



**Universidade de Aveiro** Departamento de Química  
Ano 2014

**Ana Rita**

**Santos Estrela**

**Hipovitaminose D na terapêutica com estatinas**



**Ana Rita**

**Hipovitaminose D na terapêutica com estatinas**

**Santos Estrela**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica, ramo da Bioquímica Clínica, realizada sob a orientação científica do Dr. António Frederico Ramos de Moraes Cerveira, Assistente Graduado Sénior - Responsável pela secção de Imunoquímica do Centro Hospitalar do Baixo Vouga, E.P.E. Aveiro e da Professora Doutora Maria do Rosário Gonçalves dos Reis Marques Domingues, Professora Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro.

Apoio financeiro da Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT, Portugal), da União Europeia, QREN, no âmbito do Programa Operacional Temático Fatores de Competitividade (COMPETE), à Unidade de investigação QOPNA (projeto PEst-C/UI/UI0062/2013; FCOMP-01-0124-FEDER-037296) e RNEM.



## **O júri**

Presidente

Professora Doutora Rita Maria Pinho Ferreira,  
Professora Auxiliar Convidada do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Dr. António Frederico Ramos de Moraes Cerveira,  
Chefe de Serviço de Patologia Clínica – Serviço de Patologia Clínica – Centro Hospitalar do Baixo Vouga, E.P.E

Doutor Armando Caseiro  
Professor Adjunto – Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra – Instituto Politécnico de Coimbra

## Agradecimentos

Ao Dr. Frederico Cerveira e à Professora Rosário Domingues por toda a disponibilidade prestada ao longo do ano e pela motivação que me deram em todas as etapas do meu trabalho.

À Professora Rita Ferreira pela disponibilidade prestada sempre que precisei.

A todas as técnicas do Serviço de Patologia Clínica, pela simpatia e colaboração prestada ao longo dos meses que desenvolvi o meu trabalho no hospital de Aveiro, principalmente à Cátia.

Às minhas colegas de laboratório, em especial à Ana Moreira, à Beta, à Eliana, à Tânia e à Cláudia Simões pela ajuda e motivação ao longo do meu trabalho laboratorial.

Aos meus amigos que mesmo longe, de uma forma ou de outra, contribuíram para que terminasse esta etapa com sucesso, em especial ao João Santiago.

Ao Pedro Gil pela paciência, pelo carinho e dedicação que teve comigo durante esta etapa importante na minha vida.

À minha melhor amiga, Cláudia Costa, pelo apoio incondicional, pela amizade e carinho que sempre me deu em toda a minha vida académica, principalmente nas alturas mais desmotivantes.

À minha tia Nela, que esteve sempre presente em todo o meu percurso académico e que me apoiou e me confortou nos momentos mais difíceis.

Aos meus pais principalmente, pois sem eles era impossível concretizar esta etapa tão importante na minha vida e ao amor incondicional e à motivação constante que me deram ao longo de todo o meu percurso académico.

**Palavras-chaves:** Vitamina D, Estatinas, Efeitos Pleiotrópicos, Doenças cardiovasculares, Lipidômica, Lipoproteínas, Ácidos gordos

**Resumo:**

A hipovitaminose D é um problema clínico muito recorrente à escala mundial, e que não só afecta a população idosa e crianças, como também a população jovem, neste caso de forma inesperada e assintomática. Em diversos estudos científicos, a presença de níveis baixos de vitamina D têm sido associados a um maior risco de doenças cardiovasculares (DCV). O risco de DCV está também associado a dislipidémias, cuja terapêutica com estatinas se julga poder ser um dos causadores de hipovitaminose D. No entanto, esta relação entre a terapêutica com estatinas e as alterações nos níveis plasmáticos de vitamina D ainda é um assunto controverso e que não é apoiado por todos os estudos clínicos. O presente trabalho teve como objectivo a avaliação dos níveis séricos de vitamina D em pacientes hipercolesterolémicos medicados com estatinas e avaliar a possível correlação com o tipo de estatina envolvido na terapêutica. Também teve como objectivo a realização de uma análise ao perfil lipídico plasmático desses pacientes (colesterol total (CT), LDL, HDL, triglicéridos e ácidos gordos). Desta forma, foi possível verificar que a população em estudo apresentava hipovitaminose D e que as estatinas de segunda geração apresentaram um menor impacto no decréscimo dos níveis desta vitamina. Os níveis de lípidos plasmáticos (CT, LDL, HDL e triglicéridos) encontraram-se dentro dos valores normais. Relativamente ao perfil de ácidos gordos verifica-se um aumento da abundância relativa do ácido araquidónico e uma diminuição da abundância relativa dos ácidos gordos ómega-3 nos doentes, cujo impacto no risco de DCV deve ser avaliado. Devido aos efeitos benéficos da vitamina D, o presente trabalho alerta então para a importância do seu doseamento, de forma a diminuir o risco de diversas patologias.

**Keywords:** Vitamin D, Statins, Pleiotropic effects, Cardiovascular diseases, Lipidomics, Lipoproteins, Fatty acids

**Abstract:**

Hypovitaminosis D is a very recurrent worldwide clinical problem, and affects not only the elderly and children, but also young people in an unexpected and asymptomatic manner. Several studies showed that low levels of vitamin D can be associated with an increased risk of cardiovascular disease (CVD). The CVD risk is also associated with dyslipidemias, which are usually treated with statin therapy. However statins have been considered as one of the causes of hypovitaminosis D. However, this relationship between statin therapy and changes in plasma levels of vitamin D is still controversial and it is not supported by all clinical studies. The main goal of this work was to the correlation between serum levels of vitamin D in hypercholesterolemic patients and statins. This study also aimed the achievement of an analysis to serum lipid profile of patients (total cholesterol (TC), LDL, HDL, triglycerides and fatty acids). This study found that the trial population had hypovitaminosis D and the second-generation statins had a lower impact on the decrease in the levels of this vitamin. The levels of plasma lipids (TC, LDL, HDL, and triglycerides) are in normal levels. Regarding the fatty acid profile there is an increase in relative abundance of arachidonic acid and decreased the relative abundance of omega-3 fatty acids in patients, whose impact on CVD risk should be evaluated. Due to the beneficial effects of vitamin D, this paper then highlights the need of routinely evaluation of Vitamin D levels, in order to reduce the risk of several diseases.

## **Lista de siglas e abreviaturas**

AA - Ácido araquidónico

ATP- Adenosina trifosfato

Ca<sup>2+</sup> - Cálcio

CaBP- Proteína de ligação ao cálcio

CK- Creatina cinase

COX - Cicloxigenase

CT- Colesterol total

CYP3A4 - Citocromo P450 3A4

DBP- Proteína de ligação da vitamina D

DCV – Doenças cardiovasculares

DHA - Ácido eicosapentaenóico

DHGL - Di-homogammalinolénico

EPA - Ácido docosaheptaenóico

GC-MS – Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa

HDL – Lipoproteína de alta densidade

HMG-CoA – 3-hidroxi-3-metilglutaril-Coenzima A

HPO<sub>4</sub><sup>2-</sup> - Fosforo

LDL – Lipoproteína de baixa densidade

LOX - Lipoxigenase

LTs – Leucotrienos

MUFAs – Ácidos gordos monoinsaturados

oxPL - Fosfolípidos oxidados

PGI - Prostaglandina I

PC - Prostaciclina

Pré-D<sub>3</sub>- Pré-vitamina D<sub>3</sub>

PTH – Hormona da paratiroide

PUFAs - Ácidos gordos polinsaturados

RANKL- Ligante do receptor do factor nuclear *kappa* B

RANK- Receptor activator do factor nuclear *kappa* B

RVD- Receptores da vitamina D

RVD-RXR – Complexo recetor da vitamina D e recetor do ácido retinóico

SFAs- Ácidos gordos saturados

SRA- Sistema-renina-angiotensina

Th1- Células T *helper* do tipo 1

TRG- Triglicerídeos

TXA - Tromboxano A

UFAs- Ácidos gordos insaturados

UVB- Radiação ultravioleta B

1 $\alpha$ -OHase- 1 $\alpha$ -hidroxilase

1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>- 1,25-diidroxitamina D<sub>3</sub> (calcitriol)

4 –EHH - Hidroxi-2 hexenal

4-HNE – 4-hidroxinonenal

7-DHC- 7-dehidrocolesterol

25(OH)D<sub>3</sub>- 25-hidroxivitamina D<sub>3</sub>

25-OHase- 25-hidroxilase

## Índice

<b>Resumo:</b> .....	v
<b>Abstract:</b> .....	vi
<b>Lista de siglas e abreviaturas</b> .....	vii
<b>Índice de ilustrações</b> .....	xii
<b>Índice de tabelas</b> .....	xiv
<b>I. Introdução</b> .....	1
1. A hipovitaminose D .....	3
1.1 A predominância de hipovitaminose D à escala mundial.....	3
1.2 Fisiologia e metabolismo da vitamina D .....	4
1.3 Funções da vitamina D .....	6
1.4 Níveis séricos da vitamina D.....	9
1.4.1 Definição de Hipovitaminose D.....	10
1.4.2 Fatores que influenciam os níveis séricos de vitamina D .....	10
1.5 Consequências da hipovitaminose D ao nível esquelético e não esquelético .....	11
1.5.1 Relação entre as doenças cardiovasculares e a hipovitaminose D.....	13
2. Estatinas e a hipovitaminose D.....	16
2.1 Classificação e acção farmacológica das estatinas .....	16
2.2 Influência das estatinas no metabolismo da vitamina D.....	19
3. Alteração do perfil lipídico plasmático e a hipovitaminose D nas doenças cardiovasculares.....	23
3.1 Perfil lipídico plasmático .....	23
3.2 Alteração do perfil de lípidos nas doenças cardiovasculares.....	24
3.2.1 Ácidos gordos plasmáticos .....	26
3.3 Associação entre o efeito cardioprotector da vitamina D e dos ácidos gordos.....	27
4. Análise lipidómica .....	32
4.1 Técnicas laboratoriais na lipidómica .....	32
<b>II. Objectivos</b> .....	35

<b>III. Material e Métodos</b> .....	39
5.1 Selecção e caracterização da população .....	40
5.2 Testes laboratoriais .....	41
5.3 Análise Estatística .....	42
5.4 Procedimento experimental da extracção de lípidos do soro humano e posterior análise de ácidos gordos .....	42
5.4.1 Recolha das amostras biológicas .....	42
5.4.2 Extracção de lípidos do soro humano .....	43
5.4.3 Análise e quantificação de ácidos gordos por Cromatografia Gasosa acoplado a espectrometria de massa .....	43
<b>IV. Resultados</b> .....	45
6.1 Avaliação da hipovitaminose D na população em estudo .....	47
6.1.1 Caracterização epidemiológica dos pacientes e grupo controlo .....	47
6.1.2 Análise dos níveis séricos de vitamina D da população em estudo .....	48
6.1.3 Correlação dos níveis séricos de vitamina D com as diversas terapêuticas com diferentes estatinas .....	50
6.1.4 Análise dos níveis séricos de vitamina D no grupo de doentes consoante o tempo de exposição solar .....	52
6.2 Avaliação do perfil lipídico na população com hipovitaminose D .....	54
6.2.1 Análise dos níveis lipídicos da população em estudo e respectiva correlação com os níveis de vitamina D e estatinas .....	54
6.2.2 Análise do perfil de ácidos gordos .....	61
<b>V. Discussão</b> .....	67
<b>VI. Conclusão</b> .....	77
<b>VII. Bibliografia</b> .....	81

## Índice de ilustrações

<b>Figura 1</b> Esquema ilustrativo do processo de síntese e ativação da vitamina D no organismo humano. (3) .....	6
<b>Figura 2</b> Acção da vitamina D na regulação dos níveis de cálcio e de fosforo, no metabolismo ósseo. (3).....	7
<b>Figura 3</b> As diversas acções da vitamina D após a conversão de 25(OH)D <sub>3</sub> em 1 $\alpha$ ,25(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub> nos diversos tecidos e órgãos não esqueléticos. (3) .....	13
<b>Figura 4</b> Possíveis mecanismos que levam ao aumento do risco de doenças cardiovasculares (CV) em casos de hipovitaminose D. (54).....	15
<b>Figura 5</b> Esquema que traduz a acção das estatinas na redução do colesterol, através da inibição da HMG-CoA redutase. (Adaptado de: medicinapreventiva.com.ve).....	17
<b>Figura 6</b> Ilustração de uma secção transversal de um vaso sanguíneo, onde a LDL atravessa o endotélio e pode sofrer oxidação devido ao ataque de radicais. (89) .....	25
<b>Figura 7</b> Comparação dos efeitos de n-6 PUFA e n-3 PUFA na produção de eicosanoides envolvida no sistema inflamatório do organismo humano (111).....	29
<b>Figura 8</b> Esquematisação dos efeitos cardioprotectores dos ácidos gordos omega-3 (116) .....	31
<b>Figura 9</b> Esquematisação dos efeitos cardioprotectores da vitamina D.(116) .....	31
<b>Figura 10</b> Representação gráfica da distribuição de indivíduos do grupo de doentes e controlo consoante o sexo (A) e representação gráfica da distribuição de idades do grupo controlo e de doentes em estudo (B).....	48
<b>Figura 11</b> Representação gráfica da distribuição dos níveis séricos de 25(OH)D <sub>3</sub> , do grupo controlo e do grupo de doentes em estudo, com respectiva média e desvio padrão. ....	49
<b>Figura 12</b> Representação gráfica do tempo de exposição solar dos doentes hipercolesterolémicos em estudo.....	53
<b>Figura 13</b> Representação gráfica da hipovitaminose D e do tempo de exposição solar do grupo de doentes em estudo. ....	54
<b>Figura 14</b> Representação gráfica da distribuição dos níveis séricos de colesterol total e de HDL do grupo controlo e do grupo de doentes em estudo.....	55
<b>Figura 15</b> Representação gráfica da distribuição dos níveis séricos de LDL e TRG do grupo controlo e do grupo de doentes em estudo. ....	55

<b>Figura 16</b> Representação gráfica da prevalência de hipercolesterolemia na terapêutica com estatinas nos doentes hipercolesterolêmicos em estudo. ....	60
<b>Figura 17</b> Representação gráfica dos níveis de tensão arterial (hipotenso, normotenso e hipertenso) dos doentes hipercolesterolêmicos em estudo, medicados com estatinas, segundo os níveis séricos de vitamina D.....	60
<b>Figura 18</b> Representação gráfica da percentagem dos diferentes ácidos gordos séricos nos doentes com deficiência de vitamina D (< 10 ng/mL), comparativamente aos doentes com insuficiência de vitamina D (10-29 ng/mL) assim como ao grupo controlo (pessoas sem patologias associadas) com insuficiência de vitamina D. ....	61
<b>Figura 19</b> Representação gráfica da razão entre ácidos gordos saturados e insaturados nos três grupos de estudo, grupo controlo com insuficiência em vitamina D, grupo de pacientes com insuficiência em vitamina D e grupo de pacientes com défice de vitamina D. Legenda: SFAs – ácidos gordos saturados; UFAs- ácidos gordos insaturados.....	64
<b>Figura 20</b> Representação gráfica do perfil de ácidos gordos (saturados, monoinsaturados e polinsaturados) dos três grupos de estudo, grupo controlo com insuficiência em vitamina D, grupo de pacientes com insuficiência em vitamina D e grupo de pacientes com défice de vitamina D. Legenda: SFAs – ácidos gordos saturados; UFAs- ácidos gordos insaturados.....	65

## Índice de tabelas

<b>Tabela 1</b> As diversas formas moleculares da vitamina D e respectivas estruturas químicas. ....	4
<b>Tabela 2</b> Resumo dos tipos de estatinas, com a sua fórmula molecular e a sua respectiva selectividade tecidual. ....	18
<b>Tabela 3</b> Estatinas disponíveis na prática clínica, com respectivas doses recomendadas e a redução (%) de LDL estimada para cada terapêutica. (66).....	19
<b>Tabela 4</b> Nomenclatura dos principais ácidos gordos presentes no organismo humano.(93).....	27
<b>Tabela 5</b> Intervalos de referência para cada parâmetro bioquímico em estudo.....	42
<b>Tabela 6</b> Distribuição da população em estudo consoante o sexo e a idade (dividida por cinco faixas etárias: 20-26; 27-40; 41-65; 66-80; 81+). Legenda: N- número total de indivíduos em cada grupo de estudo (Controlo e doentes). ....	47
<b>Tabela 7</b> Distribuição da população em estudo (grupo controlo e grupo de doentes) nos diferentes tipos de hipovitaminose D (défice ou insuficiência) e no grupo valores normais de vitamina D. ....	49
<b>Tabela 8</b> Representação dos casos com deficiência de vitamina D ([25(OH)D <sub>3</sub> ] é <10 ng/ml), e insuficiência de vitamina D ([25(OH)D <sub>3</sub> ] entre 10-29 ng/mL) nas terapêuticas com diferentes estatinas, no grupo de doentes em estudo.....	50
<b>Tabela 9</b> Tempo de exposição solar nas diversas faixas etárias do grupo de doentes e correlação com a existência de hipovitaminose D.....	52
<b>Tabela 10</b> Representação dos parâmetros lipídicos estudados, associados à idade de cada indivíduo do grupo controlo e divididos em dois grupos consoante o seu nível sérico de 25(OH)D <sub>3</sub> .....	56
<b>Tabela 11</b> Análise de doentes com vitamina D e colesterol normal, assim como dos doentes com vitamina D normal e níveis de colesterol alto, e respectiva correlação com a estatina envolvida na terapêutica da dislipidémia. ....	57
<b>Tabela 12</b> Análise de doentes com vitamina D baixa e colesterol normal e respetiva correlação com o tipo de estatina utilizada. ....	58
<b>Tabela 13</b> Análise de doentes com vitamina D baixa e colesterol alto e respectiva correlação com o tipo de estatina utilizada. ....	59

**Tabela 14** Representação das abundâncias relativas dos ácidos gordos plasmáticos dos vários grupos de estudo: grupo controlo, grupo de pacientes com insuficiência em vitamina D e grupo de pacientes com défice de vitamina D. .... 62

**Tabela 15** Representação dos valores de p da análise comparativa entre os dois grupos de pacientes e o grupo controlo. .... 63

# **I. Introdução**



# 1. A hipovitaminose D

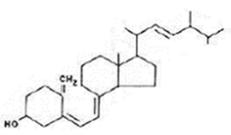
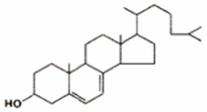
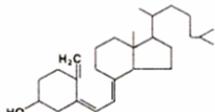
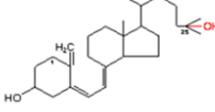
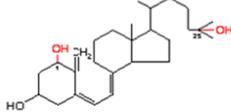
## 1.1 A predominância de hipovitaminose D à escala mundial

Actualmente tem-se verificado que a insuficiência de vitamina D é um problema bastante recorrente e que apresenta uma grande predominância à escala mundial, chegando a atingir 1 bilião de pessoas no mundo. (1) Esta alta prevalência global de hipovitaminose D apresenta maior incidência na Austrália, África, América do Sul, Ásia e Europa. (2,3) Na Europa, os níveis séricos de vitamina D encontram-se positivamente relacionados com a latitude (ao contrário do que se esperava, pois a latitudes mais baixas a ocorrência de períodos de sol é mais alta), com a pigmentação da pele (a acção da radiação ultravioleta B (UVB) apresenta maior eficácia na pele clara) e com as estações do ano. (4–6) Os níveis séricos mais elevados de vitamina D foram observados em países escandinavos (países nórdicos), enquanto os níveis mais baixos foram encontrados no sul da Europa. Isto pode ser devido a uma alta exposição solar, a uma pele clara e ao uso de multivitaminas nos países do Norte, enquanto a procura de sombras, devido a uma pele mais escura, é mais comum nos países mediterrânicos (sul da Europa). O mesmo se verifica na população afro-americana, onde a prevalência de insuficiência de vitamina D também é significativa, uma vez que possuem uma pele altamente pigmentada o que faz com que a luz ultravioleta tenha uma acção muito menos eficaz. (7) Relativamente a Portugal, observa-se na população em geral níveis baixos de vitamina D, com maior incidência nos grupos de risco, nomeadamente idosos e doentes institucionalizados. Contudo os estudos epidemiológicos de prevalência da hipovitaminose D na população portuguesa são muito escassos, não permitindo uma avaliação rigorosa sobre este assunto. (8–10) Apesar dos grupos de risco tradicionais para a insuficiência de vitamina D serem as mulheres grávidas, crianças, idosos e imigrantes não-ocidentais, a hipovitaminose D já atinge de forma global a população jovem, manifestando-se de uma forma assintomática, pelo que se torna relevante avaliar a prevalência real e as possíveis causas desta carência de vitamina D. (5)

## 1.2 Fisiologia e metabolismo da vitamina D

A vitamina D é uma molécula secosteroide (esteroide em que ocorre a abertura de um anel com adição de dois átomos de hidrogénio em cada grupo terminal), tradicionalmente associada ao metabolismo do cálcio e fosforo. (11) É uma vitamina lipossolúvel, com funções extremamente importantes para o bem-estar do nosso organismo, não só a nível ósseo como ao nível de outros tecidos biológicos. (12) Existem cinco formas moleculares de vitamina D ( $D_1$  a  $D_5$ ), no entanto as mais conhecidas são a vitamina  $D_2$  e vitamina  $D_3$ , que são as duas formas mais encontradas na alimentação (Tabela 1). (3) A vitamina  $D_2$ , também conhecida por ergocalciferol, é sintetizada principalmente nas plantas e invertebrados, e tipicamente consumida na dieta humana ou através de suplementos vitamínicos. (11) A vitamina  $D_3$  (colecalfiferol) pode ser fornecida por fontes nutricionais, especialmente peixes gordos ou formada na pele após exposição solar ou luz UVB: 80% a 90% da composição de vitamina D no organismo humano deve-se a esta síntese cutânea de vitamina  $D_3$ . (11,13)

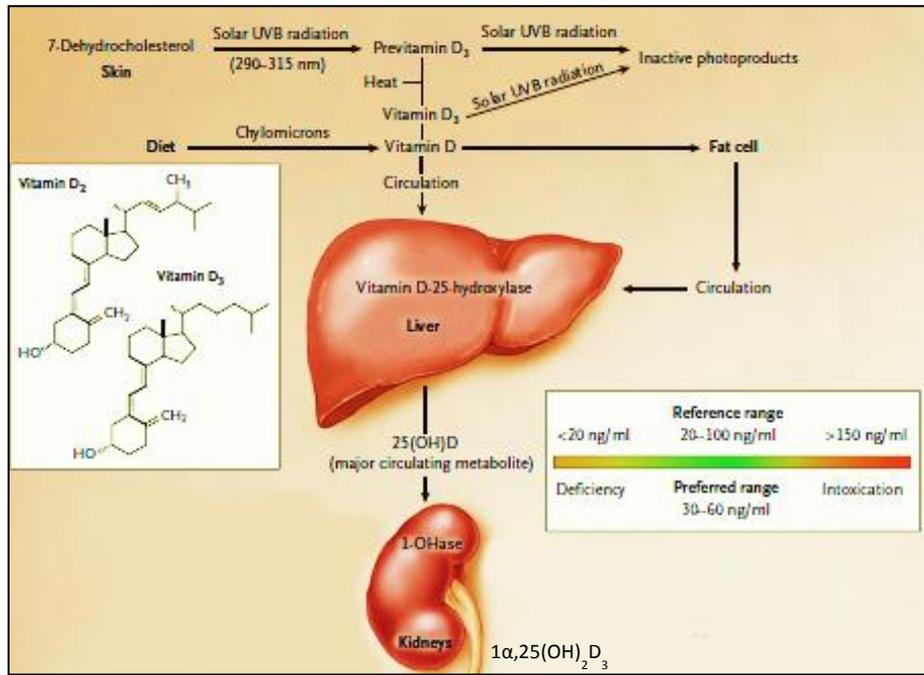
**Tabela 1** As diversas formas moleculares da vitamina D e respectivas estruturas químicas.

