para o diagnóstico de osteoporose e para a avaliação do risco de fratura, contudo existem evidências indicando que até 60% destas acontecem em indivíduos que foram considerados de baixo risco pelo DXA<sup>95</sup>. O scanner da DXA consta de um tubo de raios X de baixa dose com aplicação de duas energias para separar componentes minerais e de tecido mole e um arranjo multidetetor de alta resolução. Desta forma, o dispositivo possui dois sistemas diferentes: um que emite raios-x altos e alternados (140 kVp) e outro de baixos (70-100 kVp) através de uma área de varredura ou um feixe de raios-x constante com um filtro que separa os fótons de energia maior (70 keV) e menor (40 keV).

Os principais parâmetros são o T-escore, que representa o desvio padrão (DP) obtido em relação à densidade mineral óssea (DMO) média de uma população jovem adulta de referência da mesma etnia e sexo, e o Z-

escore, que é o DP pelo qual a DMO difere da significante DMO de uma população saudável da mesma etnia, sexo e idade da pessoa submetida à DXA. Segundo a Organização Mundial da Saúde, entre mulheres na pós-menopausa e homens com 50 anos ou mais, o diagnóstico é baseado no T-score, sendo normal maior que  $-1,0$ ; osteopenia,  $-1$  a  $-2,5$ ; e osteoporose, menor que  $-2,5$ <sup>96</sup>. A redução da DMO óssea avaliada pelo DXA foi associada de forma independente ao maior número e gravidade das fraturas vertebrais e do quadril<sup>97, 98</sup>.

#### **1.4 Tomografia computadorizada quantitativa periférica de alta resolução**

A HR-pQCT é um novo método de imagem que poderiam suprir as deficiências do DXA pois permite avaliar em 3D, o compartimento ósseo trabecular e cortical separadamente em relação a densidade mineral óssea volumétrica e parâmetros estruturais, além de fornecer dados sobre as características biomecânicas por meio do software de elementos finitos<sup>99, 100</sup>. A literatura mostra que os dados derivados da HR-pQCT são melhores preditores de risco de fratura do que o DXA<sup>101</sup>.

Não existem trabalhos na literatura que investigaram a associação entre a microarquitetura óssea medida por HR-pQCT e calcificação arterial coronariana avaliada pelo EC em indivíduos idosos. Em um estudo recente com 350 pacientes consecutivos Paccou J, Edwards M. H, Ward, K. A, et al, a HR-pQCT foi utilizada para investigar os parâmetros geométricos, volumétricos e microestruturais no rádio distal e na tíbia distal em participantes com

cardiopatia isquêmica (CI). Após análise multivariada com ajuste para idade, IMC, tabagismo, história de diabetes e gênero, a redução de um dos parâmetros corticais ósseos foi maior entre os homens com CI<sup>102</sup>.

Até onde sabemos, apenas um estudo na literatura analisou a associação entre os parâmetros de HR-pQCT e EC. No entanto, este estudo analisou sessenta e seis indivíduos com doença renal crônica (DRC) em diálise em fase terminal de ambos os sexos. Na análise multivariada estratificada por sexo e corrigida por idade, os autores descobriram que parâmetros trabeculares e corticais foram significativamente menores em pacientes com EC  $\geq 100$ <sup>103</sup>. De fato, a relação entre EC e HR-pQCT em idosos da comunidade com apenas patologias subclínicas permanece desconhecida, portanto, se faz necessário investigar a real associação destas patologias neste grupo etário.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Relação entre calcificação coronária e parâmetros da microarquitetura óssea**

Avaliar a associação entre calcificação coronária e os parâmetros da microarquitetura óssea utilizando o escore de cálcio coronariano e a tomografia computadorizada quantitativa periférica óssea de alta resolução em estudo populacional envolvendo indivíduos de ambos os sexos, maiores de 65 anos.

### **2.2 Escore de cálcio com a DXA e fatores associados à densidade óssea**

Avaliar a associação do EC com os parâmetros da DXA, exames de laboratório e medicações utilizadas no tratamento da OP.

## **3 MÉTODOS**

### **3.1 População do Estudo**

O projeto em questão trata-se de uma análise pos-hoc, observacional, transversal, utilizando os dados do estudo em andamento intitulado: “Avaliação da síndrome metabólica, calcificação coronariana e novos marcadores do metabolismo ósseo em idosos da comunidade da coorte de São Paulo Ageing & Health Study (SPAH)”, avaliado e aprovado anteriormente no Comitê de Ética em Pesquisa do HC-FMUSP (CAPPesq) sob o número CAAE 29175814.0.0000.0068, número de parecer 706.693, data da relatoria 02/07/2014 e do CNPq sob o número 457590-2013-0.

Foram estudados 256 indivíduos com idade maior que 65 anos pertencentes a uma coorte de idosos da região do Butantã/zona oeste da cidade de São Paulo (São Paulo Ageing & Healthy Study- SPAH).

#### **3.1.1 Critérios de inclusão, critérios de exclusão**

Foram incluídos indivíduos maiores de 65 anos de ambos os sexos.

Foram excluídos os indivíduos com histórico de insuficiência hepática, clearance de creatinina (ClCr) <30 ml/min/1,73m<sup>2</sup>, hipertireoidismo, hipotireoidismo, diabetes não controlado, má absorção, outras doenças metabólicas ósseas (hiperparatireoidismo primário, osteomalácia), cirurgia de revascularização do miocárdio ou coronária percutânea.

Após a assinatura do termo de consentimento, foi aplicado um questionário para obtenção do histórico pessoal de antecedentes pessoais de doenças preexistentes, medicamentos atuais e hábitos dos pacientes.

Hipertensão arterial sistêmica (HAS) foi definida como história documentada ou tratamento com medicamentos anti-hipertensivos, diabetes mellitus (DM), como diagnóstico médico e/ou uso de insulina ou hipoglicemiantes orais e dislipidemia (DLP) como doença conhecida, mas não tratada ou uso atual com medicações hipolipidemiantes. Antecedente de tabagismo foi considerado como tabagismo atual ou precedente. Infarto agudo do miocárdio (IAM), angina, acidente vascular cerebral, doença carotídea, osteoporose e consumo de café foram autoreferidos. O grau de atividade física foi classificado como baixo (não faz nem trabalhos domésticos), moderado (trabalhos domésticos, jardinagem, caminhada não regular), alto (atividade física regular fora da rotina habitual: caminhada, dança), pelo menos duas vezes por semana, durante 30 minutos (104). Para o cálculo do CrCl, foi utilizada a equação *Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration* (CKD-EPI)<sup>105</sup>.



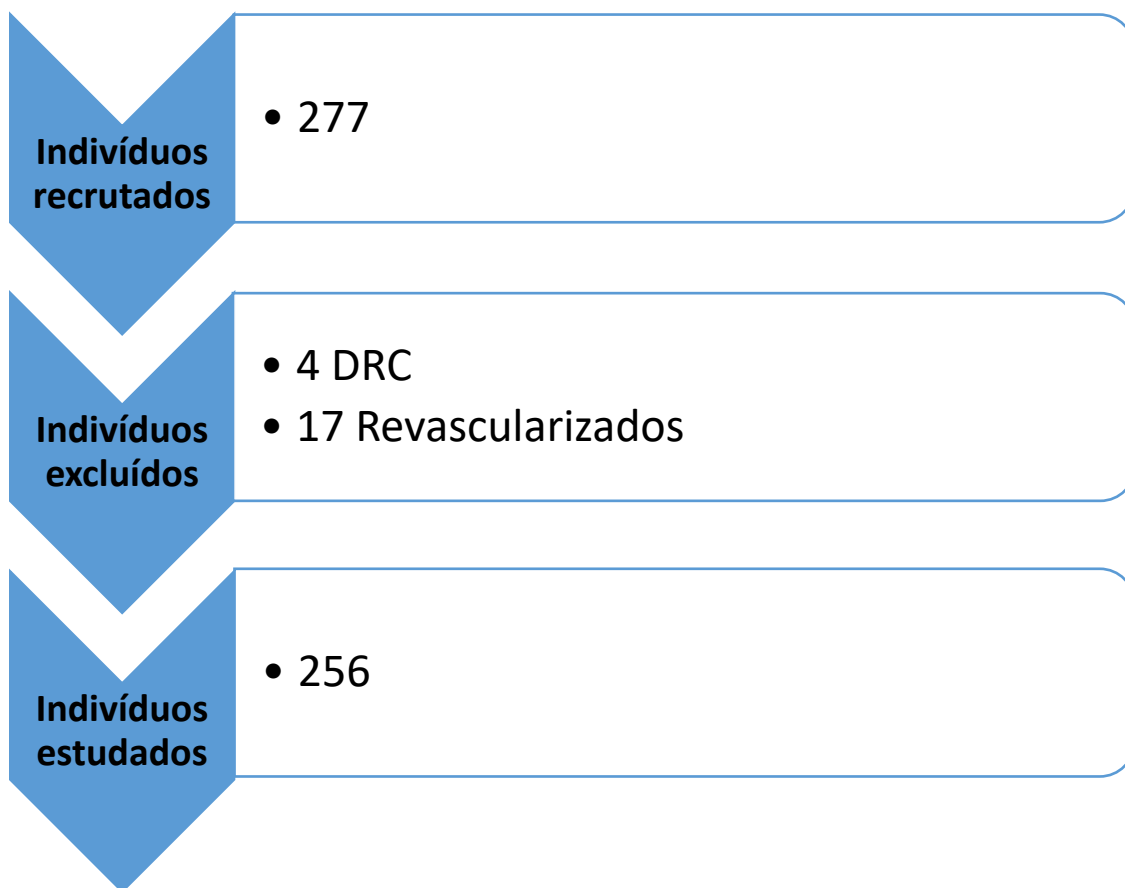


Figura 2 - Fluxograma dos participantes

### 3.2 Exames laboratoriais

Foram coletadas simultaneamente no período das 07:00hrs às 11:00hrs às amostras de sangue para a realização da análise do perfil lipídico (colesterol total, HDL colesterol, LDL colesterol, triglicérides), creatinina, glicemia, insulina, proteína C-reativa (PCR) ultrasensível e perfil bioquímico do metabolismo ósseo, cálcio, fósforo, fosfatase, paratormônio (PTH), 25-hidroxivitamina D.

Para a análise dos marcadores de remodelamento ósseo, foram coletados 10 ml de sangue em jejum e estocados a  $-80^{\circ}\text{C}$  para a análise dos seguintes marcadores do metabolismo ósseo: CTX (telopectideo amino-terminal do colágeno tipo I), P1NP (propeptídeo amino-terminal do pro-

colágeno tipo I) no Laboratório de Investigação Médica (LIM-17) - Metabolismo Ósseo da Disciplina de Reumatologia da Faculdade de Medicina da USP- LIM 17. O P1NP (marcador de formação óssea) e CTX (marcador de reabsorção óssea) foram dosados no soro por eletroquimioluminescência (Elecsys systems, Roche diagnostics, Mannheim, Germany).

### **3.3 Tomografia computadorizada de coronárias para avaliação do escore de cálcio**

Foram realizadas no Instituto do Coração-InCor, tomografias de coronárias para a avaliação do escore de cálcio com o tomógrafo Aquilion One Toshiba Medical Systems de 320 detectores com sincronização cardíaca, usando gatilho prospectivo, resolução temporal máxima de 125-250ms e espessura de fatia adquirida de 0,5 mm, reconstruída em espessura de fatia de 3 mm para análise. A voltagem de pico do tubo de raios X foi fixada em 120Kv e a corrente do tubo ajustada ao tamanho do corpo do paciente, 250-450 mA, resultando em uma dose de radiação variando de 2,6 a 4,0 mSv.

Os valores de EC foram calculados usando o escore de Agatston (estação de trabalho Aquarius, TeraRecon, Inc, San Mateo, Califórnia)<sup>106</sup>. As imagens foram avaliadas por um médico especialista, com pelo menos dois anos de treinamento específico, sem conhecimento das informações clínicas e tomográficas dos pacientes.

### **3.4 Tomografia computadorizada quantitativa periférica de alta resolução (HR-pQCT)**

Foram avaliados os segmentos distais do rádio e da tíbia. A medição incluiu 110 fatias, correspondendo a uma seção de 9,02 mm ao longo da direção axial. A microarquitetura foi medida usando um sistema tridimensional de HR-pQCT (Xtreme CT; Scanco Medical AG). Este sistema permitiu a aquisição simultânea de uma pilha de fatias paralelas com uma resolução de 82  $\mu\text{M}$  (tamanho de voxel).

Foram utilizadas as seguintes definições: energia efetiva de 60 kVp, corrente do tubo de raios X de 95 mA e matriz 1536X1536. O controle de qualidade foi monitorado através de exames diários de um fantasma (Phanton) contendo hastes de hidroxiapatita (HA) incorporadas em um tecido de resina equivalente (QRM, Moehrendorf, Alemanha); a calibração diária do dispositivo foi realizada para obter imagens com boa qualidade técnica.

#### **3.4.1 Parâmetros analisados**

1. Parâmetros trabeculares: Tb.vBMD: Densidade volumétrica trabecular (mg HA /  $\text{cm}^3$ ), Tb.N: número de trabéculas (1 mm, DP), Tb.Th: espessura trabecular (mm), Tb.Sp: separação trabecular (mm).

2. Parâmetros corticais: Ct.vBMD- Densidade volumétrica cortical (mg HA /  $\text{cm}^3$ ), Ct.Th- Espessura média da cortical (mm); Ct.Po- Porosidade cortical (1).

### 3.5 Densitometria mineral óssea (areal)

Foram avaliados os resultados obtidos da DXA já realizados do projeto em andamento intitulado: “Avaliação da síndrome metabólica, calcificação coronariana e novos marcadores do metabolismo ósseo em idosos da comunidade da coorte de “*São Paulo Ageing & Health Study (SPAHS)*”, através do equipamento Hologic QDR 4500 (Belford, MA, USA) na região da coluna lombar, colo de fêmur e fêmur total, expressa em g/cm<sup>2</sup>. Consideramos a presença de osteoporose quando a densidade mineral óssea foi abaixo de -2,5 desvios padrão, osteopênicos entre -2,5 a -1,0 desvios padrão e normais acima de -1,0 desvios padrão (T-score).

### 3.6 Análise estatística

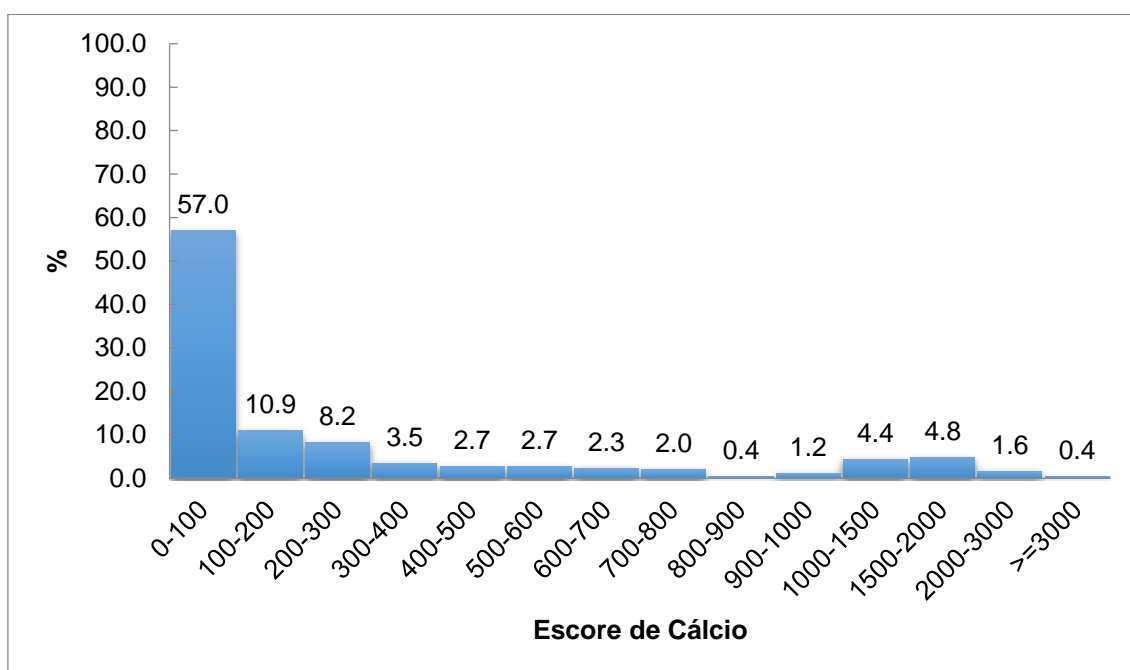
A análise estatística foi realizada usando o software estatístico STATA, versão 12.0 (Stata Corp., College Station, Estados Unidos). Os resultados descritivos foram obtidos utilizando frequências e porcentagens para as características de variáveis categóricas e medidas de tendência central (média e mediana), medidas de dispersão (desvio padrão) e posição p25 e p75 (percentil 25 e 75). Variáveis contínuas na amostra total e separadas por gênero. A variável resposta do estudo é o escore de cálcio que assume valores inteiros não negativos e tem uma distribuição assimétrica à esquerda. A análise da associação foi realizada pelo modelo de regressão linear generalizada com distribuição de probabilidade de Poisson e função de ligação logarítmica. As variáveis relacionadas à HR-pQCT foram padronizadas nos escores z, que representam o número de desvios padrão acima ou abaixo da média da

população. Todos os testes foram bicaudais. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significantes. Variáveis com valores de  $p < 0,20$  na análise univariada foram utilizadas no modelo de regressão logística multinomial com procedimento de seleção de variáveis stepwise.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Dados descritivos

Sessenta (23,4%) pacientes apresentaram escore de cálcio zero, a prevalência foi maior no faixa do EC de zero a 100 (57%) e menor prevalência de EC >300 UI Agatston nesta população de idosos.



**Figura 3** - Distribuição do escore de cálcio

Na tabela 1 com as características por sexo, observamos que houve predomínio do sexo feminino (65 %), a média de idade foi de 79,5 anos e sem diferença significativa entre ambos os sexos. A altura foi maior nos homens ( $p < 0,001$ ). Embora a circunferência abdominal foi similar nos dois grupos, o IMC foi maior nas mulheres ( $< 0,001$ ). Em relação a distribuição pela cor, a distribuição foi similar em ambos os sexos. Considerando os antecedentes, a

prevalência de síndrome metabólica, HAS, DLP, AVC e OP foi maior nas mulheres ( $p < 0,001$ ).

O consumo de álcool foi maior nos homens ( $p < 0,001$ ) e do café foi mais frequente nas mulheres, porém limítrofe em relação à significância estatística ( $p 0,051$ ) (Tabela 1).

