

TESIS DOCTORAL



**UNIVERSIDAD
DE GRANADA**

**FACULTAD DE FARMACIA
PROGRAMA DE DOCTORADO EN FARMACIA**

**ASOCIACIÓN DE LOS POLIMORFISMOS DE LA
VITAMINA D CON LA ENFERMEDAD
CARDIOVASCULAR**

PRESENTADA POR:

PAULA GONZÁLEZ ROJO

DIRECTORAS:

**DRA. MARÍA DEL CARMEN RAMÍREZ TORTOSA
DRA. CRISTINA PÉREZ REMÍREZ**

GRANADA, FEBRERO 2024

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autor: Paula González Rojo
ISBN: 978-84-1195-565-2
URI: <https://hdl.handle.net/10481/97441>

Tesis presentada por Paula González Rojo para optar al grado de Doctora.

Directoras: Dra. Cristina Pérez Ramírez
Dra. María del Carmen Ramírez Tortosa

Granada, febrero 2024

UNIVERSIDAD DE GRANADA
DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA Y BIOLOGIA MOLECULAR II
FACULTAD DE FARMACIA

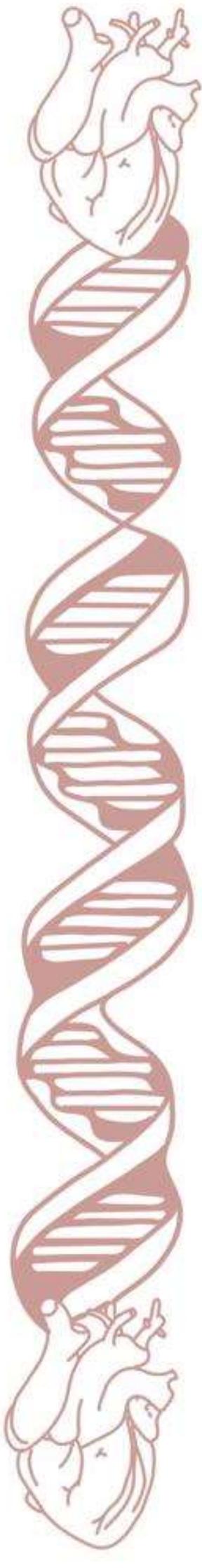
UNIDAD DE FARMACOGENÉTICA
SERVICIO DE FARMACIA
HOSPITAL UNIVERSITARIO VIRGEN DE LAS NIEVES

TESIS DOCTORAL
**“ASOCIACIÓN DE LOS POLIMORFISMOS DE LA VITAMINA
D CON LA ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR”**

Tesis presentada por Paula González Rojo para optar al grado de Doctora.

Directoras: Dra. Cristina Pérez Ramírez
Dra. María del Carmen Ramírez Tortosa

Granada, febrero 2024



AGRADECIMIENTOS

Quisiera expresar mi sincera gratitud a todas las personas e instituciones que han contribuido a la realización de esta tesis doctoral. Este viaje académico ha sido una experiencia maravillosa y enriquecedora, y no habría sido posible sin el apoyo de todos vosotros.

En primer lugar, quiero agradecer a mis directoras de tesis, la Dra. María del Carmen Ramírez Tortosa y la Dra. Cristina Pérez Ramírez por ofrecerme esta enorme oportunidad y permitirme llegar hasta aquí. Gracias por guiarme y darme todas las facilidades desde el minuto uno. Gracias por vuestra orientación, apoyo y paciencia a lo largo de este proceso. Además de unas profesionales impecables, sois unas grandísimas personas y es increíble ver como os gusta tanto vuestro trabajo y sois capaces de transmitirlo de esta manera. Sin duda, no podría haber tenido unas compañeras mejores en este viaje.

También quiero agradecer a todas las personas de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Granada y del Servicio de Farmacogenética del Hospital Universitario Virgen de las Nieves por haberme permitido realizar mi tesis y haberme ayudado en todos los procedimientos. Gracias por permitirme trabajar con vosotros, resolver todas mis dudas y ayudarme en todos los problemas que han ido apareciendo.

Gracias a todos mis amigos por su constante apoyo y comprensión durante este largo viaje. A los de siempre y a los que se van uniendo en este camino, es una gran suerte poder compartir esta vida con todos vosotros.

Por último, quiero agradecerles todo y más a mi familia. A mis padres, gracias por darme la oportunidad de estudiar y llegar a ser lo que yo quería. Gracias por no ponerme barreras y por apoyarme en todas las decisiones de mi vida. Gracias por esta ahí todos los días, en las buenas y en las no tan buenas. Si volviera a nacer mil veces, mil veces que desearía que fuerais mis padres, porque no se puede tener a unos padres mejores.

Gracias a mis hermanos, por enseñarme que la vida compartida es mucho mejor y por enseñarme lo que es el amor incondicional. Sois los dos pilares más importantes de mi vida, y espero que siga siendo así siempre. Y finalmente, quiero darle las gracias a mi abuelo, allá donde estes te tengo presente todos los días de mi vida. Este doctorado va por ti.

Es difícil plasmar con palabras la gratitud que siento. Nunca sabes por qué caminos te va llevando la vida y si estos van a ser los correctos o no. Ser doctora ha sido siempre un sueño, y no me habría gustado acabar este camino que es la vida sin intentar conseguirlo. Ahora que el final está cerca, me doy cuenta de que todo ha merecido la pena y que, con esfuerzo y perseverancia, con las personas correctas en tu camino y un poco de suerte, ¡todo llega!

Solamente puedo decir gracias, gracias ¡Gracias!



RESUMEN

Título

PAPEL DE LOS POLIMORFISMOS *VDR FOKI, TAQI, CDX2, BSMI* Y *APAI* EN EL RIESGO CARDIOVASCULAR

Resumen

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades cardiovasculares (ECV), que involucran el corazón, el cerebro y la circulación periférica, representan un importante problema de salud a nivel mundial. Son la causa de 4 millones de muertes en Europa y más de 17,9 millones de muertes en todo mundo. El aumento observado en la incidencia de ECV en las sociedades de ingresos medios en los últimos años ha suscitado interés en los factores de riesgo asociados con esta enfermedad. Esta enfermedad es multifactorial e implica una interacción compleja de factores políticos, sociales, conductuales, físicos, biológicos y genéticos.

En los últimos años, varios autores han estudiado los niveles de vitamina D como factor de riesgo cardiovascular. La relación entre la vitamina D y las ECV sigue siendo poco clara y controvertida; pero numerosos estudios relacionan los niveles bajos de vitamina D con los síndromes metabólicos, incluido el RAS, niveles elevados de citoquinas proinflamatorias, homeostasis del calcio, niveles altos de lípidos e hiperglucemia debido a la resistencia a la insulina; factores que contribuyen a la progresión de la enfermedad cardiovascular.

En particular, el gen del receptor de la vitamina D (*VDR*) y sus polimorfismos están recibiendo cada vez más atención. La mayoría de los estudios se han centrado en cinco polimorfismos: *BsmI* (rs1544410), *TaqI* (rs731236), *Apal* (rs7975232), *FokI* (rs2228570) y *Cdx2* (rs11568820). Estas variaciones juegan un papel clave en la modificación de la captación de vitamina D, pudiendo modificar su función y aumentando la susceptibilidad a los trastornos cardiovasculares.

HIPÓTESIS

Los polimorfismos del gen del receptor de la vitamina D *FokI*, *BsmI*, *TaqI*, *Apal* y *Cdx2* pueden influir en el riesgo de padecer enfermedad cardiovascular”.

OBJETIVOS

- Objetivo principal:

Determinar que polimorfismos del gen del receptor de la vitamina D pueden actuar como biomarcadores de riesgo a padecer enfermedad cardiovascular en una población caucásica.

- Objetivos específicos:

- I. Determinar la prevalencia de los polimorfismos genéticos *BsmI* (rs1544410), *TaqI* (rs731236), *Apal* (rs7975232), *FokI* (rs2228570) y *Cdx2* (rs11568820) en casos y controles.
- II. Analizar conjuntamente la influencia de variables clínicas y genéticas en la susceptibilidad a desarrollar enfermedad cardiovascular.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se realizó un estudio retrospectivo de casos y controles que comprendió 246 pacientes con ECV y 246 controles de origen caucásico del sur de España. La investigación se llevó a cabo en el Hospital Universitario Virgen de las Nieves de Granada (HUVN).

Las variables clínicas, sociodemográficas e histopatológicas se obtuvieron a partir de la revisión de las historias clínicas de los pacientes. Las muestras de ADN de sangre o saliva se obtuvieron del Biobanco público de Andalucía. Los polimorfismos genéticos *BsmI* (rs1544410), *TaqI* (rs731236), *Apal* (rs7975232), *FokI* (rs2228570) y *Cdx2* (rs11568820) se determinaron mediante reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real para discriminación alélica utilizando sondas TaqMan®.

Se evaluó la asociación de los polimorfismos con el riesgo de padecer ECV a través de los softwares R 3.5. y PLINK, aplicando los métodos estadísticos correspondientes para cada tipo de estudio.

RESULTADOS

El análisis de regresión logística ajustado por índice de masa corporal y diabetes reveló que el genotipo TT se asoció con un mayor riesgo de ECV en ambos modelos, genotípico ($p = 0,0430$; OR = 2,30; IC del 95 % = 1,06-5,37; TT frente a CC) y recesivo ($p = 0,0099$; OR = 2,71; IC 95% = 1,31-6,07; TT vs. C). El análisis de haplotipos reveló que el haplotipo GAC ($p = 0,047$; OR = 0,34; IC del 95 % = 0,12-0,98) se asoció con un mayor riesgo de ECV. Los polimorfismos *VDR FokI* (rs2228570) se asoció significativamente con el desarrollo de ECV. No se observó influencia de los polimorfismos *VDR BsmI* (rs1544410), *TaqI* (rs731236), *Apal* (rs7975232) y *Cdx2* (rs11568820) sobre el riesgo de desarrollar ECV en los pacientes estudiados.

CONCLUSIONES

CONCLUSION 1.- El análisis de los resultados del presente estudio y su contraste con los publicados al respecto en la literatura científica permiten, según nuestro estudio y condiciones experimentales, afirmar que el polimorfismo *VDR FokI* (rs2228570) se asoció significativamente con el desarrollo de ECV. Ello implicaría que este polimorfismo podría utilizarse como biomarcador de riesgo para la enfermedad mencionada.

CONCLUSION 2.- No se encontró influencia de los polimorfismos *VDR BsmI* (rs1544410), *TaqI* (rs731236), *Apal* (rs7975232) y *Cdx2* (rs11568820) sobre el riesgo de desarrollar ECV en los pacientes con patología cardiovascular bajo nuestras condiciones experimentales.