Formas moleculares da vitamina D	Forma da molécula
<b>Vitamina <math>D_2</math></b> <b>Ergocalciferol</b>	
<b>Pró-Vitamina <math>D_3</math></b> <b>7-Dihidrocolesterol</b>	
<b>Vitamina <math>D_3</math></b> <b>Colecalciferol</b>	
<b><math>25(OH)D_3</math></b> <b>Calcidiol</b>	
<b><math>1\alpha,25(OH)_2D_3</math></b> <b>Calcitriol</b>	

A vitamina D é uma vitamina bastante particular, que tanto pode ser obtida pela dieta ou suplementos vitamínicos (via exógena), como por síntese fotoquímica ocorrida na pele pela exposição a UVB (via endógena). À semelhança das outras vitaminas lipossolúveis (vitamina A, E e K), a vitamina D, proveniente da dieta, é absorvida com a gordura alimentar no intestino delgado e, em seguida, incorporada em quilomicrons, que posteriormente, são absorvidos no sistema linfático e entram na circulação venosa. (14) Já a síntese da vitamina D<sub>3</sub> endógena (descrita na Figura 1) começa com a incidência da radiação UVB sobre a pele, mais precisamente na camada de Malpighi da epiderme, onde a 7-deidrocolesterol (7-DHC) é fotolizada e conseqüentemente, convertida em pré-vitamina D<sub>3</sub> (pré-D<sub>3</sub>), que posteriormente, devido à temperatura corporal, é rapidamente convertida em vitamina D<sub>3</sub>. (3) Esta vitamina D<sub>3</sub> endógena, assim como a obtida por via exógena, são biologicamente inertes, e para se tornarem na sua forma activa e funcional, requerem dois processos de hidroxilação. Para tal, a vitamina D<sub>3</sub> endógena e exógena são transportadas na corrente sanguínea pelas proteínas de ligação da vitamina D (DBP) até ao fígado, onde sofrem o primeiro processo de hidroxilação, pela enzima 25-hidroxilase, convertendo-se desta forma, em 25-hidroxivitamina D<sub>3</sub> (25(OH)D<sub>3</sub>). (11,14) De seguida, a 25(OH)D<sub>3</sub> (calcidiol), migra até ao sistema renal pela corrente sanguínea, ligada novamente a DBP, de forma a dar origem à forma biologicamente activa. Este complexo 25(OH)D<sub>3</sub>-DBP entra nos rins através da filtração glomerular, onde de seguida a 25(OH)D<sub>3</sub> é absorvida nas células tubulares proximais por endocitose, através da megalina e cubilina (complexo de proteínas que facilitam a endocitose). (15) Após a sua absorção, o calcidiol é então metabolizado pela 1 $\alpha$ -hidroxilase (1 $\alpha$ -OHase) convertendo-se na forma activa, 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> (calcitriol), onde por fim sob esta forma irá interagir com os receptores de vitamina D (RVD) expressos por diversos tecidos biológicos, nomeadamente, no intestino delgado e nos osteoblastos, para regular o metabolismo do cálcio e fósforo. (13) O processo de formação de calcitriol nos rins é fortemente regulado por diversos elementos, entre os quais se destacam, a hormona da paratiroide (PTH), o cálcio, o fosfato, a calcitonina e o factor de crescimento de fibroblastos, que controlam a actividade da 1 $\alpha$ -OHase. (16)

O passo limitativo no metabolismo da vitamina D é o processo de catabolização da 25(OH)D<sub>3</sub> e da 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> em 24,25(OH)<sub>2</sub>D e 1,24,25(OH)<sub>2</sub>D respectivamente, realizado pela enzima 24-hidroxilase, isoenzima do citocromo P450. Para além disso, caso haja uma exposição excessiva à luz solar, também dificilmente se chega a um caso

de intoxicação por pré-D<sub>3</sub> ou vitamina D<sub>3</sub>, pois esse excesso é destruído pela luz solar, como esquematizado na Figura 1. (3)

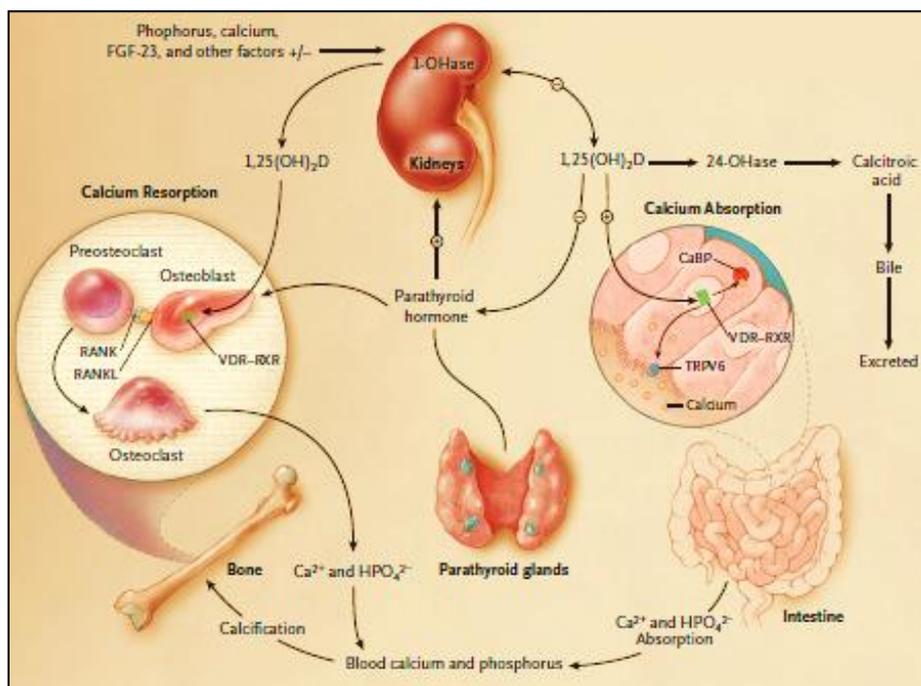


**Figura 1** Esquema ilustrativo do processo de síntese e ativação da vitamina D no organismo humano. (3)

### 1.3 Funções da vitamina D

As principais funções pelas quais a vitamina D é conhecida são: o processo de estimulação da absorção de cálcio e de fosfato no intestino, o aumento da reabsorção de cálcio nas células tubulares renais, a supressão da produção de PTH e o aumento da densidade mineral óssea. (11) Para exercer então esta acção no metabolismo do cálcio, a  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  ( $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  na Figura 2) circula até aos intestinos, onde através da interacção com o complexo receptor da vitamina D - receptor do ácido retinóico (RVD-RXR), provoca um aumento da expressão do canal de cálcio epitelial e de uma proteína de ligação ao cálcio (CaBP), a calbindina 9K, que leva a um consequente aumento da absorção de cálcio (Figura 2). (13) Quando a ingestão de cálcio na dieta é insuficiente, a concentração plasmática de cálcio consegue-se manter dentro dos níveis normais, devido ao papel da vitamina D, que permite a mobilização de cálcio do osso para a circulação sanguínea. Nestes casos, a vitamina D migra para o sistema esquelético, onde

se encontram RDV nos osteoblastos, que reconhecem a sua chegada, causando um aumento na expressão do receptor activador do factor nuclear *kappa* B (RANK), que se encontra envolvido no processo de osteoclastogénese. Este receptor RANK, nos pré-osteoclastos, interage com o seu substrato, ligante do receptor do factor nuclear *kappa* B (RANKL), induzindo desta forma a conversão dos pré-osteoclastos em osteoclastos maduros. Por fim, os osteoclastos maduros removem o cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) e o fósforo ( $\text{HPO}_4^{2-}$ ) ao nível ósseo, mantendo desta forma, os níveis adequados destes minerais na corrente sanguínea, promovendo assim a mineralização do esqueleto (Figura 2). (3,13)



**Figura 2** Acção da vitamina D na regulação dos níveis de cálcio e de fósforo, no metabolismo ósseo. (3)

Porém, há cerca de três décadas, que os estudos sobre a vitamina D vieram ampliar a gama de funções desta vitamina, atribuindo-lhe o estatuto de hormona, devido à sua multifuncionalidade em diversos tecidos biológicos. (17) Esta vitamina lipossolúvel, passou então a ser conhecida não só pela sua acção reguladora ao nível do sistema ósseo, como também ao nível doutros tecidos, nomeadamente cérebro, próstata, mama, cólon, monócitos, adipócitos, ovários. (3) Nos anos 70, foi demonstrado que a vitamina D actua através da ligação a receptores nucleares e membranares RVD, que desde então têm sido identificados em diversos tipos celulares, o que levantou desde logo a hipótese desta vitamina regular diversas funções biológicas. (17) Para além disso, também foi

descoberto que a síntese de  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  não ocorre apenas no tecido renal, como também noutros tecidos biológicos que expressam  $1\alpha\text{-OHase}$ . (1) Assim, na presença da forma activa da vitamina D ligada aos RVD, a função destes tecidos pode ser regulada por esta vitamina. Quando ocorre a ligação de  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  ao RVD, este complexo migra para o núcleo das células, para se ligar a sequências específicas do DNA, reprimindo ou activando um determinado número de genes, que codificam a resposta para determinadas funções biológicas (estima-se que o mecanismo de regulação, pelo complexo calcitriol-RVD, possa abranger 3-4% do genoma). (18) Como tal, julga-se que a vitamina D é responsável por controlar, directa e indirectamente, mais de 200 genes, incluindo genes responsáveis pela regulação da proliferação celular, diferenciação, apoptose e angiogénese de diversas células, o que faz desta vitamina um grande alvo de estudo em diversos tipos de cancro. (14,19) A indução da expressão de genes supressores tumorais (como por exemplo o gene *CDH1* que codifica a proteína de adesão E-caderina), assim como a repressão de oncogenes (como por exemplo o oncogene *C-Myc*, regulador chave da proliferação e diferenciação celular, cuja expressão se encontra alterada na maioria dos cancros) têm sido uma das funções anti-carcinogénicas bem descritas da vitamina D. (20,21)

Outros estudos clínicos descrevem também uma relação inversa entre os níveis circulantes de vitamina D e a pressão sanguínea, constatando uma possível acção da vitamina D sobre o sistema renina-angiotensina (SRA), uma vez que a suplementação em colecalciferol tem reduzido a pressão sanguínea sistólica em pacientes hipertensos. (22) Corroborando esta relação entre a vitamina D e a pressão sanguínea, um estudo laboratorial demonstrou que animais com deficiência de  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  apresentaram uma inibição na expressão de renina após tratamento com suplementos de vitamina D. A comprovar este facto, outro estudo feito em culturas celulares provou que a  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  reprime o gene da renina a nível transcripcional, num mecanismo dependente de RVD, o que comprova a acção da vitamina D ao nível do SRA. (23,24)

Para além da sua acção reguladora na pressão arterial, a vitamina D também controla o sistema imunitário, o que também têm despertado um grande interesse por parte dos investigadores. Ao nível do sistema auto-imune, o calcitriol tem mostrado uma acção na inibição das células T *helper* do tipo 1 (Th1), promovendo desta forma uma melhoria em diversas doenças auto-imunes, mediadas pela intensa proliferação dos linfócitos T, como é o caso da Diabetes *Mellitus* tipo 1. (25) A juntar-se a este importante papel ao nível do sistema imune, a vitamina D também apresenta uma acção muito importante na

promoção do bom funcionamento dos músculos esqueléticos. Verificou-se num ensaio clínico que o desempenho e a força muscular foram significativamente melhorados, quando houve um aumento de 25(OH)D<sub>3</sub> (de 4 a 16 ng/mL) e que continuou a melhorar à medida que os níveis iam aumentando (40 ng/mL). (26) No sistema neuromuscular, o calcitriol participa na síntese de proteínas musculares, assim como na cinética da contracção, reduzindo a fase de relaxamento muscular, promovendo assim uma melhoria na força e na velocidade de contracção do músculo. (27)

Por todas estas funções biológicas da vitamina D torna-se então importante a monitorização da sua concentração ao nível plasmático/sérico.

#### 1.4 Níveis séricos da vitamina D

Para determinar o nível sérico de vitamina D recorre-se geralmente à quantificação da forma de armazenamento (25(OH)D<sub>3</sub>) e não da forma activa (1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>), isto porque: a 25(OH)D<sub>3</sub> é sintetizada apenas num local (fígado), já a 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> é sintetizada nos rins e noutros tecidos extra-renais; o tempo de meia-vida de 25(OH)D<sub>3</sub> é aproximadamente 3 semanas (25 dias), enquanto que o metabolito activo apresenta um tempo de meia-vida de apenas 7-8 horas; a concentração plasmática de 25(OH)D<sub>3</sub> é 1000x mais alta do que a de 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, o que torna o doseamento mais fácil. (4,13,28) Os níveis séricos de vitamina D considerados ideais, ainda são extremamente controversos. Um intervalo de referência para esta vitamina multifuncional, continua a ser um assunto em debate, onde vários autores apresentam divergências no valor que consideram corresponder às melhores condições para o bom funcionamento do organismo humano. (5,29) Grande parte dos investigadores concorda que o nível sérico óptimo de 25(OH)D<sub>3</sub> deve ser superior a 20 ng/mL, conforme indica o recente estudo (2011) de um comité de um instituto de Medicina (IOM), e do Comité Permanente dos Médicos da Europa. (3,30) A deficiência de vitamina D ocorre quando os níveis séricos de 25(OH)D<sub>3</sub> são inferiores a 10 ng/mL, onde o quadro clínico característico inclui fraqueza muscular, dor e fracturas ósseas, e em crianças inchaço das articulações e prevalência de deformações. Em crianças que desde logo apresentam raquitismo e osteomalacia, os níveis de vitamina D são inferiores a 6 ng/mL, ou mesmo abaixo do limite de detecção. (31)

É importante realçar que ao longo dos últimos anos, os valores óptimos de vitamina D previamente estabelecidos tinham por base a prevenção da osteomalácia e do

raquitismo. Contudo, após a descoberta das novas potencialidades da vitamina D na saúde, suspeita-se que seja necessário quantidades mais elevadas para prevenir outros tipos de distúrbios. Muitos especialistas sugerem então que os valores desejáveis de 25(OH)D<sub>3</sub> para manter uma boa regulação fisiológica devem ser superiores a 30 ng/mL. (32)

#### 1.4.1 Definição de Hipovitaminose D

O presente estudo diferenciou o estado de hipovitaminose D em três tipos, tendo por base a concentração sérica de 25(OH)D<sub>3</sub>: **deficiência de vitamina D**, para casos em que a [25(OH)D<sub>3</sub>] é < 10 ng/mL; **insuficiência de vitamina D** quando a [25(OH)D<sub>3</sub>] se encontra entre 10-29 ng/mL; **valores normais de vitamina D** quando 25(OH)D<sub>3</sub> ≥ 30 ng/mL, de acordo com o proposto no kit de doseamento de vitamina D utilizado na parte prática do presente trabalho (kit Vitamin D Total (Vit. D), destinado ao equipamento ADVIA Centaur® XP da Siemens).

#### 1.4.2 Fatores que influenciam os níveis séricos de vitamina D

Os níveis séricos de vitamina D, que se mantêm no organismo são fortemente influenciados por diversos fatores. Uma vez que são poucos os alimentos ricos em vitamina D, uma dieta pobre em alimentos que forneçam esta vitamina (atum, salmão, cogumelos entre outros) condicionará os seus níveis séricos. Para além disso, existem também determinadas patologias que condicionam uma boa absorção deste elemento por parte da dieta, como são o caso das doenças gastrointestinais. No entanto, não é a fracção de vitamina D exógena, que mais condiciona os níveis séricos desta vitamina lipossolúvel e sim os diversos componentes que podem condicionar a síntese endógena de vitamina D na pele. A obtenção de vitamina D pela síntese endógena é fortemente influenciada pela baixa exposição à radiação solar, pelo avançar da idade (o envelhecimento da pele provoca um menor rendimento das suas funcionalidades), assim como pelo uso de determinadas roupas e protectores solares, que impedem a pele de receber radiação UVB. (5,13) Outro factor que influencia a síntese desta proteína é a concentração inicial de 7-deidrocolesterol, que por vezes se encontra diminuída pela acção de determinados fármacos hipocolesterolémicos, por exemplo as estatinas. (33)

No entanto, os fatores mais importantes na interferência dos níveis séricos de vitamina D são: a exposição solar, a pigmentação da pele e a sazonalidade. (32)

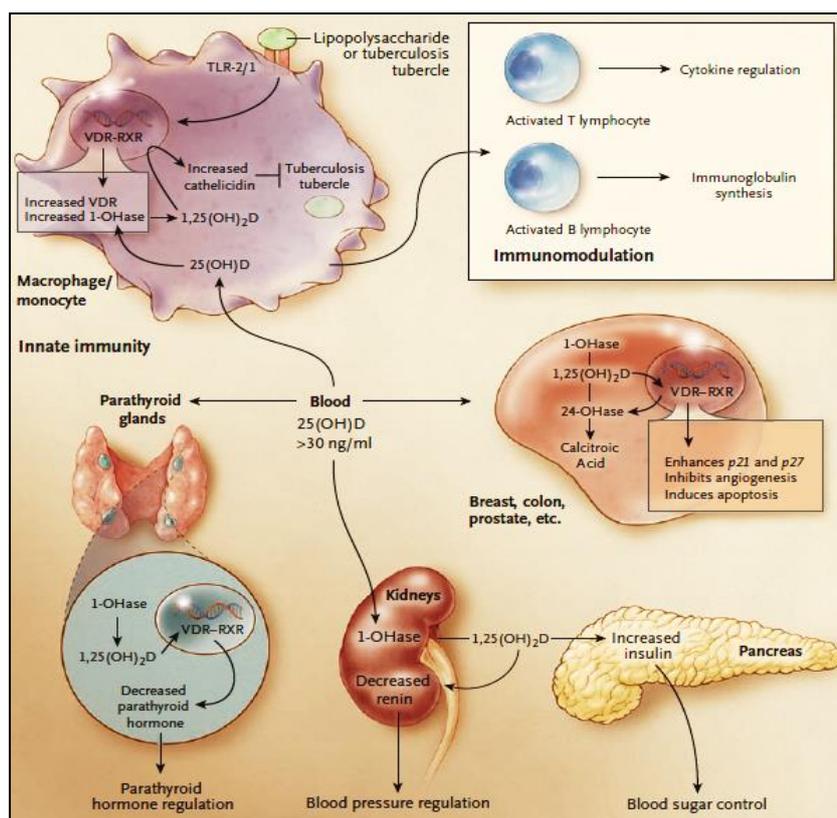
### 1.5 Consequências da hipovitaminose D ao nível esquelético e não esquelético

A hipovitaminose D pode causar diversos distúrbios, tanto ao nível esquelético como ao nível extra-esquelético, uma vez que se trata de uma vitamina multifuncional responsável por regular diversas funções em diversos órgãos e tecidos. (17) A existência de um défice acentuado de vitamina D logo no início de vida, pode dar origem a raquitismo e osteomalacia, em que um novo osso (osteóide) não é mineralizado e sofre diversas deformações. Por outro lado, uma deficiência menos severa desta vitamina pode provocar uma maior secreção de PTH, devido ao baixo nível sérico de  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ , e baixos níveis séricos de cálcio, o que resulta num elevado metabolismo ósseo e um aumento da reabsorção óssea. Esta alteração vai promover a perda óssea, o que pode contribuir para a patogénese da osteoporose e uma maior probabilidade de fracturas, especialmente na anca. (6) Um outro órgão que sofre alterações com o decréscimo dos níveis de vitamina D são as glândulas paratiróideas, que expressam a enzima  $1\alpha$ -OHase e onde a consequente produção local de  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  inibe a expressão e a síntese de PTH (Figura 3). Nos casos de hipovitaminose D esta acção encontra-se comprometida, dando origem a níveis elevados de PTH, que levam a alterações no metabolismo do cálcio e fosforo. (34)

No entanto, o papel da vitamina D não se prende apenas ao nível esquelético, como também em tecidos extra-esqueléticos, diminuindo o risco de muitas doenças crónicas como o cancro, doenças auto-imunes, doenças infecciosas e doenças cardiovasculares. (3) O papel desta vitamina nas diversas patologias tem sido um ponto de grande interesse nas investigações actuais. Ao nível do sistema imunológico, o calcitriol apresenta-se como um potente imunomodulador. (35) Na presença de um agente infeccioso, como uma bactéria ou um lipopolissacarídeo, os receptores *Toll Like Receptors 2/1* (TLR2/1) dos monócitos e macrófagos são activados e a expressão de RVD e de  $1\alpha$ -hidroxilase também é aumentada nessas células do sistema imune (Figura 3). O consequente aumento da produção de  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ , faz com que este metabolito viaje para o núcleo, onde aumentará a expressão de catelicidina, um peptídeo capaz de destruir bactérias (como por exemplo a bactéria *Mycobacterium tuberculosis*), assim

como outros agentes infecciosos. (36) Também é possível, que o  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  produzido nos monócitos e macrófagos seja libertado para actuar em linfócitos T activos, que regulam a síntese de citocinas, e em linfócitos B activos, que regulam a síntese de imunoglobulinas, contribuindo desta forma para um melhor controlo imunológico (Figura 3). (3) Nos casos em que os níveis de vitamina D se encontram diminuídos ( $< 20 \text{ ng/mL}$ ), os monócitos e macrófagos são impedidos de iniciar esta resposta imunológica, comprometendo desta forma o sistema de defesa de um indivíduo. Esta descoberta serviu de justificação para o facto de americanos negros, que muitas vezes apresentam um défice de vitamina D, serem mais propensos a contrair a tuberculose do que os de raça branca. (36)

Relativamente à correlação com o cancro verifica-se, em diversos estudos, que os níveis de vitamina D e a latitude são dois fatores fortemente relacionados com o maior risco de incidência de determinados cancros. (37) Observa-se que pessoas que vivem a latitudes mais altas apresentam um maior risco para certo tipo de cancros (cancro do cólon, pâncreas, próstata, ovário e mama) do que pessoas que vivem a latitudes mais baixas. Para além disso, estudos epidemiológicos prospectivos e retrospectivos indicam que níveis séricos de  $25(\text{OH})\text{D}_3$  inferiores a  $20 \text{ ng/mL}$  encontram-se associados a um maior risco de incidência destes tipos de cancro. Uma vez existente esta relação entre os baixos níveis de vitamina D e o desenvolvimento de cancro, acredita-se que quando os níveis de vitamina D são normais, a produção de  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  nos diversos tecidos extra-renais é responsável por regular vários genes que controlam a proliferação, angiogénese, diferenciação e apoptose, diminuindo a probabilidade de ocorrência de cancro (Figura 3). (38)



**Figura 3** As diversas acções da vitamina D após a conversão de 25(OH)D<sub>3</sub> em 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> nos diversos tecidos e órgãos não esqueléticos. (3)

A juntar-se a todas estas funções fisiológicas, tanto ao nível do sistema ósseo, como ao nível do sistema imunológico, a vitamina D apresenta também uma importante acção no sistema cardiovascular, que tem sido um grande alvo de estudo nas últimas investigações, uma vez que as doenças cardiovasculares (DCV) são das patologias mais prevalentes ao nível mundial.

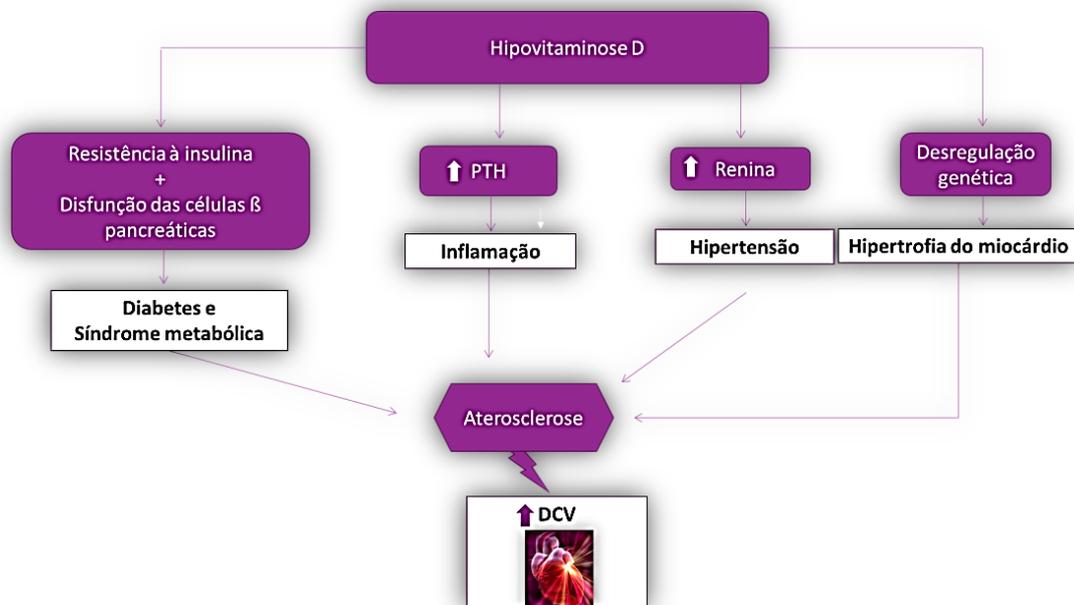
### 1.5.1 Relação entre as doenças cardiovasculares e a hipovitaminose D

Actualmente, vários autores demonstraram que 25(OH)D<sub>3</sub> pode ser um novo marcador de doenças cardiovasculares. (39–41) Estudos recentes revelaram que indivíduos com um nível de vitamina D igual ou superior a 30 ng/mL tinham aproximadamente metade do risco de enfarte do miocárdio, independentemente dos outros factores de risco cardiovasculares. (42,43) Corroborando este facto, um grupo de investigação que

estudou uma população de indivíduos sem DCV prévia, verificou que níveis baixos de  $25(\text{OH})\text{D}_3$  se relacionava com eventos cardiovasculares, principalmente nos indivíduos que sofriam de hipertensão. (44) A relação entre os níveis de vitamina D e a ocorrência de DCV pode ser devido a vários mecanismos possíveis, incluindo a regulação da produção de PTH, a regulação directa ou indirecta de  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  sobre mais de 200 genes, incluindo aqueles que estão envolvidos na produção de renina no rim, na produção de insulina no pâncreas, na libertação de citocinas a partir de linfócitos, e no crescimento e proliferação de células musculares lisas vasculares, tais como os cardiomiócitos (Figura 4). (45,46) Numa situação de níveis séricos de vitamina D baixos, a actividade da renina e a produção de angiotensina II no plasma encontram-se marcadamente aumentadas, dando origem a hipertensão, e conseqüentemente a uma hipertrofia cardíaca. (34) Um estudo recente afirma que ratos alimentados com uma dieta rica em sal (capaz de induzir hipertensão e hipertrofia cardíaca no ventrículo esquerdo, acelerando o desenvolvimento de insuficiência cardíaca), ao serem tratados com vitamina D, apresentaram uma redução no peso do coração, na hipertrofia do cardiomiócito, e no diâmetro ventricular esquerdo. Este estudo prova que a  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  atenua o desenvolvimento de hipertrofia cardíaca em ratos hipertensos. Para além disso os autores deste estudo sugeriram que a ausência de activação genómica e transdução de sinal mediada pela vitamina D resulta numa hiperestimulação dos cardiomiócitos, dando origem a um aumento na contractilidade cardíaca (Figura 4). Deste modo, estes autores afirmam que em casos de hipovitaminose D, o  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  não se vai ligar aos receptores RVD expressos nos cardiomiócitos, não exercendo o seu efeito de protecção contra o alargamento do coração. (47) Um estudo recente também corroborou a ideia de que  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  impede a hiperestimulação do coração pela diminuição da hipertrofia dos cardiomiócitos, através de um mecanismo dependente da proteína cinase C. Estes autores descrevem que a forma activa da vitamina D promove a fosforilação da proteína cinase C, mediada pelo ciclo de  $\text{Ca}^{2+}$  e por proteínas do miofilamento (fosfolamban e troponina I), resultando numa diminuição no pico de encurtamento e aceleração da contracção e relaxamento dos cardiomiócitos. (48) Actualmente, existe uma grande controvérsia sobre este assunto, desconhecendo-se ainda ao certo qual ou quais os verdadeiros mecanismos responsáveis pelo aumento do risco de DCV na presença de níveis séricos de vitamina D baixos. A juntar-se a esta indefinição dos mecanismos envolvidos no aumento do risco destas patologias em casos de hipovitaminose D, alguns autores também afirmam existir uma imprecisão na relação

entre 25(OH)D e as DCV, sugerindo que o parâmetro mais apropriado para avaliar a relação entre a vitamina D e as doenças cardiovasculares seja  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ , uma vez que é esta forma activa que vai ter uma acção directa com os RVD do sistema cardiovascular. No entanto, a forma de doseamento actual da vitamina D é feita com base nos níveis séricos de 25(OH)D<sub>3</sub>. (49)

Devido à abrangência notória dos benefícios apresentados pela vitamina D relativamente a complicações cardiovasculares, hoje em dia já se sente um aumento significativo no uso de suplementos de vitamina D, ainda que pouco extenso. (50) No entanto, apesar de grandes pesquisas em murganhos com ausência de expressão de RVD (VDRKO- *vitamin D receptor knockout*) e em várias experiências *in vitro*, pouco se sabe sobre o papel da vitamina D em modelos animais que apresentem uma boa analogia com a insuficiência cardíaca humana. (51,52) Apesar de diversos estudos terem chegado à mesma conclusão relativamente à acção benéfica da vitamina D no risco de DCV, existem outras pesquisas que contradizem esta ideia. (53) Como tal, são necessários mais estudos para suportar a ideia de que a reposição de vitamina D é um parâmetro importante no controlo do risco de DCV.