**Tabela 1** - Características antropométricas e clínicas dos 256 idosos, separados pelo sexo

Variável	Total N=256	Mulheres N=168	Homens N=88	p
<b>Idade (anos)</b>	79.5 ± 4.24	79.7 ± 4.2	79 ± 4.3	0.20
<b>Altura (cm)</b>	153.2 ± 8.8	149 ± 6.9	161.2 ± 7.45	<0.001
<b>Peso (kg)</b>	67.4 ± 12	66.4 ± 12.2	69.3 ± 11.6	<0.07
<b>CA (cm)</b>	96 ± 11.1	96.6 ± 11.5	94.8 ± 10.2	0.20
<b>IMC</b>	28.7 ± 4.9	29.9 ± 5	2.6 ± 4.1	<0.001
<b>Cor</b>				
<b>Branca</b>	75 (29.3%)	44 (26.2%)	31 (35.2%)	0.31
<b>Não branca</b>	181 (70.7%)	124 (73.8%)	57 (64.8%)	
<b>PAS (mmHg)</b>	164 (99.1%)	158.9 (23.1%)	156.3 (23.1%)	0.38
<b>PAD (mmHg)</b>	164 (99.1%)	85 (13%)	83,5 (13%)	0.40
<b>Consumo de álcool</b>	4 (1.6%)	0 (0%)	4 (4.6%)	<0.001
<b>Atual</b>	2 (0.8%)	0 (0%)	2 (2.3%)	
<b>Últimos 3- 4 anos</b>	201(78.5%)	143 (85.1%)	58 (65.9%)	
<b>Nunca</b>	49 (19.1%)	25 (4.9%)	24 (27.3%)	
<b>Tabagismo</b>	24 (9.4%)	7 (8%)	17 (10.1%)	0.57
<b>Grau de atividade física</b>				
<b>Baixa</b>	40 (15.6%)	28 (16.7%)	12 (13.6%)	0.199
<b>Moderada</b>	149 (58.2%)	102 (60.7%)	47 (53.4)	
<b>Alta</b>	67 (26.2%)	38 (22.6%)	29 (33%)	
<b>Consumo de café</b>	231 (90.2%)	156 (92.9%)	75 (85.2%)	0.051
<b>DM</b>	58 (22.7%)	42 (25%)	16 (18.2%)	0.21
<b>Síndrome metabólica</b>	103 (40.2%)	84 (50.6%)	19 ( 21.6%)	<0.001
<b>HAS</b>	192 (75%)	133 (79.2%)	59 (67.1%)	0.03

Variável	Total N=256	Mulheres N=168	Homens N=88	p
<b>DLP</b>	117 (45.7%)	89 (53%)	28 (31.8%)	0.001
<b>OP</b>	104 (40,62%)	83 (49,4%)	21 (23,9%)	<0.001
<b>Angina</b>	1 (0.4%)	1 (0.6%)	0 (0%)	1.00
<b>IAM</b>	8 (3.1%)	5 (3%)	3 (3.4%)	1.00
<b>AVC</b>	20 (7.8%)	9 (5.4%)	11 (12.5%)	0.04
<b>TVP</b>	6 (2.3%)	5 (3%)	1 (1.1%)	0.66
<b>T escore ≤ -2,5</b>	101 (39.5%)	81 (48.2%)	20 (22.7%)	<0.001
<b>Fratura nova</b>	17 (6.6%)	14 (8.3%)	3 (3.4%)	0.13
<b>Queda</b>	76 (29.7%)	58 (34.5%)	18 (20.5%)	0.01

DP: desvio padrão; n: número; IIQ: intervalo interquartil; CA Circunferência abdominal; IMC: índice de massa corpórea; PAS pressão arterial sistólica; PAD pressão arterial diastólica; HAS: Hipertensão arterial sistêmica; DLP: dislipidemia, IAM: infarto agudo do miocárdio; AVC: acidente vascular cerebral; TVP: Trombose venosa profunda; OP: osteoporose.

Os parâmetros lipídicos (CT, HDL e LDL) foram maiores nas mulheres, contrariamente aos níveis médios de insulina (16,38 + 17,8 vs 17,92 + 47,8 mU/L, p <0,001). A função renal na população em geral esteve preservada (ClCr 75,71 ml/min/1,73m<sup>2</sup>), com a creatinina sendo maior nos homens (p <0,001), conforme mostra a tabela 2.



**Tabela 2** - Características laboratoriais dos 256 idosos, separados pelo sexo

Variável	Total N=256	Mulheres N=168	Homens N=88	p Homens vs. Mulheres
<b>Glicemia, mg / dL</b>	102.30 (28.00) 96.00 [88-106]	103.2 (29.85) 96 [88-106.75]	100.6 (24.14) 96 [88-105.7]	0.48
<b>CT, mg / dL</b>	206.49 (43.51) 204 (177- 236)	192.10(36.6) 211.5 (181- 248)	100.6 (2.14) 196 (161-219)	<0,001
<b>HDL, mg/dL</b>	55.99 (15.16) 55.50 [45-65]	59.07(15.13) 58 [47.25- 67.75]	50.13 (13.46) 50 [40-59.75]	<0.001
<b>LDL, mg/dL</b>	125.55 (40.15) 123.5 [99-152]	129.18 (43.1) 126 (102-158)	118.6 (32.9) 119.5 (96- 143)	0,03
<b>Triglicerides, mg / dL</b>	131.66 (63.39) 137 [119- 168.7]	121.1 (62,5) 126 [90-175]	121.1 (62.52) 107 [78-144.5]	0.054
<b>Creatinina, mg/dL</b>	0.92 (0.28) 0.84 [0.73- 1.04]	0.83 (0,20) 0.80 [0.69- 0.94]	1.08 (0.32) 1.01 [0.851.28]	<0.001
<b>CICr mL/min/1,73 m<sup>2</sup></b>	75.71 (18.56) 77.75 [62-89]	78.55 (32.86) 77.5 [62.85-90]	74.73 (19.76) 77.15 [59.9- 89]	0.54
<b>Fosfatase alcalina, U/ L</b>	76.92 (29.33) 72 [59-90]	78.55 (32.86) 73 [60-92.7]	73 (20.71) 71 [58-88]	0.215
<b>Fosforo, mg / dL</b>	3.34 (0.49) 3.3 [3-3.6]	3.47 (0.46) 3.4 [3.2-3.7]	3.08 (0.45) 3.1 [2.73-3.4]	<0.001
<b>Cálcio, mg/dL</b>	9.68 (0.49) 9.7 [9.4-10]	9.7 (0.51) 9.7 [9.33-10]	9.63 (0.46) 9.65 [9.4-9.9]	0.29
<b>iPTH, pg/dL</b>	56.79 (26.97) 52 [39.25- 69.75]	56.1 (21.72) 53 [40.25-68]	58.09 (34.97) 50.5 [36.25-7]	0.62
<b>25(OH)D, ng/mL</b>	23.15 (9.04) 22 [17.25-27]	22.99 (9.25) 22 [17-26]	23.45 (8.68) 23 [18-29]	0.7
<b>Insulina, mU/L</b>	16.92 (31.44) 10.90 [6.98- 16.7]	16.38 (17.8) 11.8 [7.5-18.7]	17.92 (47.8) 9.05 [5.9-13.2]	0.001
<b>PCR, mg/L</b>	3.90 (9.57) 1.70 [0.70- 4.28]	4.03 (9.71) 2.10 [0.70- 4.78]	3.65 (9.35) 1.30 [0.63- 3.23]	0.07

Variável	Total N=256	Mulheres N=168	Homens N=88	p Homens vs. Mulheres
CTX, ng/mL	0.27 (0.17)	0.27 (0.17)	0.27 (0.17)	0.98
	0.23 [0.14- 0.34]	0.24 [0.14- 0.34]	0.23 [0.16- 0.33]	
P1NP, ng/mL	39.04 (25.74)	40.14 (28.43)	36.97 (19.71)	0.35
	33 [24.78-44.4]	33.9 [24.9- 47.1]	32.5 [23.7- 42.3]	

DP: desvio padrão; n: número; IIQ: intervalo interquartil; CT: Colesterol total; HDL lipoproteína de alta densidade; LDL lipoproteína de baixa densidade; CíCrI: Clearance de creatinina estimado; iPTH: paratormônio; 25OH D 25 hidroxivitamina D; PCR: proteína C reativa; CTX: telopeptídeo amino-terminal do colágeno tipo I; P1NP propeptídeo amino-terminal do pró-colágeno tipo I.

Na tabela 3 podemos ver que as medicações mais comumente usadas foram os diuréticos tiazídicos (42,6 %), mais frequente nas mulheres (48,2% vs 31,8%, p 0,012), seguido por estatinas e betabloqueadores (38,1% vs 21,6%, p 0,007 e 25% vs 12,5%, p 0,019 respectivamente).

Em relação ao OP; tratamento específico foi mais utilizado em mulheres do que homens: cálcio: 41,1% vs. 17%, 25 (OH) D: 54,2% vs 22,7% e bisfosfonato: 50% vs, 15,9% (todos p <0,001).

**Tabela 3** - Frequências absolutas e relativas dos medicamentos utilizados em 256 idosos, separados por sexo

Variável	Total		Mulheres		Homens		p
	N=256	%	N=168	%	N=88	%	
IECA	89	34.8	58	34.5	31	35.2	0.91
Tiazidico	109	42.6	81	48.2	28	31.8	0.012
Bloqueador de cálcio	47	18.4	35	20.8	12	13.6	0.15
Betabloqueador	53	20.7	42	25.0	11	12.5	0.01
Estatina	83	32.4	64	38.1	19	21.6	0.007
AAS	72	28.1	45	26.8	27	30.7	0.51
Varfarina	4	1.6	3	1.8	1	1.1	1.00
Levotiroxina	31	12.1	26	15.5	5	5.7	0.02
Uso de insulina	17	6.6	11	6.6	6	6.8	0.94
Calcio suplementar	86	33.6	69	41.1	17	19.3	<0.001
25OHD	111	43.4	91	54.2	20	22.7	<0.001
Bisfosfonato	98	38.3	84	50.0	14	15.9	<0.001
Corticoide	4	1.6	3	1.8	1	1.1	1.00

IECA: inibidores da enzima de conversão da angiotensina; AAS: ácido acetilsalicílico; 25OHD 25-hidroxivitamina D

A média do escore de cálcio Agatston foi de 283,95. Não houve diferença significativa entre os sexos ( $p = 0,065$ ). A DMO a real foi maior nos homens ( $<0,001$ ), em relação aos parâmetros do HR-pQCT da tíbia: Tb.vBMD, Ct.vBMD, Tb.N, Ct.vBMD, Ct.Th e S foram significativamente maiores nos homens. Somente a Tb.Sp foi maior as mulheres ( $<0,001$ ) (Tabela 4).

Tabela 4 - Características do EC, DMO e HR-pQCT dos 256 idosos, separados por sexo

Variável	Total	Mulheres	Homens	p
<b>EC, n</b>	256	168	88	0.065
	283.95 (528.5)	214.17 (388)	417.16 (708.7)	
	54.50 [1-290.75]	33 [0.25-236.5]	80.5 [1.25-450.25]	
<b>DMOa coluna lombar, g/cm<sup>2</sup>, n</b>	251	163	88	<0.001
	0.94 (0.19)	0.88 (0.17)	1.05 (0.19)	
	0.92 [0.80-1.06]	0.87 [0.75-0.97]	1.02 [0.93-1.17]	
<b>DMOa colo do femur, g/cm<sup>2</sup>, n</b>	253	166	87	<0.001
	0.68 (0.13)	0.64 (0.11)	0.76 (0.14)	
	0.67 [0.59-0.77]	0.64 [0.56-0.72]	0.75 [0.65-0.84]	
<b>DMOa femur total, g/cm<sup>2</sup>, n</b>	253	166	87	<0.001
	0.83 (0.15)	0.78 (0.13)	0.93 (0.15)	
	0.82 [0.73-0.94]	0.78 [0.7-0.86]	0.94 [0.8-1.06]	
<b>Tb.vBMD Tibia, mg HA/cm<sup>3</sup>, n</b>	254	167	87	<0.001
	135.24 (39.9)	123.77 (36.65)	157.27 (36.97)	
	132.45 [108-163]	122.9 [101.6-151.3]	155.7 [127.7-176]	
<b>Ct.vBMD Tibia, mg HA/cm<sup>3</sup>, n</b>	254	167	87	<0.001
	820.34 (70.53)	805.17 (68.78)	849.45 (64.8)	
	830.9 [776-865.7]	817.4 [767.9-851.2]	817.4 [767.9-851]	
<b>Tb.N Tibia, 1/mm, n</b>	254	167	87	<0.001
	1.53 (0.43)	1.41 (0.42)	1.76 (0.37)	
	1.51 [1.25-1.82]	1.41 [1.16-1.69]	1.70 [1.49-2,03]	
<b>Tb.Th Tibia, mm, n</b>	254	167	87	0.83
	0.07 (0.01)	0.92 (0.28)	0.08 (0.01)	
	0.59 [0.48-0.73]	0.92 [0.71-1.13]	0.07 [0.06-0.08]	
<b>Tb.Sp Tibia, mm, n</b>	254	167	87	<0.001
	0.65 (0.29)	0.72 (0.33)	0.52 (0,13)	
	0.59 [0.48-0.73]	0.64 [0.51-0.79]	0.52 [0.41-0.59]	
<b>Ct.Th Tibia, mm, n</b>	254	167	87	<0.001
	1.01 (0.32)	0.92 (0.28)	1.19 (0.32)	
	1.03 [0.77-1,24]	0.92 [0.71-1.13]	1.21 [0.96-1.41]	
<b>Ct.Po Tibia, (1), n</b>	253	166	87	0.49
	0.08 (0.03)	0.08 (0.03)	0.08 (0.03)	
	0.08 [0.06-0.09]	0.08 [0.06-0.10]	0.07 [0.06-0.09]	

EC: Escore de cálcio; (DP): desvio padrão; n: número; [IIQ]: intervalo interquartil; T DMOa: Densidade mineral óssea areal; Tb.vBMD: Densidade volumétrica trabecular; Ct.vBMD: Densidade volumétrica cortical; Tb.N: número de trabéculas; Tb.Th: espessura trabecular; Tb.Sp: separação entre trabéculas; Ct.Th: espessura cortical; Ct.Po porosidade cortical.

## 4.2 Análise univariada

Nas tabelas 5 e 6, considerando as variáveis clínicas e laboratoriais nas mulheres, observamos associação com EC de todas as variáveis a exceção da idade, grau de atividade moderada vs alta, antecedente de IAM níveis de cálcio.

**Tabela 5 - Associação do EC com as Características Clínicas em mulheres**

Variável	Exp $\beta$	IC		p
		Inferior	Superior	
Idade (anos)	1,0	0,998	1,003	0,69
CA (cm)	1,007	1,006	1,008	<0,001
IMC	1,028	1,026	1,030	<0,001
Cor não branca	1,662	1,618	1,708	<0,001
PAS (mmHg)	1,002	1,002	1,003	<0,001
PAD (mmHg)	1,004	1,003	1,004	<0,001
Consumo de álcool	0,91	0,883	0,938	<0,001
Tabagismo	1,641	1,594	1,688	<0,001
Grau de atividade física				
Baixa x alta	1,798	1,744	1,854	<0,001
Moderada x alta	0,991	0,964	1,018	0,523
Consumo de café	1,416	1,351	1,483	<0,001
DM	1,995	1,953	2,037	<0,001
HAS	1,396	1,357	1,436	<0,001
DLP	1,959	1,916	2,004	<0,001
IAM	1,010	0,951	1,073	0,730
AVC	1,168	1,119	1,22	<0,001
T escore $\leq -2,5$	1,11	1,089	1,135	<0,001

Exp  $\beta$ : coeficiente de equação; IC: intervalo de confiança; CA: circunferência abdominal; IMC: índice de massa corpórea; PAS: pressão arterial sistólica; PAD: pressão arterial diastólica; DM: diabetes mellitus; HAS: hipertensão arterial essencial; DLP: dislipidemia; IAM: infarto agudo do miocárdio; AVC: acidente vascular cerebral

**Tabela 6 - Associação do EC com os resultados laboratoriais em mulheres**

Variável	Exp $\beta$	IC		p
		Inferior	Superior	
Glicemia, mg / dL	1,0084	1,0082	1,0087	<0,001
CT, mg / dL	0,9971	0,9968	0,9973	<0,001
HDL, mg/dL	0,9927	0,9920	0,9934	<0,001
LDL, mg/dL	0,9967	0,9965	0,9970	<0,001
Triglicerídeos, mg / dL	1,0008	1,0006	1,0009	<0,001
Creatinina, mg/dL	0,7433	0,7057	0,7829	<0,001
CICr mL/min/1,73 m <sup>2</sup>	1,0052	1,0046	1,0058	<0,001
Fosfatase alcalina, U/ L	1,0043	1,0040	1,0045	<0,001
Fosforo, mg / dL	1,3228	1,2949	1,3512	<0,001
Cálcio, mg/dL	0,9837	0,9638	1,0040	0,114
iPTH, pg/dL	0,9934	0,9929	0,9939	<0,001
Insulina, mU/L	1,0120	1,0116	1,0124	<0,001
PCR, mg/L	1,0099	1,0092	1,0105	<0,001
CTX, ng/mL	2,0926	1,9728	2,2196	<0,001
P1NP, ng/mL	1,0034	1,0031	1,0037	<0,001

Exp  $\beta$ : coeficiente de equação; IC: intervalo de confiança; CT: Colesterol total; HDL lipoproteína de alta densidade; LDL lipoproteína de baixa densidade; CICr: Clearance de creatinina estimado; iPTH: paratormônio; PCR: proteína C reativa; CTX: telopeptídeo amino-terminal do colágeno tipo I; P1NP propeptídeo amino-terminal do pró-colágeno tipo B.

Nas mulheres, o uso de cálcio suplementar, bloqueador dos canais de cálcio, beta- bloqueadores, AAS, estatinas, corticoides e insulina foram associados significativamente a maior grau de calcificação coronariana (Tabela 7).

**Tabela 7 - Associação do EC com as medicações em mulheres**

<b>Medicação</b>	<b>Exp <math>\beta</math></b>	<b>IC 95%</b>		<b>p</b>
<b>Cálcio suplementar</b>	1,2285	1,2033	1,2543	<0,001
<b>25OHD</b>	0,7487	0,7334	0,7644	<0,001
<b>Bisfosfonato</b>	0,6977	0,6832	0,7125	<0,001
<b>IECA</b>	0,9276	0,9074	0,9483	<0,001
<b>Tiazídico</b>	0,9596	0,9399	0,9796	<0,001
<b>BBC</b>	1,8297	1,7897	1,8705	<0,001
<b>Beta-bloqueador</b>	1,3018	1,2729	1,3315	<0,001
<b>Estatina</b>	2,0530	2,0107	2,0962	<0,001
<b>AAS</b>	1,5202	1,4878	1,5534	<0,001
<b>Levotiroxina</b>	0,6373	0,6161	0,6592	<0,001
<b>Varfarina</b>	0,1099	0,0872	0,1385	<0,001
<b>Corticoide</b>	2,1044	1,9921	2,2230	<0,001
<b>Insulina</b>	2,2889	2,2213	2,3585	<0,001

BCC: Bloqueador dos canais de cálcio; IECA: inibidores da enzima de conversão da angiotensina; AAS: ácido acetilsalicílico; 25OHD: 25-hidroxivitamina D

Com relação aos homens, todas as variáveis clínicas e laboratoriais tiveram associação com o EC (Tabela 8, 9).

**Tabela 8** - Associação do EC com as Características Clínicas em homens

Variável	Exp $\beta$	IC		p
		Inferior	Superior	
<b>Idade (anos)</b>	1,062	1,060	1,064	<0,001
<b>CA (cm)</b>	1,016	1,015	1,017	<0,001
<b>IMC</b>	1,037	1,035	1,040	<0,001
<b>Cor não branca</b>	0,632	0,619	0,645	<0,001
<b>PAS (mmHg)</b>	1,002	1,002	1,003	<0,001
<b>PAD (mmHg)</b>	1,004	1,003	1,004	<0,001
<b>Consumo de álcool</b>	0,91	0,883	0,938	<0,001
<b>Tabagismo</b>	1,641	1,594	1,688	<0,001
<b>Grau de atividade física</b>				
<b>Baixa x alta</b>	0,917	0,889	0,946	<0,001
<b>Moderada x alta</b>	0,708	0,693	0,724	
<b>Consumo de café</b>	1,773	1,711	1,838	<0,001
<b>DM</b>	2,489	2,436	2,543	<0,001
<b>HAS</b>	2,049	1,997	2,103	<0,001
<b>DLP</b>	1,272	1,245	1,299	<0,001
<b>IAM</b>	2,083	2,0	2,169	<0,001
<b>AVC</b>	1,183	1,149	1,218	<0,001
<b>T escore <math>\leq</math> -2,5</b>	0,7281	0,7088	0,7479	<0,001

Exp  $\beta$ : coeficiente de equação; IC: intervalo de confiança CA Circunferência abdominal; IMC: índice de massa corpórea; PAS pressão arterial sistólica; PAD pressão arterial diastólica; HAS: Hipertensão arterial sistêmica; DLP: dislipidemia, IAM: infarto agudo do miocárdio; AVC: acidente vascular cerebral; TVP: Trombose venosa profunda; OP: osteoporose.