ÍNDICE

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	33
1.1 VITAMINA D	33
1.2 METABOLISMO DE LA VITAMINA D.....	37
1.3 RELACIÓN DE LA VITAMINA D CON LAS ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES	40
1.3.1. <i>Arritmias cardíacas</i>	47
1.3.2. <i>Miocardiopatía</i>	49
1.3.3. <i>Enfermedad cerebrovascular</i>	50
1.3.4. <i>Insuficiencia cardíaca</i>	51
1.3.5. <i>Valvulopatía</i>	52
1.3.6. <i>Enfermedad vascular periférica</i>	53
1.4 RECEPTOR DE LA VITAMINA D	55
1.5 POLIMORFISMOS DE <i>VDR</i>	56
2 HIPOTÉISIS.....	63
3 OBJETIVOS.....	63
3.1 OBJETIVO PRINCIPAL	63
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	63
4 MATERIAL Y MÉTODOS	67
4.1. DISEÑO DEL ESTUDIO	67
4.2. DECLARACIÓN ÉTICA	67
4.3. POBLACIÓN DIANA Y ÁMBITO DE ESTUDIO.....	67
4.4. CRITERIOS DE INCLUSIÓN	67
4.5. CRITERIOS DE EXCLUSIÓN	68
4.6. VARIABLES.....	68
4.6.1. <i>Variables sociodemográficas</i>	68
4.6.2. <i>Variables clínicas</i>	70
4.6.3. <i>Variables genéticas</i>	70
4.7. DETERMINACIÓN DE LOS PERFILES FARMACOGENÉTICOS.....	71

4.7.1.	<i>Extracción y purificación del ADN</i>	71
4.7.2.	<i>Análisis de polimorfismos genéticos mediante Real Time PCR</i>	71
4.7.3.	<i>Análisis de polimorfismos genéticos mediante Secuenciación</i>	73
4.8	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	74
4.8.1.	<i>Análisis Descriptivo</i>	74
4.8.2.	<i>Análisis del Riesgo</i>	74
4.8.3.	<i>Equilibrio de Hardy-Weinberg, desequilibrio de ligamento y frecuencias de haplotipos</i>	75
5.	RESULTADOS	79
5.1.	CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LOS PACIENTES	79
5.2.	DISTRIBUCIÓN DE GENOTIPOS	80
5.3.	INFLUENCIA DE LOS POLIMORFISMOS GENÉTICOS EN EL RIESGO DE ECV.....	83
6.	DISCUSIÓN	91
7.	CONCLUSIONES	100
8.	REFERENCIAS	104
9.	ANEXOS	127
9.1.	ANEXO 1	127
9.2.	ANEXO 2	132
10.	PRODUCCIÓN CIENTÍFICA	143
10.1.	ARTÍCULOS PUBLICADOS.....	143
10.2.	COMUNICACIONES A CONGRESOS.....	157

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. FUENTES ALIMENTICIAS SELECCIONADAS DE VITAMINA D.	36
TABLA 2. INGESTA DIARIA RECOMENDADA (IDR) PARA LA VITAMINA D.	37
TABLA 3. DEFUNCIONES SEGÚN LAS CAUSAS DE MUERTE MÁS FRECUENTES. ENERO- JUNIO 2019-2023. VALORES ABSOLUTOS Y VARIACIÓN PORCENTUAL.	41
TABLA 4. CARACTERÍSTICAS DEL GEN <i>VDR</i> Y LOS POLIMORFISMOS IMPLICADOS EN LA RUTA METABÓLICA DE LA VITAMINA D.	59
TABLA 5. POLIMORFISMOS GENÉTICOS Y TAQMAN® ID.	72
TABLA 6. CARACTERÍSTICAS DE CADA SNP Y LA METODOLOGÍA USADA PARA LA SECUENCIACIÓN.	74
TABLA 7. CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS DE CASOS Y CONTROLES.	80
TABLA S1. EQUILIBRIO DE HARDY-WEINBERG.	81
TABLA S2. DESEQUILIBRIO DE LIGAMIENTO.	81
TABLA S3. FRECUENCIAS DEL ALELO MENOR DE LOS SNPS.	82
TABLA S4. ESTIMACIÓN DE LAS FRECUENCIAS DE LOS HAPLOTIPOS.	83
TABLA S5. POLIMORFISMOS Y LA ASOCIACIÓN CON EL RIESGO DE ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR.	85
TABLA 8. INFLUENCIA DEL POLIMORFISMO DEL GEN DEL <i>VDR FOKI</i> (RS2228570) SOBRE EL RIESGO DE ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR.	86
TABLA 9. INFLUENCIA DE LAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS Y EL POLIMORFISMO DEL GEN <i>VDR FOKI</i> (RS2228570) Y EL RIESGO DE ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR.	87
TABLA 10. ASOCIACIÓN DE HAPLOTIPOS CON RESPUESTA.	87

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. SÍNTESIS DE COLECALCIFEROL (VITAMINA D ₃) EN LA EPIDERMIS HUMANA.	34
FIGURA 2. OBTENCIÓN DE ERGOCALCIFEROL (VITAMINA D ₂) Y COLECALCIFEROL (VITAMINA D ₃) A TRAVÉS DE LOS ALIMENTOS.	35
FIGURA 3. SÍNTESIS DE 1,25-HIDROXI-COLECALCIFEROL (1,25-HIDROXIVITAMINA D) EN HUMANOS.	38
FIGURA 4. METABOLISMO DE LA VITAMINA D.	40
FIGURA 5. FACTORES DE RIESGO QUE INTERVIENEN EN EL DESARROLLO DE LA ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR.	42
FIGURA 6. PAPEL DE LA NUTRIGENÉTICA Y LA NUTRIGENÓMICA.	44
FIGURA 7. PAPEL DE LA VITAMINA D EN LA FUNCIÓN CARDIOVASCULAR.	47
FIGURA 8. ACTIVACIÓN DEL RECEPTOR DE LA VITAMINA D.	56
FIGURA 9. GEN HUMANO DEL RECEPTOR DE LA VITAMINA D. APARECEN LOS POLIMORFISMOS <i>CDX2</i> (RS11568820); <i>FOKI</i> (RS2228570); <i>BSMI</i> (RS1544410); <i>APAI</i> (RS7975232) Y <i>TAQI</i> (RS731236).	57
FIGURA 10. LOCALIZACIÓN CROMOSÓMICA DE <i>VDR</i> Y DESEQUILIBRIO DE LIGAMIENTO (LD).	82

ABREVIATURAS

ACV	Accidente cerebrovascular
ADN	Ácido desoxirribonucleico
Akt	Proteína B Kinasa
APO	Apolipoproteína
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
AV	Auriculoventricular
CAD	Arteriopatía coronaria
CV	Calcificación valvular
CVA	Calcificación de la válvula aórtica
CVM	Calcificación de las válvulas mitrales
DBP	Proteína transportadora de la vitamina D
DM	Diabetes Mellitus
DMT2	Diabetes Mellitus tipo 2
DU	Valor diario
ECV	Enfermedades cardiovasculares
EAC	Enfermedad arterial coronaria

EDTA	Ácido etilendriaminotetraacético
EE.UU.	Estados Unidos
EVP	Enfermedad vascular periférica
FGF-23	Factor de crecimiento de fibroblastos-23
FA	Fibrilación auricular
FAV	Fístula arteriovenosa
FNB	Food and Nutrition Board
FRET	Transferencia de energía de resonancia de <i>Förster</i>
HDL	Lipoproteínas de alta densidad
HUVN	Hospital Universitario Virgen de las Nieves
HWE	Equilibrio de Hardy-Weinberg
IC	Insuficiencia cardiaca
IC	Intervalo de confianza
ICC	Insuficiencia cardiaca congestiva
IDR	Ingesta diaria recomendada
IL-1	Interleucina-1
IL-4	Interleucina-4
IL-6	Interleucina-6

IL-8	Interleucina-8
IL-10	Interleucina-10
IL-12	Interleucina-12
IMC	Índice de masa muscular
IFN-γ	Interferón gamma
K⁺	Potasio
Kb	Kilobase
LBD	Dominio de unión a ligando
LD	Desequilibrio de ligamiento
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
LIPC	Lipasa hepática
MAF	Frecuencia del alelo menor
mmHg	Milímetros de mercurio
MTHFR	Metilentetrahidrofolato reductasa
OMS	Organización Mundial de la Salud
OR	Odds Ratio
PAD	Presión arterial diastólica
PAS	Presión arterial sistólica

PCR	Proteína C reactiva
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PTH	Hormona paratiroidea
SNP	Polimorfismo de un solo nucleótido
RAS	Sistema renina-angiotensina
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RXR	Receptor del ácido retinoico
SCA	Síndrome coronario agudo
SD	Desviación estándar
TGF-α	Factor de crecimiento transformante alfa
Th	Linfocitos T helper
μg	microgramos
UBE	Unidad de bebida estándar
UI	Unidades Internacionales
UV	Ultravioleta
VD	Valor diario
VDR	Receptor de la vitamina D
VDRE	Elemento sensible a la vitamina D



INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Vitamina D

La vitamina D es una hormona esteroidea multifuncional (1) que se transporta por el sistema circulatorio hacia órganos o células distantes para coordinar su fisiología y comportamiento (2), siendo responsable de regular muchos procesos biológicos como la diferenciación celular, la proliferación celular y el sistema inmunológico (1).

La vitamina D es conocida por regular los procesos de homeostasis del calcio y el fósforo, el metabolismo esquelético y la función vascular (3); pero además posee multitud de propiedades inmunorreguladoras y antiinflamatorias (1, 4); ya que es la encargada de modular la actividad de la interleucina-12 (IL-12) y la del interferón-gamma (IFN- γ), además de suprimir la proliferación de linfocitos. También se encarga de la producción de anticuerpos, la síntesis de citocinas (5) y de la excesiva proliferación e inflamación. Tiene efectos autocrinos locales y paracrinos (6-8), además de retrasar la senescencia celular mediante la reducción del estrés oxidativo (9).

Todas estas funciones las realiza en tejidos y órganos que poseen la enzima 1α -hidroxilasa, necesaria para la producción local de calcitriol; o en los que también existe el receptor de la vitamina D (VDR). Algunos de ellos son la piel, la próstata, los ganglios linfáticos, el intestino, la mama, el páncreas, la médula espinal, el cerebro, la placenta o el sistema circulatorio entre otros (2).

En los seres humanos existen diferentes vías para generar vitamina D. La vía principal se produce a través de un proceso fisicoquímico que tiene lugar en la epidermis o capa externa de la piel, mediante la absorción de radiación ultravioleta (UV) (10, 11). Por esta producción cutánea surgen aproximadamente el 90% de todos los requerimientos humanos (12). La radiación solar incluye un amplio espectro de radiación electromagnética caracterizada por longitudes de onda específicas entre las que se encuentran la UV-C (100 a 280 nm), UV-B (280 a 315 nm) y UV-A (315 a 400 nm) (13). La radiación UV-C es totalmente absorbida en la estratosfera, mientras que los rayos UV-B

y UV-A atraviesan la atmósfera llegando a la superficie terrestre (14). La radiación UV-A llega a la dermis, mientras que la UV-B penetra principalmente en la epidermis y apenas entra en la dermis (11). La radiación UV-B impulsa la síntesis de colecalfiferol (vitamina D₃) en los queratinocitos de la membrana plasmática epidérmica en una reacción no enzimática de dos pasos. En el primer paso, el 7-dehidrocolesterol se convierte en pre-colecalfiferol, una molécula termodinámicamente inestable. En el segundo paso, la isomerización térmica tiene lugar a la temperatura corporal (~37 °C) y convierte el pre-colecalfiferol en la molécula térmicamente estable, el colecalfiferol (15) (Fig. 1).

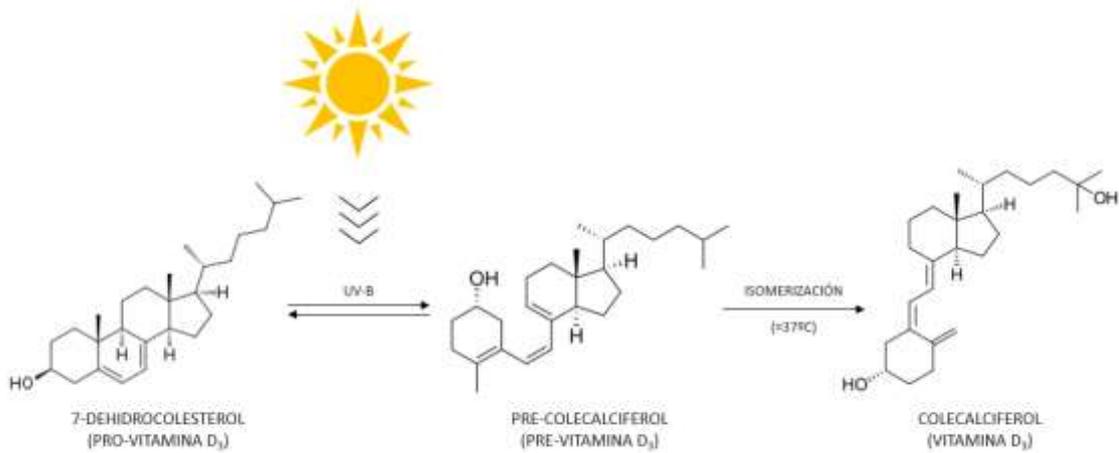


Figura 1. Síntesis de colecalfiferol (Vitamina D₃) en la epidermis humana.

La segunda fuente menor de vitamina D se encuentra en los alimentos. Las dos isoformas principales de la vitamina D son la vitamina D₃ (colecalfiferol), que se sintetiza en la piel y está contenida en alimentos de origen animal como el pescado; y la vitamina D₂ (ergocalciferol), que en el cuerpo humano no se puede sintetizar y está contenida en hongos como la levadura y los champiñones (10). Las estructuras de estas dos isoformas difieren en su cadena lateral C-17, de modo que la vitamina D₂ tiene un doble enlace C-22 a C-23 adicional y un grupo metilo C-24 (16). De tal manera que la vitamina D₃ tiene una mayor biodisponibilidad que la de la vitamina D₂ (17) (Fig. 2).