**Figura 4** Possíveis mecanismos que levam ao aumento do risco de doenças cardiovasculares (CV) em casos de hipovitaminose D. (54)

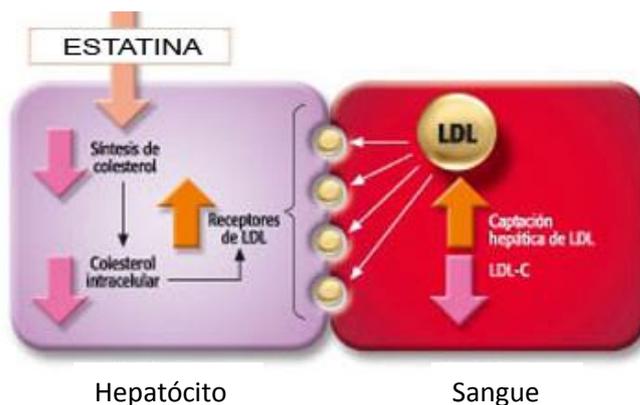
Grande parte da população portuguesa apresenta dislipidémias, que levam ao aumento do risco de DCV. Para combater os elevados níveis séricos de colesterol e a grande incidência de mortes devido às DCV, a população com hipercolesterolemia tem sido medicada com estatinas, um fármaco hipocolesterolémico, que baixa os níveis séricos de colesterol. Porém, suspeitou-se que um dos efeitos pleiotrópicos de alguns destes fármacos incidia no metabolismo da vitamina D, provocando um decréscimo dos níveis deste metabolito. No entanto, ainda é pouca a avaliação prática desta associação entre as estatinas e o metabolismo da vitamina D, uma vez que o doseamento da vitamina D não é realizado na maioria dos doentes a seguirem esta terapêutica.

## 2. Estatinas e a hipovitaminose D

### 2.1 Classificação e acção farmacológica das estatinas

As estatinas, também conhecidas por inibidores da 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A (HMG-CoA) redutase, são agentes hipolipemiantes, comumente utilizados para reduzir os níveis de colesterol total (CT), principalmente através da diminuição dos níveis da lipoproteína de baixa densidade (LDL). (55) Estes agentes farmacológicos têm vindo a tornar-se uma das classes terapêuticas mais utilizadas na prática clínica. (56) Através das diversas investigações sobre as acções terapêuticas deste fármaco, considera-se que não só são medicamentos seguros e bem tolerados pelos pacientes, como também diminuem significativamente a morbidade e mortalidade cardiovascular. (40,57,58) De forma a entender o mecanismo de acção destes fármacos é necessário compreender, de uma forma geral, o metabolismo do colesterol no organismo humano, uma vez que é na sua síntese que este fármaco vai actuar. A concentração do colesterol plasmático é regulada por uma **via endógena**, em que o colesterol é sintetizado pelo fígado e por tecidos extra-hepáticos, como também por uma **via exógena** em que o colesterol proveniente da dieta e de fontes biliares é absorvido no intestino. Todas as células que sintetizam colesterol expressam a glicoproteína HMG-CoA redutase no seu retículo endoplasmático. O mecanismo de acção das estatinas incide essencialmente sobre esta via endógena, através da inibição da HMG-CoA redutase, uma enzima chave na síntese de mevalonato, que compõe a via biossintética do colesterol, resultando desta forma, numa diminuição final deste metabolito (Figura 5). (59,60) Todas as estatinas são

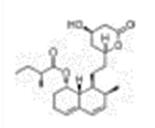
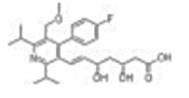
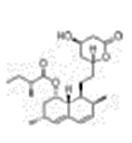
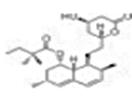
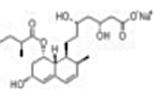
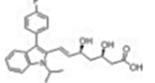
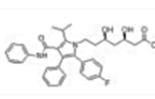
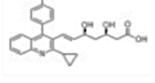
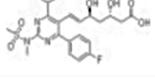
constituídas por uma parte do tipo 3-hidroxi-3-metilglutaril (HMG), que inibe a enzima HMG-CoA redutase ao ocupar o sítio de ligação do substrato (HMG-CoA) desta enzima. Para compensar a consequente redução dos níveis de colesterol, ocorre um aumento da expressão de receptores de LDL na membrana dos hepatócitos, resultando num aumento da remoção de LDL da corrente sanguínea, como ilustrado na Figura 5. (61)



**Figura 5** Esquema que traduz a acção das estatinas na redução do colesterol, através da inibição da HMG-CoA redutase. (Adaptado de: [medicinapreventiva.com.ve](http://medicinapreventiva.com.ve))

As estatinas podem ser divididas em duas gerações: as estatinas de primeira geração, conhecidas por serem fármacos derivados de metabolitos fúngicos com estruturas químicas semelhantes, e as estatinas de segunda geração, que são compostos sintéticos e diferentes estruturalmente. As estatinas de primeira geração são a sinvastatina, a pravastatina e a lovastatina, enquanto as estatinas de segunda geração são a atorvastatina, a rosuvastatina, a fluvastatina, a cerivastatina e pitavastatina. (62) Actualmente, das nove estatinas conhecidas, seis delas são as mais utilizadas na prática clínica: lovastatina, sinvastatina, pravastatina, fluvastatina, atorvastatina e rosuvastatina; e duas delas, a mevastatina e a cerivastatina, já não se utilizam devido à sua hepatotoxicidade (Tabela 2). Estes diferentes tipos de estatinas diferem entre si em diversos aspectos: na absorção, na biodisponibilidade, no tempo de meia-vida, na ligação às proteínas plasmáticas, na sua excreção, na solubilidade e na sua potência; no entanto, são todas equivalentes na redução dos níveis séricos do colesterol. (55,61) Deste modo, as diferenças que apresentam na absorção e no metabolismo podem justificar as diferenças que apresentam nos seus efeitos pleiotrópicos.

**Tabela 2** Resumo dos tipos de estatinas, com a sua fórmula molecular e a sua respectiva selectividade tecidular.

Fármaco	Fórmula Molecular	Selectividade tecidular
Compactina (Mevastatina)		Lipofílica
Cerivastatina		Lipofílica
Lovastatina		Lipofílica
Sinvastatina		Lipofílica
Pravastatina		Hidrofílica
Fluvastatina		Lipofílica
Atorvastatina		Lipofílica
Pitavastatina		Lipofílica
Rosuvastatina		Hidrofílica

A atorvastatina possui uma grande biodisponibilidade e tempo de meia-vida, sendo fortemente eficaz no controlo dos níveis de LDL (Tabela 3), no entanto, a simvastatina, a pravastatina e a rosuvastatina aumentam os níveis da lipoproteína da alta densidade (HDL) mais do que a atorvastatina, o que apresenta ser um benefício para casos de alto

risco de DCV, e como tal são fármacos também comumente utilizados. (63) Relativamente à eficácia na prevenção cardiovascular, a sinvastatina e a pravastatina apresentam um perfil benefício/risco semelhante, enquanto a fluvastatina não apresenta o mesmo efeito preventivo, assim como uma maior incidência de efeitos adversos renais e musculares. As estatinas consideradas de elevada potência são a rosuvastatina e a atorvastatina e as de baixa potência são a pravastatina, sinvastatina, fluvastatina e lovastatina. (64) A selecção de qual estatina utilizar deve ser feita tendo em conta: critérios de eficácia, segurança e custo. A estatina considerada como tratamento de eleição para a maioria dos doentes, pela sua relação custo-eficácia, é a sinvastatina. (65) A pitavastatina é um fármaco ainda muito recente e como tal não existem grandes estudos que indiquem a sua acção na redução dos níveis plasmáticos de LDL.

**Tabela 3** Estatinas disponíveis na prática clínica, com respectivas doses recomendadas e a redução (%) de LDL estimada para cada terapêutica. (66)

Fármaco	Doses recomendadas	Redução de LDL-C
Lovastatina	10-80 mg	21-41%
Sinvastatina	20-80 mg	27-42%
Pravastatina	20-40 mg	20-33%
Fluvastatina	20-80 mg	15-37%
Atorvastatina	10-80 mg	37-55%
Rosuvastatina	10-40 mg	43-55%

Actualmente, a terapêutica com estatinas é a principal recomendação para a redução do colesterol, no entanto, ainda existe um risco residual significativo de eventos cardiovasculares nestes pacientes, sendo ainda necessário avaliar outros parâmetros que possam contribuir para este facto. (63)

## 2.2 Influência das estatinas no metabolismo da vitamina D

O sucesso terapêutico desta classe de fármacos não é apenas atribuído por reduzir o colesterol de uma forma isolada, mas também por todos os efeitos pleiotrópicos que contribuem para os seus resultados positivos. (67) Entendem-se como efeitos pleiotrópicos, acções resultantes da alteração da via do mevalonato (via metabólica do colesterol), assim como as que são dependentes da diminuição da biodisponibilidade do

colesterol. (68) Um destes efeitos pleiotrópicos, que tem mostrado relevância em diversos estudos sobre a acção das estatinas no organismo humano, foi a alteração verificada nos níveis de vitamina D. (67) Constatou-se que esta classe de fármacos poderia interferir nos níveis de vitamina D, uma vez que o precursor endógeno desta vitamina é um derivado de colesterol e que poderá estar em níveis diminuídos na terapêutica com estatinas. Sabe-se que as estatinas inibem a HMG-CoA redutase, diminuindo deste modo, a síntese dos vários intermediários da via metabólica do colesterol, dos quais o 7 - dehidrocolesterol (7-DHC), que se encontra em níveis reduzido nos tecidos de pessoas sujeitas a tratamentos com este fármaco. (59) Como visto anteriormente, o 7-DHC é então o precursor da vitamina D na síntese endógena que ocorre na pele, o que leva a crer que níveis reduzidos desta molécula também possam prejudicar a produção de vitamina D ao nível cutâneo. Assim, suspeita-se que a terapêutica com estatinas provoca não só uma redução nos níveis de colesterol, como também nos níveis de vitamina D, no entanto, isso nem sempre se verifica. (59,69) Após esta descoberta vários estudos debruçaram-se na análise dos efeitos de cada estatina no metabolismo da vitamina D. (40,70) Num estudo clínico recente, com pacientes hipercolesterolémicos (medicados com pravastatina) e um grupo controlo, verificou-se que em resposta à exposição de radiação UV-B sobre a superfície da pele, os níveis de vitamina D aumentaram de uma maneira semelhante em ambos os grupos, indicando que não houve efeitos nocivos da pravastatina sobre a síntese endógena da vitamina D. (69) Para além deste facto, verificou-se também noutros estudos complementares, que determinadas estatinas aumentam os níveis de 25-hidroxivitamina D e de 1,25-di-hidroxivitamina D, contrariamente ao que se esperava. (71) Até aos dias de hoje não existe uma explicação clara do mecanismo responsável por este efeito químico paradoxal (diminuição do colesterol e seus intermediários, e um aumento de vitamina D), oferecendo deste modo, uma oportunidade para novas pesquisas que possam esclarecer a relação existente entre estatinas e o metabolismo da vitamina D. (56)

Relativamente à rosuvastatina, este fármaco foi reconhecido como um dos que provoca um aumento significativo nos níveis de vitamina D, o que por outro lado já não se sucede com a fluvastatina, que não provoca mudança evidente nos níveis desta vitamina. (40,41) Esta disparidade pode ser devido à diferença de potência ou de biodisponibilidade destas duas estatinas, no entanto ainda não é clara esta razão. A fluvastatina é um composto lipofílico, já a rosuvastatina é hidrofílica (Tabela 2) e tem

uma lenta taxa de difusão através das membranas celulares, no entanto, é absorvida rapidamente por hepatócitos através de proteínas de transporte activo, tais como o polipeptídeo transportador de aniões orgânicos. Estas diferenças na biodisponibilidade e padrão de captação no fígado das duas estatinas, podem explicar as suas diferentes acções no metabolismo da vitamina D. (41) Também se verificou que o tratamento com atorvastatina, provoca um aumento significativo dos níveis de vitamina D. (72,73) Como dito anteriormente, o mecanismo responsável por este aumento de vitamina D nos tratamentos com estatinas ainda não é completamente conhecido, como tal algumas hipóteses têm sido postas em causa. Uma dessas hipóteses incide sobre o facto do citocromo P450 3A4 (CYP3A4) ser um catabolizador da vitamina D no fígado e no intestino, assim como o responsável por metabolizar extensivamente algumas estatinas (atorvastatina, sinvastatina e lovastatina). Assim, esta via catabólica comum pode ser a responsável pelo aumento dos níveis de vitamina D em tratamentos com este fármaco. (33,41) No entanto, esta hipótese não explicaria a razão pela qual a sinvastatina, metabolizada também por CYP3A4, não provocar também um aumento significativo nos níveis de 25(OH)D<sub>3</sub> (estudos revelam que este tipo de estatina não afecta os níveis séricos de vitamina D). (59) Por outro lado, um estudo que avaliou um tratamento realizado com lovastatina, durante três meses, demonstrou um aumento nos níveis de 25(OH)D<sub>3</sub>, especialmente em pessoas idosas com deficiência desta vitamina, apoiando assim a hipótese da via catabólica em comum com CYP3A4. (74)

Actualmente ainda se desconhece a possível alteração que a pitavastatina possa provocar nos níveis de vitamina D, não sabendo, à partida se esta classe provoca um efeito de suporte na homeostase de vitamina D, ou se pelo contrário, pode provocar um decréscimo nos níveis desta vitamina secosteroide.

Em suma, verifica-se que alguns estudos científicos afirmam que o metabolismo da vitamina D não é afectado pelas estatinas, outros apoiam a hipótese das estatinas aumentarem os níveis de 25(OH)D e outros estudos ainda sugerem a hipótese da terapêuticas com estatinas diminuir os níveis de vitamina D. No entanto, existe uma marcada ausência de estudos epidemiológicos que comprovem todas estas hipóteses criadas nos estudos.

### 2.3 Efeitos secundários das estatinas e a hipovitaminose D

As estatinas, como qualquer outro fármaco, provocam efeitos secundários desagradáveis, nomeadamente efeitos ao nível muscular, causando mialgia, miosite ou rhabdomiólise, nos casos mais graves. (75) A mialgia é descrita como dores musculares e fraqueza, que se for acompanhada por elevações nos níveis da enzima creatina cinase (CK), a condição já é conhecida como miosite. O caso mais grave, no entanto com menor incidência, que pode ser induzido pelas estatinas é a rhabdomiólise, que é caracterizado pela destruição das células do músculo, normalmente em combinação com um aumento dos níveis de CK (por norma dez vezes acima do valor normal) e de níveis altos de creatinina. (76) Dentro de todos estes efeitos musculares, o que se apresenta como o principal efeito secundário na terapêutica com estatinas, é a mialgia, que chega a afectar 10-15% dos pacientes com esta terapêutica. (77) Devido a este facto, houve vários estudos que incidiram sobre a possível relação entre a insuficiência de vitamina D e a toma de estatinas, uma vez que esta vitamina apresenta um papel importante na manutenção da boa função muscular. (77,78) A forma activa da vitamina D ( $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ) liga-se a dois receptores RVD diferentes, existentes nos miócitos, promovendo através da ligação ao receptor nuclear, um aumento da síntese proteica, e com a ligação ao receptor de membrana da célula, o rápido aumento da contracção muscular. (79,80) Assim, na ausência de níveis normais de vitamina D, a função muscular encontra-se comprometida, o que pode levar a situações de miopatias (termo geral usado para descrever todo o tipo de problemas musculares). (76) Dois estudos de 2008 e 2009 descrevem que a mialgia induzida pela toma de estatinas se encontra associada à insuficiência de vitamina D existente nos pacientes em estudo (níveis de  $25(\text{OH})\text{D}_3 < 30 \text{ ng/mL}$ ) e que após a manutenção dos níveis séricos desta vitamina através da suplementação, se conseguiu reverter os casos de mialgia que anteriormente eram sentidos pelos doentes. (78)

Devido ao baixo número de efeitos secundários e à segurança terapêutica das estatinas, esta classe de fármacos tem sido a mais usada no combate às hiperlipidémias. Sabe-se também, que o aumento do perfil lipídico plasmático é a principal característica das DCV, o que ainda não se sabe, é se em casos de hipovitaminose D, essa alteração lipídica se encontra mais acentuada, de forma a justificar o maior risco de desenvolvimento dessas patologias. O presente trabalho científico pretende ajudar a

desmistificar a essa questão, avaliando o perfil lipídico de diversos pacientes com hipovitaminose D. Como tal, é importante conhecer os principais constituintes lipídicos plasmáticos e a sua relação com as DCV.

### 3. Alteração do perfil lipídico plasmático e a hipovitaminose D nas doenças cardiovasculares

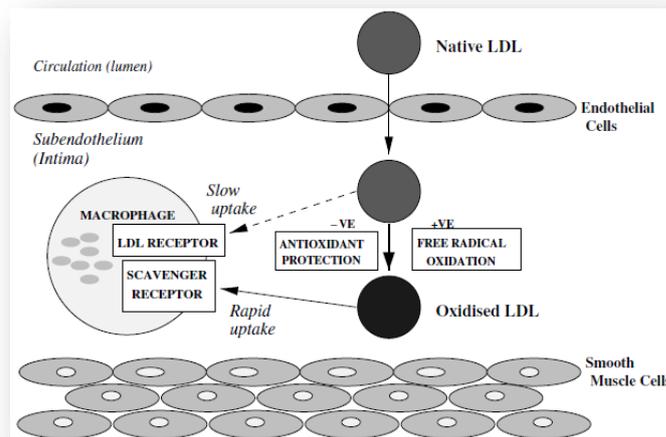
#### 3.1 Perfil lipídico plasmático

O plasma é a parte líquida do sangue, composta por água (90%), proteína e sais minerais, que percorre todo o organismo, garantindo desta forma o transporte de diversos componentes. É através deste fluido que circulam várias substâncias (proteínas, hormonas, factores de coagulação, lípidos...) necessárias à vida das células. Relativamente ao perfil lipídico do plasma humano sabe-se que é composto por milhares de lípidos diferentes, onde a diversidade das suas funções depende da grande variação na estrutura de cada um. (81) Os principais lípidos do plasma são o colesterol, os triglicerídeos, os ácidos gordos não esterificados e os fosfolípidos. (82) Uma vez que os lípidos não são solúveis em meios aquosos, estes elementos não circulam livremente no plasma e sim acoplados a lipoproteínas, que são classificadas consoante a sua composição em: lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL), as principais responsáveis pelo transporte de triglicerídeos (60% da sua composição); lipoproteínas de baixa densidade (LDL), responsáveis pelo transporte de colesterol (50% da sua composição); lipoproteínas de alta densidade (HDL), responsáveis principalmente pelo transporte de proteínas (50%), daí serem as lipoproteínas mais densas; quilomicrons, principais responsáveis pelo transporte de triglicerídeos (85-90% da sua composição). (81) As lipoproteínas, principalmente as LDL e HDL, ganharam grande ênfase na avaliação diagnóstica e terapêutica das DCV, uma vez que o decréscimo dos níveis de HDL encontra-se directamente associado a um maior risco de eventos cardiovasculares, assim como os níveis elevados de LDL significativamente relacionados com o maior risco de desenvolvimento desse tipo de patologias. (81,83) A juntar-se a este facto, altos níveis de triglicerídeos (TRG) também têm sido considerados como factor de risco independente para o desenvolvimento de DCV. (84)

### 3.2 Alteração do perfil de lípidos nas doenças cardiovasculares

Mesmo com as medidas de prevenção e os avanços nos tratamentos com agentes hipolipemiantes (estatinas por exemplo), as doenças cardíacas e o risco residual de eventos recorrentes, continuam a ter uma prevalência significativa. As etiologias relacionadas com este tipo de doenças são complexas, no entanto a dislipidémia, o *stress* oxidativo e a inflamação, são características fundamentais para estes acontecimentos patológicos. (63) Tem sido descrito em muitos trabalhos científicos o papel das lipoproteínas neste tipo de patologias. Hoje em dia já é conhecido o papel vital das HDL no transporte do excesso de colesterol dos tecidos extra-hepáticos para o fígado, onde posteriormente é excretado pela biliar (transporte reverso do colesterol). Esta remoção do excesso de colesterol das paredes arteriais apresenta uma grande diminuição na ocorrência de aterogénese. (85) Por outro lado, existe o papel nefasto das LDL que apresentam uma acção contrária, transportando o colesterol do fígado para todas as células do corpo, contribuindo desta forma para um aumento de colesterol nos vasos sanguíneos, promovendo um maior risco de DCV. Além disso, outros estudos experimentais investigaram a relação entre o aumento dos níveis triglicéridos no soro e o aumento do risco de DCV, e verificaram que a hipertriglicéridémia demonstra ser um factor de risco independente para este tipo de patologias, devido ao efeito aterogénico directo das lipoproteínas ricas em triglicéridos, particularmente as VLDL. (86) Para além disso, existe uma clara evidência de que os fosfolípidos oxidados (oxPL) apresentam um papel significativo na aterosclerose e trombose, que desencadeiam diversos eventos cardiovasculares patológicos. (87) A comprovar esta relação, vários estudos laboratoriais descrevem um aumento dos níveis de produtos de oxidação de fosfolípidos em lesões ateroscleróticas e de anticorpos contra fosfolípidos oxidados em ratos e seres humanos com esse tipo de lesões. (88) A aterosclerose é uma patologia crónica que envolve a acumulação de depósitos de colesterol dentro da parede arterial. Esta ocorrência dá origem ao estreitamento do lúmen do vaso sanguíneo, o que restringe o fluxo de sangue para os órgãos vitais, como o coração e os pulmões. (89) Os primeiros eventos, que conduzem à aterosclerose, ocorrem no espaço entre as células endoteliais e as células musculares lisas, uma região do vaso sanguíneo conhecido como o sub-endotélio ou a íntima (Figura 6). O processo aterosclerótico começa então pela deposição de colesterol, formando camadas de gordura tal nas células, que dá origem às chamadas "células espumosas" que residem nesta região da íntima da parede do vaso

sanguíneo. Esta fase é assintomática e por vezes os sintomas da aterosclerose só se revelam quando surge uma doença arterial coronária ou outro evento cardiovascular. A presença de antioxidantes na íntima e no interior da partícula de LDL pode impedir a oxidação de lípidos que possa ocorrer neste local, contudo, uma vez que ocorra a oxidação, a lipoproteína oxidada pode ser tomada mais rapidamente pelas células (Figura 6). (89)



**Figura 6** Ilustração de uma secção transversal de um vaso sanguíneo, onde a LDL atravessa o endotélio e pode sofrer oxidação devido ao ataque de radicais. (89)

Assim, muitos lípidos bioativos têm sido identificados em placas ateroscleróticas e na circulação sanguínea, incluindo oxPL, aldeídos reactivos de cadeia curta, factor de activação de plaquetas, ésteres de colesterol oxidados e ácidos gordos livres oxidados. Nos fosfolípidos do núcleo externo das lipoproteínas, encontram-se presentes ácidos gordos polinsaturados (PUFA), considerados alvos importantes para a oxidação. A formação de fosfolípidos oxidados surge então quando as LDL ou fosfolípidos celulares, contendo PUFA, sofrem um ataque oxidativo, resultante da adição de átomos de oxigénio no resíduo do ácido gordo da posição sn-2, ou a fragmentação da cadeia deste ácido gordo. Outra classe de produtos formados durante a peroxidação de PUFA são os aldeídos reactivos livres de cadeia curta: 4-hidroxinonal (HNE) e 4 - hidroxil-2 hexenal (EHH). Estes aldeídos podem reagir rapidamente com proteínas que formam aductos covalentes. (90,91) Deste modo, os lípidos oxidados podem ser então um marcador de diagnóstico de doenças cardiovasculares, ou podem representar um alvo potencial para a intervenção terapêutica. (90)

### 3.2.1 Ácidos gordos plasmáticos

Desde logo, se descreveu o importante papel dos lípidos nas diversas vias metabólicas, assim como a função moduladora por parte dos ácidos gordos. Os ácidos gordos encontram-se presentes no plasma na forma livre ou esterificada, em fosfolípidos ou nos triglicéridos e são classificados em: ácidos gordos saturados (SFAs), ácidos gordos monoinsaturados (MUFAs) e ácidos gordos polinsaturados (PUFAs). Este último grupo ainda pode ser subdividido em ómega-3 (3-n PUFA), ómega-6 (6-n PUFA) e ómega-9 (n-9 PUFA). (92) Os ácidos gordos podem ainda ser classificados individualmente por uma representação numérica, usando o número de carbonos, o número de ligações duplas e a posição da primeira ligação dupla relativamente ao terminal metil da molécula, como descrito na Tabela 4. (93) Relativamente à presença dos diferentes ácidos gordos no organismo, existem evidências que relacionam o consumo de SFAs com o aumento dos níveis de LDL e conseqüentemente a um maior risco de DCV. (92,94) Por outro lado, os MUFAs e PUFAs encontram-se directamente relacionados a uma menor incidência de mortalidade cardiovascular. (95) O organismo humano é capaz de sintetizar SFAs e MUFAs, a partir de glicose e aminoácidos, por meio de reacções enzimáticas de alongamento (onde se adicionam unidades de dois carbonos) e reacções de dessaturação, criando novas duplas ligações. No entanto, o organismo não é capaz de sintetizar o ácido linolénico (C18:3) n-3 PUFA, uma vez que não possui as enzimas dessaturases especificamente responsáveis por adicionar uma dupla ligação antes do nono carbono a partir da extremidade metil (distal). (86) As enzimas necessárias para essa finalidade seriam as delta-9 e delta-15 dessaturases, que transformam o ácido oléico (C18:1 ómega-9) em ácido linoleico (C18:2 ómega-6) e ácido linolénico (C18:3 ómega-3). Como tal, torna-se importante obter estes ácidos gordos através da alimentação (96,97)