**Tabela 9** - Associação do EC com os resultados laboratoriais em homens

Variável	Exp $\beta$	IC		p
		Inferior	Superior	
Glicemia, mg / dL	1,0035	1,0031	1,0039	<0,001
CT, mg / dL	0,9944	0,9941	0,9947	<0,001
HDL, mg/dL	0,9923	0,9915	0,9931	<0,001
LDL, mg/dL	0,9903	0,9900	0,9906	<0,001
Triglicerídeos, mg / dL	1,0038	1,0037	1,0040	<0,001
Creatinina, mg/dL	1,6725	1,6252	1,7211	<0,001
CICr mL/min/1,73 m <sup>2</sup>	0,9859	0,9854	0,9864	<0,001
Fosfatase alcalina, U/ L	0,9781	0,9775	0,9787	<0,001
Fosforo, mg / dL	2,3550	2,2999	2,4114	<0,001
Cálcio, mg/dL	1,2234	1,1983	1,2492	<0,001
iPTH, pg/dL	0,9958	0,9954	0,9962	<0,001
Insulina, mU/L	1,0031	1,0030	1,0033	<0,001
PCR, mg/L	1,0142	1,0134	1,0149	<0,001
CTX, ng/mL	0,1185	0,1088	0,1291	<0,001
P1NP, ng/mL	0,9896	0,9890	0,9902	<0,001

Exp  $\beta$ : coeficiente de equação; IC: intervalo de confiança; CT: Colesterol total; HDL lipoproteína de alta densidade; LDL lipoproteína de baixa densidade; CICr: Clearance de creatinina estimado; iPTH: paratormônio; PCR: proteína C reativa; CTX: telopeptídeo amino-terminal do colágeno tipo I; P1NP propeptídeo amino-terminal do pró-colágeno tipo

Na tabela 10 na população masculina, o uso de AAS, bisfosfonatos e levotiroxina foram associados a maior grau de EC, cálcio suplementar, 25-hidroxivitamina D, IECA, diurético tiazídico, estatina, varfarina e corticoide também mostraram associação, no entanto com menor significância.

**Tabela 10** - Associação do EC com as medicações em homens

Medicação	Exp $\beta$	IC 95%		p
<b>Cálcio suplementar</b>	1,7320	1,6935	1,7713	<0,001
<b>25OHD</b>	1,7053	1,6687	1,7427	<0,001
<b>Bisfosfonato</b>	2,8874	2,8263	2,9499	<0,001
<b>IECA</b>	1,4477	1,4181	1,4778	<0,001
<b>Tiazídico</b>	1,3694	1,3410	1,3984	<0,001
<b>BBC</b>	0,5066	0,4872	0,5268	<0,001
<b>Beta-bloqueadores</b>	0,8668	0,8390	0,8956	<0,001
<b>Estatina</b>	1,6295	1,5938	1,6659	<0,001
<b>AAS</b>	2,1211	2,0781	2,1649	<0,001
<b>Levotiroxina</b>	2,7850	2,7049	2,8674	<0,001
<b>Varfarina</b>	1,4040	1,2937	1,5237	<0,001
<b>Corticoide</b>	1,4040	1,2937	1,5237	<0,001
<b>Insulina</b>	1,4613	1,4115	1,5128	<0,001

BCC: Bloqueador dos canais de cálcio; IECA: inibidores da enzima de conversão da angiotensina; AAS: ácido acetilsalicílico; 25OHD: 25-hidroxivitamina D.

A DMOa total do fêmur em ambos os sexos e a DMOa do colo do fêmur em homens foi associada a menor EC ( $p < 0,001$ ). O T escore  $\leq -2,5$  DP foi associado a maior calcificação nas mulheres, porém nos homens essa associação foi inversa. Em relação aos parâmetros de HR-pQCT, Ct.vBMD, Ct.Po na tíbia, Ct.Po no raio nas mulheres ( $p = 0,001$ ) e Ct.vBMD e Ct.Po na tíbia e raio nos homens ( $p = 0,001$ ), foram associados com maior EC. Os parâmetros trabeculares foram associados negativamente à EC (Tabelas 11, 12).

**Tabela 11** - Densidade mineral óssea (DXA) e microarquitetura óssea (HR-pQCT) segundo o nível de EC (escore z) em mulheres

Variável	Exp $\beta$	IC 95%		p
		Inferior	superior	
<b>DMDa coluna lombar (g/cm<sup>2</sup>)</b>	1.1159	1.1003	1.1317	<0.001
<b>DMOa colo do fêmur (g/cm<sup>2</sup>)</b>	1.1020	1.0863	1.1180	<0.001
<b>DMOa fêmur total (g/cm<sup>2</sup>)</b>	0.9716	0.9571	0.9862	<0.001
<b>T escore <math>\leq</math> -2.5 SD</b>	1.1118	1.0891	1.1350	<0.001
<b>Tibia</b>				
<b>Tb.vBMD (mg HA/cm<sup>3</sup>)</b>	1.3139	1.2984	1.3296	<0.001
<b>Ct.vBMD (mg HA/cm<sup>3</sup>)</b>	0.7629	0.7521	0.7738	<0.001
<b>Tb.N (1/mm)</b>	1.0620	1.0501	1.0740	<0.001
<b>Tb.Th (mm)</b>	1.3100	1.2973	1.3228	<0.001
<b>Tb.Sp (mm)</b>	0.8662	0.8566	0.8759	<0.001
<b>Ct.Th (mm)</b>	1.0112	0.9990	1.0236	0.072
<b>Ct.Po (1)</b>	1.1743	1.1614	1.1872	<0.001
<b>Radio</b>				
<b>Tb.vBMD (mg HA/cm<sup>3</sup>)</b>	1.2219	1.2070	1.2371	<0.001
<b>Ct.vBMD (mg HA/cm<sup>3</sup>)</b>	1.1900	1.1757	1.2045	<0.001
<b>Tb.N (1/mm)</b>	1.1025	1.0904	1.1148	<0.001
<b>Tb.Th (mm)</b>	1.0734	1.0639	1.0831	<0.001
<b>Tb.Sp (mm)</b>	0.8708	0.8608	0.8809	<0.001
<b>Ct.Th (mm)</b>	1.2539	1.2391	1.2689	<0.001
<b>Ct.Po (1)</b>	1.0601	1.0539	1.0664	<0.001

DP: desvio padrão; Exp  $\beta$ : coeficiente de equação; DMOa: Densidade mineral óssea areal; Tb.vBMD: Densidade volumétrica trabecular; Ct.vBMD: Densidade volumétrica cortical; Tb.N: número de trabéculas; Tb.Th: espessura trabecular; Tb.Sp: separação entre trabéculas; Ct.Th: espessura cortical; Ct.Po porosidade cortical.

**Tabela 12** - Densidade mineral óssea (DXA) e microarquitetura óssea (HR-pQCT) segundo o nível de EC (escore z) em homens

Variável	Exp $\beta$	IC 95%		p
		Inferior	superior	
<b>DMOa coluna lombar (g/cm<sup>2</sup>)</b>	1.0006	0.9881	1.0132	0.928
<b>DMOa colo do fêmur (g/cm<sup>2</sup>)</b>	0.9113	0.9010	0.9217	<0.001
<b>DMOa femur total (g/cm<sup>2</sup>)</b>	0.9506	0.9392	0.9621	<0.001
<b>T escore <math>\leq</math> - 2.5 SD</b>	0.7281	0.7088	0.7479	<0.001
<b>Tibia</b>				
<b>Tb.vBMD (mg HA/cm<sup>3</sup>)</b>	1.0309	1.0191	1.0428	<0.001
<b>Ct.vBMD (mg HA/cm<sup>3</sup>)</b>	0.6745	0.6643	0.6848	<0.001
<b>Tb.N (1/mm)</b>	0.7417	0.7320	0.7516	<0.001
<b>Tb.Th (mm)</b>	1.4704	1.4522	1.4888	<0.001
<b>Tb.Sp (mm)</b>	1.4147	1.3821	1.4480	<0.001
<b>Ct.Th (mm)</b>	0.9184	0.9087	0.9283	<0.001
<b>CtPo (1)</b>	1.3852	1.3733	1.3972	<0.001
<b>Radio</b>				
<b>Tb.vBMD (mg HA/cm<sup>3</sup>)</b>	1.2304	1.2163	1.2447	<0.001
<b>Ct.vBMD (mg HA/cm<sup>3</sup>)</b>	0.9114	0.9013	0.9216	<0.001
<b>Tb.N (1/mm)</b>	1.2857	1.2672	1.3044	<0.001
<b>Tb.Th (mm)</b>	1.1166	1.1009	1.1326	<0.001
<b>Tb.Sp (mm)</b>	0.5924	0.5754	0.6098	<0.001
<b>Ct.Th (mm)</b>	0.9264	0.9175	0.9355	<0.001
<b>Ct.Po (1)</b>	1.3613	1.3302	1.3931	<0.001

DP: desvio padrão; Exp  $\beta$ : coeficiente de equação; DMOa: Densidade mineral óssea areal; Tb.vBMD: Densidade volumétrica trabecular; Ct.vBMD: Densidade volumétrica cortical; Tb.N: número de trabéculas; Tb.Th: espessura trabecular; Tb.Sp: separação entre trabéculas; Ct.Th: espessura cortical; Ct.Po porosidade cortical.

### 4.3 Análise multivariada

Na análise multivariada, foram realizados múltiplos modelos.

A tabela 13, o uso de estatinas foi associado a maior EC ( $p < 0,001$ ), e o uso de bisfosfonatos em mulheres foi associado a menor EC ( $p < 0,001$ ). Na análise da DMOa, o T escore  $\leq -2,5$  DP pelo DXA em mulheres foi associado a maior EC (IC 95%: 1,41-1,49 e 1,53-1,61:  $p < 0,001$ ).

Em relação aos parâmetros da HR-pQCT, tibia Ct.Po (Exp  $\beta$  1,06, IC 95% 1,04-1,07;  $p < 0,001$ ), tibia Ct.vBMD (Exp  $\beta$  0,83, IC95% 0,81-0,84;  $p < 0,001$ ) e rádio Ct.Po (Exp  $\beta$  1,08, IC95% 1,07-1,09;  $p < 0,001$ ) foram preditores independentes de menor calcificação coronariana; no entanto, TibiaTb.vBMD na tibia e rádio e Ct.vBMD no raio seguiram uma tendência contrária. Nos homens, a tibia Ct.Po (Exp  $\beta$  1,30, IC95% 1,28-1,32;  $p < 0,001$ ) e Ct.vBMD (Exp  $\beta$  0,77, IC95% 0,67-0,79;  $p < 0,001$ ) do raio estiveram associados a maior EC. Os parâmetros trabeculares foram associados a maior calcificação coronariana.

**Tabela 13** - Modelos de regressão para medicações, densitometria óssea (DXA) e parâmetros de HR-pQCT estratificados segundo o EC

<b>Mulheres</b>				
<b>Tibia</b>	<b>Exp <math>\beta</math></b>	<b>IC95%</b>		<b>p</b>
<b>Estatinas</b>	2.03	1.99	2.07	<0.001
<b>Bisfosfonatos</b>	0.67	0.65	0.68	<0.001
<b>OP <math>\leq -2.5</math> DP</b>	1.45	1.41	1.49	<0.001
<b>Ct,Po z (1)</b>	1.06	1.04	1.07	<0.001
<b>Ct.vBMD z mg HA/cm<sup>3</sup></b>	0.83	0.81	0.84	<0.001
<b>Tb.vBMD z mg HA/cm<sup>3</sup></b>	1.32	1.31	1.34	<0.001
<b>Radio</b>	<b>Exp <math>\beta</math></b>	<b>IC 95%</b>		<b>p</b>

<b>Estatinas</b>	2.10	2.05	2.14	<0.001
<b>Bisfosfonatos</b>	0.69	0.67	0.70	<0.001
<b>OP<math>\leq</math> -2.5 DP</b>	1.57	1.53	1.61	<0.001
<b>Ct.Po z (1)</b>	1.08	1.07	1.09	<0.001
<b>Ct.vBMD z mg HA/cm<sup>3</sup></b>	1.14	1.13	1.16	<0.001
<b>Tb.vBMD z mg HA/cm<sup>3</sup></b>	1.21	1.19	1.23	<0.001
<b>Homens:</b>				
<b>Tibia</b>	Exp $\beta$		IC 95%	p
<b>Idade</b>	1.01	1.01	1.01	<0.001
<b>Estatinas</b>	1.35	1.31	1.38	<0.001
<b>Bisfosfonatos</b>	2.85	2.78	2.92	<0.001
<b>DMOa colo do fêmur, g/cm<sup>2</sup></b>	1.06	0.96	1.18	0.258
<b>Ct,Po z (1)</b>	1.30	1.28	1.32	<0.001
<b>Ct.vBMD z mg HA/cm<sup>3</sup></b>	1.01	0.98	1.04	0.427
<b>Tb.vBMD z mg HA/cm<sup>3</sup></b>	1.14	1.12	1.16	<0.001
<b>Radio</b>	Exp $\beta$		IC 95%	p
<b>Idade</b>	1.01	1.01	1.01	<0.001
<b>Estatinas</b>	1.40	1.36	1.43	<0.001
<b>Bisfosfonatos</b>	3.14	3.06	3.22	<0.001
<b>DMO colo do fêmur, g/cm<sup>2</sup></b>	0.27	0.24	0.30	<0.001
<b>Ct.Po z (1)</b>	0.83	0.81	0.86	<0.001
<b>Ct.vBMD z mg HA/cm<sup>3</sup></b>	0.77	0.76	0.79	<0.001
<b>Tb.vBMD z mg HA/cm<sup>3</sup></b>	1.74	1.71	1.77	<0.001

Exp  $\beta$ : coeficiente de equação; IC: intervalo de confiança; DP: desvio padrão; z: escores z; DMOa: Densidade mineral óssea areal; Tb.vBMD: Densidade volumétrica trabecular; Ct.vBMD: Densidade volumétrica cortical; Ct.Po porosidade cortical.

No entanto, os que apresentaram os melhores modelos foram os da tíbia apresentados na tabela 14. Nestes, entre os fatores preditores nas mulheres, o T escore  $\leq$  -2,5 DP (exp  $\beta$  = 1,03, IC 95%: 1,00-1,05; p <0,001 foi associado a maior grau de EC. Em relação aos parâmetros de HR-pQCT, observamos que a Ct.Po, exp  $\beta$  = 1,12, IC 95%: 1,10-1,13, p <0,001 e a Ct.vBMD, exp  $\beta$  = 0,79

IC 95%: 0,78-0,81,  $p < 0,001$  e nos homens, Ct.Po,  $\exp \beta = 1,44$ , 95% CI: 1,42-1,46;  $p < 0,001$ , foram significativamente associados a maior EC. Já o T escore nos homens apresentou coeficiente contrário ao esperado.

**Tabela 14** - Modelos de regressão para densitometria óssea (DXA) e parâmetros de HR-pQCT na tíbia, estratificados segundo o EC

<b>Mulheres:</b>				
<b>Variável</b>	<b>Exp <math>\beta</math></b>	<b>IC</b>	<b>95%</b>	<b>p</b>
<b>T escore <math>\leq -2.5</math> DP</b>	1.03	1.00	1.05	$<0.001$
<b>Ct,Po z (1)</b>	1.12	1.10	1.13	$<0.001$
<b>Ct.vBMD z mg HA/cm<sup>3</sup></b>	0.79	0.78	0.81	$<0.001$
<b>Homens:</b>				
<b>Variável</b>	<b>Exp <math>\beta</math></b>	<b>IC</b>	<b>95%</b>	<b>p</b>
<b>T escore <math>\leq -2.5</math> DP</b>	0.75	0.73	0.77	$<0.001$
<b>Ct,Po z (1)</b>	1.44	1.42	1.46	$<0.001$
<b>Ct.vBMD z mg HA/cm<sup>3</sup></b>	1.10	1.07	1.13	$<0.001$

Exp  $\beta$ : coeficiente de equação; IC: intervalo de confiança; DP: desvio padrão; z: escores z; Ct.vBMD: Densidade volumétrica cortical; Ct.Po porosidade cortical.

## 5 DISCUSSÃO

Observamos uma associação entre os parâmetros da HR-pQCT Ct.Po e Ct.vBMD, com o EC em idosos de ambos os sexos, sugerindo uma relação inversa entre o grau de calcificação coronariana e a densidade do osso cortical. Embora tenha sido encontrada associação entre HR-pQCT e doença isquêmica do coração em um estudo de 350 pacientes consecutivos após análise multivariada com ajuste para idade, IMC, tabagismo, história de diabetes e sexo<sup>117</sup>. No nosso conhecimento, apenas um estudo na literatura comparou esses dois parâmetros biológicos usando esses dois métodos de imagem altamente precisos. No entanto, foi realizado em uma população específica com doença renal crônica em diálise, e mostrou que parâmetros trabeculares e corticais mais baixos estavam associados a maior calcificação coronariana<sup>103</sup>

Outros estudos investigaram essa relação usando DXA, EC e angio TC de coronárias em mulheres na pós-menopausa, demonstraram que maior calcificação coronariana e presença de lesões obstrutivas estavam associadas à osteoporose, independentemente de fatores de risco cardiovascular e idade<sup>107</sup>. De fato, observou-se que a menor densidade mineral óssea foi associada independentemente com maior gravidade da EC e maior mortalidade<sup>108</sup>. Outro estudo, no entanto, mostrou resultados inversos<sup>109</sup>. Nossos resultados mostraram que o escore T  $\leq$  - 2,5 DP, avaliado pelo DXA, esteve associado a menor EC em mulheres.

Considerando a análise de HR-pQCT, as alterações nos parâmetros da arquitetura óssea foram bastante influenciadas pelo sexo e pelo



envelhecimento; Mc Donald et al.<sup>110</sup> mostraram um declínio no Ct.BMD com a idade em mulheres e homens (14% e 17%, respectivamente) e que o aumento no Ct.Po foi três vezes maior nas mulheres em comparação aos homens ( $p < 0,01$ ). Whitmarsh et al.<sup>111</sup> observaram uma diminuição significativa de Tb.BMD (38,1%) e Ct.Th (13%) usando micro-CT em espécimes de cabeça femoral de mulheres submetidas a hemiartroplastia da 9ª à 10ª década de vida. Isso pode explicar por que achamos nossos achados mais evidentes em mulheres.

Evidências indicam que, além das diferenças metabólicas e estruturais entre tecido cortical e trabecular, há também uma resposta diferente a fatores exógenos e endógenos<sup>112</sup>. Em um estudo transversal recente que analisou as curvas de referência da HR-pQCT em 450 mulheres saudáveis com idade entre 20 e 85 anos, foi observado um aumento significativo de Ct.Po em mulheres na pós-menopausa, mas os parâmetros trabeculares permaneceram relativamente estáveis<sup>113</sup>.

Costa LR et. al.<sup>118</sup>, em um estudo prospectivo recente foram utilizadas imagens tomográficas vertebrais e EC em setenta pacientes assintomáticos com DRC não dialítica, mostraram uma associação entre perda óssea trabecular e progressão de calcificação vascular. Por outro lado, em nosso estudo, houve associação significativa da calcificação coronariana com os parâmetros estruturais do compartimento ósseo cortical (Ct.vBMD e Ct.Po,  $p < 0,001$ ) na tíbia de indivíduos de ambos os sexos, sugerindo uma relação inversa entre duas patologias. No entanto, na análise univariada, os parâmetros trabeculares foram associados negativamente com o EC.

A hipótese que poderia explicar esse padrão antagônico é a existência de uma área de transição com remodelação intracortical que aumenta a

porosidade por um processo de “trabecularização” do córtex interno e que pode subestimar a medida do osso cortical e superestimar o tecido trabecular<sup>114</sup>. Esse fenômeno está sujeito à análise ex vivo, utilizando microtomografia computadorizada ( $\mu$ CT), imagens de HR-pQCT de amostras cadavéricas ou microscopia eletrônica, Zebaze et al.<sup>115</sup>. Em um estudo com amostras de fêmur pós-morte obtidas de 24 mulheres brancas com idade entre 29 e 99 anos (idade média de 69 anos), sugeriu que o afinamento cortical ocorre devido à coalescência dos poros corticais, em vez da expansão endocortical<sup>116</sup>.

A interação do processo fisiopatológico comum das duas patologias provavelmente intensifica esse fenômeno. De fato, devido à alta precisão de ambos os métodos no diagnóstico e na estratificação de risco, pode ser relevante continuar a investigação dessa associação para obter novas estratégias de prevenção e tratamento que envolvam ambas as patologias, principalmente no sexo feminino.

Adicionalmente, ao ajustar para as covariáveis: bisfosfonatos em ambos os sexos e idade nos homens (tabela 13); o uso de estatina também foi positivamente associado com EC. Trabalhos anteriores tiveram resultados similares, e demonstraram que independentemente de seus efeitos regressivos de placa aterosclerótica, as estatinas promovem calcificação coronariana<sup>119</sup>. Recentemente no estudo MESA foi observado que o uso de estatinas não reduz a utilidade prognóstica do EC<sup>120</sup>.