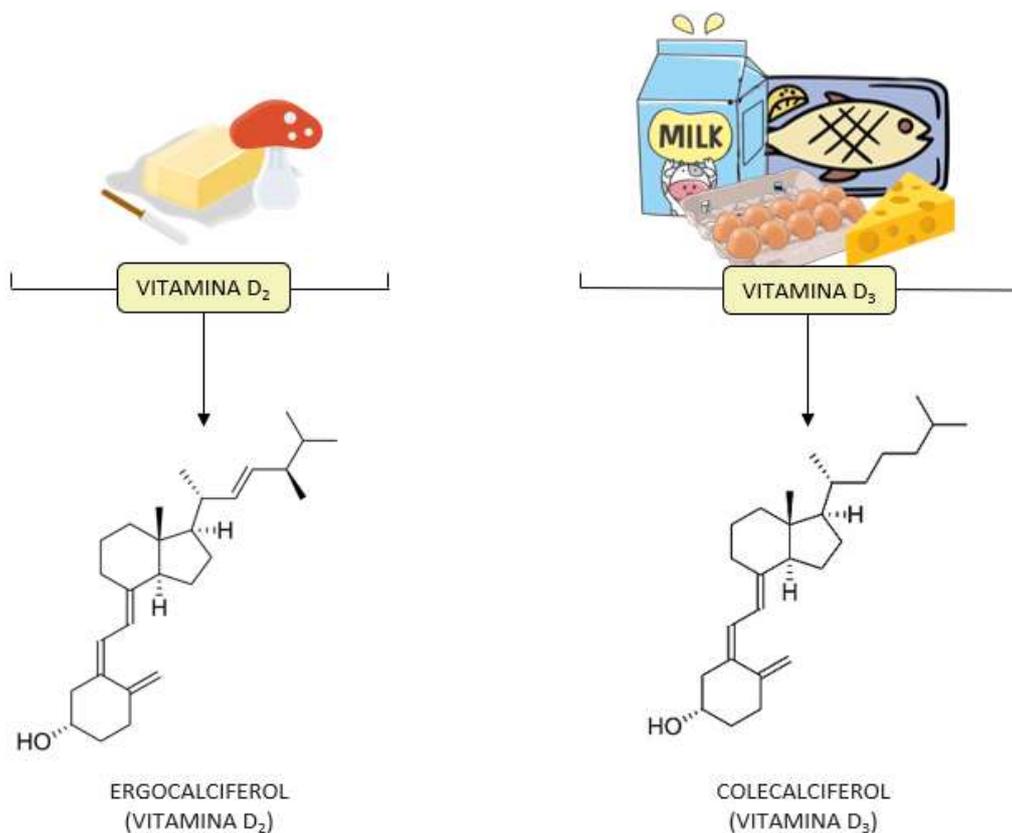


Figura 1. Obtención de ergocalciferol (vitamina D₂) y colecalciferol (vitamina D₃) a través de los alimentos.

Muy pocos alimentos en la naturaleza contienen vitamina D. La vitamina D en estos alimentos se encuentra principalmente en forma de vitamina D₃ y su metabolito 25(OH)D₃ (18). Algunos hongos proporcionan vitamina D₂ en cantidades variables (19, 20). También están disponibles los hongos con niveles mejorados de vitamina D₂ por exposición a la luz ultravioleta en condiciones controladas.

Existen varias fuentes alimenticias de vitamina D que se enumeran en la Tabla 1 (21).

Tabla 1. Fuentes alimenticias seleccionadas de vitamina D.

Comida	UI por ración	Porcentaje VD
Aceite de hígado de bacalao, (1 cucharada)	1360	340
Pez espada cocido (3 raciones)	566	142
Salmón (Sockeye) cocido (3 raciones)	447	112
Atún enlatado en agua, escurrido (3 raciones)	154	39
Jugo de naranja enriquecido con vitamina D (1 taza)	137	34
Leche sin grasa fortificada con vitamina D (1 taza)	115-124	29-31
Yogur fortificado con 20% del VD (valor diario) para la vitamina D (6 raciones)	80	20
Margarina fortificada (1 cucharada)	60	15
Sardinas enlatadas en aceite, escurridas (2 sardinas)	46	12
Hígado de res cocinado (3 raciones)	42	11
Huevo grande (la vitamina D se encuentra en la yema)	41	10
Cereal listo para comer, fortificado con el 10% del VD para la vitamina D (0,75-1 taza)	40	10
Queso suizo (1 ración)	6	2

Los valores de referencia de ingesta de vitamina D y otros nutrientes se proporcionan en la ingesta diaria recomendada (IDR) desarrolladas por la *Food and Nutrition Board* (FNB) en el Instituto de Medicina de las Academias Nacionales (anteriormente Academia Nacional de Ciencias). La IDR es el término general para un conjunto de valores de referencia utilizados para planificar y evaluar la ingesta de nutrientes de personas sanas. Estos valores varían según la edad y el género. El FNB estableció una dosis diaria recomendada de vitamina D que representa una ingesta diaria que sea suficiente para

mantener la salud ósea y el metabolismo normal del calcio en personas sanas. Las dosis diarias recomendadas de vitamina D se enumeran en unidades internacionales (UI) y microgramos (μg). La actividad biológica de 40 UI es igual a 1 μg (Tabla 2) (21).

Antes de la publicación del Instituto de Medicina en 2010, la IDR de vitamina D hasta los 50 años era de 200 UI/día. Después de 2010, se recomendó 400 UI/día para bebés de hasta 12 meses y 600 UI para niños, adolescentes y adultos de hasta 70 años. En personas mayores de 70 años, la dosis diaria recomendada es de 800 UI (22) (Tabla 2). Aunque la luz solar puede ser una fuente importante de vitamina D para algunos, las dosis diarias recomendadas de vitamina D se basan en una exposición al sol mínima. (23).

Tabla 2. Ingesta Diaria Recomendada (IDR) para la vitamina D.

Etapas de la Vida	Edad	Hombres IU/día ($\mu\text{g}/\text{día}$)	Mujeres IU/día ($\mu\text{g}/\text{día}$)	Embarazo IU/día ($\mu\text{g}/\text{día}$)	Lactancia IU/día ($\mu\text{g}/\text{día}$)
Infante	0-12 meses	400 (10)	400 (10)		
Niños	1-13 años	600 (15)	600 (15)		
Adolescentes	14-18 años	600 (15)	600 (15)	600 (15)	600 (15)
Adultos	19-50 años	600 (15)	600 (15)	600 (15)	600 (15)
Adultos	51-70 años	600 (15)	600 (15)		
Adultos	> 70 años	800 (24)	800 (24)		

1.2 Metabolismo de la vitamina D

En la vía metabólica de la vitamina D intervienen diferentes factores que actúan desde la incorporación de la vitamina D al organismo hasta su llegada tanto a los órganos

implicados en la homeostasis del calcio y el fósforo, como a los mecanismos por los que se produce la activación del VDR en estos órganos (25, 26).

La vitamina D ingerida se incorpora a los quilomicrones que se absorben en el sistema linfático y entran en la circulación (22, 27). La vitamina D₃ obtenida a través de la síntesis de la piel y la dieta, y la vitamina D₂, solamente obtenida de la dieta; se unen a la proteína transportadora de vitamina D (DBP), una glicoproteína sérica secretada por el hígado (28); y la albúmina (29, 30). Como la vitamina D en sí misma es biológicamente inactiva, es hidroxilada a 25-hidroxivitamina D (25(OH)₂D) en el hígado (10). En el suero, la 25(OH)₂D se mide para evaluar el estado de la vitamina D, ya que esta isoforma es el principal metabolito circulante y es el que mejor refleja su ingesta de todas las fuentes (12). A continuación, la 1 α -hidroxilación de 25(OH)₂D se produce en el riñón, formándose 1,25-dihidroxivitamina D (1,25(OH)₂D), la hormona activa de la vitamina D (Fig. 3).

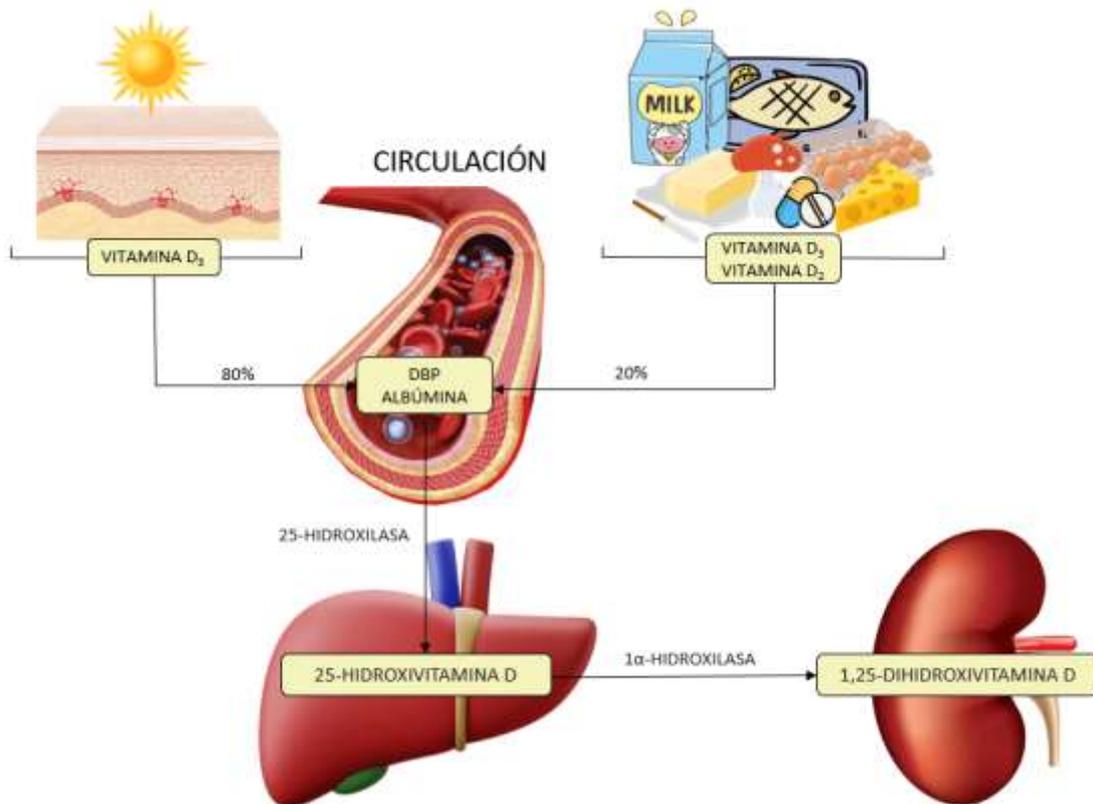


Figura 3. Síntesis de 1,25-hidroxi-colecalciferol (1,25-hidroxivitamina D) en humanos.

La producción de la vitamina D activa está fuertemente regulada y estimulada por la hormona paratiroidea (PTH) e inhibida por el factor de crecimiento de fibroblastos-23 (FGF-23) y $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ en sí misma (31). Por todo esto, las concentraciones séricas de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ no son una buena medida del suministro o estado de esta vitamina (10).

$1,25(\text{OH})_2\text{D}$ ejerce sus efectos biológicos al unirse al *VDR*. Las concentraciones más altas de *VDR* se encuentran en los tejidos que participan en la homeostasis del calcio; pero se han encontrado *VDR* en casi todos los tejidos y células del cuerpo humano (22, 27, 32, 33). Después de la activación del *VDR* citosólico mediante la unión de ligandos y la translocación al núcleo; el *VDR* activado interactúa con elementos de respuesta a la vitamina D en la región promotora de ciertos genes y, por lo tanto; regulando aproximadamente el 3% del genoma. Finalmente, 25-hidroxivitamina D y 1,25-dihidroxivitamina D se degradarán a 24,25-hidroxivitamina D y 1,24,25-dihidroxivitamina D respectivamente; metabolizándose en ácido calcitriico y excretándose por el riñón (31, 34). Este proceso enzimático de degradación se inicia por la 24-hidroxilación y es inducido por la propia activación de *VDR*; previniendo así la intoxicación por vitamina D como parte de un bucle autorregulador (10) (Fig.4).