**Tabela 4** Nomenclatura dos principais ácidos gordos presentes no organismo humano.(93)

Nomenclatura de ácidos gordos	Abreviatura	
<b>Saturados</b>		
Mirístico	C14:0	
Palmitico	C16:0	
Esteárico	C18:0	
Araquídico	C20:0	
<b>Monoinsaturados</b>		
Palmitoleico	C16:1	
Vacénico	C18:1 n-7	
Oleico	C18:1 n-9	
<b>Polinsaturados</b>		
Tricosanóico	C20:3	
Linoleico	C18:2	Omega-6
Araquidónico	C20:4	
Lignocérico	C24:0	
Linolénico	C18:3	Omega-3
Eicosapentaenóico(EPA)	C20:5	
Docosahexanóico(DHA)	C22:6	

### 3.3 Associação entre o efeito cardioprotector da vitamina D e dos ácidos gordos

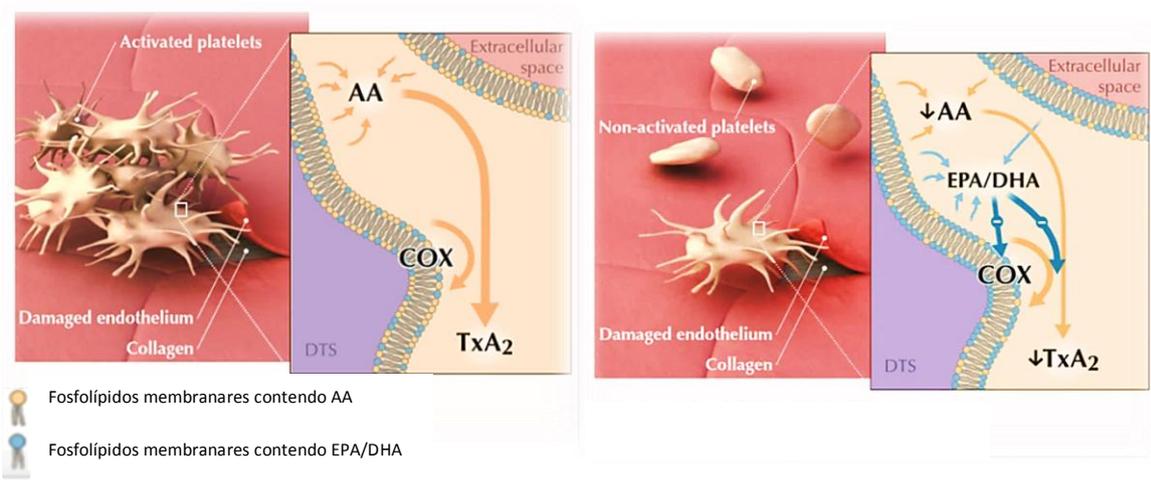
Na literatura os ácidos gordos têm sido classificados como “bons” ou “maus”, de acordo com o seu grau de insaturação, pela sua origem (animal ou vegetal) e pelas suas acções no organismo humano. Porém, os seus efeitos são complexos e dependem muito da quantidade e da natureza da molécula. (95) Sabe-se que os ácidos gordos saturados apresentam um efeito nefasto no sistema cardiovascular, por outro lado alguns ácidos gordos insaturados são considerados como cardioprotectores. (98,99) Os ácidos gordos monoinsaturados foram considerados inicialmente como “neutros”, sem grandes acções no sistema cardiovascular, no entanto hoje em dia, já se observou uma relação inversa entre os MUFAs e a mortalidade cardiovascular. (95) A corroborar este facto, o estudo “The American prospective studies of healthcare professionals” apresentou uma redução estimada de 19% no risco de doença coronária associada a um aumento de 5% no consumo de MUFAS.(99) Para além disso, os MUFAS também são conhecidos por diminuir a susceptibilidade das LDL à oxidação, melhorarem a função endotelial e regularem os processos que conduzem a migração e adesão dos monócitos, assim como na redução nos níveis de marcadores de inflamação e agregação plaquetária. (100) Relativamente aos PUFAS, existe uma distinção feita nos estudos científicos, que separa os ácidos gordos ómega-6 (n-6 PUFA) dos ácidos gordos ómega-3 (n-3 PUFA),

uma vez que as suas acções no organismo humano não são iguais. Em relação aos ómega-6 existe alguma controvérsia na sua acção no sistema cardiovascular. (101,102) Porém muitos estudos relacionam os n-6 PUFA com o aumento de inflamação e consequentemente um aumento do risco de DCV, uma vez que potenciam a formação de eicosanoides e o aumento do *stress* oxidativo. (103) Já os ácidos gordos omega-3 são mais conhecidos por apresentarem um efeito cardioprotector. (104) Há cada vez mais evidências em estudos epidemiológicos e observacionais, de que os n-3 PUFA exibem propriedades anti-inflamatórias, anti-trombóticas, anti-arritmicas e anti-aterogénicas, levando desta forma a uma redução na taxa de mortalidade por DCV. (105,106) Porém, outros estudos não conseguiram encontrar essa associação benéfica entre o consumo de omega-3 e a mortalidade por DCV, mas essa discrepância pode ser explicada por diversas razões: diferenças nas definições de morte súbita cardíaca, na estimativa da ingestão de peixe (fonte alimentar rica em n-3 PUFA), nas populações em estudo, bem como pelos possíveis efeitos adversos de metilmercúrio (um contaminante encontrado em vários peixes) que podem mascarar os efeitos favoráveis dos omega-3. (107)

A maior parte das evidências dos efeitos benéficos dos omega-3 PUFA foram obtidas para EPA e DHA (C20:5 e C 22:6, respectivamente). Num trabalho científico onde se pretendeu estudar a prevenção primária e secundária de DCV, 18.645 pacientes hipercolesterolémicos foram distribuídos aleatoriamente, de forma a uns serem medicados diariamente com 1800 mg de EPA em conjunto com uma determinada estatina e outros com apenas a toma de estatina, durante 5 anos de acompanhamento. Neste estudo verificou-se que os doentes que seguiram o tratamento com EPA apresentaram uma redução de 19% em eventos cardiovasculares, e onde a redução dos níveis de LDL por parte das estatinas não foi um factor significativo na diminuição do risco de eventos coronarianos. (108)

Todos os efeitos cardioprotectores dos 3-n PUFA são devidos essencialmente à sua acção na via dos eicosanoides, ou seja pelos seus efeitos anti-inflamatórios. Como dito anteriormente, a inflamação desempenha um papel fundamental na progressão da aterosclerose e na ocorrência de eventos trombóticos. (103) A família dos eicosanoides é composta pelas prostaglandinas (PG), prostaciclina (PC), tromboxanos (TXA), leucotrienos (LTs) e derivados dos ácidos gordos hidroxilados, que participam em muitos processos fisiológicos e patológicos. (109) Os ácidos di-homogammalinolénico (DHGL), ácido araquidónico (AA) e EPA são os precursores dos eicosanoides. O AA,

preferencialmente metabolizado pela via da cicloxigenase (COX), é o precursor dos prostanoídes da série 2 ( $PGE_2$ ,  $TXA_2$ ,  $PCI_2$ ) e LTs da série 4, considerados pró-inflamatórios, por apresentarem uma acção quimiotáctica, vasoconstritora e agregante plaquetária (Figura 7). Já o ácido EPA, preferencialmente degradado pela via da lipoxigenase (LOX), é o precursor de prostanoídes da série 3 ( $PGE_3$ ,  $TXA_3$ ,  $PCI_3$ ) e LTs da série 5, com menor poder inflamatório sobre as células imunes. Desta forma, existe competição entre o AA e o EPA pelas enzimas COX e LOX e, conseqüente, produção de diferentes eicosanóides, de acordo com o substrato que se encontra disponível na membrana celular (Figura 7). (110) Cabe ressaltar que o DHA não é um substrato para as enzimas COX e LOX, mas inibe a síntese de eicosanóides da família ômega-6 ao inibir a liberação de AA da membrana, contribuindo assim na diminuição da inflamação. Posto isto, verificou-se que uma elevada abundância de EPA e DHA, substitui, parcialmente, os ácidos gordos  $\omega$ -6 (principalmente o AA) da membrana das células, resultando numa diminuição na produção de  $PGE_2$ ,  $LTB_4$  (importantes indutores da quimiotaxia de leucócitos e inflamação) e  $TXA_2$  (um potente agregador plaquetário e vasoconstritor) e aumento na produção de  $PCI_3$  (vasodilatadoras),  $TXA_3$  (fraco agregador plaquetário e vasoconstritor) e  $LTB_5$  (menos activos na indução da inflamação e quimiotaxia do que os  $LTB_4$ ). (109)

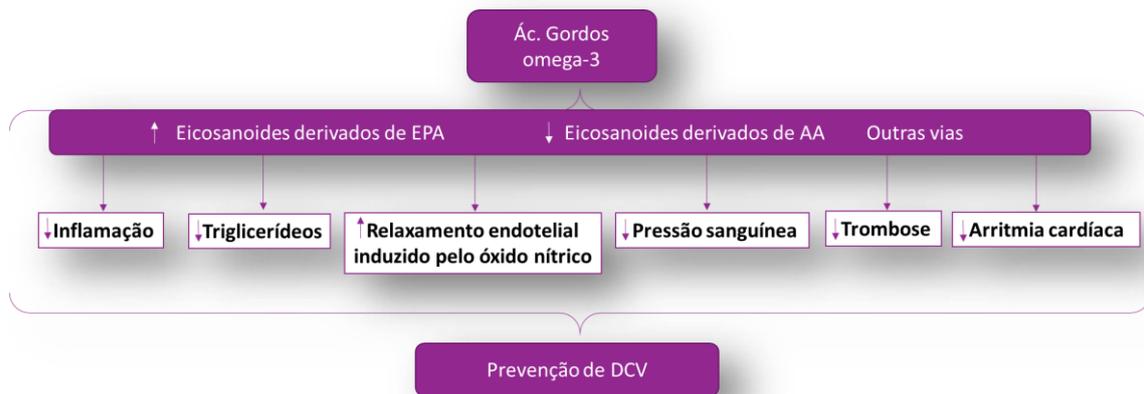


**Figura 7** Comparação dos efeitos de n-6 PUFA e n-3 PUFA na produção de eicosanóides envolvida no sistema inflamatório do organismo humano (111)

O mecanismo proposto para o controlo das arritmias cardíacas é o efeito directo dos ômega-3 sobre o próprio miocárdio. (106,112) A incorporação de omega-3 nos miócitos

leva à alteração da composição lipídica das membranas celulares, “estabilizando” as cargas eléctricas das membranas celulares do miocárdio, assim como altera as vias metabólicas dos eicosanoides. (113) A juntar-se a este facto, existem também evidências de que um aumento da ingestão de ácido linolénico reduz os níveis de vários marcadores inflamatórios, tais como a proteína C reactiva de alta sensibilidade (hs-CRP) e a interleucina-6. (114)

Após vários estudos sobre os ácidos gordos omega-3 (principalmente EPA e DHA) e a vitamina D verificou-se que ambos os metabolitos apresentavam efeitos cardioprotectores. Desta forma, começaram a surgir estudos que relacionavam estes dois compostos e analisavam as suas acções no organismo, de forma a avaliar o risco de DCV. (115,116) Para além disso, também se verificou que a maioria das fontes alimentares de vitamina D eram as mesmas fontes ricas em ácidos gordos ómega-3, com especial destaque os óleos de peixe e peixes como o salmão e a truta. (115,116) O estudo de Park Yongsoon and Kim Minkyung incidiu então sobre a hipótese dos níveis de 25(OH)D<sub>3</sub> e n-3 PUFA estarem positivamente correlacionados em pacientes com DCV, e de facto verificou-se um aumento dos níveis séricos de 25-hidroxivitamina D assim como os de n-3 PUFA, após o ajuste para idade, sexo, IMC e tabagismo, enquanto SFA total diminuiu significativamente. No entanto, a análise de regressão logística mostrou que os níveis de 25-hidroxivitamina D no soro não foram significativamente associados com o risco de DCV. (115) Porém, são muitos os estudos que associam os efeitos benéficos da vitamina D e os efeitos dos n-3 PUFA nas respostas inflamatórias e imunes, proporcionando efeitos preventivos de DCV. (117) As Figuras 6 e 7 ilustram esses efeitos cardioprotectores destes metabolitos no organismo humano.



**Figura 8** Esquematização dos efeitos cardioprotectores dos ácidos gordos omega-3 (116)



**Figura 9** Esquematização dos efeitos cardioprotectores da vitamina D.(116)

Uma vez, que os n-3 PUFA apresentam efeitos cardioprotectores, colocou-se em hipótese compensar as consequências prejudiciais da hipovitaminose vitamina D com o aumento do consumo destes ácidos gordos. Um estudo chega mesmo a indicar que a acção anti-inflamatória de n-3 PUFA ocorre mesmo na deficiência de vitamina D, no entanto as causalidades dessas inter-relações precisam ser investigadas em estudos futuros. (117) As evidências sobre o seu efeito combinado de n-3 PUFA e vitamina D em modelos animais ainda são bastante escassas. Deste modo, mais estudos são necessários para entender se de facto a relação entre a vitamina D e o perfil de ácidos gordos no organismo humano são capazes de minimizar os riscos de DCV em sintonia com as estatinas. Encontra-se em vigor um grande ensaio clínico sobre o efeito

concomitante da suplementação de vitamina D e n-3 PUFA, na prevenção do cancro e doenças cardiovasculares que está previsto ser concluído apenas em 2017. Os resultados deste estudo, intitulado VITAL study, são esperados para influenciar as decisões individuais, recomendações clínicas e directrizes de saúde pública em relação ao uso de vitamina D e suplementos de omega-3 PUFA para a prevenção destas patologias. (116)

#### 4. Análise lipidómica

A lipidómica é um ramo da metabolómica que é especializado na caracterização do complemento lipídico dos diversos sistemas biológicos. A associação existente entre a alteração do metabolismo lipídico com determinadas doenças, incluindo as doenças cardiovasculares, levou ao grande interesse sobre esta área, onde hoje em dia, apresenta grande utilidade devido à sua fácil análise e precisão na identificação das diversas classes de lípidos. Neste ramo, é possível avaliar a composição molecular e a concentração das várias espécies de lípidos e, conseqüentemente, determinar o seu impacto em certas patologias. (63,83) Actualmente, já um grande número de investigações tem demonstrado a grande importância da lipidómica na descoberta de biomarcadores lipídicos, para possíveis aplicações no prognóstico e terapêutica de diversas patologias. (118)

##### 4.1 Técnicas laboratoriais na lipidómica

Para a análise do perfil lipídico plasmático de amostras sanguíneas é necessário recorrer-se a diversas técnicas laboratoriais, que possibilitem a obtenção e compreensão da componente lipídica, para posterior avaliação do diagnóstico dos pacientes. Para se proceder a essa análise de lípidos numa amostra de plasma ou soro, é necessário inicialmente extrair-se a fracção lipídica da amostra total que é composta por diversos componentes sanguíneos, de seguida recorrer-se a um processo de quantificação e separação das várias classes lipídicas que compõem a amostra, e por fim a uma técnica de análise lipídica. (119) Desde o início que para a análise de lípidos, as técnicas de espectrometria de massa (MS) tiveram grande impacto. Actualmente, já é possível identificar e caracterizar centenas de espécies de lípidos, utilizando abordagens baseadas na análise por MS. A cromatografia gasosa (GC) é uma técnica de separação

de elevada fiabilidade, muitas vezes acoplada à espectrometria de massa (GC-MS) para análise de componentes lipídicas. (120) Desde os anos 60 que esta metodologia tem sido usada na lipidómica, com o intuito de analisar diversos extratos lipídicos, como é o caso da análise de um extracto lipídico sérico, para análise do perfil sérico de ácidos gordos. (121) Através desta técnica de GC-MS, os ácidos gordos sob a forma de esteres metílicos são inicialmente separados cromatograficamente, de seguida chegam ao espectrómetro de massa, onde as moléculas são excitadas através do fornecimento de energia (bombardeamento por um feixe de electrões). Uma vez excitadas, as moléculas procuram uma forma mais estável, que leva à quebra de ligações, formando-se assim, iões mais pequenos como fragmentos da molécula original. Estes fragmentos iónicos são depois separados de acordo com a sua relação massa/carga ( $m/z$ ) dando origem a um padrão definido (espectro de massa), que contém informação única e característica de cada ácido gordo. Desta forma, é possível analisar o perfil de lípidos, neste caso de ácidos gordos, que compõe a amostra de fluido biológico (soro ou plasma). (122)



## **II. Objetivos**



Tendo em conta o que já foi descrito na literatura relativamente às estatinas e à vitamina D verifica-se que estes fármacos não só estão associados a situações de hipovitaminose D, como também em diversos estudos indicam que a hipovitaminose D encontra-se associada a um maior risco de DCV, o que pode contrariar o efeito benéfico das estatinas, que é reduzir o risco deste tipo de patologias. Assim, o presente trabalho teve como objectivo:

- a) avaliar a incidência de hipovitaminose D aquando da terapêutica com estatinas;
- b) avaliar se a terapêutica com diferentes estatinas pode estar associada a diferenças na incidência de hipovitaminose D;
- c) avaliar se o tempo de exposição solar também pode ser um factor importante nos níveis de vitamina D neste tipo de doentes a seguir esta terapêutica;
- d) avaliar a incidência de casos de hipertensão em doentes com hipovitaminose D que contribui para o aumento do risco de DCV;
- e) Avaliar se a hipovitaminose D e as estatinas têm efeito no perfil de ácidos gordos plasmáticos.

É reconhecido também que as DCV estão directamente relacionadas com uma alteração no perfil lipídico plasmático. Assim, também se tornou importante avaliar o perfil de lípidos dos doentes em estudo através do doseamento de CT, LDL, HDL, TRG e através de uma análise ao perfil de ácidos gordos por GC-MS. Desta forma, este trabalho científico pode sugerir se a vitamina D se deve tornar um biomarcador adicional, possivelmente útil no diagnóstico e prognóstico de doenças cardiovasculares, principalmente em doentes com a terapêutica com estatinas.



## **III. Material e Métodos**



## 5.1 Seleccção e caracterização da população

No presente trabalho científico pretendeu-se estudar dois grupos de indivíduos, um grupo composto por doentes hipercolesterolémicos medicados com estatinas e um grupo de pessoas saudáveis (sem patologias diagnosticadas), com o intuito de avaliar possíveis diferenças nos valores de 25-hidroxivitamina D em cada grupo. Como tal, para a elaboração deste estudo foi necessário recolher 106 amostras de sangue de doentes hipercolesterolémicos medicados com estatinas e 20 amostras de indivíduos saudáveis para o grupo controlo. A selecção dos pacientes hipercolesterolémicos foi efectuada no Serviço de Patologia Clínica- Sector de Colheitas de Sangue das consultas externas do Centro Hospitalar do Baixo Vouga (CHBV), entre Novembro de 2013 a Março de 2014, através de um breve questionário sobre alguns dados demográficos: sexo, idade, tempo de exposição solar, a profissão, o nome da estatina usada na terapêutica, a doença pela qual o paciente é seguido no hospital e a presença ou ausência de hipertensão. Usou-se como critério de exclusão a toma de suplementos com vitamina D, que interferiria com a análise dos níveis de 25(OH)D<sub>3</sub>. A posterior obtenção dos dados clínico-laboratoriais (concentração sérica de CT, HDL, LDL, TRG e 25(OH)D<sub>3</sub>) foi realizada no Serviço de Química Clínica do CHBV e posteriormente registada através do sistema Appolo® (Sistema informático de gestão laboratorial). Todo este processo de recolha de dados foi aprovado pela Comissão de Ética do Centro Hospitalar do Baixo Vouga, E.P.E. – Aveiro.

## 5.2 Testes laboratoriais

O doseamento de todos os parâmetros clínicos em estudo (CT, HDL, LDL, TRG e 25(OH)D<sub>3</sub>) foi feito com os kits laboratoriais de rotina usados no laboratório de Química Clínica do CHBV. Para o doseamento da vitamina D recorreu-se ao kit Vitamin D Total (Vit. D), um método imunoquímico destinado ao equipamento ADVIA Centaur® XP da Siemens. Para a análise dos níveis séricos de Colesterol Total o kit usado foi Dimension® clinical chemistry system - Cholesterol Flex® reagente cartridge da Siemens. Relativamente ao doseamento dos triglicérideos, o kit usado foi o Dimension® clinical chemistry system -Triglycerides Flex® reagente cartridge da Siemens, para a avaliação dos níveis séricos de LDL foi o kit Dimension® clinical

chemistry system - Automated LDL Cholesterol Flex® reagent cartridge da Siemens e para HDL o kit Dimension® clinical chemistry system - High Density Lipoprotein Cholesterol Flex® reagent cartridge da Siemens. Os intervalos de referência considerados, foram os adoptados pelo fabricante dos kits acima referidos e que se encontram representados na Tabela 5.

**Tabela 5** Intervalos de referência para cada parâmetro bioquímico em estudo.

Parâmetros bioquímicos	Valores de referência
Colesterol Total	<200 mg/dL
HDL	35-60 mg/dL
LDL	0-130 mg/dL
TRG	<150 mg/dL
25(OH)D	≥30 ng/mL

### 5.3 Análise Estatística

A análise estatística dos dados clínico-laboratoriais a avaliar no presente estudo, tanto do grupo controlo como do grupo de doentes, foi realizada, utilizando os programas Excel® 2010 (Microsoft Corporation, USA) e o GraphPad Prism 5® (GraphPad Software Inc, USA). Os resultados são apresentados com média ± desvio padrão, e o valor de p foi calculado e considerado estatisticamente significativo quando se encontrou inferior a 0,05.

### 5.4 Procedimento experimental da extracção de lípidos do soro humano e posterior análise de ácidos gordos

#### 5.4.1 Recolha das amostras biológicas

Das 106 amostras de soro dos doentes hipercolesterolémicos e das 20 amostras de indivíduos saudáveis armazenadas a -20°C, recolheram-se 5 amostras de pacientes hipercolesterolémicos com défice de vitamina D, 5 amostras de pacientes com

insuficiência de vitamina D e também 5 amostras do grupo controlo com insuficiência em vitamina D, para posterior extracção e análise de lípidos.

#### 5.4.2 Extracção de lípidos do soro humano

O processo de extracção de lípidos de amostras de soro humano é um procedimento por vezes complicado, uma vez que neste fluido biológico encontra-se uma grande fracção proteica que dificulta este processo de extracção da fase lipídica. Assim utilizámos um método adaptado da extracção de Folch, obtendo o extracto lipídico, precipitando a fase proteica após adição de metanol e clorofórmio. No primeiro passo a 200µL de cada amostra de soro foi adicionado 1mL de metanol (MeOH), levando de seguida a agitar durante 5 minutos. Nesta fase o metanol serviu para quebrar as ligações lípido/proteína e inactivar as lipases. Posteriormente adicionou-se 1mL de clorofórmio (CHCl<sub>3</sub>) para dissolver os lípidos e levou-se mais uma vez a agitar durante 5 minutos. O passo seguinte foi centrifugar as amostras a 3000 rpm durante 10 minutos. Após a centrifugação foi possível observar a fase proteica precipitada no fundo do tubo e extrair o sobrenadante que continha a fracção lipídica para um novo tubo. Nos tubos com as fracções lipídicas adicionou-se 1,25mL de água mili-Q para induzir uma nova separação de fases e garantir uma extracção lipídica sem a presença de outros hidrofílicos. Assim as amostras foram a centrifugar novamente a 3000rpm durante 10 minutos, obtendo-se posteriormente um sistema de duas fases: fase aquosa (superior) e orgânica (inferior). Extraíu-se a fase aquosa do tubo para ficar apenas a fase orgânica contendo os lípidos plasmáticos. Por fim, os extractos lipídicos obtidos foram secos na corrente de azoto e armazenados a -20°C até à próxima etapa de análise e quantificação de ácidos gordos.

#### 5.4.3 Análise e quantificação de ácidos gordos por Cromatografia Gasosa acoplado a espectrometria de massa

De forma a analisar as espécies de ácidos gordos das amostras em estudo, fizemos uma análise utilizando Cromatografia Gasosa acoplado a espectrometria de massa (GC-MS). Assim para análise de ácidos gordos totais recorreu-se a um método de metilação das amostras antes de se injectar no GC-MS. Num primeiro passo ressuspendeu-se o extracto lipídico seco em 300µL de CHCl<sub>3</sub> e separou-se 30µL da solução obtida para

um novo tubo. De seguida secou-se na corrente de azoto e adicionou-se 1mL de n-hexano e 200 $\mu$ L de uma solução de KOH em MeOH (2M). De seguida levou-se a agitar durante 1 minuto e juntou-se 2mL de solução saturada de NaCl, e centrifugou-se durante 5 minutos a 2000rpm. Obteve-se assim um sistema de duas fases e separou-se a fase superior (fase orgânica) para um eppendorf e secou-se na corrente de azoto. Por fim, no momento da injeção da amostra no GC, ressuspendeu-se a amostra em 20 $\mu$ L de n-hexano e de seguida injectou-se. Através deste procedimento laboratorial, os ésteres metílicos dos ácidos gordos foram analisados por GC-MS Agilent Technologies 6890N Network (Santa Clara, CA) equipado com uma coluna DB-FFAP com 30 m de comprimento, 0,32 milímetros de diâmetro interno e 0,25 micrómetros de espessura de filme (J&W Scientific, Folsom, CA). O GC foi conectado a um detector selectivo de massa Agilent 5973 Network, operando com um modo de impacto de electrões de 70 eV e os espectros de MS adquiridos no intervalo de  $m/z$  40-500 num ciclo de 1 segundo num modo de aquisição verificação completa. A temperatura do forno foi programada a partir de uma temperatura inicial de 80°C, situando-se nesta temperatura durante 3 minutos, de seguida com um aumento linear até 160°C a 25°C/min, seguido por um aumento linear de temperatura de 2°C/min a 210 ° C, e, em seguida, a 30°C/min a 250°C. As temperaturas do injector e do detector eram de 220 e 280°C, respectivamente. Como gás transportador foi utilizado o hélio, a um caudal de 1,7 mL/min. Por fim a análise dos espectros obtidos no GC-MS foram analisados por comparação com a base de dados. A técnica GC-MS possibilita desta forma a análise de misturas mesmo as mais complexas, de uma forma qualitativa, com a ajuda de bibliotecas de espectros, ou quantitativa, recorrendo a padrões de referência. No presente trabalho a análise realizada foi qualitativa, onde se procedeu à comparação do espectro de massa que cada pico apresenta com os espectros existentes numa base de dados (bibliotecas informatizadas), neste caso a WILEY275. A quantificação relativa foi realizada após a integração e determinação da área de cada pico para cada ácido gordo identificado.