Inversamente a esse achado, o uso de bisfosfonatos foi associado a menor calcificação coronariana nas mulheres. Este resultado difere do mostrado por um estudo multicêntrico recente que não encontrou nenhuma diferença significativa no EC após 12 meses de tratamento com

bisfosfonatos<sup>121</sup>. No entanto, coincide com os resultados de Casula, Manuela et al<sup>122</sup>, que em um estudo de coorte retrospectivo com 82.704, sendo 87,0% do sexo feminino, mostrou que a adesão estrita ao tratamento com bisfosfonatos esteve associada a menor incidência de eventos cardiovasculares.

Nossos resultados reforçam o conhecimento da relação entre a CV e a diminuição do remodelamento ósseo e têm implicações clínicas importantes para a concepção de novas estratégias de diagnóstico e tratamento das duas patologias de um modo mais específico.

Reconhecemos as limitações do nosso estudo; o desenho transversal não permite inferir a causa e o efeito dessa associação. Em relação aos resultados em homens, eles podem ser explicados pelo menor número de participantes neste grupo.

## 6 CONCLUSÕES

Nosso estudo sugere que o comprometimento ósseo cortical avaliado pela HR-pQCT está associado a maior calcificação coronariana em indivíduos maiores de 65 anos, principalmente em mulheres, da coorte do São Paulo Aging & Health Study.

Com relação aos objetivos secundários, observamos que a menor DMO avaliada pela DXA foi associada maior grau de EC coronariana nas mulheres. No entanto, nos homens estes resultados foram inversos.

Adicionalmente observamos que o uso de estatinas foi preditor independente de maior calcificação coronariana.

## 7 ANEXOS

### Anexo A – Termo de consentimento livre e esclarecido

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

#### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

##### DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME: .....  
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : ..... SEXO : .M  F   
DATA NASCIMENTO: ...../...../.....  
ENDEREÇO ..... Nº ..... APTO:  
.....  
BAIRRO: ..... CIDADE  
.....  
CEP:..... TELEFONE: DDD (.....) .....

##### 2. RESPONSÁVEL LEGAL

.....  
NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)  
.....  
DOCUMENTO DE IDENTIDADE :.....SEXO: M  F   
DATA NASCIMENTO.: ...../...../.....  
ENDEREÇO: ..... Nº ..... APTO:  
.....  
BAIRRO: ..... CIDADE:  
.....  
CEP: ..... TELEFONE: DDD (...). .....

##### DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA .....  
.....  
PESQUISADOR:  
.....  
CARGO/FUNÇÃO: ..... INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº  
.....  
UNIDADE DO HCFMUSP:  
.....  
3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO  RISCO MÉDIO

RISCO BAIXO  RISCO MAIOR

4. DURAÇÃO DA PESQUISA:  
.....

Rubrica do sujeito de pesquisa ou responsável \_\_\_\_\_

Rubrica do pesquisador \_\_\_\_\_

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

**O texto deverá ser redigido de maneira simples, compreensível por indivíduos de baixa escolaridade. Não serão aceitáveis termos técnicos ou siglas. O texto deverá ser redigido em forma coloquial como se estivesse conversando com o sujeito da pesquisa e não de forma impessoal. Medidas técnicas devem ser convertidas em medidas caseiras (por exemplo, 5 ml – 1 colher de chá)**  
**ITENS QUE DEVEM CONTER NO TCLE. O PREENCHIMENTO NÃO PRECISA SER FEITO, OBRIGATORIAMENTE NESTE ORDEM**

1 – Convite para participação voluntária e objetivos(s) “essas informações estão sendo fornecidas para sua participação voluntária neste estudo, que visa.....”; ou “o objetivo deste estudo é.....”;

2 – Descrição dos procedimentos que serão realizados, seus propósitos e identificar os que forem experimentais e não rotineiros;

3 – Relação dos procedimentos rotineiros e como são realizados – coleta de sangue por punção periférica da veia do antebraço; exames radiológicos;

4 – Descrição dos desconfortos e riscos esperados nos procedimentos dos itens 2 e 3;

**No caso de risco para gestantes ou necessidade de contracepção deverá ficar claro o tempo de contracepção necessário, bem com a informação, quando necessária, da existência de suporte e acompanhamento do parto e avaliação do recém-nascido.**

**Os métodos de contracepção possíveis deverão ser descritos e oferecidos pela equipe sem custo ao sujeito de pesquisa.**

**Obs: Diversos pareceres da CONEP deixam claro que a opção de abstinência sexual pelo tempo necessário como método contraceptivo é válido e aceitável.**

5 – Benefícios para o participante (Por exemplo: Não há benefício direto para o participante... Trata-se de estudo experimental testando a hipótese de que..... Somente no final do estudo poderemos concluir a presença de algum benefício...;

6 – Relação de procedimentos alternativos que possam ser vantajosos, pelos quais o paciente pode optar;

**Os telefones informados para o sujeito da pesquisa deverão ser de acesso simples e direto. Não é aceitável o fornecimento de PABX de Hospitais ou Instituições.**

7 – Garantia de acesso: em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é o Dr **(preencher o nome do pesquisador principal)**, que pode ser encontrado no endereço **(institucional)** Telefone(s) ..... Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com.....

Rubrica do sujeito de pesquisa ou responsável\_\_\_\_\_

Rubrica do pesquisador\_\_\_\_\_

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

o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar  
– tel: 2661-6442 ramais 16, 17, 18 – e-mail: [cappesq@hcnet.usp.br](mailto:cappesq@hcnet.usp.br).

8 – Deverá ser explicada a garantia de liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição.

09 – Deverá ser garantido o direito de confidencialidade – As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgado a identificação de nenhum paciente;

10 – Deverá ser garantido o direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas, quando em estudos abertos, ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores; 11 – Deverá ser informado os custos com despesas e compensações: não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação.

**Não se espera que seja oferecida compensação além das básicas como transporte e alimentação dentro de limites razoáveis.**

**Deverão ser evitadas afirmações como: “Eventuais despesas serão cobertas pelo orçamento do projeto” deve ser evitada. O oferecimento de ressarcimento por eventuais complicações só deve ser feito se o projeto contar com apólice de seguro específico para esta finalidade ou previsão orçamentária evidentemente discriminada para este fim..**

12 – Informar o compromisso do pesquisador de utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa.

**Nos casos em que prevê a coleta e guarda de material na forma de repositório devem ser inseridos os parágrafos referentes a biorrepositório.**

Nos casos que se pretende armazenar o material coletado para pesquisas futuras deverá ser incluído no TCLE uma breve justificativa sobre tipos de informação que poderão ser obtidos nas pesquisas futuras, utilizando o material biológico por ele doado, para fins de conhecimento e decisão autônoma do sujeito que deverá responder claramente à seguinte pergunta:

***Há necessidade de consultá-lo para autorizar o uso deste material doado em outras pesquisas científicas?***

***(.....) SIM. Eu quero ser consultado para autorizar a cada pesquisa futura na qual será utilizado com o meu material.***

Rubrica do sujeito de pesquisa ou responsável\_\_\_\_\_

Rubrica do pesquisador\_\_\_\_\_

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

**(....) NÃO. Eu dispenso a autorização futura para cada pesquisa e estou informado(a) que a Comissão de Análise de Projetos de Pesquisa do Hospital das Clínicas (CAPPesq) irá examinar a nova pesquisa e decidir sobre a utilização ou não do material que eu estou doando.**

Deve-se especificar ainda que o tempo de armazenamento do material será autorizado pela Comissão de Análise de Projetos de Pesquisa do Hospital das Clínicas (CAPPesq).

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo”.....”

Eu discuti com o Dr. **(preencher o nome do pesquisador principal)** sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

-----

Assinatura do paciente/representante legal Data \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

-----

Assinatura da testemunha Data \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

*(Somente para o responsável do projeto)*

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Rubrica do sujeito de pesquisa ou responsável\_\_\_\_\_

Rubrica do pesquisador\_\_\_\_\_



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

-----

Assinatura do responsável pelo estudo Data \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

Rubrica do sujeito de pesquisa ou responsável \_\_\_\_\_

## Anexo B – Comprovante de submissão no *PLOS ONE*

17/11/2020

Gmail - Submission Confirmation for PONE-D-20-36238 - [EMID:0cab653d7d9e746a]



luis guzman &lt;luisguzman709@gmail.com&gt;

---

### Submission Confirmation for PONE-D-20-36238 - [EMID:0cab653d7d9e746a]

1 mensagem

PLOS ONE &lt;em@editorialmanager.com&gt;

17 de novembro de 2020 23:21

Responder a: PLOS ONE &lt;plosone@plos.org&gt;

Para: Luis Fernando Escobar Guzman &lt;luisguzman709@gmail.com&gt;

PONE-D-20-36238

Coronary artery calcification and cortical bone microarchitecture by high-resolution peripheral quantitative computed tomography in the elderly from São Paulo Ageing & Health Study  
PLOS ONE

Dear Dr. Escobar Guzman,

Thank you for submitting your manuscript entitled 'Coronary artery calcification and cortical bone microarchitecture by high-resolution peripheral quantitative computed tomography in the elderly from São Paulo Ageing & Health Study' to PLOS ONE. Your assigned manuscript number is PONE-D-20-36238.

We will now begin processing your manuscript and may contact you if we require any further information. You will receive an update once your manuscript passes our in-house technical check; you can also check the status of your manuscript by logging into your account at <https://www.editorialmanager.com/pone/>.

If during submission you selected the option for your manuscript to be posted on the bioRxiv preprint server (<http://biorxiv.org>), we will be assessing the manuscript for suitability shortly. If suitable, your preprint will be made publicly available on bioRxiv and you will receive an email confirmation from them when it has posted. Please check your response to this question and email us as soon as possible at [plosone@plos.org](mailto:plosone@plos.org) if it has been answered incorrectly. Further information about our partnership with bioRxiv to facilitate the rapid availability of life sciences research is available at <http://journals.plos.org/plosone/s/preprints>.

If you have any inquiries or other comments regarding this manuscript please contact [plosone@plos.org](mailto:plosone@plos.org).

Thank you for your support of PLOS ONE.

Kind regards,  
PLOS ONE

## Anexo C – Artigo complementar publicado no *Cardiology Research and Practice*

Hindawi  
 Cardiology Research and Practice  
 Volume 2020, Article ID 5169669, 11 pages  
<https://doi.org/10.1155/2020/5169669>



### Review Article

## Pathophysiological and Genetic Aspects of Vascular Calcification

Luis Fernando Escobar Guzman,<sup>1</sup> Cristian Andres Escobar Guzman,<sup>2</sup>  
 and Neuza Helena Moreira Lopes<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Heart Institute (InCor), University of São Paulo Medical School, São Paulo, Brazil

<sup>2</sup>Department of Pathology, University of São Paulo Medical School, São Paulo, Brazil

Correspondence should be addressed to Luis Fernando Escobar Guzman; [luisguzman789@gmail.com](mailto:luisguzman789@gmail.com)

Received 18 October 2019; Revised 17 February 2020; Accepted 23 March 2020; Published 14 April 2020

Academic Editor: Elena Cavarretta

Copyright © 2020 Luis Fernando Escobar Guzman et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Recent evidence suggests that vascular calcification is an independent cardiovascular risk factor (CRF) of morbidity and mortality. New studies point out the existence of a complex physiopathological mechanism that involves inflammation, oxidation, the release of chemical mediators, and genetic factors that promote the osteochondrogenic differentiation of vascular smooth muscle cells (VSMC). This review will evaluate the main mechanisms involved in the pathophysiology and genetics modulation of the process of vascular calcification. **Objective.** A systematic review of the pathophysiology factors involved in vascular calcification and its genetic influence was performed. **Methods.** A systematic review was conducted in the Medline and PubMed databases and were searched for studies concerning vascular calcification using the keywords and studies published until 2020/01 in English. **Inclusion Criteria.** Studies in vitro, animal models, and humans. These include cohort (both retrospective and prospective cohort studies), case-control, cross-sectional, and systematic reviews. **Exclusion Criteria.** Studies before 2003 of the existing literature.

### 1. Introduction

According to data from the World Health Organization, there was a 17% decline in mortality from 2005 to 2015. Currently, the prevalence of cardiovascular diseases (CVDs) remains high, 7.4% for men and 5.3% for women, due to the highest prevalence of cardiovascular risk factors (CRFs) and aging [1].

Recent evidence shows that there is a high prevalence of vascular calcification (VC) in atherosclerosis, diabetes, and chronic kidney disease, standing out as an independent CRF of morbidity and mortality [2, 3]. Data from the MESA study show that the calcium score (CAC), the main marker of CV, was associated with a gradual increase in risk events. In the multivariate analysis, considering the traditional risk factors, CAC > 300 was associated with a nearly 7-fold increased risk (CI 95% 2.93–15.99) for cardiovascular outcomes compared to those with a zero CAC [4].

Depending on the histological arterial site, different types of VC can be distinguished: intimal calcification or medial artery calcification.

Intimal calcification is associated with atherosclerotic plaque formation comprises fibrous cap, necrotic/lipid nucleus, cholesterol crystals, inflammatory cells that are prone to erosion, rupture and obstruction of blood flow, reduced organ perfusion, and ischemic syndromes [5, 6].

Medial artery calcification, also called Monckeberg calcification, represents the pathological deposition of calcium and phosphate in the medial layer of the arteries. This vascular calcification is considered less directly associated with inflammation. It can cause stiffness of the vascular wall, leading to changed arterial hemodynamic properties. This results in an increased chance of hypertension and left ventricular hypertrophy and aggravates the risk of cardiac events [5, 6].

In the past, VC was considered being the consequence of a passive degenerative process, but recent studies suggest the existence of a complex physiopathological mechanism still in elucidation that involves inflammation, oxidation, and release of chemical mediators. This mediator promotes or inhibits differentiation of vascular smooth muscle cells

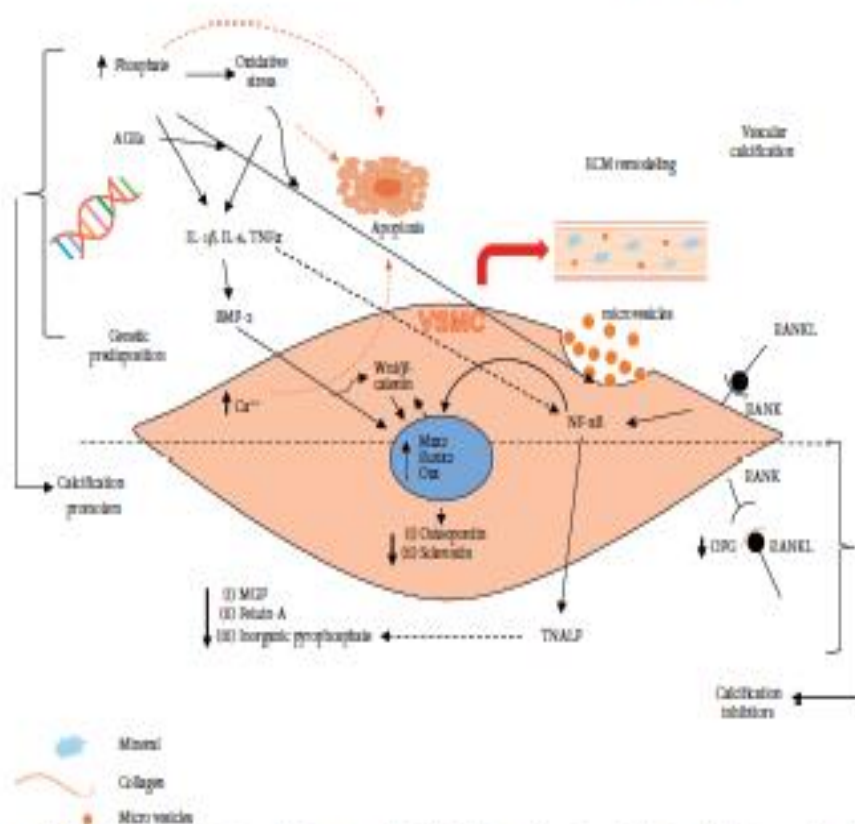


FIGURE 1: Pathophysiological mechanisms which promote cellular differentiation and vascular calcification. AGEs, advanced glycation end products; VSMC, vascular smooth muscle cell; BMP, bone morphogenetic protein; Runx2, runt-related transcription factor 2; Max2, mah homobox 2; IL-1 $\beta$ , interleukin-1beta; IL-6, interleukin-6; TNF $\alpha$ , tumor necrosis factor alpha; NF- $\kappa$ B, nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells; RANK, receptor activator of nuclear factor kappa-B; RANKL, receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand; ECM, extracellular matrix; OPG, osteoprotegerin; MGP, matrix gla protein; TNALP, tissue nonspecific alkaline phosphatase.

(VSMCs) in osteo/chondroblastic cells. There is also evidence of genetic factors involved in this process [7, 8].

In this review, we will appraise the main cellular mechanisms, chemical mediators, and genetic components that involve the pathophysiology of vascular calcification (Figure 1).

## 2. Pathophysiology

**2.1. Vascular Calcification Inducing Factors Inflammation, Oxidative Stress, and Lipids.** It is recognized that VC is associated with a chronic and low-grade inflammatory state, exacerbated by nonvascular conditions such as metabolic alterations, autoimmune diseases, environmental factors (pollution), cancer, and obesity [7–10].

This inflammatory process was related to the increase of serum levels of TNF- $\alpha$  IL-1 $\beta$  promoting the stimulation of tissue nonspecific alkaline phosphatase (TNAP) activity, the enzyme that hydrolyzes pyrophosphate ions, which are potent inhibitors of mineralization and, therefore, can induce calcification regardless of the main transcription factor

for osteoblasts RUNX2, in VSMC [7, 11]. Moreover, IL-6 was significantly associated with coronary artery calcification and cardiovascular mortality in patients with impaired renal function [12].

Studies have reported that increased oxidative stress is related to VC in vitro; recently, Zhao et al. showed that mitochondrial reactive oxygen species (ROS) are the major source of ROS production and are essential for the PI-triggered phenotype switch of SMCs from a contractile to an osteogenic form [13].

Proinflammatory proteins include C-reactive protein (CRP) synthesized during inflammatory processes mainly by hepatocytes. Also, they are expressed by other cell types including local production in vascular tissue by VSMCs [14]. An in vitro study discloses a novel direct role of CRP during vascular calcification. CRP induces cellular oxidative stress and activates procalcific intracellular signaling pathways promoting osteo/chondrogenic transdifferentiation of VSMCs in vitro by the increased expression of TNAP and activity of the enzyme Fc fragment of IgG receptor IIa [15].

Oxidized LDL (oxLDL) plays a crucial role in the development of VC. The suggested mechanism is a reduction of prostacyclin production and the reduction of cyclooxygenase expression induced by the sustained increase of intracellular calcium. Those changes lead to the rupture of the glycocalyx monolayer integrity that causes endothelial cell apoptosis and the inflammatory process [16].

HDL plays a protective role in atherosclerosis by taking part in the process known as reverse cholesterol transport. In this process, it is believed that the existence of anti-inflammatory and antioxidant properties, probably dependent on the proteins, transported in the HDL particle, such as the enzyme paraoxonase and the reduction of cytokines with consequent attenuation of the osteogenic differentiation induced by oxidized LDL in vascular cells [17]. However, it was observed that patients with established coronary artery disease could have dysfunctional HDL production caused by posttranslational modification of apoA or by the reduction of HDL production induced by microRNAs [18].

**2.2. Extracellular Vesicles: Exosomes.** Extracellular vesicles are derived from different kinds of cells and classified into 3 classes by origin and size: (1) microvesicles (100–500 nm), which originate from cell membrane evaginations, (2) exosomes (40–100 nm), which have the origin of intracellular organelles, and (3) apoptotic bodies (~1,000 nm), which are generated during programmed cell death [19].

It has been suggested that, during cellular osteochondrogenic differentiation, exosomes are released by VSMC from intracellular multivesicular bodies induced by the production of sphingomyelin phosphodiesterase 3 in response to environmental stress of calcium [20]. The serine protein encoded by the SORT1 gene is associated also with vascular calcification. It was localized in humans and mouse atherosclerosis promoting *in vitro* the formation of microcalcifications and extracellular vesicles stimulating the alkaline phosphatase release [21].

Other factors associated with exosome formation are the annexins (Anx 6) in the VSMC and Anx 5 in the macrophages that comprise a class of calcium-dependent proteins that mediate cellular processes such as exocytosis and endocytosis. They also participate in regulating inflammation, coagulation, and fibrinolysis [22–24].