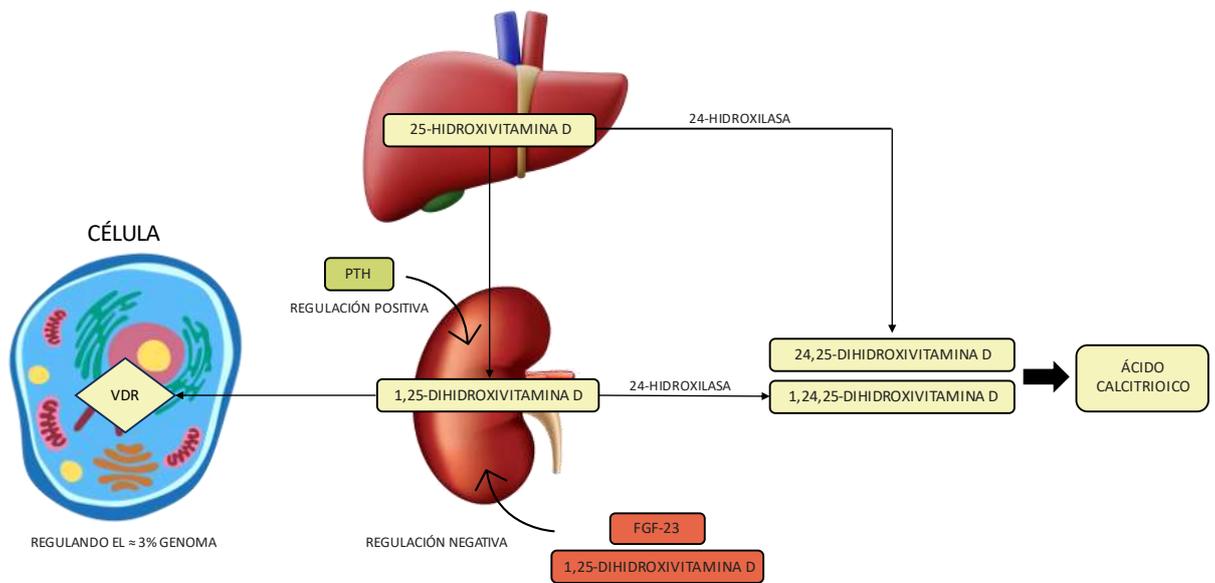


Figura 4. Metabolismo de la vitamina D.

1.3 Relación de la vitamina D con las enfermedades cardiovasculares

Las enfermedades cardiovasculares (ECV) son un grupo de trastornos del corazón y de los vasos sanguíneos. Se clasifican en enfermedad coronaria, enfermedad cerebrovascular, arteriopatías periféricas, cardiopatía reumática, cardiopatía congénita, trombosis venosa profunda y embolia pulmonar.

Según la Organización Mundial de la Salud (35), un total de 17,9 millones de personas mueren de esta enfermedad cada año, y su prevalencia ha aumentado progresivamente en los últimos años (35-38). En España, el grupo de enfermedades del sistema circulatorio se mantuvo como primera causa de muerte en 2022, con el 26% del total (y una tasa de 252,2 fallecidos por cada 100.000 habitantes). Respecto al año anterior, los fallecimientos debidos a enfermedades del sistema circulatorio aumentaron un 1,2% (39). Los fallecimientos debidos a enfermedades cardiovasculares siguen siendo los más numerosos durante el primer semestre de 2023, con el 27,1% de las muertes. A nivel

más detallado, las enfermedades isquémicas del corazón fueron la causa de muerte más frecuente, con 13.865 personas fallecidas, un 6,8% menos que el mismo período de 2022. Por detrás se situaron las enfermedades cerebrovasculares con 11.926 defunciones y la insuficiencia cardiaca con 10.459 fallecimientos (Tabla 3) (40)

En consecuencia, la identificación de los factores de riesgo que intervienen en el progreso de esta enfermedad y las estrategias terapéuticas eficaces para su prevención y tratamiento son de suma importancia; dada la enorme implicación social y económica (41).

Tabla 3. Defunciones según las causas de muerte más frecuentes. Enero-junio 2019-2023. Valores absolutos y variación porcentual.

	Enero-Junio 2019	Enero-Junio 2020	Enero-Junio 2021	Enero-Junio 2022	Enero-Junio 2023	Variación Enero-Junio 2023/2022
Total enfermedades	219.350	264.773	2330.558	235.707	221.462	-6.0%
Enfermedades isquémicas del corazón	15.742	15.394	14.755	14.879	13.865	-6.8%
Enfermedades cerebrovasculares	13.284	13.306	12.452	12.598	11.926	-5.3%
Cáncer de bronquios y pulmón	10.980	10.854	10.837	11.339	11.225	-1.0%
Demencia	11.517	10.775	9.337	10.471	10.704	2.2%
Insuficiencia cardiaca	10.441	10.276	10.134	11.022	10.459	-5.1%
Enfermedad hipertensiva	6.392	7.446	7.367	7.523	7.590	0.9%

A pesar de que la etiología de las ECV no ha sido claramente establecida, a lo largo de los años muchos estudios epidemiológicos e intervencionistas han permitido caracterizar los factores asociados con un mayor riesgo de ECV.

Existen factores de riesgo no modificables como la edad y el sexo, y modificables como el tabaquismo, la falta de actividad física, los hábitos alimentarios, la hipertensión arterial, la diabetes mellitus tipo 2 (DMT2), las dislipidemias o la predisposición genética (42, 43) (Fig. 5).

A pesar de todos estos avances, los mecanismos que subyacen a las diferencias individuales en la presentación y las características fisiopatológicas de las ECV no se conocen bien (44-46).

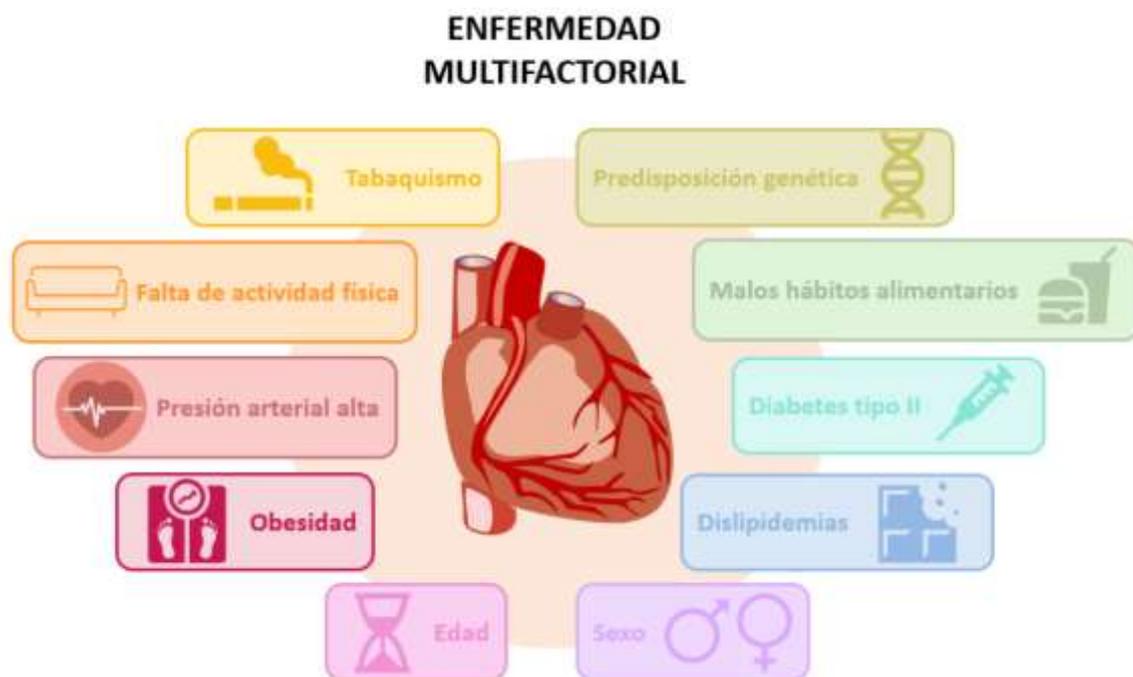


Figura 5. Factores de riesgo que intervienen en el desarrollo de la enfermedad cardiovascular.

Un porcentaje de la enfermedad cardiovascular podría prevenirse con un estilo de vida saludable, permitiendo a largo plazo disminuir su incidencia en la población general; ya que la dieta es un factor muy importante en su desarrollo. Las modificaciones en la nutrición y el estilo de vida han sido fundamentales para la prevención de este tipo de

enfermedades. Sin embargo, la genética también tiene un papel considerable; ya que una gran cantidad de genes y sus variantes pueden influir en el riesgo de ECV por diferentes vías. Es fundamental emplear un enfoque personalizado que tenga en cuenta el aspecto de la variabilidad biológica entre los individuos para maximizar los beneficios de estas modificaciones en el contexto de la salud. En este sentido, la nutrigenómica y la nutrigenética se han convertido en una importante pieza para la prevención y el tratamiento de las enfermedades cardiovasculares (47).

Mientras que la nutrigenómica estudia la influencia de los nutrientes en la expresión genética, la nutrigenética estudia la influencia de las variaciones genéticas en el cuerpo promovidas por los nutrientes (48). La nutrición de precisión integra información genómica con datos asociados a preferencias fenotípicas, de estilo de vida, conductuales, fisiopatológicas y socioculturales. A su vez, la metagenómica y metabolómica pueden aprovecharse para diseñar una guía universal y un asesoramiento personalizado para el mantenimiento de la salud (47, 49, 50) (Fig. 6).

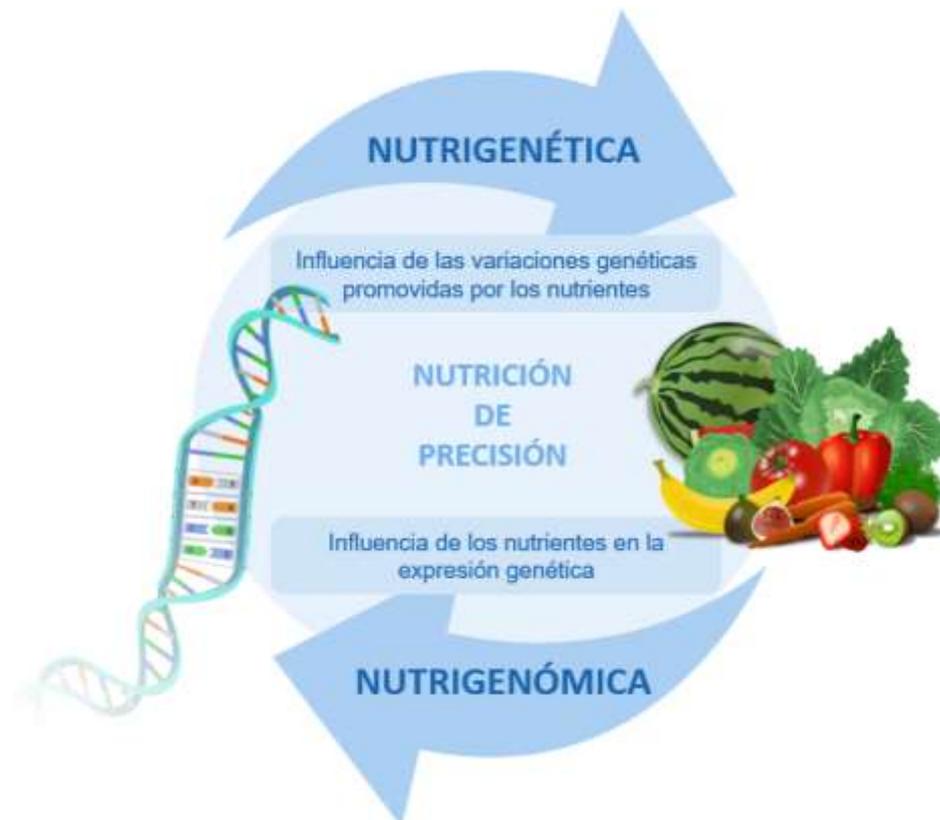


Figura 6. Papel de la nutrigenética y la nutrigenómica.

El campo de la nutrigenómica abarca múltiples enfoques destinados a comprender los efectos de la dieta en la salud o en el desarrollo de esta enfermedad incluidos los estudios nutrigenéticos, que investigan la relación entre las variantes genéticas y la dieta en la modulación del riesgo cardiometabólico; así como los efectos de los componentes dietéticos en múltiples medidas "ómicas", incluida la transcriptómica, la metabolómica, la proteómica, la lipidómica, las modificaciones epigenéticas y el microbioma (51).

La búsqueda de genes que predispongan a las ECV ha llevado a la identificación de polimorfismos de un solo nucleótido (SNP), variaciones humanas del ácido desoxirribonucleico (52) (52); la evaluación del perfiles de riesgo y la adopción de medidas preventivas o terapéuticas (45).