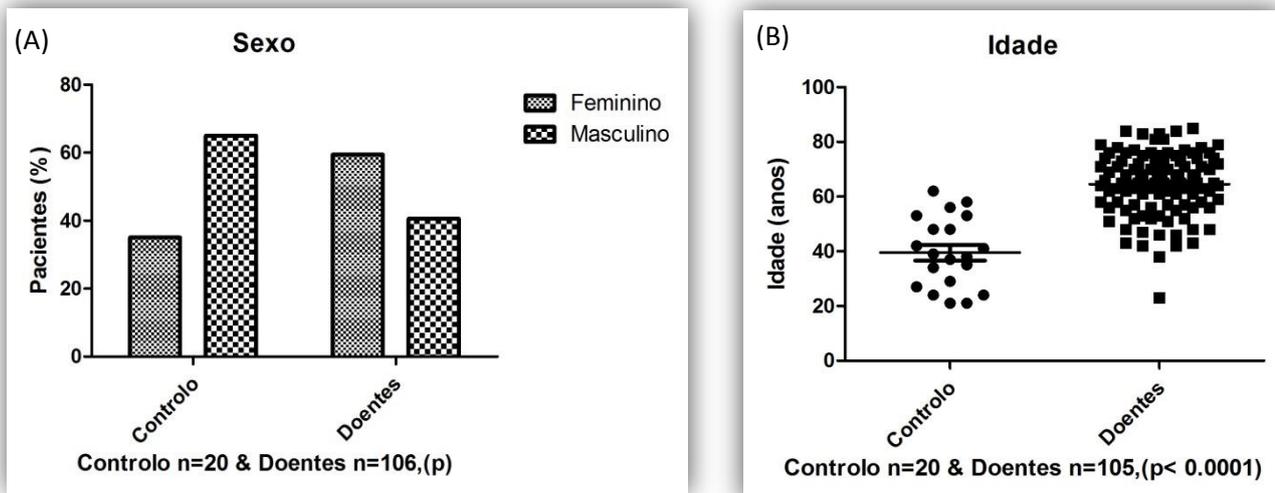
## 6.1 Avaliação da hipovitaminose D na população em estudo

### 6.1.1 Caracterização epidemiológica dos pacientes e grupo controlo

Neste estudo avaliaram-se os níveis séricos da vitamina D de 106 pacientes (63 mulheres e 43 homens) com hipercolesterolemia e 20 indivíduos saudáveis para o grupo controlo (7 mulheres e 13 homens). Com o intuito de caracterizar a população de doentes em estudo, avaliaram-se alguns marcadores antropométricos, tais como: sexo, idade, o tempo de exposição solar, a profissão, a in/existência de hipertensão arterial e o nome da estatina usada no tratamento para a hipercolesterolemia. Para além destes dados, também se avaliaram vários parâmetros clínicos, como: os níveis séricos de CT, LDL, HDL, TRG e 25(OH)D<sub>3</sub>. A Tabela 6 e a Figura 10 apresentam a distribuição de indivíduos do grupo controlo e de doentes consoante o sexo e a idade.

**Tabela 6** Distribuição da população em estudo consoante o sexo e a idade (dividida por cinco faixas etárias: 20-26; 27-40; 41-65; 66-80; 81+). Legenda: N- número total de indivíduos em cada grupo de estudo (Controlo e doentes).

População em estudo	Sexo		Idade					N
	Feminino	Masculino	Faixas etárias					
			20-26	27-40	41-65	66-80	81 +	
<b>Controlo</b>	7	13	4	7	9	-	-	20
<b>Doentes</b>	63	43	1	1	52	45	7	106



**Figura 10** Representação gráfica da distribuição de indivíduos do grupo de doentes e controlo consoante o sexo (A) e representação gráfica da distribuição de idades do grupo controlo e de doentes em estudo (B).

Através da Tabela 6 verifica-se que o grupo controlo é composto por 20 indivíduos saudáveis com idades compreendidas entre os 20 e os 65 anos e o grupo de doentes formado por 106 indivíduos com idades compreendidas entre os 20 e os 85 anos. Juntamente com a Figura 10 é possível observar que no grupo controlo 35% dos indivíduos são do sexo feminino e 65% do sexo masculino, enquanto que no grupo de doentes 59 % são do sexo feminino e 41% são do sexo masculino (A). O gráfico B da Figura 10 ilustra a distribuição de idades dos dois grupos de estudo, onde o grupo controlo apresenta idades compreendidas entre os 21 e os 62 anos, com uma média de  $39.50 \pm 2.870$ , e o grupo de doentes, idades compreendidas entre os 23 e os 85 anos, com uma média de  $64.51 \pm 1.118$ .

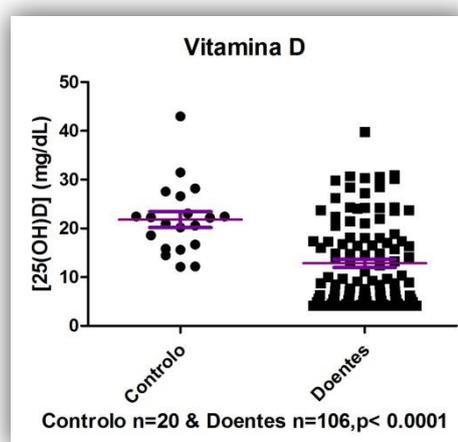
### 6.1.2 Análise dos níveis séricos de vitamina D da população em estudo

Um dos parâmetros avaliados neste trabalho foi o nível sérico de vitamina D das amostras de soro dos pacientes hipercolesterolémicos medicados com estatinas e do grupo controlo. De acordo com os resultados da concentração de 25(OH)D<sub>3</sub> plasmática obtidos, os indivíduos foram distribuídos em três estados: o de hipovitaminose por **deficiência de vitamina D** ([25(OH)D<sub>3</sub>] é <10 ng/m), hipovitaminose por **insuficiência de vitamina D** ([25(OH)D<sub>3</sub>] entre 10-29 ng/mL) ou com **valores normais de vitamina**

**D** ( $[25(\text{OH})\text{D}_3] \geq 30 \text{ ng/mL}$ ). A Tabela 7 ilustra essa distribuição da população em estudo (controlo e doentes) nos três estados referentes aos níveis de vitamina D e a Figura 11 representa a distribuição dos níveis séricos da população controlo e da população de doentes, com respectivas médias e desvios padrão.

**Tabela 7** Distribuição da população em estudo (grupo controlo e grupo de doentes) nos diferentes tipos de hipovitaminose D (défice ou insuficiência) e no grupo valores normais de vitamina D.

Níveis de Vitamina D		Grupo Controlo (%)			Grupo de doentes (%)				
		Faixas etárias			Faixas etárias				
		20-26	27-40	41-65	20-26	27-40	41-65	66-80	81+
Hipovitaminose	Deficiência	-	-	-	0,94	0,94	26,42	22,64	2,83
	Insuficiência	20	35	35	-	-	22,64	14,15	3,78
Valores normais de vitamina D		-	-	10	-	-	-	5,66	-
Total		100%			100%				



**Figura 11** Representação gráfica da distribuição dos níveis séricos de  $25(\text{OH})\text{D}_3$ , do grupo controlo e do grupo de doentes em estudo, com respectiva média e desvio padrão.

Através da Tabela 7 verifica-se que no grupo controlo, a maioria dos indivíduos apresenta insuficiência em vitamina D (90% dos indivíduos), afectando todas as faixas etárias, e apenas 10% dos indivíduos com idades compreendidas entre os 41 e 65 anos é que apresenta valores normais de vitamina D. Neste grupo de indivíduos saudáveis não há a presença de casos de deficiência em vitamina D. O mesmo não acontece no grupo de doentes, onde aproximadamente metade da população em estudo, apresenta

deficiência em vitamina D (53,77%). A outra metade dos indivíduos do grupo de doentes, 40,57% apresenta insuficiência em vitamina D e 5,66% apresenta níveis séricos de 25(OH)D<sub>3</sub> dentro do intervalo de referência.

No sentido de avaliar a média e o desvio padrão dos resultados obtidos no doseamento de vitamina D (25(OH)D<sub>3</sub>) elaborou-se um gráfico de distribuição (descrito na Figura 11) com a realização do teste estatístico t-test, onde se obteve uma média com respectivo desvio padrão de 21.82 ± 1.620, para o grupo controlo ( N=20) e de 12.84 ± 0.8484 para o grupo de doentes (N=106). Verificaram-se níveis séricos de vitamina D mais baixos nos doentes tratados com estatinas em comparação com o controlo. No entanto, é de salientar que mesmo nos indivíduos controlo, os níveis séricos de vitamina D encontram-se abaixo dos valores de referência.

### 6.1.3 Correlação dos níveis séricos de vitamina D com as diversas terapêuticas com diferentes estatinas

Um outro objectivo do presente trabalho científico foi avaliar os níveis de vitamina D nas diferentes terapêuticas com estatinas, para verificar se de facto estes fármacos tinham efeitos dissimilares neste parâmetro sérico. Assim, a Tabela 8 apresenta a distribuição de doentes com hipovitaminose D e de doentes com níveis de vitamina D normal nos diversos tratamentos com estatinas, assim como a média da concentração de 25(OH)D<sub>3</sub> obtida em cada tratamento.

**Tabela 8** Representação dos casos com deficiência de vitamina D ([25(OH)D<sub>3</sub>] é <10 ng/m), e insuficiência de vitamina D ([25(OH)D<sub>3</sub>] entre 10-29 ng/mL) nas terapêuticas com diferentes estatinas, no grupo de doentes em estudo.

Nível de vitamina D		% de doentes com hipovitaminose ou níveis normais de vitamina D nos diversos tratamentos com estatinas						
		Fluvastatina (n=1)	Pravastatina (n=4)	Sinvastatina (n=58)	Lovastatina (n=2)	Atorvastatina (n=17)	Rosuvastatina (n=17)	Pitavastatina (n=7)
Hipovitaminose D	Deficiência	-	75	56,9	100	58,83	35,29	28,57
	Insuficiência	100	25	39,65	-	35,29	52,94	57,14
Vitamina D normal		-	-	3,45	-	5,88	11,77	14,29
Total (%)		100						
Média da [25(OH)D] (ng/mL)		13,14	11,24	12,28	4,41	10,86	16,29	17,17

De um modo geral, pela análise da Tabela 8, verifica-se que a maioria dos doentes hipercolesterolémicos a tomarem estatinas apresenta hipovitaminose D, independentemente do tipo de estatina que constitui o seu tratamento. É possível observar-se apenas quatro terapêuticas com níveis de vitamina D normais: terapêutica com sinvastatina (3,45%), com atorvastatina (5,88%), com rosuvastatina (11,77%) e com pitavastatina (14,29%). A terapêutica associada à melhor percentagem de níveis séricos de vitamina D dentro dos parâmetros de referência foi o da pitavastatina, apesar da grande maioria dos doentes com esta terapêutica apresentar insuficiência de vitamina D (57,14%). As estatinas menos utilizadas na população em estudo foram a fluvastatina e a lovastatina (um e dois doentes respectivamente), que apresentaram hipovitaminose D (défice no caso da fluvastatina e insuficiência no caso da lovastatina) e a mais utilizada foi a sinvastatina, onde se registaram 58 doentes a serem medicados por este fármaco. Excluindo a lovastatina que apenas é representada por dois doentes (pouco significativo), a estatina que apresentou a maior percentagem de casos com défice de vitamina D foi a pravastatina, com 75% dos casos, ainda que também não apresente uma grande significância, uma vez que apenas faz parte do tratamento de quatro doentes. Assim, a estatina com um maior número de doentes e com uma elevada percentagem de hipovitaminose D foi a atorvastatina, com 58,83% dos casos. Logo de seguida, a estatina que apresenta igualmente um elevado número de doentes com défice em vitamina D é a sinvastatina, onde mais de metade dos pacientes apresenta valores séricos muito reduzidos de vitamina D (56,9%). Com uma percentagem menor de casos de hipovitaminose D por défice de vitamina D encontra-se a pitavastatina (28,57%), que por outro lado, demonstra ser o fármaco com mais casos de hipovitaminose D por insuficiência (57,14%), excluindo a fluvastatina, que apenas é representada por um doente. Para além dos doentes medicados com pitavastatina, a maioria dos pacientes medicados com rosuvastatina também apresentam insuficiência de vitamina D (52,94% dos casos), os restantes apresentam défice de vitamina D (35,29%) e 11,77% dos doentes apresentam níveis séricos de vitamina D normais.

Relativamente à média da concentração de 25(OH)D<sub>3</sub> obtida nos tratamentos, as estatinas que obtiveram uma média de concentração sérica mais elevada foi a pitavastatina com 17,17 ng/mL e logo de seguida a rosuvastatina com 16,29 ng/mL.

Os doentes com uma média de concentração sérica de 25(OH)D<sub>3</sub> mais baixa (4,41 ng/mL) foram os doentes medicados com lovastatina, ainda que haja apenas o registo de

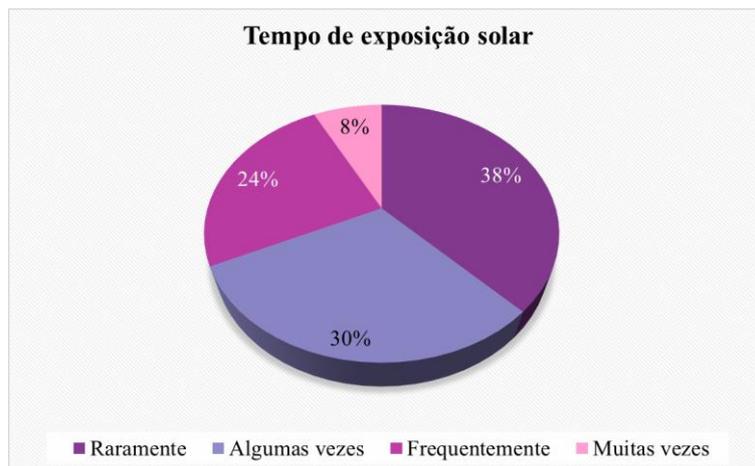
2 doentes nesta terapêutica, o que é pouco significativo. Assim, excluindo a lovastatina, a estatina com a média de concentração mais baixa foi a atorvastatina (10,86 ng/mL). Analisando a Tabela 7 é possível verificar que as estatinas de segunda geração apresentam uma maior percentagem de doentes com níveis de vitamina D normal e que têm uma menor percentagem de doentes com défice de vitamina D.

#### 6.1.4 Análise dos níveis séricos de vitamina D no grupo de doentes consoante o tempo de exposição solar

É do conhecimento científico que os níveis séricos de vitamina D no organismo são mantidos essencialmente pela síntese endógena na pele pela exposição à radiação solar, mais precisamente à radiação UV. Assim é importante ter em conta o tempo de exposição solar da população de doentes em estudo para verificar se este parâmetro não pode interferir também com os seus níveis séricos de vitamina D. A Tabela 9 representa os doentes de cada faixa etária consoante o seu tempo de exposição solar (informação obtida por inquérito aos doentes), assim como a percentagem de casos com hipovitaminose D, relacionando com o tempo de exposição à radiação solar. De forma a facilitar a visualização do tempo de exposição solar da população em estudo, a Figura 12 descreve os resultados obtidos na forma de gráfico circular e a Figura 13 representa um gráfico que relaciona o número de casos de hipovitaminose D em cada tempo de exposição solar.

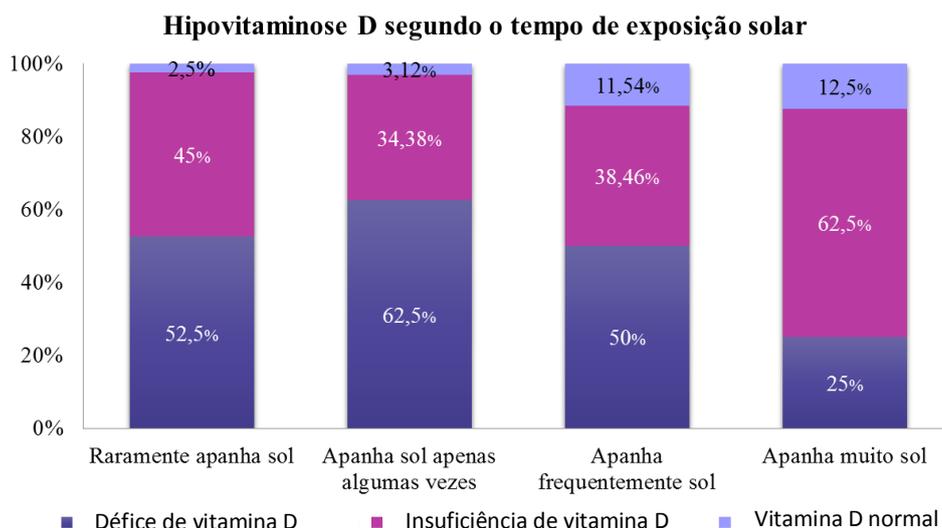
**Tabela 9** Tempo de exposição solar nas diversas faixas etárias do grupo de doentes e correlação com a existência de hipovitaminose D.

Exposição Solar	Idade Doentes					Total de indivíduos	Hipovitaminose D (%)		Vitamina D normal
	20-26	27-40	41-65	66-80	81+		Défice	Insuficiência	
Raramente	1	1	32	6	-	40	52,5	45	2,5
Por vezes	-	1	15	16	-	32	62,5	34,38	3,12
Frequentemente	-	-	-	22	4	26	50	38,46	11,54
Muito	-	-	4	1	3	8	25	62,5	12,5



**Figura 12** Representação gráfica do tempo de exposição solar dos doentes hipercolesterolémicos em estudo.

Através da Tabela 9 é possível verificar que do total de indivíduos (106) a maioria dos pacientes raramente se expõem ao sol (40 doentes), em especial nas faixas etárias 45-65 anos e 65-80 anos. Desses 40 doentes 52,5% dos doentes apresenta um défice de vitamina D e 45% uma insuficiência em vitamina D. Da restante parte da população de pacientes, 32 doentes afirmam apanhar apenas algumas vezes sol e 26 doentes é que apanham de facto sol com frequência. Em ambos os casos, a maioria dos doentes apresenta um défice de vitamina D (62,5% dos doentes que apenas algumas vezes apanham sol e 50% dos doentes que apanham frequentemente sol). Pela Figura 12, verifica-se então que a maioria dos pacientes afirma expor-se raramente ao sol (38%), outros apenas algumas vezes (30%) e em menor percentagem alguns pacientes chegam a afirmar que estão frequentemente ao sol (24 %) ou mesmo até muito ao sol (8%).



**Figura 13** Representação gráfica da hipovitaminose D e do tempo de exposição solar do grupo de doentes em estudo.

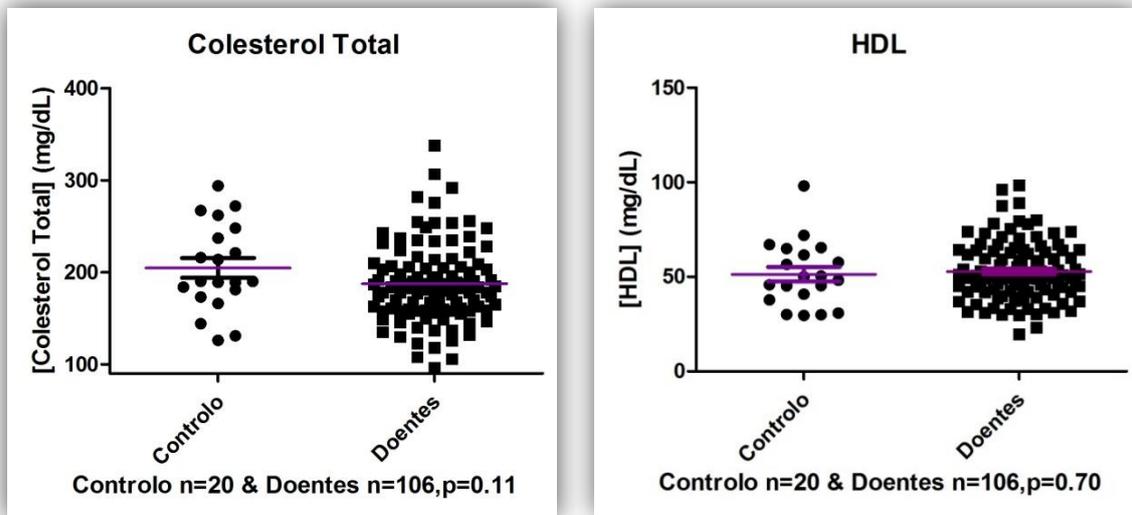
Relativamente à Figura 13 observa-se que dos doentes que raramente apanha sol, 52,5% dos casos apresenta um défice de vitamina D e nos que algumas vezes expõem-se ao sol 62,5% dos casos apresente igualmente um défice desta vitamina. A percentagem de casos com vitamina D dentro do intervalo de referência é muito baixa nestes dois casos de exposição solar (2,5% e 3,12% respectivamente). No grupo de doentes com um bom tempo de frequência ao sol, também metade dos casos apresenta um défice de vitamina D, no entanto o número de casos com níveis plasmáticos de vitamina D normais já é maior (11,54%). Por fim, o grupo de doentes que afirma apanhar bastante radiação solar, a percentagem de casos com défice em vitamina D é menor relativamente aos outros grupos (25%) e apresenta uma maior percentagem de casos com insuficiência em vitamina D. Verifica-se então que quanto maior a exposição ao sol, menor a incidência de casos com défice de vitamina D.

## 6.2 Avaliação do perfil lipídico na população com hipovitaminose D

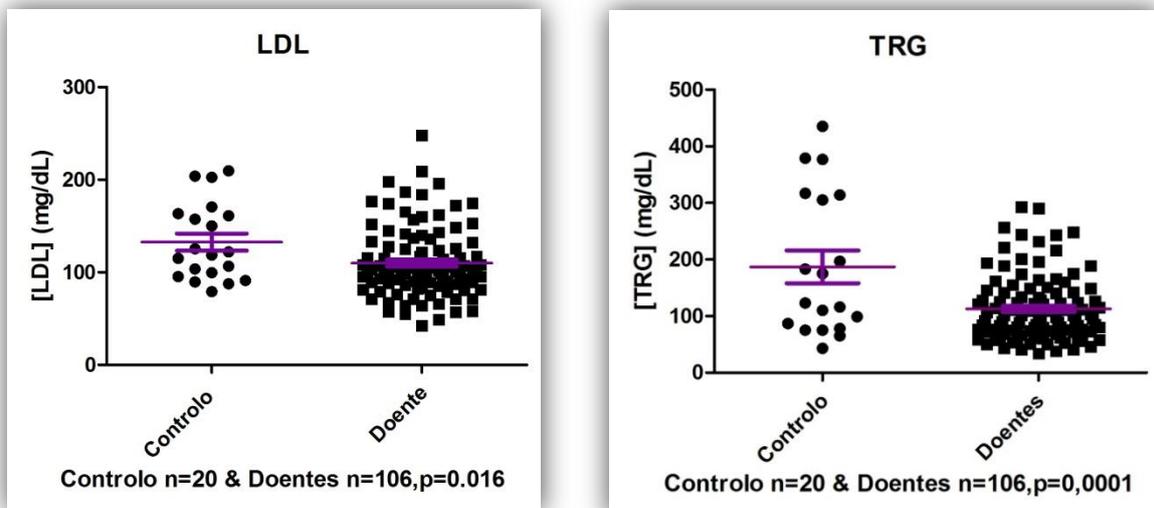
### 6.2.1 Análise dos níveis lipídicos da população em estudo e respectiva correlação com os níveis de vitamina D e estatinas

Tanto para o grupo controlo como para o grupo de pacientes em estudo, para além da avaliação aos níveis séricos de vitamina D, também se procedeu a uma análise lipídica, registando-se os níveis de colesterol total, LDL, HDL e TRG de cada indivíduo. As Figuras 14 e 15 ilustram os gráficos de distribuição dos níveis séricos dos diversos

parâmetros lipídicos com respectivas médias, desvios padrão e valor de p, tanto do grupo controlo como do grupo de doentes.



**Figura 14** Representação gráfica da distribuição dos níveis séricos de colesterol total e de HDL do grupo controlo e do grupo de doentes em estudo.



**Figura 15** Representação gráfica da distribuição dos níveis séricos de LDL e TRG do grupo controlo e do grupo de doentes em estudo.

Observando a Figura 14 verifica-se que no grupo controlo, o valor médio associado ao respectivo desvio padrão do colesterol total é  $204.7 \pm 10.61$  (n=20), e no grupo de doentes é  $187.5 \pm 4.181$  (n=106), o que significa que em ambos os grupos o nível sérico de colesterol total encontra-se relativamente controlado, tendo em conta que o intervalo

de referência é < 200mg/dL. Relativamente ao doseamento de HDL observa-se uma média de  $51.35 \pm 3.847$  (n=20) no grupo controlo e de  $52.84 \pm 1.518$  no grupo de pacientes. Uma vez que o intervalo de referência de HDL é entre 35-60 mg/dL, verifica-se que ambos os grupos apresentam uma boa média de valores.

A Figura 15 representa os resultados do doseamento de LDL e de TRG obtidos e onde é possível verificar que a média de valores para o grupo controlo relativamente ao LDL foi de  $132.6 \pm 9.341$  (N=20) e de TRG foi de  $187.0 \pm 28.97$  (N=19). Relativamente ao grupo de doentes a média obtida dos níveis séricos de LDL foi de  $109.9 \pm 3.620$  (N=106) e dos níveis séricos de TRG foi de  $112.9 \pm 5.609$  (N=106). Desta forma, verifica-se que o grupo controlo apresenta uma concentração média de LDL e TRG acima do limite máximo de referência (LDL deve-se encontrar entre 0-130 mg/dL e TRG <150 mg/dL). Relativamente ao grupo de doentes verifica-se que a média destes dois parâmetros lipídicos apresenta-se dentro dos limites de referência.

De forma a relacionar o perfil lipídico com a idade de cada individuo do grupo controlo, assim como o seu nível sérico de 25(OH)D<sub>3</sub>, a Tabela 10 representa a análise bioquímica desses mesmos parâmetros.

**Tabela 10** Representação dos parâmetros lipídicos estudados, associados à idade de cada individuo do grupo controlo e divididos em dois grupos consoante o seu nível sérico de 25(OH)D<sub>3</sub>.