**2.3. Runx-Related Transcription Factor 2 (Runx2).** RUNX2 is the main transcription factor in vascular calcification, and its activity is subjected to regulation by phosphorylation events mediated by kinases and by nuclear translocation, DNA-binding capacity, and interaction with transcriptional cofactors. Runx2 regulates the expression of genes related to osteoblasts, such as osteonin, receptor activator of nuclear factor kappa- $\beta$  ligand (RANKL), and type I collagen [25–28].

Tang et al. showed that cells isolated from the middle layer of the vessel wall are expressed as markers *Sox17*, *Sox10*, *S100 $\beta$* , and neural medium filament polypeptide and differentiated into CML-like cells and later into osteoblastic cells [29]. In an animal model, with SM22-Cre mice with Runx2 exon 8 floxed, the inhibition of receptor activator of

nuclear factor kappa- $\beta$  ligand (RANKL) was observed. RANKL was associated with decreased macrophage infiltration and formation of osteoclast-like cells in the aortic wall [30]. However, in other work using Runx2 knockout mice, no reduction in RANKL expression, macrophage infiltration, or atherosclerotic lesion size was observed compared to the control group. Instead, it was found a decrease in the lesion mineralization, besides the substantially decreased expression of osteocalcin, alkaline phosphatase, and chondrocyte maturation [31].

**2.4. Bone Morphogenetic Proteins (BMPs).** BMPs are a group of proteins expressed by myofibroblasts, and they belong to the family of transforming growth factor- $\beta$ . BMPs are known for their important roles during embryogenesis and in the maintenance and repair of bones and other tissues in adults. The most known one is the BMP2 that has osteogenic activities that were related to oxidative stress, inflammation, and hyperglycemia [32]. The mechanism of stimulation would be mediated by the expression of Runx2 and by the induction of apoptosis of vascular smooth muscle cells, an event that starts vascular calcification [33]. BMPs also bind to type II and type I serine-threonine kinase receptors (bone morphogenetic protein receptor-1A (BMPRIA), BMPR-1B, activin receptor-like kinase-2 (ALK-2), and ALK1) to form complexes that regulate the phosphorylation of Smad1/5/8 and then combine with Smad4 protein. They together translocate to the nucleus where they are involved in the transcription of genes related to osteoblast differentiation, including ERK (extracellular regulated by signal kinase), and JNK (protein c-Jun N-terminal kinase) [34].

In contrast to BMP2, BMP 7 had a cytoprotective action for vascular proliferative disorders. In a coronary, carotid, and abdominal aorta in a diabetes-enriched cohort with 920 subjects, the SNPs rs6127984, rs6123674, and rs6123678 of BMP7 were independently associated with lower VC [35]. This antagonistic action could be mediated by the existence of specific receptors, such as endoglin (a type III TGF receptor), which binds to BMP-2 and not to BMP-7 [33].

**2.5. Osteocalcin (OC).** OC are vitamin K-dependent proteins, expressed by preosteoclasts and osteoclasts. Total OC includes both carboxylated osteocalcin (cOC), which has a high affinity for hydroxyapatite, located predominantly in the bone matrix, and undercarboxylated osteocalcin (ucOC), which represents between 40 and 60% of the total circulating osteocalcin. This protein was recently associated with metabolic and cardiovascular disorders [36, 37]. The role of OC in VC is controversial. A recent inflammatory protocol, demonstrated using interferon- $\gamma$  and tumor necrosis factor- $\alpha$ , was used to examine the acute (24 hr) and chronic (144 hr) effects of ucOCN in subcultured human aortic endothelial cells (HAECs) and VSMCs. The ucOCN did not affect inflammatory cytokine production, nor inflammatory signaling pathways in VSMCs or HAECs [38]. In another study, Szad et al. observed in elderly patients with metabolic syndrome that osteocalcin serum levels were negatively

correlated with carotid atherosclerosis [37]. However, other works suggest the opposite idea.

An animal model with cultured C57BL/6 thoracic aorta revealed that calcification was correlated with increased expression of osteocalcin [39]. It is suggested that the mechanism by which OC promotes SMC differentiation and mineralization is mediated by the production of *Sox9*, *Runx2*, collagen type X, and proteoglycans and stimulating glucose metabolism in vascular cells via hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) [40]. Also, Flammer et al. showed that high levels of CO were strongly associated with unstable CAD [41].

**2.6. Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa-B/ Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa-B Ligand (RANK/ RANKL).** Growing evidence suggests that the binomial of RANK/RANKL may be important players in vascular calcification. RANK is present in atherosclerotic plaques and valvular heart disease. It is a type I membrane protein expressed on the surface of osteoclasts and is involved in their activation upon ligand (RANKL) binding. RANKL is a transmembrane protein, but a soluble form (soluble RANKL, sRANKL) also circulates in the blood. RANKL binds as a homotrimer to RANK on target cells [42, 43].

It has been demonstrated that RANKL stimulates vascular calcification by binding to RANK through the alternative NF- $\kappa$ B pathway. Also it was indicated that RANK indirectly promoted vascular smooth muscle cell calcification by enhancing macrophage paracrine procalcific activity. This is achieved through the release of IL6 and TNF $\alpha$  binding of TNF receptor-associated factors (TRAFs 2, 5, and 6) to specific sites in the cytoplasmic domain of RANK [42, 43].

**2.7. Nuclear Factor-Kappa B (NF- $\kappa$ B).** Nuclear factor-kappa B (NF- $\kappa$ B) is an essential protein for cell proliferation and migration. The increase in NF- $\kappa$ B expression in VC is mediated by multiple factors, the main one being TNF $\alpha$ , which decreases the expression of ankylosis protein homolog (ANKH). This is a transmembrane protein that controls the efflux of pyrophosphate cells [44]. Voelkl et al. showed that in vitro and in animal model under conditions of calcification, the serum- and glucocorticoid-inducible kinase 1 (SGK1) are powerful regulators of NF- $\kappa$ B activity [45]. Studies have also shown that the advanced glycation end products (AGEs) and their receptors (RAGEs) are involved in this process [46, 47].

NF- $\kappa$ B is a DNA-binding protein that contributes to the process of vascular calcification by multiple mechanisms. It triggers the transcription of TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , and IL6, enables the action of the RANKL/RANK pathway, and can modulate the proinflammatory cascade in VSMCs when associated with the WNT/ $\beta$ -catenin signaling pathway in response to hyperphosphatemia. It also promotes the calcification of VSMCs by the expression of *msx homeobox 2* (MSX2) and, consequently, *Runx2*. Also, it increases the expression of *tristetraprolin* (TTP), a destabilizing RNA protein, and reduces the ANKH mRNA decreasing pyrophosphate levels in the extracellular space [47, 48].

**2.8. Canonical Signaling Pathway: Wntless/Beta Catenin (Wnt/ $\beta$  Catenin).** The Wnt/ $\beta$  catenin pathway is involved in a variety of physiological processes including tissue/organ differentiation, morphogenesis, and in many aspects in the development and progression of vascular lesions. This vascular injury includes endothelial dysfunction, macrophage activation, proliferation, and vascular smooth muscle cell migration. In adults, these glycoproteins take part of the key developmental and physiological processes, including cell proliferation, differentiation, migration, and apoptosis [48, 49].

The activation of the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway is the binding of a Wnt ligand from the extracellular environment to two transmembrane proteins: a Frizzled protein acting as the receptor and a low-density lipoprotein receptor-related protein 5 or 6 (LRP5/6) acting as a coreceptor [50]. It is established that this pathway is essential for the VSMC differentiation [51].

The Wnt/ $\beta$ -catenin release is enhanced by the action of different mechanisms [25]. We can mention *Mxt2* suppresses the antagonist *Dkk1* that interacts with the LRP5/6 coreceptor [52].

WNT/ $\beta$ -catenin acts by stimulating the production of *Runx2*, the main CV factor, and consequently the Sp7 transcription factor (*osterix*) during hyperphosphatemia [53]. Also, it can participate even more in the calcification by induction of MMP2 and MMP9 in VSMCs and thus plays a crucial role in the progression of this phenomenon. [54].

**2.9. Pentraxin 3 (PTX3).** Pentraxin 3 (PTX3) is a member of the pentraxin family. It is produced primarily in the liver and vascular endothelial cells in response to TNF $\alpha$ , IL-1, and IL-6 [52–54]. It is also released by peripheral blood leukocytes, myeloid dendritic cells, smooth muscle cells, fibroblasts, adipocytes, chondrocytes, mesangial, and epithelial cells. It has been reported that PTX3 induces the expression of RANKL by human osteoblasts, promoting osteoclastogenesis in vitro culture system [52–55].

In a population-based study with apparently healthy adults from four ethnic groups, PTX3 was associated with CVD risk factors, subclinical CVD, CAC, and clinical CHD events. These associations were independent of CRP supporting the hypothesis that PTX3 reflects different aspects of atherosclerosis-related inflammation than CRP [56].

**2.10. Vascular Calcification-Inhibiting Factors: Inorganic Pyrophosphate.** Inorganic pyrophosphate (PPI) is the main known calcification inhibitor found in intracellular space [60]. The PPI is produced in VSMCs and transported from the intracellular to the extracellular environment by the membrane protein ANK (progressive ankylosis or ANKH) [25]. It also is produced in the liver through ATP-binding cassette subfamily C member 6 (ABCC6) protein [57].

PPI is hydrolyzed by ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterases (ENPP1) and local tissue-nonspecific alkaline phosphatase (TNAP) promoting pathophysiological vascular calcification [58, 59]. High extracellular phosphate, which is frequently present in CKD, diabetes, and aortic

calcification, reduces the production of PPI by increasing the expression of ENPP1 and TNAP by inducing apoptosis of the VSMCs [25–60]. However, in other work, it was observed in experimental models that PPI synthesis increases in VSMCs during phosphate-induced calcification because of compensatory regulation of PPI extracellular metabolism [60].

**2.11. Matrix Gla Protein (MGP).** Matrix gla protein (MGP) is a protein phosphorylated and carboxylated by vitamin K. It is synthesized in various cellular types (mesenchymal, vascular, and chondrocytes). The expression of the MGP gene can be regulated via various mechanisms that have the potential to become genomic biomarkers for the prediction of vascular calcification (VC) progression [61, 62].

MGP acts as a potent inhibitor of VC. The mechanism of action includes direct inhibition of calcium-phosphate precipitation, the formation of matrix vesicles (MVs), the formation of apoptotic bodies, and differentiation of VSMCs [55]. The specific action of MGP could be related to the functional inhibition of BMP 2 and BMP-4, which have a similar structure [62, 63].

**2.12. Fetuin-A (F-A).** Strong evidence indicates that human vascular smooth muscle cells exposed to changes in the extracellular calcium and phosphorus concentration undergo phenotypic differentiation leading to calcification, especially in chronic kidney disease (CKD) [60, 64].

F-A is a plasma glycoprotein, which in adults is synthesized by the liver, is a circulating proteinaceous calcification inhibitor, being able to bind ~100  $\text{Ca}^{2+}$  ions per molecule. When F-A is exposed to high calcium and phosphate concentrations, the molecules coalesce to form the primary calciprotein particles (CPPs) that contain amorphous calcium phosphate with a diameter of 50–100 nm, and F-A keeps these particles in solution and prevents it from precipitation [47–65].

Observational studies have shown that serum F-A reduction was associated with higher overall mortality and CV in patients with CKD [65, 66]. Mice deficient in F-A presented soft tissue calcification when treated with diets enriched with vitamin D or phosphorus. In a study with subjects without diabetes and without renal dysfunction undergoing cardiac catheterization, multivariate logistic regression analysis revealed that F-A levels were inversely correlated with the presence of coronary calcification (OR: 0.54, 95% CI,  $P=0.025$ ). Similarly, low serum F-A levels were associated with greater severity of CD in a large multiethnic population without clinical CVD, regardless of traditional CV risk factors, gender, ethnicity, and renal function [67, 68].

The polymorphisms in the corresponding  $\alpha 2$ -Heremans-Schmid glycoprotein gene (AHSG) were shown to be associated with F-A serum levels. In the Diabetes Heart Study, SNPs of this molecule were analyzed in 829 diabetic adults; after multivariate analysis, two SNPs in AHSG in the exon region 6–7, rs2593813 and rs2070632, showed a significant association with CAC [69]. However, in a recent study, the

molecular analysis of the AHSG T256S gene variant (rs4918) was performed when individuals with zero CAC to 10 and those with CAC >10 were compared, and there was no significant association with F-A [70].

**2.13. Osteoprotegerin.** OPG is a cytokine produced in the bone marrow derived from stromal cells. It acts on bone remodeling by inhibiting the binding of RANK to RANKL on the surface of osteoclasts and T lymphocytes [71]. The role in vascular calcification is not completely defined.

A protective action was proposed for the accelerated evolution of atherosclerosis in OPG knockout mice [72]. However, another study showed that a high level of OPG was associated with a moderate calcium score in high in diabetic individuals [73]. Findings suggest that OPG can be used as a disease marker, increasing the levels of this protein as a compensatory response to the loss of bone mass and vascular damage [74].

In a prospective study of 130 patients, Pessaro et al. showed that elevated RANKL levels were associated with CHD (OR 1.75 (95% CI 1.04–2.94,  $P=0.035$ ) [75]. Recently, Choe et al. analyzed genetic variations using SNPs representative of OPG (rs2073618), RANK (rs1805034), and RANKL (rs2073618) and investigated the association with atherosclerotic plaque instability assessed by cardiac catheterization. It was found that the non-TT genotype of rs9594782 RANKL SNP was an independent risk factor for the occurrence of acute coronary syndrome [76].

**2.14. Dickkopf Proteins (Dkk).** The Dkk members include Dkk 1, 2, 3, and 4, among which only Dkk 1 is considered inhibitors of the canonical pathway Wnt/ $\beta$ -catenin, by blocking its interaction with coreceptors 5 and 6 of LDL (LRP5/6) [77]. Studies showed that Dkk-1 attenuates the expression of Runx2, which is a canonical Wnt target and an important transcription factor for the osteogenic trans-differentiation of VSMCs [53]. It has been suggested that high levels of Dkk-1 may contribute to the formation of unstable plaque by inhibiting the deposition of diffuse protective calcifications, in addition to influencing the cellular composition of the plaque [78].

Some studies related elevated serum levels of Dkk1 and the presence of VC by CAC [79]. Levels of Dkk-1 were also independently associated with a composite of cardiovascular death, myocardial infarction, or stroke and with cardiovascular death alone [80]. Fang et al. showed, in diabetic mice, with induced kidney disease, that the combination of Dkk1 neutralization and reduction of urinary phosphate by a phosphate ligand was sufficient to decrease vascular calcification [63].

**2.15. Sclerostin.** Protein that has been discovered in genetic studies of rare sclerosing bone dysplasias in humans is encoded by the SOST gene [81]. It is a 190 amino acid glycoprotein, a member of DAN proteins. Its structure consists of four different cysteine bonds synthesized by osteocytes with their gene expression also produced in the

Table 1: Summary of vascular calcification mediators and their potential functions in promoting calcification.

Protein	Gene	Function	Calcification
IL-1 $\beta$	IL1B (interleukin 1 beta)	Proinflammatory cytokine which promotes vascular calcification via NF- $\kappa$ B and Wnt signaling pathway	Intima/ media
IL-6	IL6 (interleukin 6)	Proinflammatory cytokine which promotes vascular calcification through inflammation-induced oxidative stress.	Intima/ media
TNF $\alpha$ (tumor necrosis factor alpha)	TNF (tumor necrosis factor)	Inflammatory cytokine which promotes vascular calcification by increasing the expression of osteogenic genes.	Intima/ media
CRP	CRP (C-reactive protein)	Proinflammatory protein may contribute to vascular calcification through the raised expression of osteogenic factors such as Runx2 and TNAP.	Intima/ media
TNAP (tissue nonspecific alkaline phosphatase)	ALPL (gene encoding human TNAP)	Degrades inorganic pyrophosphate which makes VSMCs susceptible to calcification	Media
Cbfa1/RUNX2 (RUNX family transcription factor 2)	RUNX2 (RUNX family transcription factor 2)	Transcription factor involved in chondrocyte and osteoblast differentiation	Media
Osterin	SP7 (Sp7 transcription factor)	Controls the osteoblast differentiation and bone formation	Media
BMP-2 (bone morphogenetic protein 2)	BMP2 (bone morphogenetic protein 2)	Osteogenic and osteoblast proliferation factor which upregulates the expression of Runx2	Media
Osteocalcin	BGLAP (bone gamma-carboxyglutamic protein)	Protein derived from osteoblasts, which stimulates the PI3K/Akt signaling pathway and upregulating the nuclear factor-kappa $\beta$ (NF- $\kappa$ B)	Media
RANKL (receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand)	TNFS11 (TNF superfamily member)	Regulates osteoclast differentiation and activation	Media/ intima
RANK (receptor activator of nuclear factor kappa-B)	TNFRSF11A (TNF receptor superfamily member 11a)	Activates the transcription factor NF- $\kappa$ B for the generation and survival of osteoclasts	Media/ intima
NF- $\kappa$ B	NF $\kappa$ B (NF-kappa-B protein complex: NFKB1, NFKB2, RELA, RELB, and REL)	Transcription factor which promotes vascular calcification through the expression of MSX2 (which increases TNAP expression) and reduces the expression of ANKH through the expression of tripartite protein	Media/ intima
Wnt/ $\beta$ -catenin	WNT1/CTNNB1 (Wnt family member 1/catenin beta 1)	Through its canonical pathway promotes osteogenic gene expression via nuclear $\beta$ -catenin dependent transcription	Media
PTX3	PTX3 (pentraxin 3)	It has been reported that PTX3 induces the expression of RANKL by human osteoblasts, thereby promoting osteoclastogenesis in vitro culture system	Media
Inorganic pyrophosphate	—	Prevents the nucleation of amorphous calcium phosphate and inhibits hydroxyapatite crystallization	Media
ANKH	ANKH (ankylosis, progressive homolog)	Inhibits mineralization by exporting inorganic pyrophosphate to the extracellular space to inhibit hydroxyapatite formation	Media
Matrix gla protein	MGP (matrix gla protein)	Inhibits vascular mineralization by binding to calcium ions	Media
Fetuin A	AHSG (alpha 2-HS glycoprotein)	Inhibitor of calcification by binding to calcium ions and forming calciprotein particles (CCPs) which prevent the precipitation of amorphous calcium phosphate particles	Media
Osteoprotegerin	TNFRSF11B (TNF receptor superfamily member 11b)	Binds to RANKL as a decoy receptor resulting in down regulation of osteoclast differentiation, which decreases osteoclast activity	Media/ intima
DKK1 (Dickkopf Wnt signaling pathway inhibitor 1)	DKK1 (Dickkopf Wnt signaling pathway inhibitor 1)	Inhibitor of the canonical $\beta$ -catenin-dependent Wnt pathway, it was shown to reduce the expression of Runx2 which is a canonical Wnt target	Media



TABLE 1: Continued.

Protein	Gene	Function	Calcification
LRP5/6 (LDL receptor-related protein 5/6)	LRP5/6 (LDL receptor-related protein 5/6)	Wnt co-receptors that upon activation lead to stabilization of cytoplasm $\beta$ -catenin, nuclear translocation, and target gene expression Inhibitor of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling, decreases bone formation by inhibiting osteoblastogenesis in osteoclasts, and enhances bone resorption	Media
Sclerostin	SCST (sclerostin)	Inhibitor of mineralization and ectopic calcification linking the extracellular matrix with calcium	Media
Osteopontin	SPP1 (secreted phosphoprotein 1)		Media

kidneys, liver, placenta, and cartilage. It binds to LRP (low-density lipoprotein receptor) 5 and 6 of the osteoblasts, inhibiting the Wnt pathway, which is a group of proteins that function as the genetic signaling of cell proliferation and the increase of osteoblastic activity and with antagonistic activity to BMP in the bone [81].

In vitro, sclerostin was expressed in the calcification process of vascular smooth muscle cells [74]. Recently, Nguyen-Yamamoto et al. showed in a mice model study that sclerostin protected the organism from VC by suppressing BMP2 production [82].

Elevated serum levels of this protein in individuals with chronic kidney disease were associated with a lower mortality rate, which leads to the hypothesis that sclerostin elevation is related to the protective function against vascular calcification [83].