Existen varios genes que se han relacionado con la enfermedad cardiovascular (53), entre ellos destacan el gen de la metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR) (54-56); el

gen PPAR (57) (58-60); genes de la familia de las apolipoproteínas (APO) APO-A (61-63) y APO-E (64-67) o el gen de la lipasa hepática (LIPC) (68).

La relación entre la vitamina D y la enfermedad cardiovascular ha sido objeto de numerosos estudios y sigue siendo un tema de investigación activa, sugiriendo que puede desempeñar un papel en la salud cardiovascular. Estudios recientes han demostrado que los pacientes con deficiencia de vitamina D tienen un mayor riesgo de desarrollar ECV (69) y las variaciones del gen del receptor de la vitamina D son factores de riesgo potenciales de desarrollar esta patología, sin embargo; el mecanismo subyacente exacto en su patogénesis aún no está claro (31, 70-72).

Se ha propuesto que la vitamina D puede tener efectos beneficiosos en la función cardiovascular, incluida la regulación de la presión arterial y la función del músculo cardíaco; además de estar asociada con un menor riesgo de desarrollar factores de riesgo cardiovascular, como la hipertensión arterial, la DMT2 y la dislipidemia.

En primer lugar, existen evidencias sólidas de que la vitamina D se expresa en el corazón y en los vasos sanguíneos (73-76) y tiene un importante papel en la regulación de la función endotelial afectando al crecimiento y proliferación de las células musculares y endoteliales (77). Además, la activación del VDR induce un aumento dependiente de la concentración de óxido nítrico en las células endoteliales y mejora las propiedades angiogénicas de las células progenitoras endoteliales.

En segundo lugar, la vitamina D es un importante regulador del sistema renina-angiotensina (RAS). La deficiencia de vitamina D implicaría la activación del gen de la renina, produciendo un aumento de la angiotensina II, que puede provocar hipertensión e hipertrofia ventricular (78, 79). Además, provocaría un aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y la activación de proteínas G como la Rho A, lo que provocaría la inhibición de las vías necesarias para el transporte intracelular de glucosa y, por tanto; el desarrollo de resistencia a la insulina y la aparición del síndrome metabólico (80).

En tercer lugar, la vitamina D podría regular las células inmunitarias, inhibiendo la liberación de citocinas proinflamatorias y aumentando la liberación de citocinas antiinflamatorias, desempeñando así un papel en la protección de los vasos sanguíneos (81).

Finalmente, la deficiencia de vitamina D se asocia con un perfil lipídico aterogénico que incluye una disminución de los niveles de colesterol de lipoproteínas de alta densidad (del inglés High Density Lipoprotein, HDL) y un aumento de los niveles séricos de colesterol de lipoproteínas de baja densidad (del inglés Low Density Lipoprotein, LDL). La forma biológicamente activa de vitamina D suprime la formación de células espumosas, células modificadas del músculo liso o macrófagos que poseen receptores que no están regulados y que acumulan intracelularmente el colesterol esterificado; disminuyendo la absorción de colesterol por los macrófagos e induciendo la autofagia de LDL mediante la regulación genética a través de *VDR*. Además, modula la respuesta inflamatoria al disminuir la expresión del factor de necrosis tumoral alfa ($\text{TNF}\alpha$), interleucina-6 (IL-6), interleucina-1 (IL-1) e interleucina-8 (IL-8) en monocitos sanguíneos aislados y la expresión de trombomodulina y factor tisular en monocitos, afectando la agregación plaquetaria y la actividad trombogénica. Sin embargo, se ha demostrado que la reposición a corto plazo de los niveles de 25-hidroxivitamina D no mejora el perfil lipídico en humanos (82-87) (Fig. 7).

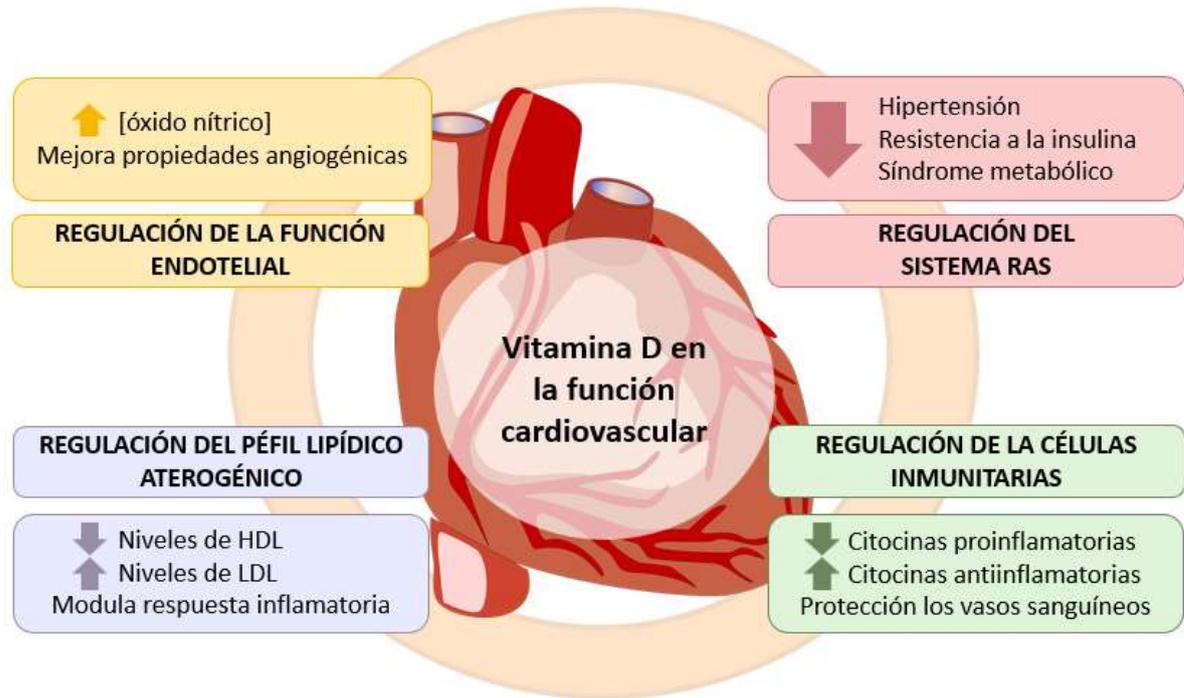


Figura 7. Papel de la vitamina D en la función cardiovascular.

En resumen, la vitamina D puede tener efectos antihipertensivos, antiinflamatorios, antiproliferativos, antihipertróficos, antifibróticos, antidiabéticos y antitrombóticos, modulando beneficiosamente los factores de riesgo cardiovascular clásicos (73).

Se ha observado una relación de los efectos de la vitamina D y algunos trastornos cardiovasculares, como las arritmias cardíacas, la miocardiopatía, las enfermedades cerebrovasculares, la insuficiencia cardíaca, las valvulopatías y la enfermedad periférica vascular.

1.3.1. Arritmias cardíacas

Las arritmias cardíacas son anomalías o perturbaciones en la activación o en los latidos normales del miocardio. El nódulo sinusal envía una onda de despolarización sobre la aurícula y el nódulo auriculoventricular (AV) despolarizante que se propaga sobre el

sistema His-Purkinje y despolariza el ventrículo de forma sistemática. Existen muchos tipos de arritmias cardíacas o latidos cardíacos anormales y su gravedad depende de la presencia o ausencia de enfermedad cardíaca estructural. La fibrilación auricular (FA) es la arritmia benigna más frecuente.

Las arritmias cardíacas se presentan con síntomas ambiguos, desde completamente asintomáticos hasta una amplia gama de síntomas y signos, que incluyen palpitaciones, dolor en el pecho, dificultad para respirar, ansiedad, fatiga, aturdimiento o mareos, visión borrosa y sudoración profusa. A pesar de la disponibilidad de un tratamiento eficaz, más de 3,7 millones de pacientes mueren cada año en todo el mundo por arritmias cardíacas (88).

La patogénesis de las arritmias no se comprende completamente, pero se han identificado factores que parecen ser elementos críticos en su desarrollo como los trastornos del sistema renina-angiotensina-aldosterona, indicadores de inflamación y especialmente proteína C reactiva (PCR), metabolismo de ácidos grasos y niveles reducidos de vitamina D que se correlacionan de alguna manera con los factores mencionados anteriormente (89).

Un número significativo de estudios ha correlacionado la deficiencia de vitamina D con un mayor riesgo de desarrollar arritmias cardíacas (90). La señalización de la vitamina D parece influir en los componentes RAS, y las citocinas profibróticas y el factor de crecimiento transformante b1 parecen contribuir en los procesos de remodelación a través de sus acciones proliferativas y proinflamatorias (91). Además, a través del receptor nuclear de la vitamina D y la vía de la proteína B kinasa (23), se produce el mecanismo implicado en los miocitos ventriculares, un aumento en la corriente de salida transitoria rápida y las densidades de corriente de potasio (K⁺) rectificadora retardada ultrarrápida (92).

1.3.2. Miocardiopatía

Cardiomiopatía es el nombre que se usa para llamar a las enfermedades del músculo cardíaco. Estas enfermedades aumentan el tamaño del corazón o lo hacen más grueso y rígido que lo normal. En raros casos, el tejido cicatrizante reemplaza el tejido muscular (93).

Las miocardiopatías se clasifican en primarias (genéticas, mixtas o adquiridas) y secundarias, que dan como resultado fenotipos variados que incluyen patrones dilatados, hipertróficos y restrictivos. La miocardiopatía hipertrófica es la miocardiopatía primaria más común y puede causar disnea de esfuerzo, presíncope, dolor torácico atípico, insuficiencia cardíaca y muerte súbita cardíaca. La miocardiopatía dilatada puede ser genética o adquirida y típicamente se presenta con síntomas clásicos de insuficiencia cardíaca con fracción de eyección reducida (94).

Algunos factores de riesgo que propician sufrir cardiomiopatía son el consumo de alcohol, drogas, situaciones estresantes, la edad, antecedentes familiares, enfermedades que afectan el funcionamiento de los músculos que producen la acumulación de sustancias en el corazón, inflamación cardíaca, infecciones, obesidad o diabetes (DM) (95).

Varios estudios han demostrado que la $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ ejerce efectos antihipertróficos sobre los cardiomiocitos y reduce la expresión de varios genes que están regulados positivamente en la hipertrofia miocárdica (96, 97) mediante la supresión de RAS cardíaco y de los péptidos natriuréticos. Además, tiene efectos sobre el crecimiento y la diferenciación de los cardiomiocitos, mejorando la función y estructura miocárdica (98-103).

1.3.3. Enfermedad cerebrovascular

Un accidente cerebrovascular (ACV), o ictus, puede ocurrir cuando el flujo de sangre al cerebro queda bloqueado o cuando se produce un sangrado repentino en el cerebro. Existen dos tipos de ACV: el accidente cerebrovascular isquémico o infarto cerebral, que se produce cuando el flujo sanguíneo no puede llegar al cerebro por un tapón e impide que las células cerebrales reciban el oxígeno y nutrientes de la sangre, muriendo en pocos minutos; y el accidente cerebrovascular hemorrágico o derrame cerebral, que se produce por un sangrado súbito en el cerebro que se escapa de los vasos sanguíneos, haciendo presión y dañando las células cerebrales. Casi el 90% de los ACV se producen por una obstrucción de los vasos sanguíneos (accidentes isquémicos), y solo el 10% se deben a sangrado interno (accidentes hemorrágicos) (104). El accidente cerebrovascular es la segunda causa de muerte entre las personas de 60 años o más, y está causando una importante carga de morbilidad a nivel mundial (105).

El ACV puede producir distintos síntomas, desde debilidad leve hasta parálisis o pérdida de sensibilidad de un lado de la cara o del cuerpo, dolor de cabeza repentino y muy intenso, sensación súbita de debilidad, problemas de vista y dificultad para hablar o para entender lo que se le dice (104).

Los ACV isquémicos y hemorrágicos comparten muchos de los mismos factores de riesgo, como presión arterial alta, diabetes y colesterol alto en sangre. Los coágulos de sangre pueden producirse debido a cardiopatía coronaria, fibrilación auricular, enfermedad de las válvulas cardíacas y enfermedad de las arterias carótidas. También puede producirse un sangrado después del uso de anticoagulantes (106).