Idade	Vit D	Col. T	HDL	LDL	TRG	Grupo Controlo
48	31,47	216	98	106,7	78	Vitamina D Normal
58	42,98	181	67,1	103,5	2451	
62	12,12	237	30,8	157,4	379	Vitamina D Baixa
35	12,17	221	40,8	150,2	314	
53	14,46	267	45,2	203,8	175	
42	15,62	214	45,8	163,3	75	
39	15,83	189	29,9	118,6	305	
29	16,68	190	29,5	87,6	435	
56	18,58	272	56,6	202,7	197	
24	20,2	144	48,2	89,6	87	
21	20,57	131	30,1	95,4	116	
24	20,93	126	37,8	79,2	75	
34	22,18	248	45,3	161,2	377	
37	22,29	190	57,7	122	123	
41	22,42	294	61,5	209,7	183	
21	22,43	173	64,9	99,6	110	
48	23,08	262	50,4	170,6	317	
53	26,59	189	65,4	115	65	
27	27,55	166	71,9	91,2	43	
38	28,17	184	50,1	125,3	99	

Através da Tabela 10 é possível verificar que o grupo controlo, composto por pessoas saudáveis apresenta níveis séricos de 25(OH)D<sub>3</sub> baixos, como visto nos resultados já apresentados acima na Tabela 7, e onde apenas duas pessoas saudáveis apresentam níveis dentro do intervalo de referência (>30 ng/mL). É possível também verificar que consoante a idade, os níveis de 25(OH)D<sub>3</sub> não variam significativamente. Relativamente aos níveis de colesterol verifica-se que existem alguns casos com níveis de colesterol ligeiramente elevados, no entanto pela Figura 14 verifica-se que a média de valores obtida (204,7 mg/dL) encontra-se aproximadamente no limite máximo do intervalo de referência (<200 mg/dL). O mesmo acontece com os valores séricos de LDL, que se encontram ligeiramente acima do intervalo de referência em certos casos (8 indivíduos em 20), com uma média ligeiramente elevada de 132,63 mg/dL. Os níveis de triglicédeos encontram-se muito acima do intervalo de referência uma vez que o grupo de pessoas em estudo não se encontrava em jejum no momento da colheita de sangue. Em relação aos níveis de HDL observa-se que na maioria dos casos se encontra no intervalo de referência, apresentando uma média de 51,35 mg/dL.

Para se proceder de igual forma à análise lipídica com respectiva correlação com a idade e os níveis de vitamina D do grupo de doentes em estudo, as Tabelas 11, 12 e 13 descrevem todos os resultados obtidos. Nos casos dos doentes em estudo também se acrescentou a estatina envolvida em cada caso.

**Tabela 11** Análise de doentes com vitamina D e colesterol normal, assim como dos doentes com vitamina D normal e níveis de colesterol alto, e respectiva correlação com a estatina envolvida na terapêutica da dislipidémia.

Estatina	Idade	Vit. D	Col T	HDL	LDL	TRG	Grupo de doentes
Atorvastatina	70	30,61	158	36,9	105	114	Vit. D Normal e Colesterol Normal
Sinvastatina	79	30,74	161	48,9	100,7	60	
Rosuvastatina	66	39,77	123	37,4	64	80	
Rosuvastatina	72	30,17	282	62,8	186,8	128	Vit. D Normal e Colesterol Alto
Pitavastatina	72	30,34	207	42	152,8	89	
Sinvastatina	74	30,96	204,0	78,0	110	53	

Dos 106 doentes em estudo apenas 6 doentes apresentam níveis séricos de vitamina D normais e encontram-se descritos na Tabela 11. Verifica-se que desses 6 pacientes, metade apresenta níveis de colesterol total, HDL e LDL dentro dos intervalos de referência, em análise comparativa com a Tabela 4 em material e métodos que descreve

todos os intervalos de referência de todos os parâmetros em estudo. A restante metade apresenta níveis de colesterol total ligeiramente acima do limite máximo de referência. Relativamente aos níveis de TRG verifica-se que na globalidade todos se encontram dentro do intervalo de referência.

**Tabela 12** Análise de doentes com vitamina D baixa e colesterol normal e respetiva correlação com o tipo de estatina utilizada.

Estatinas	Idade	Vit D	Col T	HDL	LDL	TRG	
Sinvastatina	76	<4,2	96,0	19,7	58,2	54,0	Vit. D Baixa e Colesterol Normal
Sinvastatina	73	4,5	106,0	29,8	57,4	62,0	
Sinvastatina	67	4,6	108,0	39,1	49,2	38,0	
Sinvastatina	81	5,5	132,0	38,5	67,0	121,0	
Sinvastatina	62	24,4	137,0	67,2	57,0	88,0	
Sinvastatina	75	24,3	140,0	42,7	75,0	85,0	
Sinvastatina	83	22,0	147,0	23,2	95,7	164,0	
Sinvastatina	76	<4,2	149,0	52,4	71,0	111,0	
Sinvastatina	71	8,6	150,0	50,8	65,9	221,0	
Sinvastatina	65	6,2	155,0	33,1	90,7	90,0	
Sinvastatina	68	6,0	156,0	50,0	85,0	81,0	
Sinvastatina	42	28,5	158,0	52,6	92,0	84,0	
Sinvastatina	65	<4,2	158,0	35,4	106,8	73,0	
Sinvastatina	64	29,9	160,0	65,4	82,1	34,0	
Sinvastatina	75	6,2	161,0	31,5	103,1	121,0	
Sinvastatina	57	9,7	165,0	49,4	99,0	61,0	
Sinvastatina	78	11,2	168,0	61,8	81,0	83,0	
Sinvastatina	78	14,8	168,0	58,7	88,2	125,0	
Sinvastatina	57	<4,2	168,0	37,0	96,0	142,0	
Sinvastatina	70	5,5	174,0	51,4	101,6	80,0	
Sinvastatina	68	24,1	175,0	66,3	95,0	58,0	
Sinvastatina	61	5,2	181,0	39,1	109,0	174,0	
Sinvastatina	84	7,7	183,0	64,3	101,5	62,0	
Sinvastatina	75	9,7	183,0	45,8	115,8	85,0	
Sinvastatina	63	21,1	184,0	74,0	93,0	59,0	
Sinvastatina	68	8,9	185,0	60,1	89,0	151,0	
Sinvastatina	79	4,3	187,0	63,1	97,7	91,0	
Sinvastatina	63	16,5	187,0	56,2	105,8	102,0	
Sinvastatina	71	8,8	190,0	64	97,2	122,0	
Sinvastatina	51	4,4	191,0	48,3	127,5	103,0	
Sinvastatina	76	5,3	191,0	64,4	104,1	81,0	
Sinvastatina	53	23,7	192,0	45,2	136,0	80,0	
Sinvastatina	70	15,8	193,0	67,3	97,0	149,0	
Sinvastatina	46	18,1	196,0	49,5	117,4	124,0	
Sinvastatina	55	10,3	198,0	55,3	123,6	111,0	
Sinvastatina	74	6,9	200,0	44,8	115,2	175,0	
Estatinas	Idade	Vit D	Col T	HDL	LDL	TRG	
Atorvastatina	63	13,3	126,0	41,8	71,0	77,0	Vit. D Baixa e Colesterol Normal
Atorvastatina	72	8,5	135,0	35,8	81,1	83,0	
Atorvastatina	59	9,3	137,0	49,0	76,0	72,0	
Atorvastatina	70	<4,2	144,0	59,5	64,0	77,0	
Atorvastatina	57	<4,2	158,0	37,9	101,0	112,0	
Atorvastatina	77	6,2	159,0	45,0	90,0	107,0	
Atorvastatina	56	18,9	167,0	79,9	71,0	76,0	
Atorvastatina	84	12,4	170,0	79,6	78,8	44,0	
Atorvastatina	69	14,1	177,0	50,1	101,8	146,0	
Atorvastatina	81	18,0	180,0	54,1	121,6	67,0	
Atorvastatina	71	4,9	184,0	58,7	107,0	96,0	
Lovastatina	63	4,6	118,0	51,9	42,4	72,0	
Lovastatina	74	<4,2	159,0	31,2	93,0	141,0	
Pitavastatina	68	24,2	160,0	49,5	98,0	92,0	
Pitavastatina	62	6,1	178,0	70,4	83,4	41,0	
Pitavastatina	47	6,2	193,0	45,1	108,0	216,0	
Pitavastatina	52	10,0	195,0	59,7	89,3	69,0	
Pravastatina	67	6,4	178,0	46,6	100,4	140,0	
Rosuvastatina	62	<4,2	146,0	42,0	71,0	166,0	
Rosuvastatina	58	18,1	149,0	31,9	79,0	194,0	
Rosuvastatina	55	9,2	158,0	33,4	89,0	115,0	
Rosuvastatina	56	21,5	163,0	53,0	87,0	56,0	
Rosuvastatina	56	7,1	178,0	53,9	98,7	123,0	
Rosuvastatina	48	16,1	178,0	67	86,1	102,0	
Rosuvastatina	66	28,4	187,0	45,9	102,6	248,0	
Rosuvastatina	72	14,8	189,0	62,4	108,0	63,0	

Através da Tabela 12 é possível verificar que a maioria do grupo de doentes se encontra neste subgrupo, ou seja, com níveis de vitamina D baixos e níveis de colesterol dentro dos limites de referência.

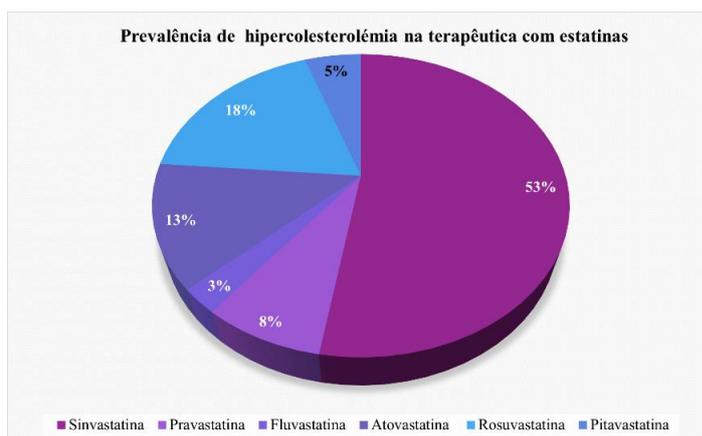
**Tabela 13** Análise de doentes com vitamina D baixa e colesterol alto e respectiva correlação com o tipo de estatina utilizada.

Estatinas	Idade	Vit D	Col T	HDL	LDL	TRG
Atorvastatina	52	<4,2	210,0	87,5	105,0	46,0
Atorvastatina	85	8,8	217,0	89,1	106,0	74,0
Atorvastatina	74	17,3	232,0	71,2	145,2	88,0
Atorvastatina	65	5,6	176,0	47,3	96,4	133,0
Atorvastatina	42	<4,2	195,0	56,9	103,0	102,0
Fluvastatina	43	13,1	234,0	30,1	174,0	196,0
Pitavastatina	53	17,1	237,0	51,3	172,0	74,0
Pitavastatina	61	26,3	163,0	42,2	98,2	155,0
Pravastatina	71	27,3	206,0	71,3	110,0	51,0
Pravastatina	58	<4,2	243,0	75,6	162,0	58,0
Pravastatina	64	7,2	292,0	40,7	209,0	201,0
Rosuvastatina	65	24,3	214,0	46,3	148,3	77,0
Rosuvastatina	66	6,7	215,0	52,9	125,1	257,0
Rosuvastatina	48	5,5	222,0	74,1	133,4	41,0
Rosuvastatina	73	16,5	235,0	44,6	132,0	290,0
Rosuvastatina	46	4,5	256,0	64,2	174,6	134,0
Rosuvastatina	83	16,4	338,0	63,7	248,0	109,0
Rosuvastatina	67	14,0	170,0	39,9	95,0	189,0
Sinvastatina	61	<4,2	203,0	33,4	115,9	293,0
Sinvastatina	56	<4,2	203,0	30,2	137,0	149,0
Sinvastatina	76	4,9	205,0	31,1	141,5	189,0
Sinvastatina	77	20,6	206,0	73,2	114,3	50,0
Sinvastatina	68	6,2	209,0	50,9	125,8	160,0
Sinvastatina	52	23,6	228,0	98,4	117,0	50,0
Sinvastatina	65	22,4	235,0	47,2	165,3	126,0
Sinvastatina	38	17,3	248,0	56,4	157,0	128,0
Sinvastatina	65	<4,2	249,0	59,3	160,0	162,0
Sinvastatina	65	7,1	254,0	33,0	176,9	244,0
Sinvastatina	61	17,4	254,0	96,2	143,0	62,0
Sinvastatina	23	5,1	255,0	43,6	196,0	69,0
Sinvastatina	58	23,7	276,0	43,4	184,0	232,0
Sinvastatina	48	16,8	307,0	48,8	198,0	243,0
Sinvastatina	62	5,1	130,0	53,5	55,0	75,0
Sinvastatina	76	14,6	155,0	49,3	80,6	109,0
Sinvastatina	51	14,9	174,0	64,3	96,0	98,0
Sinvastatina	76	<4,2	192,0	73,1	96,0	124,0
Sinvastatina	63	6,9	224,0	49,5	152,0	67,0
Sinvastatina	43	7,6	239,0	78,2	140,2	98,0

Vit. D Baixa  
e Colesterol Alto

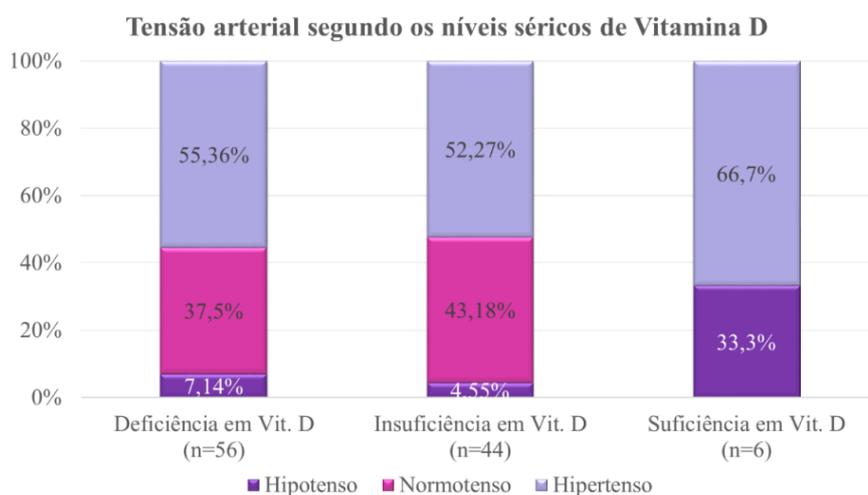
A Tabela 13 representa os pacientes que dentro do grupo de doentes apresenta níveis de vitamina D baixos e níveis de colesterol acima dos limites máximos de referência. Verifica-se que é principalmente com a terapêutica com sinvastatina que obtemos um menor controlo dos níveis séricos de colesterol.

No sentido de avaliar a acção das estatinas no controlo dos níveis de colesterol, a Figura 16 descreve a percentagem de doentes que seguem um tratamento com determinada estatina e continuam a apresentar hipercolesterolemia.



**Figura 16** Representação gráfica da prevalência de hipercolesterolemia na terapêutica com estatinas nos doentes hipercolesterolêmicos em estudo.

Outro parâmetro registado no inquérito feito aos doentes hipercolesterolêmicos em estudo foi a presença ou ausência de hipertensão, que se encontra agora descrito na Figura 17.



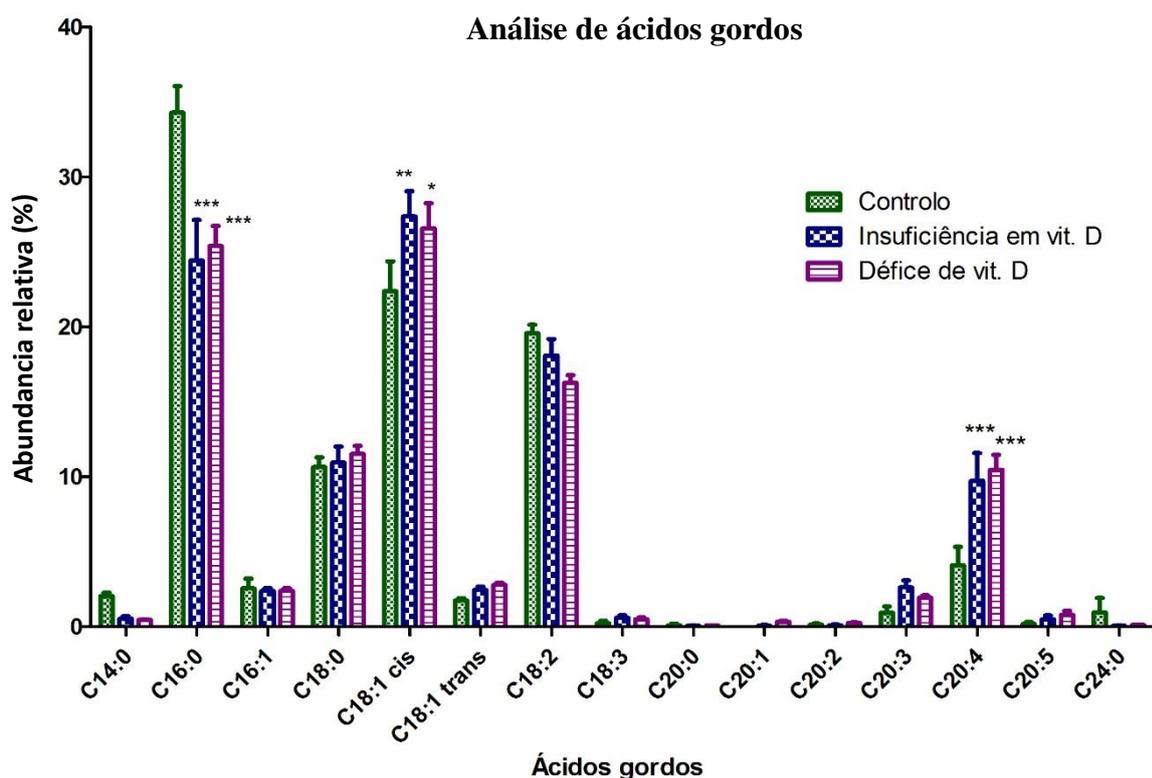
**Figura 17** Representação gráfica dos níveis de tensão arterial (hipotenso, normotenso e hipertenso) dos doentes hipercolesterolêmicos em estudo, medicados com estatinas, segundo os níveis séricos de vitamina D.

A Figura 17 mostra que 55,36% dos doentes com défice de vitamina D apresentam hipertensão, assim como mais de metade dos pacientes com níveis normais de vitamina D (52,27%) também apresenta hipertensão. A prevalência de hipertensão também se verifica no grupo de doentes com níveis normais de vitamina D, no entanto este grupo é composto por um número mais reduzido de pacientes (apenas 6 doentes- pouco

significativo). A presença de hipotensão é bastante baixa em todos os grupos, à excepção do grupo com os níveis séricos de vitamina D normais (7,14%, 4,55% e 33,3% respectivamente). Relativamente à existência de casos de tensão arterial normal, apenas se registaram nos grupos com deficiência ou insuficiência de vitamina D (37,5% e 43,18% respectivamente).

### 6.2.2 Análise do perfil de ácidos gordos

Para além da análise aos níveis de CT, LDL, HDL e TRG, o presente trabalho também teve como objectivo avaliar o perfil de ácidos gordos de alguns doentes seleccionados. Assim através de uma análise por GC-MS foi possível avaliar a variação do perfil em ácidos gordos e estimar a presença/ausência de diferenças significativas entre indivíduos sem patologias associadas do grupo controlo, relativamente a doentes com défice de vitamina D e outros com insuficiência em vitamina D.



**Figura 18** Representação gráfica da percentagem dos diferentes ácidos gordos séricos nos doentes com deficiência de vitamina D (< 10 ng/mL), comparativamente aos doentes com insuficiência de vitamina D (10-29 ng/mL) assim como ao grupo controlo (pessoas sem patologias associadas) com insuficiência de vitamina D.

**Tabela 14** Representação das abundâncias relativas dos ácidos gordos plasmáticos dos vários grupos de estudo: grupo controlo, grupo de pacientes com insuficiência em vitamina D e grupo de pacientes com défice de vitamina D.

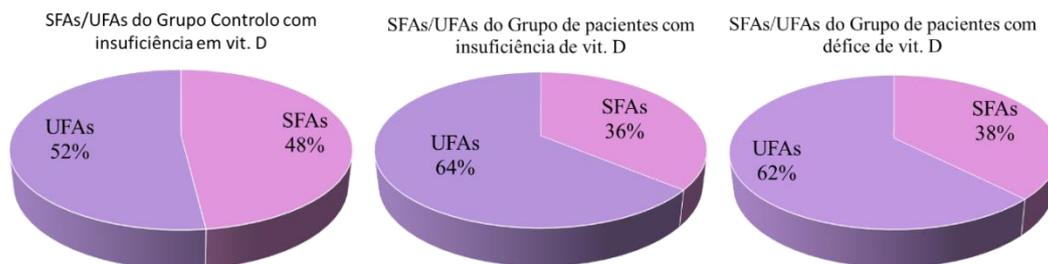
Ácidos gordos	Abundância reltiva (%) Controlo	Abundância reltiva (%) Insuficiência em vitamina D	Abundância reltiva (%) Défice em vitamina D
C14:0	2,04	0,54	0,48
C16:0	34,28	24,42	25,39
C16:1	2,56	2,39	2,41
C18:0	10,66	10,95	11,53
C18:1 cis	22,38	27,36	26,58
C18:1 trans	1,77	2,47	2,81
C18:2	19,57	18,09	16,26
C18:3	0,25	0,61	0,51
C20:0	0,12	0,06	0,09
C20:1	0	0,07	0,34
C20:2	0,14	0,11	0,25
C20:3	0,95	2,63	1,95
C20:4	4,11	9,74	10,48
C20:5	0,2	0,51	0,8
C24:0	0,97	0,05	0,12

A Figura 18 e a Tabela 14 representam os resultados obtidos da análise feita ao perfil de ácidos gordos de algumas amostras de soro da população em estudo, através da técnica GC-MS. A Figura 18 é ilustra a abundancia relativa dos vários ácidos gordos presentes no soro dos vários grupos de estudo (controlo, pacientes com insuficiência em vitamina D e pacientes com défice de vitamina D), assim como os seus desvios padrão. A Tabela 14 vem completar a informação fornecida da Figura 18, mostrando os valores percentuais das abundâncias relativas de cada ácido gordo. É possível verificar que os ácidos gordos C16:0, C18:1 cis, C18:2 e C20:4 são os mais abundantes, tanto no grupo controlo como nos grupos de pacientes. Por outro lado, os ácidos gordos menos abundantes são o C14:0, C18:3, C20:0, C20:1, C20:2, C20:3, C24:0 (à excepção no grupo controlo), C20:5.

**Tabela 15** Representação dos valores de p da análise comparativa entre os dois grupos de pacientes e o grupo controlo.

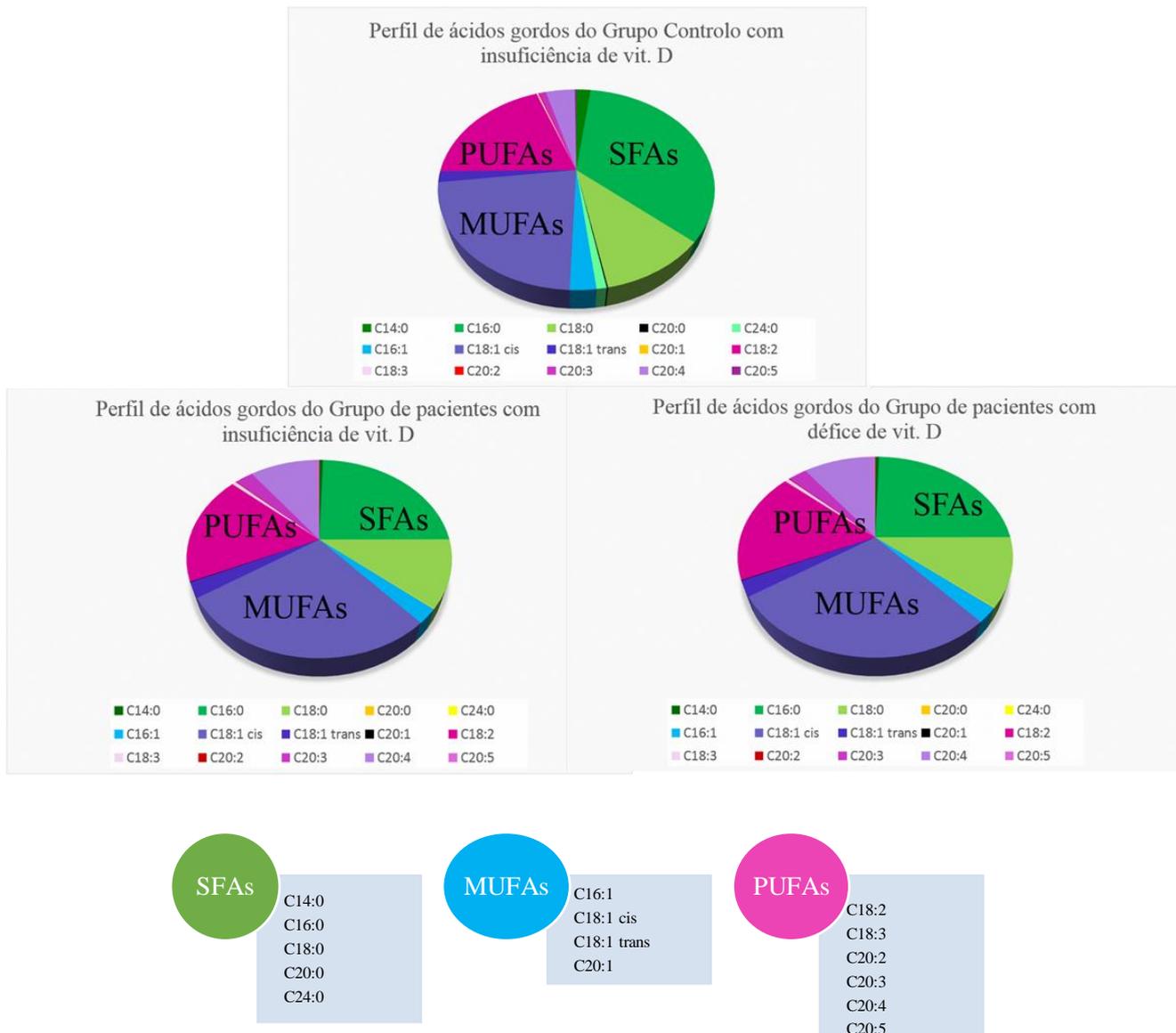
Ácidos gordos plasmáticos	Controlo vs Insuficiência em vit. D		Controlo vs Défice de vit. D	
	Valor de p	Significância	Valor de p	Significância
C14:0	P > 0.05	ns	P > 0.05	ns
C16:0	P < 0.001	***	P < 0.001	***
C16:1	P > 0.05	ns	P > 0.05	ns
C18:0	P > 0.05	ns	P > 0.05	ns
C18:1 cis	P < 0.001	**	P < 0.01	*
C18:1 trans	P > 0.05	ns	P > 0.05	ns
C18:2	P > 0.05	ns	P > 0.05	ns
C18:3	P > 0.05	ns	P > 0.05	ns
C20:0	P > 0.05	ns	P > 0.05	ns
C20:1	P > 0.05	ns	P > 0.05	ns
C20:2	P > 0.05	ns	P > 0.05	ns
C20:3	P > 0.05	ns	P > 0.05	ns
C20:4	P < 0.01	***	P < 0.001	***
C20:5	P > 0.05	ns	P > 0.05	ns
C24:0	P < 0.01	ns	P < 0.01	ns

A Tabela 15 representa os valores de p para cada ácido gordo obtido através da análise comparativa dos dois grupos de doentes relativamente ao grupo controlo. Através do programa Graph Prism realizou-se o teste estatístico Anova de 2 vias e o teste de Bonferroni para obtenção destes valores com a respectiva significância. Pela tabela de resultados (Tabela 15) verifica-se então que existem diferenças significativas entre os três grupos de estudo na abundância dos ácidos gordos C16:0, C18:1 cis, e C20:4, com valor de  $p < 0.001$ . Verifica-se que no dois grupos de doentes a abundância relativa do ácido gordo saturado C16:0 é menor do que no grupo controlo, assim como do ácido insaturado C18:2. Relativamente aos ácidos gordos insaturados C18:1 cis e C20:4 as suas abundâncias relativas são maior no grupo de doentes, tanto co insuficiência como com défice em vitamina D, relativamente ao grupo controlo.