**2.16. Osteopontin (OP).** The role of OP in vascular calcification is still controversial; it is a protein that acts by binding to osteoclasts through  $\alpha$ 5 $\beta$ 1 integrin and stimulates calcium reabsorptive activity. It was found in calcified vascular tissue. In an experimental model, the protein inhibits the mineralization of vascular smooth muscle cells by direct binding to calcium crystals [84, 85]. However, in a study by Benetiz et al., 126 subjects with type 2 DM and asymptomatic coronary artery disease, as determined by the CAC, the OP was an independent predictor of coronary calcification (OR = 3.23, 95% CI = 1.09–5.20;  $P = 0.044$ ) [86].

**2.17. Genetics.** In addition to chemical mediators, genetic characteristics and predisposition also play an important role in VC (Table 1).

A genome-wide association study (GWAS) reported a total of 31 DCV-associated loci at wide genomic significance ( $P < 5 \times 10^{-8}$ ), accounting for only 10% of CVD heritability. This result may be explained probably because of the polygenic nature of the locus identified [8].

Data from the CARDIOGRAMplusC4D Consortium study, with 63,746 cases and 130,681 controls, identified 15 loci of genomic significance. Initially, six loci had relevant cardiovascular phenotypes, namely, ABCG8, APOB, GUCY1A3, PLG, LPL, and FES. PLG is adjacent to LPA, and the risk variant of PLG rs4252120 is strongly associated with elevated lipoprotein levels. Of the 30 loci of susceptibility to CAD previously reported in individuals of European and South Asian descent, PEMT, APOE, LDLR,

COL4A1, LIPA, APOA1, APOA5, PPAP2B, and PCSK9 also present phenotypic characteristics directly relevant to the disease [8].

Toutouzas et al. retrospectively evaluated coronary angiograms of patients with established CAD that were re-investigated for stable/unstable angina. The -174C allele of the IL-6 gene has been shown to increase the risk of progression of coronary plaques over 4 years [65].

In another in vitro study, there was an overexpression of the cannabinoid receptor type 2 gene (CNR2), which is an inflammatory marker in atherosclerotic plaques, compared to normal arteries, but not exclusively in vulnerable plaques [66].

In a meta-analysis of broad exomic association, 25,109 European ancestors and African ancestors with CD and 52,869 participants using CAC and carotid medial-intimal thickening measured by ultrasonography found protein-coding variants in APOE  $\epsilon$ 2. They were significantly associated with subclinical and clinical atherosclerosis, independently of ethnicity (odds ratio 0.77,  $P = 1 \times 10^{-11}$ ) [87].

Chasman et al., in a cross-sectional study with white individuals, a polygenic risk score derived from an analysis of 50 SNPs that had genomic significance for association with coronary artery disease in previous studies and lifestyle were associated with CAC. The standardized CAC was 46 Agatston units (95% CI, 39 to 54) among participants with high genetic risk, compared to CAC 21 Agatston units (95% CI, 18 to 25) among those with low genetic risk ( $P < 0.001$ ). CAC was significantly higher among participants with an unfavorable lifestyle than among those with a favorable lifestyle: CAC 46 Agatston units (95% CI, 40 to 53) versus CAC 28 Agatston units (95% CI, 25 to 31) ( $P < 0.001$ ) [88].

A recent systematic review of the literature with twelve studies showed that ADAMTS7 polymorphisms, especially SNP rs4380028 allele, have been consistently associated with CAD. ADAMTS7 rs4380028 was consistently related to coronary artery disease: both coronary artery calcification and coronary artery stenosis [89].

Van Setten et al. calculated polygenic scores based on SNPs with  $P$  values reported by the CARDIOGRAMplusC4D2 consortium that reached a predefined threshold ( $< 5 \times 10^{-7}$ ,  $< 5 \times 10^{-8}$ ,  $< 5 \times 10^{-9}$ ,  $< 5 \times 10^{-10}$ ,  $< 5 \times 10^{-11}$ ,  $< 0.05$ ,  $< 0.1$ ,  $< 0.2$ ,  $< 0.3$ ,  $< 0.4$ , and  $< 0.5$ ), which resulted in 11 polygenic models containing between 39 and 15,475 SNPs [8]. Later, they performed the association with EC in 2599 participants of the Dutch and Belgian Lung Cancer Screening (NELSON) trial. This polygenic model

could explain up to 13.9% of the variance observed in CAC. This suggests that a substantial fraction of the hereditary risk for CAD/MI is mediated by arterial calcification. Besides, it was observed that genetic variants associated with serum lipid levels and the body mass index influence the level of CAC [80].

Mendelian disorders are related to vascular calcification. For example, in genome-wide association, studies were able to identify loci at 6p21.3, 10q21.3, and 9p2 associated with CAC. It was also showed that ENPP1 that encodes a cell surface protein that regulates extracellular phosphate is the gene responsible for idiopathic infantile arterial calcification (IIAC) [91].

Recently, mutations in the ABCG6 gene encoding a transmembrane ATP-binding protein were described in 14 of 28 children with IIAC and pseudoxanthoma elasticum. An animal model suggests that the ABCG6 gene is related to ectopic and vascular calcification. This calcification was attributed to reduced levels of  $\gamma$ -carboxylation of matrix gla protein (MGP), an important calcification inhibitor [80].

### 3. Conclusion

The VC has a complex pathophysiology still under investigation. The knowledge of the relationship of genetic factors with this process certainly becomes important, not only for the field of basic research but also for better definition of progression, prognosis, and provision of new therapies in the prevention and treatment of atherosclerosis. Future studies should better elucidate the mechanism involved in the pathophysiology and genetics of vascular calcification processes.

### Abbreviations

CRF:	Cardiovascular risk factor
VSMC:	Vascular smooth muscle cell
CD:	Cardiovascular disease
VC:	Vascular calcification
CAC:	Coronary artery calcium
CI:	Confidence interval
IL:	Interleukin
IIAC:	Idiopathic infantile arterial calcification
TNF:	Tumor necrosis factor
oxLDL:	Oxidized low-density lipoprotein
HDL:	High-density lipoprotein
Anx:	Annexin
F-A:	Fetuin-A
Cbfa/Runx2:	Core-binding factor subunit 1 alpha/runt-related transcription factor 2
CRP:	C-reactive protein
RANKL:	Receptor activator of nuclear factor kappa- $\beta$ ligand
BMPs:	Bone morphogenetic proteins
MVs:	Matrix vesicles
OC:	Osteocalcin
OP:	Osteopontin
OPG/RANK/	Osteoprotegerin system-nuclear factor
RANKL:	receptor kappa-B ligand

PTX 3:	Pentraxin 3
Wnt/ $\beta$ Catenin:	Canonical signaling pathway Wingless/ $\beta$ catenin
DKK:	Dickkopf proteins
GWAS:	Genome-wide association study
Lp:	Lipoprotein
CNR2:	Cannabinoid receptor type 2 gene
SNPs:	Single nucleotide polymorphisms.

### Conflicts of Interest

The authors declare no conflicts of interest.

### Authors' Contributions

L.F.E.G. and N.H.M.L. were responsible for conceptualization and original draft preparation. Reviewing and final editing were done by L.F.E.G., N.H.M.L., and C.A.E.G. N.H.M.L. performed critical reading and initiated and supervised the whole work.

### References

- [1] E. J. Benjamin, S. S. Virani, C. W. Callaway et al., "Heart disease and stroke statistics—2018 update: a report from the American Heart Association," *Circulation*, vol. 137, pp. 67–492, 2018.
- [2] J. N. Stables and D. A. Towler, "Arterial calcification in diabetes mellitus," *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, vol. 37, no. 2, pp. 205–217, 2017.
- [3] J. M. Valdiviaño, D. Rodríguez-Pujol, J. Pascual et al., "Atherosclerosis in chronic kidney disease," *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, vol. 39, no. 10, pp. 1938–1966, 2019.
- [4] D. E. Bild, G. Burke, K. Liu et al., "Coronary calcium as a predictor of coronary events in four racial or ethnic groups," *New England Journal of Medicine*, vol. 358, no. 13, pp. 1336–1345, 2008.
- [5] A. E. Schmitt, M. E. Ivarsson, and J.-C. Leroux, "Investigational pharmacological treatments for vascular calcification," *Advanced Therapeutics*, vol. 2, no. 1, p. 1800094, 2019.
- [6] L. Zaccaroni, G. Faggioli, and G. Pasquini, "Mechanisms of arterial calcification: the role of matrix vesicles," *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery*, vol. 55, no. 3, pp. 425–432, 2018.
- [7] J. Deng, Q. Ghali, P. Lencel et al., "TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  inhibit RUNX2 and collagen expression but increase alkaline phosphatase activity and mineralization in human mesenchymal stem cells," *Life Sciences*, vol. 84, no. 15–16, pp. 499–504, 2009.
- [8] F. Deloukas, S. Kanoni, J. R. Thompson et al., "Large-scale association analysis identifies new risk loci for coronary artery disease," *Nature Genetics*, vol. 45, no. 1, pp. 25–33, 2012.
- [9] B. H. Hahn, J. Grossman, W. Chen, and M. McMahon, "The pathogenesis of atherosclerosis in autoimmune rheumatic disease: roles of inflammation and dyslipidemia," *Journal of Autoimmunity*, vol. 28, no. 2–3, pp. 69–75, 2007.
- [10] R. D. Brook, S. Rajagopalan, C. Arden Pope et al., "Particulate matter air pollution and cardiovascular disease: an update to the scientific statement from the American," *Circulation*, vol. 121, no. 21, 2010.

- [11] P. Lencl, S. Delplace, P. Pilet et al., "Cell-specific effects of TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  on alkaline phosphatase: implication for syndesmophyte formation and vascular calcification," *Laboratory Investigation*, vol. 91, no. 10, pp. 1434-1442, 2011.
- [12] J. Kaminski, M. Stopinski, K. Macha et al., "IL-6 but not TNF is linked to coronary artery calcification in patients with chronic kidney disease," *Cytokine*, vol. 120, pp. 9-14, 2019.
- [13] M.-M. Zhao, M.-J. Xu, Y. Cai et al., "Mitochondrial reactive oxygen species promote p65 nuclear translocation mediating high-phosphate-induced vascular calcification in vitro and in vivo," *Kidney International*, vol. 79, no. 10, pp. 1071-1079, 2011.
- [14] X. Zhang, J. Liu, X. Pang, J. Zhao, S. Wang, and D. Wu, "Aldosterone induces C-reactive protein expression via MDR-ROS-MAPK-NF- $\kappa$ B signal pathway in rat vascular smooth muscle cells," *Molecular and Cellular Endocrinology*, vol. 395, no. 1-2, pp. 60-68, 2014.
- [15] L. A. Henne, T. T. D. Luong, B. Boehme et al., "Impact of C-reactive protein on osteo/chondrogenic trans-differentiation and calcification of vascular smooth muscle cells," *Ageing*, vol. 11, no. 15, pp. 5445-5462, 2019.
- [16] P. Conti and Y. Shukla-dashgiriach, "Atherosclerosis: a chronic inflammatory disease mediated by mast cells," *Central European Journal of Immunology*, vol. 3, no. 3, pp. 380-386, 2015.
- [17] F. Parhami, B. Basseri, J. Hwang, Y. Tintut, and L. I. Demer, "High-density lipoprotein regulates calcification of vascular cells," *Circulation Research*, vol. 91, no. 7, pp. 570-576, 2002.
- [18] E. A. Fisher, J. E. Feig, B. Hewing, S. L. Hansen, and J. D. Smith, "High-density lipoprotein function, dysfunction, and reverse cholesterol transport," *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, vol. 32, no. 12, pp. 2813-2820, 2012.
- [19] E. Van der Pol, A. N. Böing, E. L. Gool, and R. Nieuwland, "Recent developments in the nomenclature, presence, isolation, detection and clinical impact of extracellular vesicles," *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, vol. 14, no. 1, pp. 48-56, 2015.
- [20] A. N. Kapustin, M. L. L. Chatrou, I. Drondov et al., "Vascular smooth muscle cell calcification is mediated by regulated exosome secretion," *Circulation Research*, vol. 116, no. 8, pp. 1312-1323, 2015.
- [21] C. Goettach, J. D. Hutchison, M. Akawa et al., "Sortilin mediates vascular calcification via its recruitment into extracellular vesicles," *Journal of Clinical Investigation*, vol. 126, no. 4, pp. 1323-1336, 2016.
- [22] V. Gerke, C. E. Creutz, and S. E. Moss, "Annexin linking Ca<sup>2+</sup> signaling to membrane dynamics," *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, vol. 6, no. 6, pp. 449-461, 2005.
- [23] A. N. Kapustin, J. D. Davies, J. L. Reynolds et al., "Calcium regulates key components of vascular smooth muscle cell-derived matrix vesicles to enhance mineralization," *Circulation Research*, vol. 109, no. 1, pp. e1-12, 2011.
- [24] J. F. Marchini, K. Croce, C. M. Shanahan et al., "Macrophage-derived matrix vesicles," *Circulation Research*, vol. 113, no. 1, pp. 72-77, 2013.
- [25] I. Voelkl, F. Lang, K.-U. Eckardt et al., "Signaling pathways involved in vascular smooth muscle cell calcification during hyperphosphatemia," *Cellular and Molecular Life Sciences*, vol. 76, no. 11, pp. 2077-2091, 2019.
- [26] D. Ngai, M. Lino, and M. P. Bendick, "Cell-matrix interactions and matrix signaling in the pathogenesis of vascular calcification," *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, vol. 5, p. 174, 2018.
- [27] S. A. Steitz, M. Y. Spoor, G. Curings et al., "Smooth muscle cell phenotypic transition associated with calcification," *Circulation Research*, vol. 89, no. 12, pp. 1147-1154, 2001.
- [28] J. B. Lian, G. S. Stein, A. Javed et al., "Networks and hubs for the transcriptional control of osteoblastogenesis," *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*, vol. 7, no. 1-2, pp. 1-16, 2006.
- [29] Z. Tang, A. Wang, F. Yuan et al., "Differentiation of multipotent vascular stem cells contributes to vascular diseases," *Nature Communications*, vol. 3, no. 1, p. 875, 2012.
- [30] Y. Sun, C. H. Byon, K. Yuan et al., "Smooth muscle cell-specific runx2 deficiency inhibits vascular calcification," *Circulation Research*, vol. 111, no. 5, pp. 545-552, 2012.
- [31] M.-E. Lin, T. M. Chen, M. C. Wallingford et al., "Runx2 deletion in smooth muscle cells inhibits vascular osteochondrogenesis and calcification but not atherosclerotic lesion formation," *Cardiovascular Research*, vol. 112, no. 2, pp. 606-616, 2016.
- [32] N. Fukui, Y. Zhu, W. J. Maloney, I. Chohay, and L. J. Sandell, "Stimulation of BMP-2 expression by pro-inflammatory cytokines IL-1 and TNF- $\alpha$  in normal and osteoarthritic chondrocytes," *The Journal of Bone and Joint Surgery-American Volume*, vol. 85, pp. 59-66, 2003.
- [33] K. A. Hruska, S. Mathew, and G. Saab, "Bone morphogenetic proteins in vascular calcification," *Circulation Research*, vol. 97, no. 2, pp. 105-114, 2005.
- [34] K. Miyazono, "Signal transduction by bone morphogenetic protein receptors: functional roles of Smad proteins," *Bone*, vol. 25, no. 1, pp. 91-93, 1999.
- [35] E. I. Freedman, D. W. Bowden, I. T. Ziegler et al., "Bone morphogenetic protein 7 (BMP7) gene polymorphisms are associated with inverse relationships between vascular calcification and BMD: the diabetes heart study," *Journal of Bone and Mineral Research*, vol. 24, no. 10, pp. 1719-1727, 2009.
- [36] A. Tacey, T. Quresh, T. Brennan-Speranza, A. Hayes, A. Zulli, and I. Levinger, "Potential role for osteocalcin in the development of atherosclerosis and blood vessel disease," *Nutrients*, vol. 10, no. 10, p. 1426, 2018.
- [37] C. R. Dhore, J. P. M. Goutjers, E. Lutgens et al., "Differential expression of bone matrix regulatory proteins in human atherosclerotic plaques," *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, vol. 21, no. 12, pp. 1998-2003, 2001.
- [38] S. A. Millar, I. Zala, S. I. Anderson, and S. E. O'Sullivan, "Osteocalcin does not influence acute or chronic inflammation in human vascular cells," *Journal of Cellular Physiology*, vol. 235, no. 4, pp. 3414-3424, 2020.
- [39] T. Akiyoshi, H. Ota, K. Iijima et al., "A novel organ culture model of aorta for vascular calcification," *Atherosclerosis*, vol. 244, pp. 51-58, 2016.
- [40] A. Ládlečnický, Y. Rais, and E. Mészáros-Orman, "Bone Gla protein increases HIF-1 $\alpha$ -dependent glucose metabolism and induces cartilage and vascular calcification," *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, vol. 31, no. 9, 2011.
- [41] A. I. Flammer, M. Gossel, R. I. Widmer et al., "Osteocalcin positive CD133+/CD34-/KDR+ progenitor cells as an independent marker for unstable atherosclerosis," *European Heart Journal*, vol. 33, no. 23, pp. 2963-2969, 2012.
- [42] L. Rochette, A. Meloux, É. Rigal, M. Zeller, Y. Cottin, and C. Vergely, "The role of osteoprotegerin and its ligands in vascular function," *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 20, no. 3, p. 705, 2019.
- [43] M. Wu, C. Remesier, and C. M. Giachelli, "Vascular calcification: an update on mechanisms and challenges in