Muchos estudios han proporcionado evidencia de posibles mecanismos para explicar el efecto de la vitamina D en el accidente cerebrovascular (107). El *VDR* desempeña funciones importantes en el desarrollo del accidente cerebrovascular, ya que se expresa en las células del músculo liso vascular (77), las plaquetas (108) y muchas otras células inmunes (109), importantes en el desarrollo del ACV. Además, la supresión de RAS es un posible mecanismo a través del cual la vitamina D influye en el riesgo de sufrir ictus (78,

110-114). La vitamina D también podría inhibir la producción de factores de inflamación, como IL-6 y TNF- α y, como resultado, afectar el progreso del ACV (115). Se considera que 1,25(OH) $_2$ D y análogos sintéticos pueden tener efectos anticoagulantes. Por este motivo, se sugiere desarrollar agentes antitrombóticos derivados de la vitamina D (77, 116, 117).

1.3.4. Insuficiencia cardíaca

La insuficiencia cardíaca (IC) es un síndrome clínico crónico y progresivo inducido por anomalías cardíacas estructurales o funcionales que muestran una fracción de eyección del ventrículo izquierdo reducida, conduciendo a presiones de llenado cardíacas elevadas en reposo y durante el estrés. Se caracteriza por un engrosamiento de la pared y, a menudo, un aumento del tamaño de la cámara. El aumento del tamaño de los cardiomiocitos se acompaña de fibrosis intersticial y disfunción cardíaca. Los síntomas de la insuficiencia cardíaca incluyen disnea (dificultad para respirar) y fatiga, a menudo acompañadas de signos físicos típicos, como estertores pulmonares (crepitantes anormales), edema periférico o venas yugulares distendidas (118, 119). En los países desarrollados, la IC se ha convertido en un importante problema de salud pública, que afecta al 2% de la población adulta, y el número de ingresos hospitalarios relacionados con la IC se ha triplicado desde la década de 1990 (120).

Una revisión sistemática de los factores de riesgo de insuficiencia cardíaca en todo el mundo encontró que los principales factores subyacentes de la enfermedad son la cardiopatía isquémica, la hipertensión y la cardiopatía reumática (121).

Existen estudios experimentales que demuestran que la señalización de la vitamina D tiene un efecto protector contra el desarrollo de insuficiencia cardíaca (122), ya que se observan niveles disminuidos de vitamina 25(OH) $_2$ D en plasma de pacientes con esta patología. Los datos de varios estudios experimentales respaldan el papel antifibrótico y antihipertrófico de la vitamina D, ayudando en la disfunción cardíaca, la hipertrofia y la fibrosis (123-126). Además, la vitamina D tiene un papel beneficioso contra la rigidez

arterial y suprime la actividad de metaloproteinasas de la matriz, una molécula importante para la patogénesis de la insuficiencia cardíaca (127) y puede mejorar la contracción y relajación de los cardiomiocitos (128). El tratamiento in vitro con 1,25(OH)₂D dio como resultado una disminución de la expresión del gen profibrótico y del depósito de colágeno en células madre mesenquimales multipotentes, pero la suplementación con vitamina D de sujetos no proporciona ningún beneficio en términos de la salud cardiovascular en la población general (76).

1.3.5. Valvulopatía

La valvulopatía es una enfermedad que se produce cuando una o más de las 4 válvulas cardíacas (mitral, tricúspide, pulmonar y aórtica) no se abren o cierran correctamente, interrumpiendo el flujo de sangre que pasa por el corazón hacia el resto del cuerpo. Las patologías valvulares más prevalentes a nivel mundial son la cardiopatía reumática, la enfermedad estenótica de la válvula aórtica, la insuficiencia mitral y la insuficiencia aórtica, mientras que, en el mundo desarrollado; la enfermedad estenótica de la válvula aórtica es más prevalente (129). Las valvulopatías son una de las principales causas de morbilidad y mortalidad cardiovascular en todo el mundo y se prevé que la carga de morbilidad resultante aumentará en las próximas décadas (130).

Algunos síntomas de la enfermedad de las válvulas cardíacas son sonido sibilante (soplo cardíaco) cuando el médico escucha el corazón con un estetoscopio, dolor en el pecho, hinchazón abdominal (más común en la regurgitación tricúspidea avanzada), fatiga, falta de aire, en particular cuando se está activo o recostado, hinchazón de los tobillos y los pies, mareos, desmayo o latidos irregulares del corazón (131).

La calcificación valvular (CV) conduce a una destrucción lenta y progresiva de las valvas valvulares, dañando su libre movilidad y función (132). Hay varios factores que pueden aumentar el riesgo de presentar enfermedad de las válvulas cardíacas como la edad avanzada, antecedentes de ciertas infecciones que pueden afectar el corazón, presión

arterial alta, colesterol alto, DM y otros factores de riesgo de padecer enfermedades cardíacas (131).

La vitamina D activada modula la inflamación, que es un componente clave de la calcificación de las arterias coronarias y valvulares (133). Se ha encontrado asociación entre la calcificación de las válvulas mitrales (CVM) y la presencia de calcio en el árbol coronario derecho y entre la calcificación de la válvula aórtica (CVA) y presencia de calcio en el árbol coronario izquierdo. Por lo tanto, CVA y CVM pueden servir como una "ventana" que implica también la presencia de calcio en las arterias coronarias (134). El proceso de CV comparte mediadores comunes que también participan en la formación de placas ateroscleróticas en los vasos coronarios, en el cuál interviene la vitamina D (135).

1.3.6. Enfermedad vascular periférica

La enfermedad vascular periférica (EVP) consiste en un daño u obstrucción en los vasos sanguíneos más alejados del corazón: las arterias y venas periféricas. Las arterias y venas periféricas transportan sangre hacia y desde los músculos de los brazos y las piernas y los órganos del abdomen. La EVP puede también afectar a las arterias que llevan sangre a la cabeza (arterias carótidas). Cuando la EVP afecta sólo a las arterias y no a las venas, se denomina enfermedad arterial periférica (136, 137). La EVP es un importante problema de salud y su incidencia está aumentando debido a la obesidad, la DM y el envejecimiento de la población (138).

Las enfermedades de las arterias pueden ocasionar obstrucciones arteriales (incluso la enfermedad arterial periférica), aneurismas aórticos, enfermedad de Buerger y/o fenómeno de Raynaud. Las enfermedades de las venas pueden ocasionar coágulos sanguíneos venosos (incluso la trombosis venosa profunda), embolia pulmonar, flebitis y várices (137).

La arterioesclerosis o acumulación de depósitos grasos que contienen colesterol (placas) en las paredes de las arterias es la principal causa de la enfermedad. Existen factores que aumentan el riesgo a padecer EVP como la edad, antecedentes familiares y genética, hábitos del estilo de vida como el tabaquismo, concentraciones de colesterol en sangre no saludables, triglicéridos altos en sangre, presión arterial alta, sobrepeso y obesidad y síndrome metabólico (139).

Los niveles bajos de $25(\text{OH})_2\text{D}$ se asocian con la regulación de las vías biológicas ateroscleróticas (140). El calcitriol también puede inhibir la absorción de colesterol por los macrófagos y la formación de células espumosas (141). Además, la activación de *VDR* puede regular el proceso aterosclerótico mediante la modulación de citoquinas inflamatorias. La arterioesclerosis es inducida mediante la activación de las células T helper (Th), la interleucina-1b ($\text{IL-1}\beta$), IL-6 y $\text{TNF-}\alpha$, e inhibida por las células Th 2, interleucina-4 (IL-4) e interleucina-10 (IL-10) (142). La suplementación con vitamina D demuestra propiedades antiaterogénicas a través de la inhibición de los niveles séricos de $\text{TNF-}\alpha$ y la promoción de los niveles de IL-10 (141).

La vitamina D está implicada en multitud de procesos biológicos, y queda patente que la deficiencia de vitamina D se ha asociado con factores de riesgo de enfermedad cardiovascular (143). Los efectos descritos de su influencia en la patogenia de la ECV aparecen por la regulación de la transcripción genética por parte del metabolito activo de la vitamina D que actúa a través su receptor nuclear *VDR* (144). Como el *VDR* se expresa en una gran cantidad de tejidos, no es sorprendente que al activarse module la expresión de múltiples genes específicos (145).

Por todo esto, el estudio sobre la influencia de la vitamina D en el riesgo de padecer la ECV puede mejorar la prevención, el diagnóstico, el pronóstico y el tratamiento de dicha patología.

1.4 Receptor de la vitamina D

Todas las acciones biológicas, tanto de la vitamina D como de sus análogos sintéticos, son mediadas por su unión al *VDR* (2). El *VDR* pertenece a la familia de receptores de esteroides que incluye receptores para el ácido retinoico, hormona tiroidea, hormonas sexuales y esteroides suprarrenales (146).

El gen que codifica el receptor nuclear de vitamina D es un gen de más de 100 kilobases (Kb) (147), que se encuentra en el brazo largo del cromosoma 12 (locus 12q12-q14) (148). Tiene al menos 5 regiones promotoras (149), ocho exones codificantes y al menos seis exones no codificantes. La proteína *VDR*, que contiene 427 aminoácidos; funciona como un heterodímero obligado con el receptor del ácido retinoico (RXR) para la activación de genes diana de la vitamina D (144, 150, 151).

La señalización de la vitamina D se produce cuando un metabolito hidroxilado activo de la vitamina D₃ se une al dominio de unión a ligando (LBD) del *VDR* (152-154). Después de la activación por su ligando, este complejo se traspone al núcleo donde se heterodimeriza con RXR y se une a su elemento sensible de la vitamina D (*VDRE*), que se encuentran en la región promotora de los genes diana, reclutando factores de transcripción y moléculas co-reguladoras (activadores o inhibidoras de la transcripción) (155); pudiendo afectar la transcripción de más de 900 genes que participan en multitud de procesos fisiológicos (156) (Fig.8).

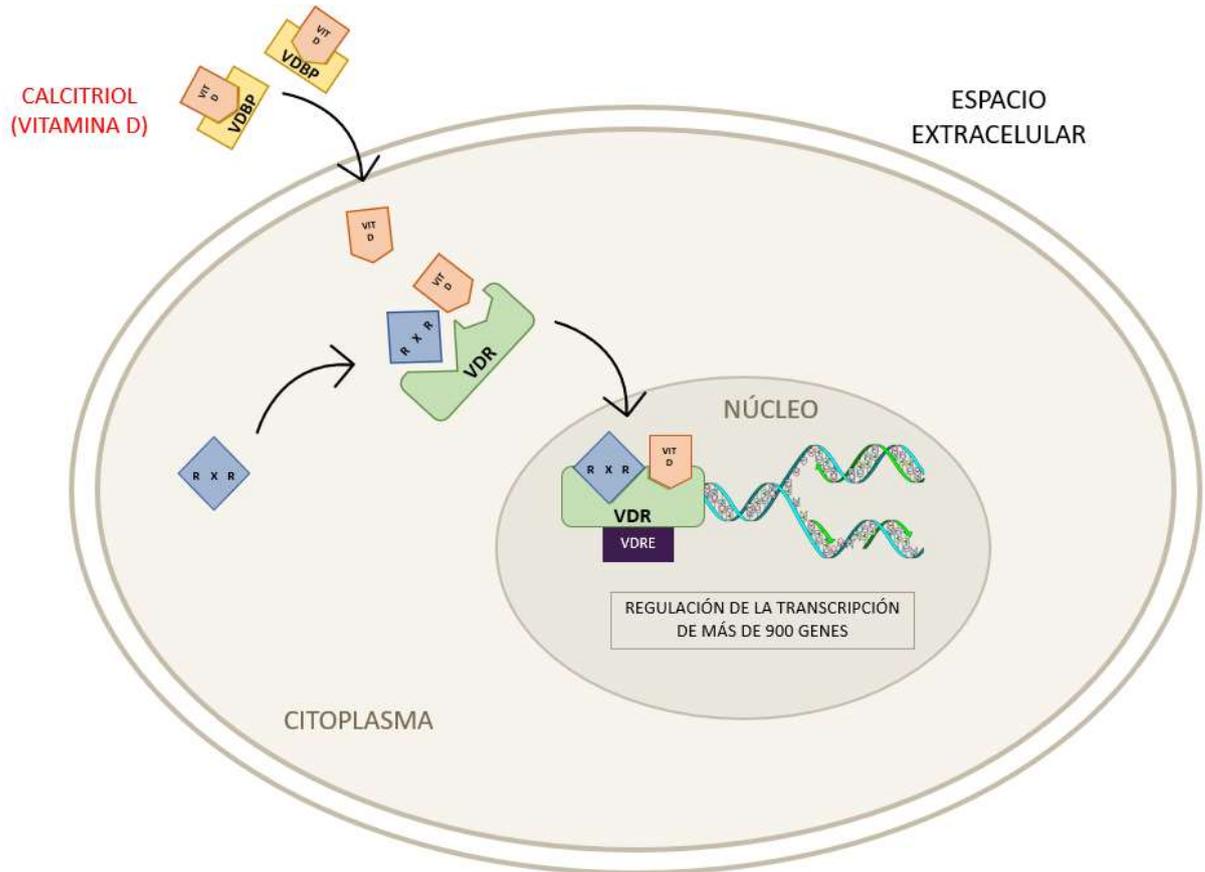


Figura 8. Activación del receptor de la vitamina D.