**Figura 19** Representação gráfica da razão entre ácidos gordos saturados e insaturados nos três grupos de estudo, grupo controlo com insuficiência em vitamina D, grupo de pacientes com insuficiência em vitamina D e grupo de pacientes com défice de vitamina D. Legenda: SFAs – ácidos gordos saturados; UFAs- ácidos gordos insaturados.

Com a análise ao perfil de ácidos gordos por GC-MS foi possível estudar a razão de ácidos gordos saturados e insaturados para cada grupo de estudo. Desta forma, pela análise da Figura 19 verifica-se que relativamente ao grupo controlo a abundância relativa dos SFAs é semelhante à abundância de ácidos gordos (48% e 52%, respectivamente, com SFAs/UFAs= 0,92. Relativamente ao grupo de doentes com insuficiência em vitamina D e com terapêutica com estatinas verifica-se que a abundância de ácidos gordos insaturados nestes casos é superior à abundância de ácidos gordos saturados (64% e 36% respectivamente), apresentando uma razão entre SFAs/UFAs= 0,56. Quanto ao grupo de doentes a seguirem a terapêutica com estatinas e com um défice de vitamina D observa-se também uma maior abundância de UFAs do que SFAs, mostrando uma razão SFAs/UFAs= 0,61.



**Figura 20** Representação gráfica do perfil de ácidos gordos (saturados, monoinsaturados e polinsaturados) dos três grupos de estudo, grupo controlo com insuficiência em vitamina D, grupo de pacientes com insuficiência em vitamina D e grupo de pacientes com défice de vitamina D. Legenda: SFAs – ácidos gordos saturados; UFAs- ácidos gordos insaturados.

Também foi possível avaliar o perfil detalhado de ácidos gordos com respectiva abundância relativa e fazer uma análise comparativa entre os três grupos para verificar que classe de ácidos gordos é que predomina no soro (SFAs, MUFAs ou PUFAs). Verifica-se que no grupo controlo os ácidos gordos mais abundantes são os saturados (SFAs), principalmente o C16:0 e de seguida o C18:0 e com menor abundância os ácidos gordos polinsaturados. Relativamente ao grupo de doentes, tanto com insuficiência como com défice de vitamina D, apresentam no plasma uma maior abundância em ácidos gordos monoinsaturados (MUFAs), principalmente o ácido gordo C18:1 cis. Assim como no grupo controlo, os ácidos gordos polinsaturados (PUFAs) continuam a ser os menos abundantes no plasma nos dois grupos de doentes.

## **V. Discussão**



Através da análise dos resultados obtidos neste trabalho é possível verificar que grande parte da população em estudo (grupo controlo e grupo de doentes), apresenta hipovitaminose D (Tabela 7). Observa-se também, que existem casos de deficiência de vitamina D no grupo de doentes, o que não acontece na população saudável (grupo controlo) onde apenas se verifica uma insuficiência desta vitamina, e um número reduzido de casos com níveis séricos de vitamina D normais nos dois grupos, o que nos leva a concluir que possivelmente a população portuguesa apresenta uma carência de vitamina D, desconhecendo-se, no entanto, a verdadeira razão para este facto. Através do teste t e da análise da Figura 11, verifica-se que o grupo de doentes apresenta níveis séricos de 25(OH)D<sub>3</sub> mais reduzidos que o grupo controlo, com uma média de valores muito baixa ( $12.84 \pm 0.8484$ ). Porém, o grupo controlo, mesmo demonstrando níveis séricos de 25(OH)D<sub>3</sub> acima dos níveis séricos obtidos no grupo de doentes, também apresenta concentração média de vitamina D ( $21.82 \pm 1.620$ ) abaixo do intervalo considerado referência ( $\geq 30$  ng/mL). Contudo, é preciso ter em conta que em diversos estudos, o intervalo de referência para esta vitamina D é  $\geq 20$  ng/mL, o que colocaria a população controlo dentro dos níveis considerados referência. (3,30) Por outro lado, noutros estudos científicos, o nível indicado como referência para 25(OH)D<sub>3</sub> é igual ou superior a 30 ng/mL. (32) Devido a esta divergência de propostas sobre o intervalo de referência para a vitamina D, este assunto ainda é bastante controverso e colocado em debate em diversas pesquisas. Assim, no presente estudo, considerando o intervalo de referência para 25(OH)D<sub>3</sub>  $\geq 30$ ng/mL, verifica-se que é no grupo de doentes que se observa níveis de vitamina D mais baixos, podendo isto se dever a diversos factores, entre os quais: um comprometimento nas funções metabólicas do organismo devido a diversas patologias, podendo levar consecutivamente a um comprometimento no metabolismo endógeno desta vitamina, principalmente em casos de doença hepática ou renal (principais órgãos responsáveis pelo metabolismo da vitamina D), ou ainda devido à baixa exposição solar por parte destes doentes ou devido à terapêutica com estatinas. Pode-se verificar também, pela análise da Tabela 7, que se obteve valores de concentração de 25(OH)D<sub>3</sub> dentro do intervalo de referência nos dois grupos de estudo para faixas etárias diferentes: no grupo controlo em idades compreendidas entre os 41-65 anos e no grupo de doentes em idades entre os 66-80 anos. Para além disso, também se observou casos de insuficiência de vitamina D em todas as faixas etárias do grupo controlo e no grupo de doentes, à exceção da faixa etária mais jovem (20-40 anos). Neste ultimo grupo, a baixa percentagem de hipovitaminose D pode ser devido ao

número reduzido de doentes registados com esta idade. Adicionalmente, no grupo de doentes observa-se também a ocorrência de casos com défice de vitamina D em diversas idades, chegando até a atingir a população jovem, ainda que numa percentagem bastante reduzida (0.94%), o que comprova que a hipovitaminose D é capaz de se manifestar em qualquer idade, não demonstrando neste estudo, uma faixa etária mais susceptível à hipovitaminose D. Na tentativa de obter um melhor intervalo de confiança relativamente a estas conclusões da hipovitaminose D nas diversas idades na população portuguesa, uma sugestão para futuros trabalhos seria aumentar o número de indivíduos nos grupos em estudo.

Relativamente à análise de correlação entre estatinas e hipovitaminose D (Tabela 8) verifica-se que, de um modo geral, em nenhuma terapêutica com as diversas estatinas, a média de concentração de 25(OH)D<sub>3</sub> se encontra dentro do intervalo de referência, supondo desta forma, que estes fármacos muito provavelmente não contribuirão para o aumento desta vitamina, como dito anteriormente em diversos estudos. (33,40,73) No entanto, verifica-se que existem doentes com os níveis de 25(OH)D<sub>3</sub> dentro do intervalo de referência na terapêutica com sinvastatina, atorvastatina, rosuvastatina e pitavastatina, ainda que em número reduzido (Tabela 8). Tendo em conta o que já foi publicado na literatura, seria de esperar valores séricos de vitamina D normais ou elevados na terapêutica com rosuvastatina, atorvastatina e lovastatina, uma vez que diversos estudos apontam para um aumento da metabolização desta vitamina no organismo com a toma destes fármacos. (41,72,74) No entanto, com nenhuma destas estatinas se atingiu uma média de concentração de 25(OH)D<sub>3</sub> dentro do intervalo de referência (> 30ng/mL). Contudo, os doentes medicados com rosuvastatina são os que apresentam níveis séricos de 25(OH)D<sub>3</sub> mais elevados (à excepção dos doentes medicados com pitavastatina), com uma média de 16,29 ng/mL e com 11,77% de doentes com valores superiores a 30 ng/mL. A estatina com melhor média de concentração de 25(OH)D<sub>3</sub> é a pitavastatina, porém não existem estudos científicos que descrevam a sua acção no metabolismo da vitamina D. Porém, através de uma análise comparativa aos resultados obtidos com pitavastatina e as restantes estatinas, verifica-se que é com este fármaco que se atinge a melhor média de concentração de 25(OH)D<sub>3</sub> (17,17 ng/mL) e com o maior número de doentes com níveis séricos de vitamina D superiores a 30 ng/mL (14,29%), assim como a que apresenta uma menor percentagem de casos com défice de vitamina D (28,57%). No entanto, serão necessários mais estudos e com um maior número de doentes a seguir esta medicação para se tirar

conclusões mais assertivas desta relação entre pitavastatina e os níveis séricos de vitamina D. A lovastatina, ainda que considerada como uma das estatinas com capacidade para aumentar os níveis séricos de vitamina D, apresenta dois casos de défice de vitamina D, no entanto devido ao baixo número de doentes em estudo não se pode tirar conclusão sobre a sua verdadeira acção no metabolismo desta vitamina. Relativamente à atorvastatina, também considerada como outro fármaco que aumenta os níveis de vitamina D no organismo, verifica-se através dos doentes estudados (17) que mais de metade apresenta défice de vitamina D (58,83%) e apenas 5,88% apresenta níveis dentro do intervalo de referência, apresentando assim uma média de concentração de 25(OH)D<sub>3</sub> muito baixa, 10,86 ng/mL. As restantes estatinas, fluvastatina, sinvastatina e pravastatina, são já conhecidas por não interferirem no metabolismo endógeno da vitamina D, o que não põe em causa os baixos níveis séricos 25(OH)D<sub>3</sub> obtidos nestes casos, mesmo não sabendo à partida a razão de estarem tão diminuídos.

Com esta análise detalhada aos níveis séricos de vitamina D em cada terapêutica (Tabela 8) foi possível verificar que as estatinas de segunda geração (fluvastatina, rosuvastatina, atorvastatina e pitavastatina) apresentaram uma menor incidência de casos com défice de vitamina D (à excepção da atorvastatina) e com médias de concentração de 25(OH)D<sub>3</sub> mais elevadas que as médias obtidas com as estatinas de primeira geração (sinvastatina, lovastatina e pravastatina).

Por fim, após a análise da relação entre as diversas estatinas e os níveis de hidroxivitamina D, confirma-se que são necessários estudos mais aprofundados sobre a acção das estatinas nos níveis de vitamina D para perceber se de facto estes fármacos inibem o metabolismo da vitamina D ou se, por outro lado, são capazes de aumentar os níveis séricos desta vitamina.

Sabe-se que é através de uma boa exposição solar que o organismo tem a capacidade de metabolizar vitamina D e controlar os níveis séricos deste metabolito, uma vez que é este metabolismo endógeno o principal responsável por regular os níveis séricos desta vitamina no organismo (90%). (11,13) Se hoje em dia a população não apresenta um tempo de exposição solar razoavelmente longo na sua vida quotidiana, a síntese endógena da vitamina D poderá estar comprometida e possivelmente os níveis séricos desta vitamina encontrar-se-ão diminuídos. Para além disso, hoje em dia, torna-se obrigatório o uso de protectores solares devido ao perigo das radiações que hoje atingem a superfície terrestre, no entanto eles impedem a síntese de vitamina D cutânea (um protector solar com factor de protecção 15 já chega a bloquear aproximadamente

99% da produção de vitamina D na pele). (54) Através deste estudo é possível verificar que uma boa parte da população de doentes em estudo apanha pouco sol (38%-raramente apanham sol e 30% apenas algumas vezes), possivelmente uma das razões para os baixos níveis séricos de 25(OH)D<sub>3</sub> (Tabela 9 e Figura 12). Através da Tabela 9 e da Figura 13 verifica-se que mais de metade dos doentes que raramente ou por vezes apanham sol, apresentam défice de vitamina D (52,5% e 62,5% dos doentes respectivamente), corroborando a ideia de que uma baixa exposição solar se encontra relacionada com baixos níveis de vitamina D. Porém, dos doentes que afirmam apanhar frequentemente sol, também metade desse grupo de pacientes apresenta um défice desta vitamina (50%). Todavia, é no grupo de doentes que apanham frequentemente ou muito sol que a percentagem de casos com níveis séricos de vitamina D dentro do limite de referência é maior (11,54% e 12,5% respectivamente). A grande percentagem de casos com défice de vitamina D na população que apanha muito sol pode ser justificada pela toma de estatinas (uma vez que podem interferir no metabolismo da vitamina D), ou por patologias crónicas, que comprometam a síntese endógena de 25(OH)D<sub>3</sub>, ou ainda pelo uso de protectores que impedem a epiderme de receber a radiação UVB. Esta prevalência de hipovitaminose D na população merece grande atenção, uma vez que a carência desta vitamina no organismo se encontra directamente relacionada com o aumento do risco de diversas patologias, entre as quais as DCV. (39–41)

Tem sido abordado em diversos estudos referentes às patologias cardiovasculares, que um dos problemas mais significativos neste tipo de patologia são os níveis aumentados de lípidos no plasma. (123) Geralmente, este conceito de lípidos aumentados encontra-se relacionado com o aumento dos níveis plasmáticos de lipoproteínas, em especial as LDL, e em consequência, níveis aumentados de colesterol total, assim como por vezes também se encontra associado a níveis aumentados de triglicédeos. Uma vez que a toma das estatinas serve essencialmente para controlar os níveis de lípidos no plasma, principalmente do colesterol, o presente estudo também avaliou os níveis séricos dos lípidos na população em estudo. Através da Figura 14 e da análise estatística realizada (teste t para cálculo de médias e desvio padrão) verifica-se que a população controlo apresenta níveis de colesterol total aproximadamente entre os 100 e os 300 mg/dL, com maior distribuição na zona dos 200 mg/dL ( média de concentração de  $204.7 \pm 10.61$ , ligeiramente acima do limite máximo de referência que é 200 mg/dL). Quanto ao grupo de doentes verifica-se uma maior incidência de casos com uma concentração sérica de CT à volta dos 100 mg/dL, ainda que existam doentes com níveis acima de 200 mg/dL,

apresentando assim uma média de concentração de  $187,5 \pm 4,181$ , que se encontra dentro dos limites de referência. Deste modo, verifica-se que a população em estudo apresenta níveis de colesterol total controlados, não contribuindo para um maior risco de DCV. Juntamente com a análise do CT, também se avaliaram os níveis de HDL, LDL e TRG, também muito importantes para a avaliação do risco de DCV. Da mesma forma que a concentração sérica de CT, a concentração média de HDL nos dois grupos encontra-se dentro dos limites de referência ( $51,35 \pm 3.847$  no grupo controlo e  $52,84 \pm 1,518$  no grupo de doentes) (Figura 14). Já as médias de concentração sérica de LDL e TRG no grupo controlo encontram-se acima do limite máximo de referência, aumentando assim o risco de desenvolvimento de DCV, se não controlarem atenuadamente estes níveis lipídicos. Relativamente à população de doentes medicadas com estatinas observam-se concentrações médias de LDL e TRG dentro do intervalo de referência, indicando desta forma que a medicação está a surtir efeito nestes pacientes (Figura 15). No entanto, ainda se observaram casos de hipercolesterolemia neste grupo. Assim foi importante avaliar em que terapêutica se obtiam níveis séricos lipídicos acima do intervalo de referência. Através da análise comparativa entre as Tabelas 11, 12 e 13 e pela Figura 16 verificou-se que a terapêutica com sinvastatina é a que mais casos apresenta de hipercolesterolemia (53%). A prevalência de altos níveis séricos de colesterol, mesmo com a toma estatinas, pode ser devido a diversos fatores, entre os quais: uma má metabolização do fármaco no organismo, uma má posologia ou ainda uma alimentação rica em lípidos. É possível também observar através da Figura 16, que as estatinas de segunda geração (rosuvastatina, fluvastatina, atorvastatina e pitavastatina) são as que apresentam menos casos de hipercolesterolemia, corroborando então a ideia de que são mais eficazes no controlo dos níveis séricos de colesterol. (66) No entanto, a sinvastatina, continua a ser a estatina mais utilizada, como se pode verificar nas Tabelas 11, 12 e 13 (58 doentes em estudo), possivelmente devido à sua relação custo/eficácia. (65)

Para além da avaliação dos níveis séricos lipídicos e dos níveis séricos de  $25(\text{OH})\text{D}_3$ , este trabalho também teve como objecto de estudo a percentagem de casos com hipertensão arterial na população de doentes, uma vez que em diversos estudos científicos o aumento do risco de DCV em casos de hipovitaminose D, se encontra directamente relacionado com um aumento da pressão arterial. (34) De forma a avaliar a incidência de hipertensão e a sua relação com os níveis séricos de  $25(\text{OH})\text{D}_3$ , a Figura 17 descreve a relação entre a tensão arterial nos diversos casos de hipovitaminose D.

Verificou-se então, que independentemente de se tratar de um caso de déficit ou insuficiência de vitamina D, a prevalência de hipertensão nos doentes é bastante acentuada em ambos os casos (55,36% e 52,27% respectivamente). Este facto apoia então a ideia de que em casos de hipovitaminose D, a expressão de renina pode estar aumentada e contribuir para o aumento da pressão arterial, como dito em estudos anteriores. (34,45,46) Nos doentes com os níveis de 25(OH)D<sub>3</sub> dentro do intervalo de referência também se registaram casos de hipertensão, no entanto, este grupo apresenta um número total de indivíduos pouco significativo (6 doentes), o que não permite fazer uma avaliação concreta da verdadeira incidência de hipertensão neste grupo de doentes. Assim, os dados da população em estudo parecem apoiar a ideia de que a hipovitaminose D encontra-se directamente relacionada com um aumento da tensão arterial, aumentando deste forma o risco de DCV.

No entanto, o que mais caracteriza as doenças cardiovasculares são os níveis elevados de colesterol no sangue, principalmente LDL, dando origem a eventos ateroscleróticos e um aumento da tensão arterial. As LDL são constituídas maioritariamente por colesterol, e como tal encontra-se sempre associada a um aumento de CT. Porém, as lipoproteínas são também transportadoras de fosfolípidos e ácidos gordos que podem estar na forma livre ou como componentes dos fosfolípidos. Existem diversos estudos que reportam a importância da variação do perfil de ácidos gordos plasmáticos com o risco de doença cardiovascular, relacionando o efeito pejorativo dos ácidos gordos saturados com o efeito benéfico dos ácidos gordos insaturados. (92,95) É certo, que com o estilo de vida e dieta ocidental, a ingestão de SFAs é muito elevada, e consequentemente o risco de DCV encontra-se aumentado. (95) Assim, o presente trabalho analisou o perfil de ácidos gordos de alguns doentes seleccionados e avaliou a possível relação entre o perfil de ácidos gordos e a presença de hipovitaminose D, assim como avaliou a possível relação entre o perfil de ácidos gordos e a terapêutica com estatinas. A Figura 18 descreve então o perfil de ácidos gordos obtidos por GC-MS, dos três grupos de estudo (grupo controlo com insuficiência de vitamina D e sem terapêutica com estatinas, grupo de doentes com insuficiência de vitamina D a seguiram a terapêutica com estatinas e grupo de doentes com déficit de vitamina D a seguiram a terapêutica com estatinas). Observou-se então que o perfil de ácidos gordos entre pessoas com déficit de vitamina D e com insuficiência em vitamina D não variava significativamente, sugerindo desta forma, que baixos níveis de vitamina D não se encontram directamente relacionados com uma alteração no perfil de ácidos gordos. No

entanto, comparando o grupo de pessoas saudáveis (grupo controlo) com o grupo de pacientes a tomar estatinas, (ambos com insuficiência em vitamina D, de forma a não ser um factor de variação), verifica-se que o grupo controlo apresenta uma maior abundância relativa de ácidos gordos saturados (Figura 18) e uma menor abundância de ácidos gordos insaturados. Este facto sugere que a terapêutica com estatinas, pode interferir com o perfil de ácidos gordos e de certo modo diminuir os níveis de SFAs plasmáticos que mais contribuem para o desenvolvimento de DCV, desconhecendo-se à partida o mecanismo subjacente. Através de uma análise mais detalhada da Figura 18 e Tabela 14 é possível também observar-se, que os ácidos gordos predominantes no soro de ambos os grupos são o ácido palmítico (C16:0), o ácido esteárico (C18:0), o ácido oleico (C18:1), o ácido linoleico (C18:2) e o ácido araquidónico (C20:4). Verifica-se também, que existem diferenças significativas entre o grupo controlo e os dois grupos de doentes em estudo, na abundância relativa do ácido gordo saturado C16:0 e nos ácidos gordos insaturados C18:1 cis e C20:4 (Tabela 15), onde a maior percentagem de UFAs se encontra no grupo de doentes tratados com estatinas, que desta forma diminuem o risco de DCV. (98,99)

Sabendo que a dieta ocidental e principalmente nos países industrializados é composta essencialmente por SFAs, seria de esperar uma maior abundância deste tipo de ácidos gordos ao nível plasmático e uma baixa abundância em ácidos gordos insaturados, no entanto isso não se verificou (Figura 18 e Tabela 14). Para além disso, na região ocidental também se verifica um elevado consumo de ómega-6 PUFAs, e um baixo consumo de ácidos gordos ómega-3 PUFAs. (95) Na verdade é possível observar-se no perfil de ácidos gordos (Figura 18 e Figura 20) a presença do ácido araquidónico (AA) (C20:4), o principal ácido gordo ómega-6 presente na dieta. Relativamente à abundância relativa deste ácido gordo, observa-se que este se encontra mais abundante nos grupos de doentes do que no grupo controlo. A presença deste ácido gordo ao nível plasmático pode contribuir para processos inflamatórios, e consequentemente a um maior risco de DCV, uma vez que este ácido gordo é precursor dos eicosanóides, responsáveis por regular a função imune e inflamatória no organismo. (111) A substituição do AA (ácido gordo  $\omega$ -6), precursor de TxA<sub>2</sub>, nos fosfolípidos membranares das plaquetas, por EPA e DHA (ácidos gordos ómega-3 encontrados na dieta rica em peixe) proporciona uma menor produção de TxA<sub>2</sub> reduzindo a agregação plaquetária (Figura 7). Além disso, também provocam um efeito inibidor sobre a enzima cicloxigenase (COX), que liga AA a TxA<sub>2</sub> conduzindo a um estado trombogénico mais reduzido. (100) Assim, seria

benéfico para este tipo de doentes, mesmo com a toma de estatinas reduzir o consumo de SFAs e aumentar o consumo de ácidos gordos ómega-3 em detrimento dos ácidos gordos ómega-6. Uma vez que a vitamina D e os ácidos gordos  $\omega$ -3 se encontram nas mesmas fontes alimentares (essencialmente peixes e óleos de peixe), seria benéfico para estes doentes seguirem uma dieta rica neste tipo de alimentos. (111) É preciso ter em conta também, que existem interações significativas entre os diferentes tipos ácidos gordos, o que faz com que seja importante avaliar a razão entre SFAs e UFAs no organismo. Um estudo demonstra que a razão entre SFAs e UFAs deve cair no intervalo entre 0,5 e 1. (95) Através da análise da Figura 19 e do ratio SFAs/UFAs realizado para cada grupo, verifica-se que nos três grupos se obtém uma razão entre SFAs e UFAs dentro do intervalo recomendado. Um estudo de intervenção, onde a população em estudo teve um decréscimo na ingestão de SFA e um aumento simultâneo do consumo de UFAs, registou uma redução primária na incidência de doença coronariana em pacientes com hipercolesterolemia. (124) Dos três grupos em estudo verifica-se que o grupo de doentes com insuficiência em vitamina D e a tomar estatinas, é o grupo que apresenta uma razão SFAs/UFAs mais baixa (0,56), e conseqüentemente um menor risco de DCV devido a uma menor abundância em SFAs.

Por fim, após a análise de todos os resultados obtidos, verifica-se que de facto existe uma grande prevalência de hipovitaminose D nos pacientes a tomarem estatinas, que pode pôr em causa o risco de DCV. O nível de colesterol nestes pacientes encontra-se de facto controlado pela terapêutica com hipocolesterolémicos, mas o risco de desenvolver doenças cardiovasculares ainda é posto em causa, uma vez que uma carência de vitamina D assim como baixos níveis de ácidos gordos ómega-3 no organismo, se encontram relacionados com um aumento do risco dessas patologias.

## **VI. Conclusão**



Com este trabalho científico foi possível verificar que a hipovitaminose D afecta a população portuguesa, não só nos doentes a seguirem a terapêutica com estatinas, como também na população saudável, sem patologias associadas. Mesmo sendo um país com a presença de sol em grande parte do ano, as pessoas apresentam uma carência de vitamina D talvez devido a diversos factores, entre os quais: o uso de protectores solares que impedem a pele de receber a radiação UVB, ao estilo de vida que impossibilita as pessoas hoje em dia de apanharem sol, assim como a toma de alguns fármacos que condicionam o metabolismo desta vitamina no organismo. Na população em estudo verificou-se então uma grande incidência de hipovitaminose D em todas as faixas etárias e nas diversas terapêuticas com estatinas. Ao contrário do que é descrito em alguns estudos, este trabalho demonstra que a terapêutica com estatinas não parece aumentar os níveis de vitamina D. No entanto, mais estudos são necessários para avaliar o efeito de cada estatina no metabolismo da vitamina D, e preferencialmente com um maior número de indivíduos. Adicionalmente, este trabalho pretende também demonstrar, que mesmo controlando os níveis séricos de colesterol com a toma de estatinas, o risco dos doentes poderem vir a desenvolver DCV ainda existe, uma vez que tanto a carência de vitamina D, como o baixo nível de n-3 PUFA e o elevado nível de n-6 PUFA (C20:4 principalmente), se encontram relacionados com um maior risco dessas patologias. O presente estudo sugere que a combinação de vitamina D e n-3 PUFA na terapêutica com estatinas parece ser promissora na redução do risco de DCV.