- treatment," *Calcified Tissue International*, vol. 93, no. 4, pp. 365–373, 2013.
- [44] G. Zhao, M.-J. Xu, M.-M. Zhao et al., "Activation of nuclear factor-kappa B accelerates vascular calcification by inhibiting arylsulfatase B expression," *Kidney International*, vol. 82, no. 1, pp. 34–44, 2012.
- [45] J. Voelkl, T. T. D. Luong, R. Tuffaha et al., "SGK1 induces vascular smooth muscle cell calcification through NF- $\kappa$ B signaling," *Journal of Clinical Investigation*, vol. 128, no. 7, pp. 3024–3040, 2018.
- [46] S. V. Suryawathi and Y. A. Kulkarni, "NF- $\kappa$ B: a potential target in the management of vascular complications of diabetes," *Frontiers in Pharmacology*, vol. 8, pp. 1–12, 2017.
- [47] A. M. Kay, C. L. Simpson, and I. A. Stewart Jr., "The role of AGE/RAGE signaling in diabetes-mediated vascular calcification," *Journal of Diabetes Research*, vol. 2016, p. 6809703, 2016.
- [48] W. Mathijs Blankensteijn and K. C.M. Hermans, "Wnt signaling in atherosclerosis," *European Journal of Pharmacology*, vol. 763, pp. 122–130, 2015.
- [49] S. Foulquier, E. P. Daskalopoulos, G. Lhari, K. C. M. Hermans, A. Deb, and W. M. Blankensteijn, "WNT signaling in cardiac and vascular disease," *Pharmacological Reviews*, vol. 70, no. 1, pp. 68–141, 2018.
- [50] S. K. Bisson, R. V. Ung, and F. Mac-Way, "Role of the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway in renal osteodystrophy," *International Journal of Endocrinology*, vol. 2018, 2018.
- [51] L. Yao, Y.-c. Sun, W. Sun et al., "High phosphorus level leads to aortic calcification via  $\beta$ -catenin in chronic kidney disease," *American Journal of Nephrology*, vol. 41, no. 1, pp. 28–36, 2015.
- [52] F. Moadi, S. Jallon, A. Inforzato et al., "Pathogen recognition by the long pentraxin PTX3," *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, vol. 2011, Article ID 830421, 15 pages, 2011.
- [53] T. Cai, D. Sun, Y. Duan et al., "WNT/ $\beta$ -catenin signaling promotes VSMCs to osteogenic transdifferentiation and calcification through directly modulating Runx2 gene expression," *Experimental Cell Research*, vol. 345, no. 2, pp. 206–217, 2016.
- [54] M. Klotzsch, G. Peri, C. Krabbe et al., "Modified atherogenic lipoproteins induce expression of pentraxin-3 by human vascular smooth muscle cells," *Atherosclerosis*, vol. 175, no. 2, pp. 221–228, 2004.
- [55] G. D. Norata, P. Marchesi, V. K. Palakoddi Venu et al., "Deficiency of the long pentraxin PTX3 promotes vascular inflammation and atherosclerosis," *Circulation*, vol. 120, p. 699708, 2009.
- [56] N. S. Jeney, R. S. Blumenthal, R. A. Kronmal, J. I. Rotter, D. S. Siscovick, and R. M. Patey, "Associations of pentraxin 3 with cardiovascular disease: the multi-ethnic study of atherosclerosis," *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, vol. 12, no. 6, pp. 999–1005, 2014.
- [57] R. S. Jensen, S. Daijot, S. Mahakena et al., "ABCC6-mediated ATP secretion by the liver is the main source of the mineralization inhibitor inorganic pyrophosphate in the systemic circulation—brief report," *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, vol. 34, no. 9, pp. 1985–1989, 2014.
- [58] A. Y. Savinova, M. Salehi, M. C. Yadav, I. Radichev, I. L. Millin, and O. V. Savinova, "Transgenic overexpression of tissue-nonspecific alkaline phosphatase (TNAP) in vascular endothelium results in generalized arterial calcification," *Journal of the American Heart Association*, vol. 4, no. 12, pp. 1–13, 2015.
- [59] M. Bäck, T. Aranyi, M. L. Casco et al., "Endogenous calcification inhibitors in the prevention of vascular calcification: a consensus statement from the cost action euro soft calc net," *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, vol. 5, 2019.
- [60] I. L. Reynolds, A. I. Ioannidis, I. N. Skjellerup et al., "Human vascular smooth muscle cells undergo vesicle-mediated calcification in response to changes in extracellular calcium and phosphate concentrations: a potential mechanism for accelerated vascular calcification in ESRD," *Journal of the American Society of Nephrology*, vol. 15, no. 11, pp. 2857–2867, 2004.
- [61] J. Wuyts and A. Dhondt, "The role of vitamin K in vascular calcification of patients with chronic kidney disease," *Acta Clinica Belgica*, vol. 71, no. 6, pp. 462–467, 2016.
- [62] B. Geir, E. Swanberg, M. Dalar, and J. David, "The role of matrix Gla protein (MGP) in vascular calcification," *Current Medicinal Chemistry*, vol. 25, p. 1, 2018.
- [63] Y. Fang, C. Ginsberg, M. Scifert et al., "CKD-induced wingless/integration1 inhibitors and phosphorus cause the calc–mineral and bone disorder," *Journal of the American Society of Nephrology*, vol. 25, no. 8, pp. 1760–1773, 2014.
- [64] S. L. West, V. J. D. Swen, and S. A. Jamal, "Effects of calcium on cardiovascular events in patients with kidney disease and in a healthy population," *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, vol. 5, no. 1, pp. 41–47, 2010.
- [65] K. Toutouza, D. Klettas, N. Anouskiki-Vlachochristou et al., "The -174 G>C interleukin-6 gene polymorphism is associated with angiographic progression of coronary artery disease over a 4-year period," *Hellenic Journal of Cardiology*, vol. 58, no. 1, pp. 80–86, 2017.
- [66] R. Meletta, R. Slavik, I. Mu et al., "Cannabinoid receptor type 2 (CB2) as one of the candidate genes in human carotid plaque imaging: evaluation of the novel radiotracer [ $^{11}$ C]BS-016 targeting CB2 in atherosclerosis," *Nuclear Medicine and Biology*, vol. 47, pp. 31–43, 2017.
- [67] C. Schäfer, A. Heins, A. Schwarz et al., "The serum protein  $\alpha$ 2-Heremans-Schmid glycoprotein/fetuin-A is a systemically acting inhibitor of ectopic calcification," *Journal of Clinical Investigation*, vol. 112, no. 3, pp. 357–366, 2003.
- [68] J. H. ix, R. Katz, I. H. de Boer et al., "Fetuin-A is inversely associated with coronary artery calcification in community-living persons: the multi-ethnic study of atherosclerosis," *Clinical Chemistry*, vol. 58, no. 5, pp. 887–895, 2012.
- [69] A. B. Lehtinen, K. P. Burdon, J. P. Lewis et al., "Association of  $\alpha$ 2-heremans-schmid glycoprotein polymorphisms with subclinical atherosclerosis," *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, vol. 92, no. 1, pp. 345–352, 2007.
- [70] C. Bellia, L. Agnello, B. Lo Scazo et al., "Fetuin-A is associated to serum calcium and AHSN T256S genotype but not to coronary artery calcification," *Biochemical Genetics*, vol. 54, no. 3, pp. 222–231, 2016.
- [71] M. Schoppa, K. T. Preisner, and L. C. Hofbauer, "RANK ligand and osteoprotegerin," *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, vol. 22, no. 4, pp. 549–553, 2002.
- [72] W. J. Boyle, S. Kaufman, S. Morony et al., "Osteoprotegerin reverses osteoporosis by inhibiting endosteal osteoclasts and prevents vascular calcification by blocking a process resembling osteoclastogenesis," *The Journal of Experimental Medicine*, vol. 192, no. 4, pp. 463–474, 2002.
- [73] D. V. Anand, A. Lahiri, E. Lim, D. Hopkins, and R. Corlier, "The relationship between plasma osteoprotegerin levels and coronary artery calcification in uncomplicated type 2 diabetic subjects," *Journal of the American College of Cardiology*, vol. 47, no. 9, pp. 1850–1857, 2006.
- [74] S. I. McFarlane, R. Muniyappa, I. I. Shin, G. Bahiyar, and I. R. Sowers, "Osteoporosis and cardiovascular disease: brittle

- bones and bony arteries, is there a link?" *Endocrine*, vol. 23, no. 1, pp. 1-10, 2004.
- [75] A. E. Peters, M. Katz, Liberman M et al., "Circulating osteogenic proteins are associated with coronary artery calcification and increase after myocardial infarction," *PLoS One*, vol. 13, no. 8, Article ID e0202738, 2018.
- [76] W.-S. Choe, H.-L. Kim, I.-K. Han et al., "Association between OPG, RANK and RANKL gene polymorphisms and susceptibility to acute coronary syndrome in Korean population," *Journal of Genetics*, vol. 91, no. 1, pp. 87-89, 2012.
- [77] K.-I. Kim, K. U. Park, E. I. Chun et al., "A novel biomarker of coronary atherosclerosis: serum DKK1 concentration correlates with coronary artery calcification and atherosclerotic plaques," *Journal of Korean Medical Science*, vol. 26, no. 9, pp. 1178-1184, 2011.
- [78] R. Haetta and C. Harfi, "Dkk (Dickkopf) proteins," *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, vol. 39, no. 7, pp. 1330-1342, 2019.
- [79] M. M. Schoen, P. Murterdani, M. J. Garcia et al., "Prevalence, impact, and predictive value of detecting subclinical coronary and carotid atherosclerosis in asymptomatic adults," *Journal of the American College of Cardiology*, vol. 63, no. 11, pp. 1065-1074, 2015.
- [80] T. Ueland, A. Alnandi, T. Ghukasyan et al., "Admission levels of DKK1 (Dickkopf-1) are associated with future cardiovascular death in patients with acute coronary syndromes," *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, vol. 39, no. 2, pp. 294-302, 2019.
- [81] N. Kasu, J. Luurikkala, M. Imanishi et al., "Sclerostin is a novel secreted osteoclast-derived bone morphogenetic protein antagonist with unique ligand specificity," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 278, no. 26, pp. 24111-24117, 2003.
- [82] L. Nguyen-Yamamoto, K.-I. Tanaka, R. St-Arnaud, and D. Collier, "Vitamin D-regulated osteocytic sclerostin and BMP2 modulate uremic extraskeletal calcification," *ICI Insight*, vol. 4, no. 13, pp. 1-14, 2019.
- [83] L. Visero, G. I. Behari, K. Glass et al., "Sclerostin: another bone-related protein related to all-cause mortality in haemodialysis?" *Nephrology Dialysis Transplantation*, vol. 28, no. 12, pp. 3024-3030, 2013.
- [84] A. Miyachi, J. Alvarez, E. M. Greenfield et al., "Recognition of osteopontin and related peptides by  $\alpha$ 5 $\beta$ 1 integrin stimulates immediate cell signals in osteoclast," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 266, pp. 2369-2374, 1991.
- [85] T. Wada, M. D. McKee, S. Stein, and C. M. Giachelli, "Calcification of vascular smooth muscle cell cultures," *Circulation Research*, vol. 84, no. 2, pp. 166-178, 1998.
- [86] A. E. Berzin and A. A. Kromer, "Circulating osteopontin as a marker of early coronary vascular calcification in type two diabetes mellitus patients with known asymptomatic coronary artery disease," *Atherosclerosis*, vol. 229, no. 2, pp. 475-481, 2013.
- [87] P. Natarajan, J. C. Hix, I. F. Eick et al., "Multiethnic genome-wide association study of subclinical atherosclerosis," *Circulation: Cardiovascular Genetics*, vol. 9, no. 6, pp. 511-520, 2016.
- [88] D. I. Chasman, Ph.D., U. Haber et al., "Genetic risk, adherence to a healthy lifestyle, and coronary disease," *New England Journal of Medicine*, vol. 375, no. 24, pp. 2349-2358, 2016.
- [89] S. W. Rabkin and P. G. Keitopoulos, "Clinical genomics of the relationship between ADAMTS7 and coronary artery calcification and atherosclerosis," *Journal of Translational Medicine and Genomics*, vol. 2, p. 4, 2018.
- [90] J. Van Setten, J. Iqbal, S. Pechlivanis et al., "Serum lipid levels, body mass index, and their role in coronary artery calcification," *Circulation: Cardiovascular Genetics*, vol. 8, no. 2, pp. 327-333, 2015.
- [91] M. A. Hofmann Bowman and E. M. McNally, "Genetic pathways of vascular calcification," *Trends in Cardiovascular Medicine*, vol. 22, no. 4, pp. 93-98, 2012.

## 8 REFERÊNCIAS

1. Brito F. Transição demográfica e desigualdades sociais no Brasil. *Rev Bras Estud Popul.* 2008; 25(1):5–26.
2. E. J. Benjamin, S. S. Virani, C. W. Callaway et al., “Heart disease and stroke statistics—2018 update: a report from the American Heart Association,”. *Circulation*, vol. 137, pp. 67–492, 2018.
3. Osako MK, et al. Estrogen inhibits vascular calcification via vascular RANKL system: common mechanism of osteoporosis and vascular calcification. *Circ Res.* 2010; 107:466–75. <https://doi.org/10.1161/circresaha.110.216846>.
4. Cranney A, Jamal AS, Tsang JF, Josse RG, Leslie WD. Low bone mineral density and fracture burden in postmenopausal women. *CMAJ* 2007; 177: 575-580.
5. Tankó LB, Christiansen C, Cox DA, Geiger MJ, McNabb MA, Cummings SR. Relationship between osteoporosis and cardiovascular disease in postmenopausal women. *J Bone Miner Res.* 2005;20(11):1912–20.
6. A. E. Schantl, M. E. Ivarsson, and J.-C. Leroux, “Investigational pharmacological treatments for vascular calcification,” *Advanced Therapeutics*, vol. 2, no. 1, p. 1800094, 2019.
7. L. Zazzeroni, G. Faggioli, and G. Pasquinelli, “Mechanisms of arterial calcification: the role of matrix vesicles,” *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery*, vol. 55, no. 3, pp. 425–432, 2018.
8. Demer LL. Vascular calcification and osteoporosis: Inflammatory responses to oxidized lipids. *Int J Epidemiol.* 2002;31(4):737–41.
9. J. Ding, O. Ghali, P. Lencel et al., “TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  inhibit RUNX2 and collagen expression but increase alkaline phosphatase activity and mineralization in human mesenchymal stem cells,” *Life Sciences*, vol. 84, no. 15-16, pp. 499–504, 2009.

10. P. Deloukas, S. Kanoni, J. R. Thompson et al., "Large-scale association analysis identifies new risk loci for coronary artery disease," *Nature Genetics*, vol. 45, no. 1, pp. 25–33, 2012.
11. Escobar Guzman LF, Escobar Guzman CA, Lopes NHM. Pathophysiological and Genetic Aspects of Vascular Calcification. *Cardiol Res Pract.* 2020;2020:5169069. Published 2020 Apr 14. doi:10.1155/2020/5169069
12. J. Ding, O. Ghali, P. Lencel et al., "TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  inhibit RUNX2 and collagen expression but increase alkaline phosphatase activity and mineralization in human mesenchymal stem cells," *Life Sciences*, vol. 84, no. 15-16, pp. 499–504, 2009.
13. Shao JS, Cheng SL, Sadhu J, Towler DA. Inflammation and the osteogenic regulation of vascular calcification: a review and perspective. *Hypertension.* 2010;55(3):579-592. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.109.134205
14. B. H. Hahn, J. Grossman, W. Chen, and M. McMahon, "The pathogenesis of atherosclerosis in autoimmune rheumatic diseases: roles of inflammation and dyslipidemia," *Journal of Autoimmunity*, vol. 28, no. 2-3, pp. 69–75, 2007.
15. R. D. Brook, S. Rajagopalan, C. Arden Pope et al., "Particulate matter air pollution and cardiovascular disease an update to the scientific statement from the american," *Circulation*, vol. 121, no. 21, 2010.
16. P. Lencel, S. Delplace, P. Pilet et al., "Cell-specific effects of TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  on alkaline phosphatase: implication for syndesmophyte formation and vascular calcification," *Laboratory Investigation*, vol. 91, no. 10, pp. 1434–1442, 2011.
17. J. Kaminska, M. Stopinski, K. Mucha et al., "IL 6 but not TNF is linked to coronary artery calcification in patients with chronic kidney disease," *Cytokine*, vol. 120, pp. 9–14, 2019.
18. M. M. Zhao, M.-J. Xu, Y. Cai et al., "Mitochondrial reactive oxygen species promote p65 nuclear translocation mediating high-phosphate-induced vascular

- calcification in vitro and in vivo,” *Kidney International*, vol. 79, no. 10, pp. 1071–1079, 2011.
19. X. Zhang, J. Liu, X. Pang, J. Zhao, S. Wang, and D. Wu, “Aldosterone induces C-reactive protein expression via MRROS-MAPK-NF- $\kappa$ B signal pathway in rat vascular smooth muscle cells,” *Molecular and Cellular Endocrinology*, vol. 395, no. 1-2, pp. 61–68, 2014.
  20. L. A. Henze, T. T. D. Luong, B. Boehme et al., “Impact of C-reactive protein on osteo-/chondrogenic transdifferentiation and calcification of vascular smooth muscle cells,” *Aging*, vol. 11, no. 15, pp. 5445–5462, 2019.
  21. P. Conti and Y. Shaik-dasthagirisaeb, “Atherosclerosis: a chronic inflammatory disease mediated by mast cells,” *Central European Journal of Immunology*, vol. 3, no. 3, pp. 380–386, 2015.
  22. F. Parhami, B. Basseri, J. Hwang, Y. Tintut, and L. L. Demer, “High-density lipoprotein regulates calcification of vascular cells,” *Circulation Research*, vol. 91, no. 7, pp. 570–576, 2002.
  23. E. A. Fisher, J. E. Feig, B. Hewing, S. L. Hazen, and J. D. Smith, “High-density lipoprotein function, dysfunction, and reverse cholesterol transport,” *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, vol. 32, no. 12, pp. 2813–2820, 2012.
  24. E. Van der Pol, A. N. Böing, E. L. Gool, and R. Nieuwland, “Recent developments in the nomenclature, presence, isolation, detection and clinical impact of extracellular vesicles,” *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, vol. 14, no. 1, pp. 48–56, 2015.
  25. A. N. Kapustin, M. L. L. Chatrou, I. Drozdov et al., “Vascular smooth muscle cell calcification is mediated by regulated exosome secretion,” *Circulation Research*, vol. 116, no. 8, pp. 1312–1323, 2015.



26. C. Goettsch, J. D. Hutcheson, M. Aikawa et al., "Sortilin mediates vascular calcification via its recruitment into extracellular vesicles," *Journal of Clinical Investigation*, vol. 126, no. 4, pp. 1323–1336, 2016.
27. V. Gerke, C. E. Creutz, and S. E. Moss, "Annexins: linking Ca<sup>2+</sup> signalling to membrane dynamics," *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, vol. 6, no. 6, pp. 449–461, 2005.
28. A. N. Kapustin, J. D. Davies, J. L. Reynolds et al., "Calcium regulates key components of vascular smooth muscle cell-derived matrix vesicles to enhance mineralization," *Circulation Research*, vol. 109, no. 1, pp. e1–12, 2011.
29. J. F. Marchini, K. Croce, C. M. Shanahan et al., "Macrophage derived matrix vesicles," *Circulation Research*, vol. 113, no. 1, pp. 72–77, 2013.
30. J. Voelkl, F. Lang, K.-U. Eckardt et al., "Signaling pathways involved in vascular smooth muscle cell calcification during hyperphosphatemia," *Cellular and Molecular Life Sciences*, vol. 76, no. 11, pp. 2077–2091, 2019.
31. D. Ngai, M. Lino, and M. P. Bendeck, "Cell-matrix interactions and matricrine signaling in the pathogenesis of vascular calcification," *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, vol. 5, p. 174, 2018.
32. S. A. Steitz, M. Y. Speer, G. Curinga et al., "Smooth muscle cell phenotypic transition associated with calcification," *Circulation Research*, vol. 89, no. 12, pp. 1147–1154, 2001.
33. J. B. Lian, G. S. Stein, A. Javed et al., "Networks and hubs for the transcriptional control of osteoblastogenesis," *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*, vol. 7, no. 1-2, pp. 1–16, 2006.
34. Z. Tang, A. Wang, F. Yuan et al., "Differentiation of multipotent vascular stem cells contributes to vascular diseases," *Nature Communications*, vol. 3, no. 1, p. 875, 2012.

35. Y. Sun, C. H. Byon, K. Yuan et al., "Smooth muscle cell-specific runx2 deficiency inhibits vascular calcification," *Circulation Research*, vol. 111, no. 5, pp. 543–552, 2012.
36. M.-E. Lin, T. M. Chen, M. C. Wallingford et al., "Runx2 deletion in smooth muscle cells inhibits vascular osteochondrogenesis and calcification but not atherosclerotic lesion formation," *Cardiovascular Research*, vol. 112, no. 2, pp. 606–616, 2016.
37. N. Fukui, Y. Zhu, W. J. Maloney, J. Clohisy, and L. J. Sandell, "Stimulation OF BMP-2 expression BY pro-inflammatory cytokines IL-1 and TNF- $\alpha$  IN normal and osteoarthritic chondrocytes," *The Journal of Bone and Joint Surgery-American Volume*, vol. 85, pp. 59–66, 2003.
38. K. A. Hruska, S. Mathew, and G. Saab, "Bone morphogenetic proteins in vascular calcification," *Circulation Research*, vol. 97, no. 2, pp. 105–114, 2005.
39. K. Miyazono, "Signal transduction by bone morphogenetic protein receptors: functional roles of Smad proteins," *Bone*, vol. 25, no. 1, pp. 91–93, 1999.
40. B. I. Freedman, D. W. Bowden, J. T. Ziegler et al., "Bone morphogenetic protein 7 (BMP7) gene polymorphisms are associated with inverse relationships between vascular calcification and BMD: the diabetes heart study," *Journal of Bone and Mineral Research*, vol. 24, no. 10, pp. 1719–1727, 2009.
41. A. Tacey, T. Qaradakh, T. Brennan-Speranza, A. Hayes, A. Zulli, and I. Levinger, "Potential role for osteocalcin in the development of atherosclerosis and blood vessel disease," *Nutrients*, vol. 10, no. 10, p. 1426, 2018.
42. C. R. Dhore, J. P. M. Cleutjens, E. Lutgens et al., "Differential expression of bone matrix regulatory proteins in human atherosclerotic plaques," *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, vol. 21, no. 12, pp. 1998–2003, 2001.
43. S. A. Millar, I. Zala, S. I. Anderson, and S. E. O'Sullivan, "Osteocalcin does not influence acute or chronic inflammation in human vascular cells," *Journal of Cellular Physiology*, vol. 235, no. 4, pp. 3414–3424, 2020.