1.5 Polimorfismos de *VDR*

Se han descubierto múltiples variaciones genéticas en el *VDR*. Las variaciones de la secuencia de ADN, que ocurren con frecuencia en la población, se denominan "polimorfismos" y pueden tener efectos biológicos.

Hasta la fecha, más de 25 polimorfismos diferentes han sido mapeados en el locus *VDR* (149), pero existen cinco polimorfismos comunes que se han asociado típicamente con la actividad de *VDR*; *Cdx2* (rs11568820 A>G), *FokI* (rs2228570 C>T), *TaqI* (rs731236 T>C), *BsmI* (rs1544410 A>G) y *Apal* (rs7975232 C>T) (157, 158) (Fig. 9). Los polimorfismos en las proteínas de unión a la vitamina D pueden afectar su afinidad de unión por la

vitamina D y podrían estar directamente relacionados con el riesgo de deficiencia de vitamina D o ECV (159).

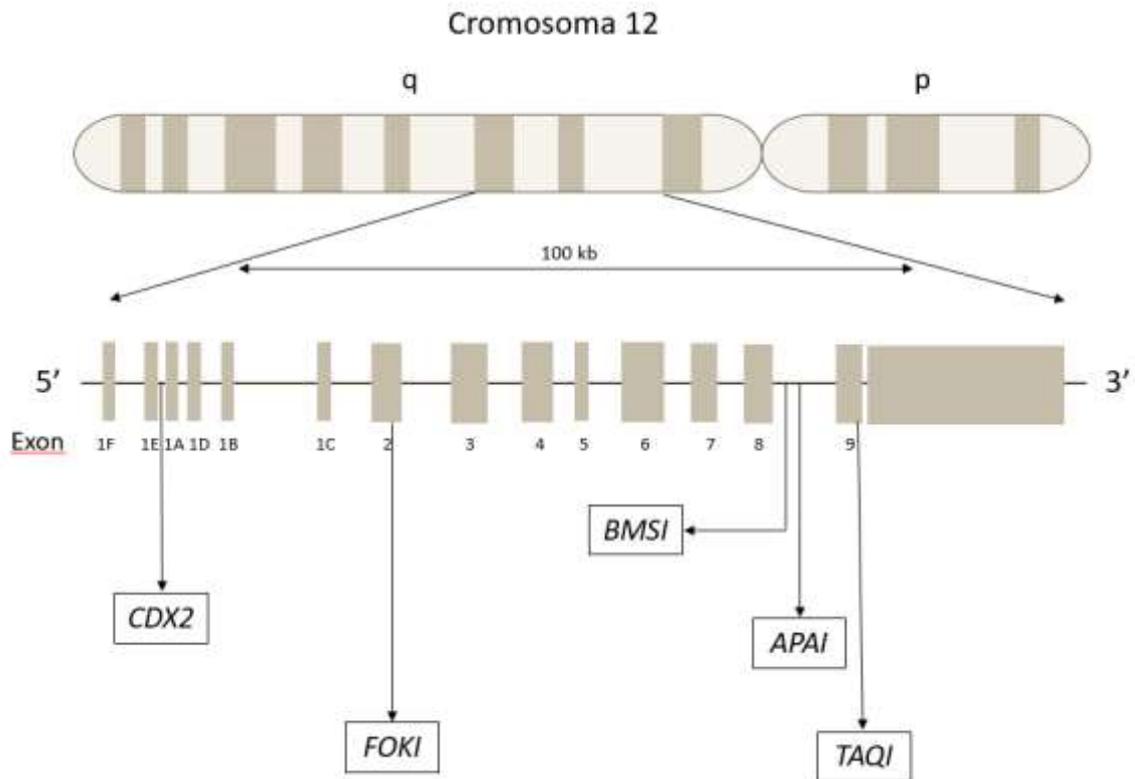


Figura 9. Gen humano del receptor de la vitamina D. Aparecen los polimorfismos *Cdx2* (rs11568820); *FokI* (rs2228570); *BsmI* (rs1544410); *Apal* (rs7975232) y *TaqI* (rs731236).

Recientemente, estos polimorfismos y sus haplotipos, agrupación física de polimorfismos que tienden a heredarse juntas (160); están obteniendo un reconocimiento cada vez mayor a medida que más estudios han verificado sus asociaciones significativas con varias enfermedades (161, 162).

Se ha descrito que estos polimorfismos (*FokI*, *BsmI*, *TaqI*, *Apal* y *Cdx2*) juegan un papel clave en la modificación de la captación de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ y por lo tanto pueden modificar la función de la vitamina D (163). Sin embargo, el mecanismo molecular exacto que explica la asociación entre los polimorfismos *VDR* y los niveles séricos de $25(\text{OH})_2\text{D}$ sigue siendo desconocido (148).

El polimorfismo de *FokI* (rs2228570) se encuentra en el exón 2 y se caracteriza por una sustitución de citosina por timidina (147). Representa una mutación sin sentido en el sitio del inicio de la traducción que modifica la longitud y la actividad funcional de la proteína *VDR* (164, 165).

El SNP *FokI* es el único polimorfismo de *VDR* con impacto funcional, es decir, supone la pérdida de un sitio de inicio de la transcripción (164). El alelo C da como resultado una variante de la proteína *VDR* más corta (424 aminoácidos)(164-168), que produce un factor de transcripción más activo (169). En cambio, la variante de proteína *VDR* asociada con el alelo T (164-168), conduce a la producción de una proteína *VDR* más larga (427 aminoácidos). Aunque no se han encontrado diferencias significativas con la afinidad del ligando, la unión al ADN o la actividad de transactivación entre las dos formas alélicas de *FokI*; la variante más corta muestra una mayor actividad del receptor que la más larga (170).

El polimorfismo *FokI* es posiblemente es el más estudiado en el gen *VDR*, y ha sido previamente asociado con multitud de enfermedades (165, 171-176).

El SNP *BsmI* está ubicado en el intrón 8 (177), cerca de la región 3'UTR del gen *VDR*. Es una sustitución de nucleótidos de adenina a guanina que afecta la estabilidad de la transcripción, ya que está involucrado en la regulación de la expresión de *VDR*; especialmente a través de la regulación de la estabilidad del ácido ribonucleico mensajero (ARNm) (178, 179) y la vida media (156). Por lo tanto, puede influir en la expresión de la proteína (180), pero no altera la estructura o función de la misma.

El SNP *TaqI* está presente en el exón 9, cerca del extremo 3' del gen *VDR*. Es una sustitución de nucleótidos de citosina a timina. Está involucrado en la regulación de la expresión, especialmente a través de la regulación de la estabilidad del ARNm, incluyendo para los receptores de esteroides (164).

El polimorfismo *ApaI* está ubicado en el extremo 3' del gen *VDR* (157), en el intrón 8 del mismo. Es una sustitución de nucleótidos de citosina a timina. Está involucrado en la

regulación de la expresión, especialmente a través de la regulación de la estabilidad del ARNm, incluyendo para los receptores de esteroides (164).

El polimorfismo *Cdx2* se localiza en la región promotora del extremo 5' del gen *VDR* y se caracteriza por una variación de la secuencia de guanina por adenina (166, 181).

Tabla 4. Características del gen *VDR* y los polimorfismos implicados en la ruta metabólica de la vitamina D.

Gen	DbSNP ID	Posición	Alelos	Frecuencia (ALFA)
VDR (12q13.11)	rs1544410 (<i>BsmI</i>)	Exón 8	C > T	T=0.388066 (85636/220674)
	rs11568820 (<i>Cdx2</i>)	Exón 1	G > A	A=0.28140 (14569/51774)
	rs2228570 (<i>FokI</i>)	Exón 2	C > T	T=0.388743 (91849/236272)
	rs7975232 (<i>Apal</i>)	Exón 8	C > A	C=0.44552 (17435/39134)
	rs731236 (<i>TaqI</i>)	Exón 9	A > G	G=0.387180 (74890/193424)



HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2 HIPOTÉISIS

La determinación de alteraciones genéticas en el receptor de la vitamina D ((*BsmI* (rs1544410), *TaqI* (rs731236), *Apal* (rs7975232), *FokI* (rs2228570) y *Cdx2* (rs11568820)) pueden actuar como biomarcadores de riesgo a padecer enfermedad cardiovascular.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo principal

Evaluar la influencia de los polimorfismos genéticos en el gen *VDR* (*BsmI* (rs1544410), *TaqI* (rs731236), *Apal* (rs7975232), *FokI* (rs2228570) y *Cdx2* (rs11568820)) y el riesgo a padecer enfermedad cardiovascular.

3.2 Objetivos específicos

- I. Determinar la prevalencia de los polimorfismos genéticos *BsmI* (rs1544410), *TaqI* (rs731236), *Apal* (rs7975232), *FokI* (rs2228570) y *Cdx2* (rs11568820) en casos y controles.
- II. Analizar conjuntamente la influencia de variables clínicas y genéticas en la susceptibilidad a desarrollar enfermedad cardiovascular.



MATERIAL
Y
MÉTODOS

4 MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. Diseño del estudio

Para determinar la asociación de los polimorfismos del gen *VDR* y la ECV se realizó un estudio observacional retrospectivo de casos y controles.

4.2. Declaración ética

Esta investigación se llevó a cabo de acuerdo con la Declaración de *Helsinki*, bajo la aprobación del Comité de Ética e Investigación del Hospital Universitario Virgen de las Nieves (HUVN), código de aprobación 0957-N-21 (*Anexo 1*). Todos los sujetos participantes en el estudio firmaron un consentimiento informado para la recogida y análisis genético de las muestras de saliva, y su donación al Biobanco del Sistema Sanitario Público de Andalucía; el cual ha avalado la investigación (*Anexo 2*). Las muestras fueron codificadas y tratadas de forma confidencial.

4.3. Población diana y ámbito de estudio

El estudio involucró 246 casos y 246 controles de origen caucásico del sur de España. Con una relación caso/control de 1. Los casos englobaban pacientes diagnosticados de arritmia cardíaca, miocardiopatía, enfermedad cerebrovascular, insuficiencia cardíaca, enfermedad de las válvulas cardíacas, enfermedad vascular periférica en el Hospital Universitario Virgen de la Nieves en Granada, España, entre marzo de 2013 y octubre de 2022. Los controles eran personas sin antecedentes de enfermedad cardiovascular.

4.4. Criterios de inclusión

- Pacientes mayores de 18 años

- Pacientes caucásicos europeos, que habían residido en la misma área geográfica
- Pacientes cuyo seguimiento clínico se haya realizado en el Hospital Virgen de las Nieves (Granada), y sus historias clínicas se encuentren disponibles.
- Pacientes que hayan aceptado de manera voluntaria participar en el estudio firmando el consentimiento informado y contaban con muestra de sangre o saliva en el Biobanco público de Andalucía

4.5. Criterios de exclusión

- Pacientes con una negativa a participar en el estudio o cumplimentar la hoja de Consentimiento Informado.
- Historia clínica no disponible para realizar el seguimiento

4.6. Variables

4.6.1. Variables sociodemográficas

- Sexo: variable cualitativa nominal (femenino/masculino)
- Edad: variable cuantitativa continua
- Hábito alcohólico: variable cualitativa nominal (Bebedor/ Exbebedor/ No bebedor)

Los individuos fueron clasificados según las unidades de bebida estándar (UBE). Se considerarán no bebedores si son abstemios o no consumen alcohol de forma habitual; como bebedores activos si su consumo de alcohol > 4 UBE/día en hombres y > 2.5 UBE/día en mujeres; y como antiguos bebedores si su consumo de alcohol era > 4 unidades UBE/día en hombres y > 2.5 UBE/día en mujeres, pero actualmente no beben.