Já são muitos os estudos que descrevem os efeitos benéficos da vitamina D e a segurança da sua utilização, no entanto o seu doseamento e a sua utilização como terapêutica, ainda são poucos postos em prática. Assim, o presente trabalho pretende consciencializar a população e as entidades médicas para os efeitos benéficos da vitamina D, e realçar a importância do seu doseamento na prática clínica, de forma a minimizar a incidência de hipovitaminose D na população portuguesa.



## **VII. Bibliografia**



1. Mosekilde L. Vitamin D and the elderly. *Clin Endocrinol.* 2005;62(3):265-81.
2. Thacher T., Fischer P., Strand M., Pettifor J. Nutritional rickets around the world: causes and future directions. *Ann. Trop. Paediatr.* 2006;26:1–16.
3. Holick M. Vitamin D deficiency. *N. Engl. J. Med.* 2007;357(3):266–81.
4. Lips P., Duong T., Oleksik A., Black D., Cummings S., Cox D. A global study of vitamin D status and parathyroid function in postmenopausal women with osteoporosis: baseline data from the multiple outcomes of raloxifene evaluation clinical trial. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2001;86(3):1212–21.
5. Van Schoor N., Lips P. Worldwide vitamin D status. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 2011;25(4):671–80.
6. Lips P. Vitamin D Deficiency and Secondary Hyperparathyroidism in the Elderly : Consequences for Bone Loss. *Endocr. Rev.* 2001;22(4):477-501.
7. Holick F. Vitamin D- new horizons for the 21st century. *Am J Clin Nutr .* 1994;60:619-30.
8. Silva L., Freitas J., Sampaio L., Terroso G., Pinto J., Veludo V. Níveis séricos de vitamina D em portugueses com fracturas de fragilidade. *Acta Reumatol Port.*2010;35(3):352–357.
9. Canhão H., Fonseca J., Queirós V. Avaliação de hábitos alimentares e estilos de vida numa população portuguesa- factores de risco e de protecção para a osteoporose. *Acta Reumatol Port.* 2006;31(4):331-339.
10. Lucas R, Costa L, Barros H. Ingestão de cálcio e vitamina D numa amostra urbana de mulheres Portuguesas. *Arquivos de Medicina* 2005;19:7-14.
11. Reddy V., Good M., Howard P., Vacek J. Role of vitamin D in cardiovascular health. *Am. J. Cardiol.* 2010;106(6):798–805.
12. Braithwaite M., Kumar P., Tyagi C., Tomar L., Choonara Y., Pillay V. Vitamin D therapy and related metabolomics: is the calciferol dose and form the only requirements for successful clinical therapeutics? *Med. Hypotheses.* 2013;81(4):656–63.
13. Lips P. Vitamin D physiology. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 2006;92(1):4–8.
14. Holick M. Science in medicine Resurrection of vitamin D deficiency and rickets. *J. Clin. Invest.* 2006 Aug;116(8):2062-72.

15. Nykjaer A., Dragun D., Walther D., Vorum H., Jacobsen C., Herz J. An endocytic pathway essential for renal uptake and activation of the steroid 25-(OH) vitamin D<sub>3</sub>. *Cell*. 1999;96(4):507–15.
16. Peterlik M., Cross H. Vitamin D and calcium deficits predispose for multiple chronic diseases Part I: hypovitaminosis D. *Eur J Clin Invest*. 2005;3:290–304.
17. Adams J., Hewison M. Update in vitamin D. *J. Clin. Endocrinol. Metab*. 2010;95:471–8.
18. Deeb K., Trump D., Johnson C. Vitamin D signalling pathways in cancer: potential for anticancer therapeutics. *Nat.Rev.Cancer*. 2007;7:684–700.
19. Nagpal S., Na S., Rathnachalam R. Noncalcemic actions of vitamin D receptor ligands. *Endocr. Rev*. 2005;26(5):662–87.
20. Pálmer H., Sánchez C., Ordóñez M., Larriba M., Cordón C., Muñoz A. Genetic signatures of differentiation induced by 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> in human colon cancer cells. *Cancer Res*. 2003;63(22):7799–806.
21. Palmer H. Vitamin D<sub>3</sub> promotes the differentiation of colon carcinoma cells by the induction of E-cadherin and the inhibition of beta-catenin signaling. *J. Cell Biol*. 2001 Jul 16;154(2):369–88.
22. Pfeifer M., Begerow B., Minne H., Nachtigall D., Hansen C. Effects of a short-term vitamin D(3) and calcium supplementation on blood pressure and parathyroid hormone levels in elderly women. *J. Clin. Endocrinol. Metab*. 2001;86(4):1633–7.
23. Qiao G., Kong J., Uskokovic M., Li Y. Analogs of 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D(3) as novel inhibitors of renin biosynthesis. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol*. 2005;96(1):59-66.
24. Li Y., Qiao G., Uskokovic M., Xiang W., Zheng W., Kong J. Vitamin D: a negative endocrine regulator of the renin-angiotensin system and blood pressure. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol*. 2004;89-90(1-5):387–92.
25. Schuch N., Garcia V., Martini L. Vitamina D e as doenças endocrinometabólicas. *Arq. Bras. Endocrinol. Metab*. 2009;625–33.
26. Bischoff F., Giovannucci E., Willett W., Dietrich T., Dawson H. Estimation of optimal serum concentrations of 25-hydroxyvitamin D for multiple health outcomes. *Am. J. Clin. Nutr*. 2006;84(1):18–28.

27. Marques C., Dantas A., Fragoso T., Duarte A. The importance of vitamin D levels in autoimmune diseases. *Bra. J. Reumatol.* 2010;50(1):67-80.
28. Lips P. Relative Value of 25(OH)D and 1,25(OH)<sub>2</sub>D Measurements. *J. Bone Miner. Res.* 2007;22(11):1668–71.
29. Ponda M., Dowd K., Finkelstein D., Holt P., Breslow J. The short-term effects of vitamin D repletion on cholesterol: a randomized, placebo-controlled trial. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2012;32(10):2510–5.
30. Ross C., Manson J., Abrams S., Aloia J., Brannon P., Clinton S. The 2011 report on dietary reference intakes for calcium and vitamin D from the Institute of Medicine: what clinicians need to know. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2011;96(1):53–8.
31. Need A., Loughlin P., Morris H., Coates P., Horowitz M., Nordin B. Vitamin D metabolites and calcium absorption in severe vitamin D deficiency. *J. Bone Miner. Res.* 2008;23(11):1859–63.
32. Vieth R., Bischoff H., Boucher B., Dawson B., Garland C., Heaney R. The urgent need to recommend an intake of vitamin D that is effective. *Am. J. Clin. Nutr.* 2007;85(3):649-50.
33. Xu Y., Hashizume T., Shuhart M., Davis C., Nelson W., Sakaki T. Intestinal and Hepatic CYP3A4 Catalyze Hydroxylation of 1 alpha, 25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>: Implications for Drug-Induced Osteomalacia. *Mol. Pharmacol.* 2006;69(1):56-65.
34. Li Y., Kong J., Wei M., Chen Z., Liu S., Cao L. 1, 25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> is a negative endocrine regulator of the renin-angiotensin system. *J. Clin. Invest.* 2002;110(2):229-38.
35. Penna G., Roncari A., Amuchastegui S., Daniel K., Berti E., Colonna M. Expression of the inhibitory receptor ILT3 on dendritic cells is dispensable for induction of CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells by 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>. *Blood.* 2005;106(10):3490–7.
36. Liu P., Stenger S., Li H., Wenzel L., Tan B., Krutzik S. Toll-like receptor triggering of a vitamin D-mediated human antimicrobial response. *Science.* 2006;311:1770–3.
37. Demille D., Piscitelli M., Ocker A., Vuong C., Hartner L., Lynch M. Vitamin D deficiency in the oncology setting. *J. Community Support Oncol.* 2014;12(1):13-9.

38. Grant W. An Estimate of Premature Cancer Mortality in the U . S . Due to Inadequate Doses of Solar Ultraviolet-B Radiation. *Cancer*. 2002;94:1867-75.
39. Kim D., Sabour S., Sagar U., Adams S., Whellan D. Prevalence of hypovitaminosis D in cardiovascular diseases (from the National Health and Nutrition Examination Survey 2001 to 2004). *Am. J. Cardiol*. 2008;102(11):1540-4.
40. Yavuz B., Ertugrul D., Cil H., Ata N., Akin K., Yalcin A. Increased levels of 25 hydroxyvitamin D and 1,25-dihydroxyvitamin D after rosuvastatin treatment: a novel pleiotropic effect of statins? *Cardiovasc. Drugs Ther*. 2009;23(4):295-9.
41. Ertugrul D., Yavuz B., Cil H., Ata N., Akin K., Kucukazman M. STATIN-D Study: Comparison of the Influences of Rosuvastatin and Fluvastatin Treatment on the Levels of 25 Hydroxyvitamin D. *Cardiovasc. Ther*. 2011;29(2):146-52.
42. Melamed M., Michos E., Post W., Astor B. 25-hydroxyvitamin D levels and the risk of mortality in the general population. *Arch. Intern. Med*. 2008;168(15):1629-37.
43. Giovannucci E., Liu Y., Hollis B., Rimm E. 25-Hydroxyvitamin D and Risk of Myocardial Infarction in Men. *Arch. Intern. Med*. 2008;168(11):1174-80.
44. Judd S., Tangpricha V. Vitamin D deficiency and risk for cardiovascular disease. *Am. J. Med. Sci*. 2009;338:40-4.
45. Hagström E., Hellman P., Larsson T., Ingelsson E., Berglund L., Sundström J. Plasma parathyroid hormone and the risk of cardiovascular mortality in the community. *Circulation*. 2009;119(21):2765-71.
46. Zittermann A., Schleithoff S., Koerfer R. Putting cardiovascular disease and vitamin D insufficiency into perspective. *Br. J. Nutr*. 2007;94(04):483.
47. Mancuso P., Rahman A., Hershey S., Dandu L., Nibbelink K., Simpson R. Hypertrophy and Left Ventricular Diameter in Spontaneously Hypertensive Heart Failure – prone ( cp / + ) Rats Independent of Changes in Serum Leptin. *J. Cardiovasc. Pharmacol*. 2008;51(6):559-64.
48. Green J., Robinson D., Wilson G., Simpson R., Westfall M . Calcitriol modulation of cardiac contractile performance via protein kinase C. *J. Mol. Cell. Cardiol*. 2006;41(2):350-9.
49. Karhapää P., Pihlajamäki J., Pörsti I., Kastarinen M., Mustonen J., Niemelä O. Diverse associations of 25-hydroxyvitamin D and 1,25-dihydroxy-vitamin D with dyslipidaemias. *J. Intern. Med*. 2010;268(6):604-10.

50. Bailey R., Dodd K., Goldman J., Gahche J., Dwyer J., Moshfegh A. Estimation of Total Usual Calcium and Vitamin D Intakes in the United States. *J. Nutr.* 2010;817–22.
51. Simpson R., Hershey S., Nibelink K. Characterization of heart size and blood pressure in the vitamin D receptor knockout mouse. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 2007;103(3-5):521–4.
52. Rahman A., Hershey S., Ahmed S., Nibelink K., Simpson R. Heart extracellular matrix gene expression profile in the vitamin D receptor knockout mice. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 2007;103(3-5):416–9.
53. Jorde R., Sneve M., Torjesen P., Figenschau Y. No improvement in cardiovascular risk factors in overweight and obese subjects after supplementation with vitamin D<sub>3</sub> for 1 year. *J. Intern. Med.* 2010;267(5):462–72.
54. Güttler N., Zheleva K., Parahuleva M., Chasan R., Bilgin M., Neuhof C. Omega-3 Fatty acids and vitamin d in cardiology. *Cardiol. Res. Pract.* 2012:729670.
55. Endo A. A historical perspective on the discovery of statins. *Proc. Japan Acad. Ser.* 2010;86(5):484–93.
56. Ridker P., Danielson E., Fonseca F., Genest J., Gotto A., Kastelein J. Rosuvastatin to prevent vascular events in men and women with elevated C-reactive protein. *N. Engl. J. Med.* 2008;359:2195–207.
57. Rasmussen J., Chong A., Alter D.. Relationship between adherence to evidence-based pharmacotherapy and long-term mortality after acute myocardial infarction. *JAMA.* 2007;297:177–86.
58. Ho P., Rumsfeld J., Masoudi F., McClure D., Plomondon M., Steiner J. Effect of medication nonadherence on hospitalization and mortality among patients with diabetes mellitus. *Arch. Intern. Med.* 2006;166:1836–41.
59. Rejnmark L., Vestergaard P., Heickendorff L., Mosekilde L. Simvastatin does not affect vitamin d status, but low vitamin d levels are associated with dyslipidemia: results from a randomised, controlled trial. *Int. J. Endocrinol.* 2010:957174.
60. Shepherd J. The role of the exogenous pathway in hypercholesterolaemia. *Eur. Hear. J. Suppl.* 2001;3:E2–E5.
61. Reiner Z., Catapano A., De Backer G., Graham I., Taskinen M., Wiklund O. ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias: the Task Force for the management of dyslipidaemias of the European Society of Cardiology (ESC)

- and the European Atherosclerosis Society (EAS). *Eur. Heart J.* 2011;32(14):1769–818.
62. Fine D., Derek M. Statin-Related Muscle Toxicity. *Adv. Stud. Med.* 2003;3(10):554–560.
  63. Rasmiena A., Ng T., Meikle P. Metabolomics and ischaemic heart disease. *Clin. Sci.* 2013;124(5):289–306.
  64. Tonelli M., Lloyd A., Clement F., Conly J., Husereau D., Hemmelgarn B. Efficacy of statins for primary prevention in people at low cardiovascular risk: a meta-analysis. *Can. Med. Assoc. J.* 2011. p. E1189–E1202.
  65. Lim S., Sakuma I., Quon M., Koh K. Potentially important considerations in choosing specific statin treatments to reduce overall morbidity and mortality. *Int. J. Cardiol.* 2013;167(5):1696–702.
  66. Antonio F., Fonseca F. Estratificação de risco e metas lipídicas para prevenção e tratamento da aterosclerose. *Rev. Fact. Risco.* 2009:34–43.
  67. Shaw S., Fildes J., Yonan N., Williams S. Pleiotropic effects and cholesterol-lowering therapy. *Cardiology.* 2009;112:4–12.
  68. Zhou Q., Liao J. Pleiotropic effects of statins - Basic research and clinical perspectives. *Circ. J.* 2010;74:818–26.
  69. Dobs A., Levine M., Margolis S. Effects of pravastatin, a new HMG-CoA reductase inhibitor, on vitamin D synthesis in man. *Metabolism.* 1991;40:524–8.
  70. Girgis C., Clifton-Bligh R., Hamrick M., Holick M., Gunton J. The roles of vitamin D in skeletal muscle: form, function, and metabolism. *Endocr. Rev.* 2013;34(1):33–83.
  71. Bhattacharyya S., Bhattacharyya K., Maitra A. Commentary Possible mechanisms of interaction between statins and vitamin D. *QJM.* 2012;105(5):487-91.
  72. Pérez J., Vega G., Abad L., Sanz A., Chaves J., Hernandez G. Effects of Atorvastatin on vitamin D levels in patients with acute ischemic heart disease. *Am. J. Cardiol.* 2007;99(7):903–5.
  73. Pérez J., Abad L., Vega G., Montes J., Luis D., Laita A. Vitamin d levels and lipid response to atorvastatin. *Int. J. Endocrinol.* 2010:320721.

74. Shalaev S., Safiullina Z., Zhuravleva T., Nikitina V., Baranova T. Effects of lovastatin (mevacor) on platelet function in hypercholesterolemia in patients with ischemic heart disease. *Kardiologiya*. 1992;32:19–21.
75. Sirvent P., Mercier J., Lacampagne A. New insights into mechanisms of statin-associated myotoxicity. *Curr. Opin. Pharmacol.* 2008;8(3):333–8.
76. Stasi S., Macleod T., Joshua D., Binder S. Perspective Effects of Statins on Skeletal Muscle: A Prespective for physical Therapists. *Phys. Ther.* 2010;1530–42.
77. Harper C., Jacobson T. Evidence-based management of statin myopathy. *Curr. Atheroscler. Rep.* 2010;12(5):322–30.
78. Ahmed W., Khan N., Glueck C., Pandey S., Wang P., Goldenberg N. Low serum 25 (OH) vitamin D levels (<32 ng/mL) are associated with reversible myositis-myalgia in statin-treated patients. *Transl. Res.* 2009;153:11–6.
79. Norman A. Receptors for 1 alpha,25(OH) 2 D 3 : Past, Present, and Future. *J. Bone Miner. Res.* 1998;13(9):1360–9.
80. Dawson B. Serum 25-hydroxyvitamin D and functional outcomes in the elderly. *Am. J. Clin. Nutr.* 2008;88(2):537S–540S.
81. Quehenberger O., Armando A., Brown A., Milne S., Myers D., Merrill A. Lipidomics reveals a remarkable diversity of lipids in human plasma. *J. Lipid Res.* 2010;51(11):3299–305.
82. Lennep J., Westerveld H., Erkelens D., van der Wall E. Risk factors for coronary heart disease: implications of gender. *Cardiovasc. Res.* 2002;53(3):538–49.
83. Gonzalez V. Lipidomics in longevity and healthy aging. *Biogerontology*. 2013;14(6):663–72.
84. Liberopoulos E., Daskalopoulou S., Mikhailidis D. Management of high triglycerides: what non-specialists in lipids need to know. *Hellenic J. Cardiol.* 2005;46(4):268–72.
85. Nordestgaard B., Stender S., Kjeldsen K. Reduced atherogenesis in cholesterol-fed diabetic rabbits. Giant lipoproteins do not enter the arterial wall. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1988;8(4):421–8.
86. Seo T., Blaner W. Omega-3 fatty acids: Molecular approaches to optimal biological outcomes. *Curr Opin Lipidol.* 2005;(16):11–8.

87. Leitinger N. The role of phospholipid oxidation products in inflammatory and autoimmune diseases: evidence from animal models and in humans. *Subcell. Biochem.* 2008;49:325–50.
88. Abdalla S., Sevanian A., Chang Y. Characterization of cholesterol oxidation products formed by oxidative modification. *Free Radic. Biol. Med.* 1997;23(2):202-14.
89. Cobbold C., Sherratt J., Maxwell S. Lipoprotein oxidation and its significance for atherosclerosis: a mathematical approach. *Bull. Math. Biol.* 2002;64(1):65–95.
90. Ashraf M., Kar NS, Podrez E. Oxidized phospholipids: biomarker for cardiovascular diseases. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2009;41(6):1241–4.
91. Han X., Gross R.. Shotgun lipidomics: electrospray ionization mass spectrometric analysis and quantitation of cellular lipidomes directly from crude extracts of biological samples. *Mass Spectrom. Rev.* 2005;24(3):367–412.
92. Schaefer E. Lipoproteins, nutrition, and heart disease. *Am. J. Clin. Nutr.* 2002;75(2):191–212.
93. Hulbert J., Turner N., Storlien L., Else P. Dietary fats and membrane function: implications for metabolism and disease. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* 2005;80(1):155–69.
94. Jakobsen M., Reilly E., Heitmann B., Pereira M., Ba K., Fraser G. Major types of dietary fat and risk of coronary heart disease : a pooled analysis of 11 cohort studies. *Am J. Clin. Nutr.* 2009;89(5):1425-32.
95. Lecerf M. Fatty acids and cardiovascular disease. *Nutr. Rev.* 2009;67(5):273–83.
96. Tocher D., Bell J., MacGlaughlin P., McGhee F., Dick J. Hepatocyte fatty acid desaturation and polyunsaturated fatty acid composition of liver in salmonids: effects of dietary vegetable oil. *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.* 2001;130(2):257–70.
97. Meyer A., Kirsch H., Domergue F., Abbadi A., Sperling P., Bauer J. Novel fatty acid elongases and their use for the reconstitution of docosahexaenoic acid biosynthesis. *J. Lipid Res.* 2004;45(10):1899–909.
98. Oh K., Hu F., Manson J., Stampfer M., Willett W. Dietary fat intake and risk of coronary heart disease in women: 20 years of follow-up of the nurses' health study. *Am. J. Epidemiol.* 2005;161(7):672–9.

99. Hu F., Stampfer M., Manson J., Rimm E., Colditz G., Rosner B. Dietary fat intake and the risk of coronary heart disease in women. *N. Engl. J. Med.* 1997;337(21):1491–9.
100. Berry M., Eisenberg S., Haratz D., Friedlander Y., Norman Y., Kaufmann N., Stein Y. Effects of diets rich in monounsaturated fatty acids on plasma lipoproteins-the Jerusalem Nutrition Study : high MUFAs vs high PUFAs. *Am J. Clin. Nutr.* 1991;53(4):899-907.
101. Kris-etherton P., Hecker K., Binkoski A. Polyunsaturated Fatty Acids and Cardiovascular Health. *Nutr. Rev.* 2004;62(11):414-26.
102. Kark J., Kaufmann N., Binka F., Goldberger N., Berry E. Adipose tissue n-6 fatty acids and acute myocardial infarction in a population consuming a diet high in polyunsaturated fatty acids. *Am J. Clin. Nutr.* 2003;77(4):796-802.
103. Dwyer J., Allayee H., Dwyer K., Fan J., Wu H., Mar R. Arachidonate 5-lipoxygenase promoter genotype, dietary arachidonic acid, and atherosclerosis. *N. Engl. J. Med.* 2004;350(1):29–37.
104. Hu F., Stampfer M., Manson J., Rimm E., Wolk A., Colditz G. Dietary intake of alpha-linolenic acid and risk of fatal ischemic heart disease among women. *Am. J. Clin. Nutr.* 1999;69(5):890–7.
105. Calder P. n-3 Fatty acids and cardiovascular disease: evidence explained and mechanisms explored. *Clin. Sci.* 2004;107(1):1–11.
106. Kris E. Fish Consumption, Fish Oil, Omega-3 Fatty Acids, and Cardiovascular Disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2003;23(2):20e–30.
107. Rissanen T., Voutilainen S., Nyssonen K., Lakka T., Salonen J. Fish Oil-Derived Fatty Acids, Docosahexaenoic Acid and Docosapentaenoic Acid, and the Risk of Acute Coronary Events : The Kuopio Ischaemic Heart Disease Risk Factor Study. *Circulation.* 2000;102(22):2677–9.
108. Kris E., Taylor D., Yu P., Huth P., Moriarty K., Fishell V. Polyunsaturated fatty acids in the food chain in the United States. *Am. J. Clin. Nutr.* 2000;71(1 Suppl):179S–88S.
109. Mattos P., Andrade M. N-3 fatty acids: a link between eicosanoids, inflammation and immunity. *Metabólica.* 2006;8(3):135–43.
110. Ratnayake W., Galli C. Fat and fatty acid terminology, methods of analysis and fat digestion and metabolism: a background review paper. *Ann. Nutr. Metab.* 2009;55(1-3):8–43.

111. Holub B. Clinical nutrition: 4. Omega-3 fatty acids in cardiovascular care. *CMAJ*. 2002;166(5):608–15.
112. McLennan L. Relative effects polyunsaturated of dietary saturated , fatty acids on cardiac arrhythmias and in rats. *Am J. Clin. Nutr.* 1993;57( 2) 207-212.
113. Nair S., Leitch J., Falconer J., Garg M. Prevention of cardiac arrhythmia by dietary (n-3) polyunsaturated fatty acids and their mechanism of action. *J. Nutr.* 1997;127(3):383–93.
114. Rallidis L., Paschos G., Liakos G., Velissaridou A., Anastasiadis G., Zampelas A. Dietary  $\alpha$ -linolenic acid decreases C-reactive protein, serum amyloid A and interleukin-6 in dyslipidaemic patients. *Atherosclerosis*. 2003;167(2):237–42.
115. Park Y., Kim M. Serum 25-hydroxyvitamin D concentrations are associated with erythrocyte levels of n-3 PUFA but not risk of CVD. *Br. J. Nutr.* 2011;106(10):1529–34.
116. Manson J., Bassuk S., Lee I., Cook N., Albert M., Gordon D. The VITamin D and OmegA-3 Trial (VITAL): rationale and design of a large randomized controlled trial of vitamin D and marine omega-3 fatty acid supplements for the primary prevention of cancer and cardiovascular disease. *Contemp. Clin.* 2012;33(1):159–71.
117. Itariu B., Zeyda M., Leitner L., Marculescu R., Stulnig T. Treatment with n-3 polyunsaturated fatty acids overcomes the inverse association of vitamin D deficiency with inflammation in severely obese patients: a randomized controlled trial. *PLoS One*. 2013;8(1):54634.
118. Hu C., van der Heijden R., Wang M., van der Greef J., Hankemeier T., Xu G. Analytical strategies in lipidomics and applications in disease biomarker discovery. *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 2009;877(26):2836–46.
119. McAnoy A., Wu C., Murphy, R. Direct qualitative analysis of triacylglycerols by electrospray mass spectrometry using a linear ion trap. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 2005;16:1498–1509.
120. Gutnikov G. Fatty acid profiles of lipid samples. *J. Chromatogr.* 1995;B(671):71–89.
121. Kleiman R., Spencer G. Gas chromatography-mass spectrometry of methyl esters of unsaturated oxygenated fatty acids. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 1973;(50):31–8.

122. Ackman R. The gas chromatograph in practical analyses of common and uncommon fatty acids for the 21st century. *Anal. Chim. Acta.* 2002;(465):175–92.
123. Mannarino M., Ministrini S., Pirro M. Nutraceuticals for the treatment of hypercholesterolemia. *Eur. J. Intern. Med.* 2014.
124. Hjermann I., Velve B., Holme I. Effect of diet and smoking intervention on the incidence of coronary heart disease. Report from the Oslo Study Group of a randomised trial in healthy men. *Lancet.* 1981;2(8259):1303–10.