44. T. Akiyoshi, H. Ota, K. Iijima et al., "A novel organ culture model of aorta for vascular calcification," *Atherosclerosis*, vol. 244, pp. 51–58, 2016.
45. A. Idelevich, Y. Rais, and E. Monsonego-Ornan, "Bone Gla protein increases HIF-1 $\alpha$ -dependent glucose metabolism and induces cartilage and vascular calcification," *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, vol. 31, no. 9, 2011.
46. A. J. Flammer, M. Gossl, R. J. Widmer et al., "Osteocalcin positive CD133+/CD34-/KDR+ progenitor cells as an independent marker for unstable atherosclerosis," *European Heart Journal*, vol. 33, no. 23, pp. 2963–2969, 2012.
47. L. Rochette, A. Meloux, E. Rigal, M. Zeller, Y. Cottin, and C. Vergely, "The role of osteoprotegerin and its ligands in vascular function," *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 20, no. 3, p. 705, 2019.
48. M. Wu, C. Rementer, and C. M. Giachelli, "Vascular calcification: an update on mechanisms and challenges in treatment," *Calcified Tissue International*, vol. 93, no. 4, pp. 365–373, 2013.
49. G. Zhao, M.-J. Xu, M.-M. Zhao et al., "Activation of nuclear factor-kappa B accelerates vascular calcification by inhibiting ankylosis protein homolog expression," *Kidney International*, vol. 82, no. 1, pp. 34–44, 2012.
50. J. Voelkl, T. T. D. Luong, R. Tuffaha et al., "SGK1 induces vascular smooth muscle cell calcification through NF- $\kappa$ B signaling," *Journal of Clinical Investigation*, vol. 128, no. 7, pp. 3024–3040, 2018.
51. S. V. Suryavanshi and Y. A. Kulkarni, "NF- $\kappa$ B: a potential target in the management of vascular complications of diabetes," *Frontiers in Pharmacology*, vol. 8, pp. 1–12, 2017.
52. A. M. Kay, C. L. Simpson, and J. A. Stewart Jr., "The role of AGE/RAGE signaling in diabetes-mediated vascular calcification," *Journal of Diabetes Research*, vol. 2016, p. 6809703, 2016.

53. A. M. Kay, C. L. Simpson, and J. A. Stewart Jr., "The role of AGE/RAGE signaling in diabetes-mediated vascular calcification," *Journal of Diabetes Research*, vol. 2016, p. 6809703, 2016.
54. W. Matthijs Blankesteyn and K. C.M. Hermans, "Wnt signaling in atherosclerosis," *European Journal of Pharmacology*, vol. 763, pp. 122–130, 2015.
55. W. Matthijs Blankesteyn and K. C.M. Hermans, "Wnt signaling in atherosclerosis," *European Journal of Pharmacology*, vol. 763, pp. 122–130, 2015.
56. S. Foulquier, E. P. Daskalopoulos, G. Lluri, K. C. M. Hermans, A. Deb, and W. M. Blankesteyn, "WNT signaling in cardiac and vascular disease," *Pharmacological Reviews*, vol. 70, no. 1, pp. 68–141, 2018.
57. S. K. Bisson, R. V. Ung, and F. Mac-Way, "Role of the Wnt/betacatenin pathway in renal osteodystrophy," *International Journal of Endocrinology*, vol. 2018, 2018.
58. L. Yao, Y.-t. Sun, W. Sun et al., "High phosphorus level leads to aortic calcification via  $\beta$ -catenin in chronic kidney disease," *American Journal of Nephrology*, vol. 41, no. 1, pp. 28–36, 2015.
59. F. Moalli, S. Jaillon, A. Inforzato et al., "Pathogen recognition by the long pentraxin PTX3," *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, vol. 2011, Article ID 830421, 15 pages, 2011.
60. T. Cai, D. Sun, Y. Duan et al., "WNT/ $\beta$ -catenin signaling promotes VSMCs to osteogenic transdifferentiation and calcification through directly modulating Runx2 gene expression," *Experimental Cell Research*, vol. 345, no. 2, pp. 206–217, 2016.
61. M. Klouche, G. Peri, C. Knabbe et al., "Modified atherogenic lipoproteins induce expression of pentraxin-3 by human vascular smooth muscle cells," *Atherosclerosis*, vol. 175, no. 2, pp. 221–228, 2004.
62. J. L. Reynolds, A. J. Joannides, J. N. Skepper et al., "Human vascular smooth muscle cells undergo vesicle-mediated calcification in response to changes in extracellular calcium and phosphate concentrations: a potential mechanism for

- accelerated vascular calcification in ESRD,” *Journal of the American Society of Nephrology*, vol. 15, no. 11, pp. 2857–2867, 2004.
63. R. S. Jansen, S. Duijst, S. Mahakena et al., “ABCC6-mediated ATP secretion by the liver is the main source of the mineralization inhibitor inorganic pyrophosphate in the systemic circulation-brief report,” *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, vol. 34, no. 9, pp. 1985–1989, 2014.
64. A. Y. Savinov, M. Salehi, M. C. Yadav, I. Radichev, J. L. Millán, and O. V. Savinova, “Transgenic overexpression of tissue-nonspecific alkaline phosphatase (TNAP) in vascular endothelium results in generalized arterial calcification,” *Journal of the American Heart Association*, vol. 4, no. 12, pp. 1–13, 2015.
65. M. Bäck, T. Aranyi, M. L. Cancela et al., “Endogenous calcification inhibitors in the prevention of vascular calcification: a consensus statement from the cost action euro soft calc net,” *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, vol. 5, 2019.
66. J. Wuyts and A. Dhondt, “The role of vitamin K in vascular calcification of patients with chronic kidney disease,” *Acta Clinica Belgica*, vol. 71, no. 6, pp. 462–467, 2016.
67. B. Geir, E. Svanberg, M. Dadar, and J. David, “The role of matrix Gla protein (MGP) in vascular calcification,” *Current Medicinal Chemistry*, vol. 25, p. 1, 2018.
68. Y. Fang, C. Ginsberg, M. Seifert et al., “CKD-induced wingless/integration1 inhibitors and phosphorus cause the ckd—mineral and bone disorder,” *Journal of the American Society of Nephrology*, vol. 25, no. 8, pp. 1760–1773, 2014.
69. S. L. West, V. J. D. Swan, and S. A. Jamal, “Effects of calcium on cardiovascular events in patients with kidney disease and in a healthy population,” *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, vol. 5, no. 1, pp. 41–47, 2010.
70. K. Toutouzas, D. Klettas, N. Anousakis-Vlachochristou et al., “The -174 G>C interleukin-6 gene polymorphism is associated with angiographic progression of

- coronary artery disease over a 4-year period," *Hellenic Journal of Cardiology*, vol. 58, no. 1, pp. 80–86, 2017.
71. R. Meletta, R. Slavik, L. Mu et al., "Cannabinoid receptor type 2 (CB2) as one of the candidate genes in human carotid plaque imaging: evaluation of the novel radiotracer [ 11 C]RS-016 targeting CB2 in atherosclerosis," *Nuclear Medicine and Biology*, vol. 47, pp. 31–43, 2017.
72. C. Schäfer, A. Heiss, A. Schwarz et al., "The serum protein  $\alpha$ 2-Heremans-Schmid glycoprotein/fetuin-A is a systemically acting inhibitor of ectopic calcification," *Journal of Clinical Investigation*, vol. 112, no. 3, pp. 357–366, 2003.
73. J. H. Ix, R. Katz, I. H. de Boer et al., "Fetuin-A is inversely associated with coronary artery calcification in community-living persons: the multi-ethnic study of atherosclerosis," *Clinical Chemistry*, vol. 58, no. 5, pp. 887–895, 2012.
74. M. Schoppet, K. T. Preissner, and L. C. Hofbauer, "RANK ligand and osteoprotegerin," *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, vol. 22, no. 4, pp. 549–553, 2002.
75. W. J. Boyle, S. Kaufman, S. Morony et al., "Osteoprotegerin reverses osteoporosis by inhibiting endosteal osteoclasts and prevents vascular calcification by blocking a process resembling osteoclastogenesis," *The Journal of Experimental Medicine*, vol. 192, no. 4, pp. 463–474, 2002.
76. D. V. Anand, A. Lahiri, E. Lim, D. Hopkins, and R. Corder, "The relationship between plasma osteoprotegerin levels and coronary artery calcification in uncomplicated type 2 diabetic subjects," *Journal of the American College of Cardiology*, vol. 47, no. 9, pp. 1850–1857, 2006.
77. S. I. McFarlane, R. Muniyappa, J. J. Shin, G. Bahtiyar, and J. R. Sowers, "Osteoporosis and cardiovascular disease: brittle bones and boned arteries, is there a link?" *Endocrine*, vol. 23, no. 1, pp. 1–10, 2004.

78. A. E. Pesaro, M. Katz, Liberman M et al., "Circulating osteogenic proteins are associated with coronary artery calcification and increase after myocardial infarction," *PLoS One*, vol. 13, no. 8, Article ID e0202738., 2018.
79. W.-S. Choe, H.-L. Kim, J.-K. Han et al., "Association between OPG, RANK and RANKL gene polymorphisms and susceptibility to acute coronary syndrome in Korean population," *Journal of Genetics*, vol. 91, no. 1, pp. 87–89, 2012.
80. K.-I. Kim, K. U. Park, E. J. Chun et al., "A novel biomarker of coronary atherosclerosis: serum DKK1 concentration correlates with coronary artery calcification and atherosclerotic plaques," *Journal of Korean Medical Science*, vol. 26, no. 9, pp. 1178–1184, 2011.
81. R. Baetta and C. Banfi, "Dkk (dickkopf) proteins," *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, vol. 39, no. 7, pp. 1330–1342, 2019.
82. M. M. Schoos, P. Muntendam, M. J. Garcia et al., "Prevalence, impact, and predictive value of detecting subclinical coronary and carotid atherosclerosis in asymptomatic adults," *Journal of the American College of Cardiology*, vol. 65, no. 11, pp. 1065–1074, 2015.
83. T. Ueland, A. Ålandai, T. Ghukasyan et al., "Admission levels of DKK1 (Dickkopf-1) are associated with future cardiovascular death in patients with acute coronary syndromes," *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, vol. 39, no. 2, pp. 294–302, 2019.
84. N. Kusu, J. Laurikkala, M. Imanishi et al., "Sclerostin is a novel secreted osteoclast-derived bone morphogenetic protein antagonist with unique ligand specificity," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 278, no. 26, pp. 24113–24117, 2003.
85. L. Nguyen-Yamamoto, K.-I. Tanaka, R. St-Arnaud, and D. Goltzman, "Vitamin D-regulated osteocytic sclerostin and BMP2 modulate uremic extraskeletal calcification," *JCI Insight*, vol. 4, no. 13, pp. 1–14, 2019.

86. L. Viaene, G. J. Behets, K. Claes et al., Sclerostin: another bone-related protein related to all-cause mortality in haemodialysis? *Nephrology Dialysis Transplantation*, vol. 28, no. 12, pp. 3024–3030, 2013.
87. A. Miyauchi, J. Alvarez, E. M. Greenfield et al., “Recognition of osteopontin and related peptides by  $\alpha$  and  $\beta$  3 integrin stimulates immediate cells signals in osteoclast,” *Journal of Biological Chemistry*, vol. 266, pp. 2369–2374, 1991.
88. T. Wada, M. D. McKee, S. Steitz, and C. M. Giachelli, “Calcification of vascular smooth muscle cell cultures,” *Circulation Research*, vol. 84, no. 2, pp. 166–178, 1999.
89. A. E. Berezin and A. A. Kremzer, “Circulating osteopontin as a marker of early coronary vascular calcification in type two diabetes mellitus patients with known asymptomatic coronary artery disease,” *Atherosclerosis*, vol. 229, no. 2, pp. 475–481, 2013.
90. Robyn L NcKelland, Hyoju Chung, Robert Detrano, Wendy Post, Richard AK. Distribution of Coronary Artery Calcium by Race, Gender and Age: Results from the Multy- Ethnic Syudy of Atherosclerosis (MESA). *Circulation* 2006; 113: 30-7.
91. Budoff MJ, Nasir K, McClelland RL. Coronary Calcium Predicts Events Better With Absolute Calcium Scores Than Age-Sex-Race\Ethnicity Percentiles. *JACC*. 2009; 53: 345-52.
92. Gottlieb I, Miller JM, Arbab-Zadeh A, Dewey M, Melvin E. Clouse, Leonardo Sara, Hiroyuki Niinuma, David E. Bush, Narinder Paul, Andrea L. Vavere, John Texter, Jeffery Brinker, João A. C. Lima, Carlos E. Rochitte. The Absence of Coronary Calcification Does Not Exclude Obstructive Coronary Artery Disease or the Need for Revascularization in Patients Referred for Conventional Coronary Angiography. *JACC*. 2010; 55(7): 627–634.



93. Vliegenthart R, Oudkerk M, Song B et al. Coronary calcification detected by electron-beam computed tomography and myocardial infarction. *Eur Heart J*. 2002; 23: 1596-1603.
94. Sharma RK, Voelker DV. Cardiac Risk Stratification: Role of the Coronary Calcium Score. *Vasc Health Risk Man* 2010; 6: 603-11.
95. Nancy E. Lane. Epidemiology, etiology, and diagnosis of osteoporosis. *Am J Obstet Gynecol*. 2006; 194: 3–11.
96. Lorente-Ramos et al. Dual-Energy X-Ray Absorptiometry in the Diagnosis of Osteoporosis: A Practical Guide. *AJR* 2011; 196:897–904.
97. Szulc P, Samelson EJ, Sornay-Rendu E, Chapurlat R, Kiel DP. Severity of aortic calcification is positively associated with vertebral fracture in older men—a densitometry study in the STRAMBO cohort. *Osteoporos Int*. 2013;24:1177–1184.
98. Zhou R, Zhou H, Cui M, Chen L, Xu J. The association between aortic calcification and fracture risk in postmenopausal women in China: The prospective Chongqing osteoporosis study. *PLoS One*. 2014;9(5):1–6.
99. Fuller H, Fuller R, Pereira RMR. High resolution peripheral quantitative computed tomography for the assessment of morphological and mechanical bone parameters. *Rev Bras Reumatol* [Internet]. 2015;55(4):352–62. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.rbr.2014.07.010>
100. Macneil JA, Boyd SK. Improved reproducibility of high-resolution peripheral quantitative computed tomography for measurement of bone quality. *Med Eng Phys*. 2007; 29: 1096-105.
101. Biver, E, Durosier-Izart, C, Chevalley, T, van Rietbergen, B, Rizzoli, R. and Ferrari, S. (2018). Evaluation of Radius Microstructure and Areal Bone Mineral Density Improves Fracture Prediction in Postmenopausal Women. *J Bone Miner Res*, 33: 328-337

102. Paccou J, Edwards MH, Ward KA, et al. Ischemic heart disease is associated with lower cortical volumetric bone mineral density of distal radius. *Osteoporos Int*. 2015;26(7):1893–901.
103. Cejka D, Weber M, Diarra D, Reiter T, Kainberger F, Haas M. Inverse association between bone microarchitecture assessed by HR-pQCT and coronary artery calcification in patients with end-stage renal disease. *Bone*. 2014; 64:33–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bone.2014.03.048>
104. Fitti JE, Kovar M. The Supplement on Aging to the 1984 National Health Interview Survey. *Vital Health Stat* 1987; 1:1e115.
105. Levey AS, Stevens LA, Schmid CH, Zhang Y, Castro III AF, Feldman HI, et al. A New Equation to Estimate Glomerular Filtration Rate. *Ann Intern Med*. 2009;150(9):604–12.
106. Agatston AS, Janowitz WR, Hildner FJ, Zusmer NR, Viamonte M, Detrano R. Quantification of coronary artery calcium using ultrafast computed tomography. *J Am Coll Cardiol* [Internet]. 1990;15(4):827–32. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/0735-1097\(90\)90282-T](http://dx.doi.org/10.1016/0735-1097(90)90282-T)
107. Lee SN, Cho JY, Eun YM, Song SW, Moon KW. Associations between osteoporosis and coronary artery disease in postmenopausal women. *Climacteric*. 2016;19(5):458–62.
108. Ahmadi, N., Mao, S.S., Hajsadeghi, F. *et al*. The relation of low levels of bone mineral density with coronary artery calcium and mortality. *Osteoporos Int* 29, 1609–1616 (2018). <https://doi.org/10.1007/s00198-018-4524-7>
109. Aoyagi K, Ross PD, Orloff J, Davis JW, Katagiri H, Wasnich RD. Low bone density is not associated with aortic calcification. *Calcif Tissue Int*. 2001;69(1):20-24. doi:10.1007/s002230020003

110. MacDonald HM, Nishiyama KK, Kang J, Hanley DA, Boyd SK. Age-related patterns of trabecular and cortical bone loss differ between sexes and skeletal sites: A population-based HR-pQCT study. *J Bone Miner Res.* 2011;26(1):50–62.
111. Whitmarsh T, Otake Y, Uemura K, Takao M, Sugano N, Sato Y. A cross-sectional study on the age-related cortical and trabecular bone changes at the femoral head in elderly female hip fracture patients. *Sci Rep* [Internet]. 2019;9(1):1–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-018-36299-y>
112. Ott SM. Cortical or Trabecular Bone: What's the Difference? *Am J Nephrol.* 2018;47(6):373–5.
113. Alvarenga, J.C., Fuller, H., Pasoto, S.G. et al. Age-related reference curves of volumetric bone density, structure, and biomechanical parameters adjusted for weight and height in a population of healthy women: an HR-pQCT study. *Osteoporos Int* (2017) 28: 1335. <https://doi.org/10.1007/s00198-016-3876-0>
114. Zebaze R, Seeman E. Cortical bone: a challenging geography. *J Bone Miner Res.* 2015; 30: 24– 9.
115. Zebaze, Roger & Ghasem-Zadeh, Ali & Mbala, Aloys & Seeman, E. (2013). A New Method of Segmentation of Compact-Appearing, Transitional and Trabecular Compartments and Quantification of Cortical Porosity from High Resolution Peripheral Quantitative Computed Tomographic Images. *Bone.* 54. [10.1016/j.bone.2013.01.007](https://doi.org/10.1016/j.bone.2013.01.007).
116. Zebaze, R. M., Ghasem-Zadeh, A., Bohte, A., Iuliano-Burns, S., Mirams, M., Price, R. I. Seeman, E. (2010). Intracortical remodelling and porosity in the distal radius and post-mortem femurs of women: a cross-sectional study. *The Lancet*, 375(9727), 1729–1736. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)60320-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)60320-0).
117. Paccou J, Edwards MH, Ward KA, et al. Ischemic heart disease is associated with lower cortical volumetric bone mineral density of distal radius. *Osteoporos Int.* 2015;26(7):1893–901.

118. Costa LR, Carvalho AB, Bittencourt AL, Rochitte CE, Canziani MEF. Cortical unlike trabecular bone loss is not associated with vascular calcification progression in CKD patients. *BMC Nephrol.* 2020 Apr 6;21(1):121. doi: 10.1186/s12882-020-01756-2. PMID: 32252657; PMCID: PMC7137513.
119. Puri R, Nicholls SJ, Shao M, Kataoka Y, Uno K, Kapadia SR, et al. Impact of statins on serial coronary calcification during atheroma progression and regression. *J Am Coll Cardiol.* 2015;65(13):1273–82. 10.1016/j.jacc.2015.01.036
120. Rifai MA, Blaha MJ, Patel J, Xiaoming J, Cainzos-Achirica M, Greenland P, Budoff M, Yeboah J, Nasir K, Al-Mallah MH, Virani SS. Coronary Artery Calcification, Statin Use and Long-Term Risk of Atherosclerotic Cardiovascular Disease Events (from the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis). *Am J Cardiol.* 2020 Mar 15;125(6):835-839. doi: 10.1016/j.amjcard.2019.12.031. Epub 2019 Dec 28. PMID: 31980142.
121. Iseri K, Watanabe M, Yoshikawa H, Mitsui H, Endo T, Yamamoto Y, Iyoda M, Ryu K, Inaba T, Shibata T. Effects of Denosumab and Alendronate on Bone Health and Vascular Function in Hemodialysis Patients: A Randomized, Controlled Trial. *J Bone Miner Res.* 2019 Jun;34(6):1014-1024. doi: 10.1002/jbmr.3676. Epub 2019 Mar 4. PMID: 30690785..
122. Casula M, Olmastroni E, Galimberti F, Tragni E, Corrao G, Scotti L, Catapano AL. Association between the cumulative exposure to bisphosphonates and hospitalization for atherosclerotic cardiovascular events: A population-based study. *Atherosclerosis.* 2020 May;301:1-7. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2020.03.021. Epub 2020 Apr 7. PMID: 32289617.