- Índice de masa corporal (IMC): variable cualitativa nominal (Peso saludable/ sobrepeso /obesos clase I /obesos clase II /obesos clase III).

Se considerarán personas con peso insuficiente los que tengan un IMC < 18.5; con peso saludable los que tengan un IMC entre 18.5 y 24.9; con sobrepeso los que tengan un IMC entre 25 y 29.9; con obesidad clase I los que tengan un IMC entre 30 y 34.9; con obesidad clase II los que tengan un IMC entre 35 y 39.9; y con obesidad clase III los que tengan un IMC mayor de 40.

- Dislipemia: variable cualitativa nominal (Si /No)

Se consideran personas con dislipemia las que tengan triglicéridos > 150 mg/dl; colesterol de alta densidad (del inglés High Density Lipoprotein, HDL) < 40 mg/dl en hombres y HDL < 48 mg/dl en mujeres; colesterol de baja densidad (del inglés Low Density Lipoprotein, LDL) > 100 mg/dl; y colesterol total > 200 mg/dl).

- Hipertensión: variable cualitativa nominal (Si /No)

Se consideran personas con hipertensión las que tengan la presión arterial sistólica (PAS) > 140 milímetros de mercurio (mmHg) y presión arterial diastólica (PAD) > 90 mmHg).

- Diabetes: variable cualitativa nominal (Diabetes tipo I /Diabetes tipos II)

Se consideran personas con diabetes esteroidea aquellos con hiperglucemia inducida por glucocorticoides); los que tenían diabetes tipo I aquellos con glucemia en ayunas > 126 mg/dl producida por una reacción autoinmune contra las células productoras de insulina; y los que tenían diabetes tipo II con glucemia en ayunas > 126 mg/dl producida por resistencia a la insulina.

- Hábito tabáquico: variable cualitativa nominal (Fumador/ Exfumador/ No fumador)

Se considerarán no fumadores si han fumado menos de 100 cigarrillos en su vida. Los pacientes exfumadores también se considerarán fumadores si hace menos de 15 años que han dejado de fumar y fumaban más de 10 paquetes/año.

- Desarrollo de ECV: variable cualitativa nominal (Sí/No)

Se consideran pacientes con ECV aquellos que padecían tromboembolismo arterial, fibrilación auricular, insuficiencia cardiaca, valvulopatías o tromboembolismo venoso.

Estas variables fueron recogidas a partir de las historias clínicas de los pacientes, procedentes de los datos recogidos por los facultativos del hospital mediante las bases de datos del Hospital Universitario Virgen de las Nieves (Estación Clínica, Diraya Clínica, TaoNet).

4.6.2. Variables clínicas

- Arritmias cardíacas
- Miocardiopatía
- Enfermedades cerebrovasculares
- Insuficiencia cardíaca
- Valvulopatías
- Enfermedad periférica vascular.

Estas variables fueron recogidas a partir de las historias clínicas de los pacientes, procedentes de los datos recogidos por los facultativos del hospital mediante las bases de datos del Hospital Universitario Virgen de las Nieves (Estación Clínica, Diraya Clínica, TaoNet).

4.6.3. Variables genéticas

- Estatus de los marcadores genéticos. Variable cualitativa ordinal que toma los valores Homocigoto AA/Homocigoto aa/Heterocigoto Aa para cada polimorfismo genético.

Las variables genéticas fueron obtenidas a partir de los análisis de detección de polimorfismos realizados en la unidad de farmacogenética del servicio de farmacia del HUVN.

4.7. Determinación de los perfiles farmacogenéticos

La determinación de los polimorfismos genéticos incluidos en el estudio se ha llevado a cabo mediante la siguiente metodología:

4.7.1. Extracción y purificación del ADN

Las muestras de ADN, aisladas de sangre o saliva, fueron obtenidas del Biobanco del Hospital Universitario Virgen de las Nieves, que es parte del Biobanco del Sistema Sanitario Público de Andalucía. Las muestras de sangre fueron recogidas en tubos *BD Vacutainer*[®] con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) K₃ como anticoagulante (3 ml). Las muestras de saliva fueron recogidas en tubos cónicos *BD Falcon*[™] de 50 ml (*BD, Plymouth, United Kingdom*). La extracción de ADN se realizó utilizando el kit de extracción *QIAamp DNA Mini* (*Qiagen GmbH, Hilden, Alemania*), siguiendo las especificaciones proporcionadas por el fabricante para la purificación de ADN a partir de sangre o saliva y almacenado a -40°C. La concentración y la pureza del ADN se midieron con el espectrofotómetro de UV *NanoDrop 2000*^{™™} mediante la relación de absorbancia a 280/260 y 280/230.

4.7.2. Análisis de polimorfismos genéticos mediante Real Time PCR

La determinación de los polimorfismos genéticos *BsmI* (rs1544410), *TaqI* (rs731236), *Apal* (rs7975232), *FokI* (rs2228570) y *Cdx2* (rs11568820) fue realizada mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR en tiempo real para discriminación alélica utilizando sondas TaqMan[®] (ABI Applied Biosystems, 7300 Real-Time PCR System) basándonos en las instrucciones del fabricante. El assay ID usado para el polimorfismo

TaqI (rs731236) fue C__2404008_10, para *Apal* (rs7975232) C__28977635_10, *FokI* (rs2228570) C__12060045_20 y para *Cdx2* (rs11568820) C__2880808_10. El polimorfismo *BsmI* (rs1544410) fue analizado mediante un assay customizado por *ThermoFisher Scientific* (Waltham, Massachusetts, Estados Unidos) codificado como AN324M4. Los criterios para el control de calidad de los SNP fueron: [1] tasa de genotipo faltante por SNP < 0,05; [2] frecuencia de alelo menor > 0,01; [3] valor de p > 0,05 en la prueba de equilibrio de Hardy-Weinberg; [4] tasa de genotipo faltante entre casos y controles < 0,05 (Tabla 5).

Tabla 5. Polimorfismos genéticos y TaqMan® ID.

Gen	dbSNP ID	Assay ID
VDR (12q13.11)	rs1544410 (<i>BsmI</i>)	AN324M4 *
	rs11568820 (<i>Cdx-2</i>)	C__2880808_10
	rs2228570 (<i>FokI</i>)	C__12060045_20
	rs7975232 (<i>Apal</i>)	C__28977635_10
	rs731236 (<i>TaqI</i>)	C__2404008_10

* Los polimorfismos se analizaron mediante ensayos personalizados de ThermoFisher Scientific.

La técnica y el análisis se llevaron a cabo en el *Applied Biosystem StepOne Real Time PCR System* (ABI Applied Biosystems, 7300 Real-Time PCR System, Foster City, CA, USA). Las sondas TaqMan™ son reactivos fluorogénicos que utilizan la actividad 5' nucleasa de la *Taq* polimerasa del ADN, de tal forma, que son capaces de detectar un producto específico a medida que se acumula durante los distintos ciclos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los reactivos TaqMan™ contienen sondas con diferentes fluorocromos notificadores específicos para cada alelo en el extremo 5', y apantalladores no fluorescentes en el extremo 3'. El fluorocromo VIC se encuentra unido en el extremo 5' de la sonda del alelo 1, mientras que el fluorocromo FAM está unido al extremo 5' de la sonda del alelo 2. El apantallador hace que se reduzca la fluorescencia que emite el fluorocromo, mientras que la sonda se encuentra intacta, mediante FRET (*Transferencia de energía de resonancia de Förster*). En el caso de que la sonda encuentre su diana de actuación, hibrida de manera específica con su secuencia complementaria situada entre el cebador directo y el reverso, y se rompe debido a la

actividad 5' nucleasa de la enzima *AmpliTaq Gold DNA polimerasa*, durante el proceso de extensión del ADN. Esto hace que se separe el fluorocromo notificador del apantallador, aumentando la señal de fluorescencia del fluorocromo correspondiente. Asimismo, se produce la separación de la sonda de la cadena diana, permitiendo la extensión del cebador hasta el final de la cadena molde. En cada ciclo se separan más moléculas de fluorocromo notificador de sus respectivas sondas, por lo que se va produciendo un aumento progresivo de la intensidad de fluorescencia, proporcional a la cantidad de amplicón producido. En función del genotipo que tengamos en el ADN, emitirá fluorescencia el fluorocromo *VIC* (alelo 1), el fluorocromo *FAM* (alelo 2), o ambos (heterocigosidad).

Las condiciones utilizadas para llevar a cabo la reacción de PCR fueron las siguientes: se inició el proceso con la desnaturalización a 95°C durante 10 minutos, a continuación, se aplicaron 40 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 15 segundos y anillado/extensión a 60°C durante 60 segundos.

4.7.3. Análisis de polimorfismos genéticos mediante Secuenciación

El 10% de los polimorfismos genéticos se determinaron mediante PCR y secuenciación directa, en la unidad de Farmacogenética y el laboratorio de análisis clínico del HUVN. Los productos de PCR se purificaron utilizando el *illustra Exostar Kit* para PCR enzimática y Limpieza de secuenciación (*GE Healthcare Life Sciences*, Chicago, Illinois, EE.UU.).

La reacción de secuenciación se realizó utilizando 1 µl de reactivo de secuenciación cíclica *Big Dye Terminator v1.1* (*Applied Biosystems*, Foster City, CA, EE.UU.), 2 µl del producto de PCR purificado y 119 nM del cebador de PCR inversa. A continuación, los productos de secuenciación se purificaron mediante precipitación con etanol y se analizaron en un analizador genético *ABI PRISM 3130xl* (*Applied Biosystems*, Foster City, CA, EE.UU.). Las características de los ensayos se muestran en la tabla 6.

Tabla 6. Características de cada SNP y la metodología usada para la secuenciación.

dbSNP ID		Primers	
		Forward	Reverse
VDR (12q13.11)	rs1544410 (<i>BsmI</i>)	CGGGGAGTATGAAGGACAAA	CTCTGCTCTTGCGTGAAGTCTG
	rs11568820 (<i>Cdx-2</i>)	AAAGGAAGGAAGGCAGGAAG	AAGACCCCTTGTTTGGCTTT
	rs2228570 (<i>FokI</i>)	AGGGCGAATCATGTATGAGG	TGACCCTGGAGACTTTGACC
	rs7975232 (<i>Apal</i>)	TCGGCTAGCTTCTGGATCAT	CTATGACTGCTGACCGGTGA
	rs731236 (<i>TaqI</i>)	CTGCCGTTGAGTGTCTGTGT	ATGATCCAGAAGCTAGCCGA

4.8 Análisis estadístico

4.8.1. Análisis Descriptivo

Los datos cuantitativos se expresaron como media \pm desviación estándar (sd) para variables con distribución normal y medianas o percentiles (25 y 75) para variables con distribución no normal. Se utilizó la prueba de Shapiro-Wilks para verificar la normalidad. Las variables cualitativas se expresaron como número de observaciones y el porcentaje de observaciones en cada categoría.

4.8.2. Análisis del Riesgo

Los casos y los controles se emparejaron por edad y sexo con el método de emparejamiento por puntuación de propensión 1:2 (183).

El análisis de asociación bivariado entre el riesgo de ECV y los polimorfismos se realizó con múltiples modelos (genotípico, aditivo, alélico, dominante y recesivo) utilizando la prueba Chi-cuadrado de Pearson y la prueba exacta de Fisher, y se evaluó mediante valores de Odds Ratio (OR) y sus correspondientes intervalos de confianza (IC) del 95%. Los modelos se definieron de la siguiente manera: alélicos (D vs. d), dominantes

((DD, Dd) vs. dd), recesivos (DD vs. (Dd, dd), genotípicos (DD vs. Dd vs. Dd) y aditivo (dd=0, Dd=1, DD=2), siendo D el alelo menor y d el alelo mayor. Para las comparaciones múltiples se utilizó la corrección de Bonferroni. Se consideraron los modelos de regresión logística múltiple incondicional (genotípico, dominante, y recesivo) para determinar la influencia de posibles variables de confusión en el riesgo de padecer ECV.

Todas las pruebas fueron bilaterales con un nivel de significancia $p < 0,05$ y se estimaron utilizando software de libre acceso para el conjunto de herramientas de análisis de asociación del genoma completo *PLINK* y el programa estadístico R 3.2.2 (184, 185).

4.8.3. Equilibrio de Hardy-Weinberg, desequilibrio de ligamento y frecuencias de haplotipos

Se determinó el equilibrio de Hardy-Weinberg (HWE), las frecuencias de haplotipos y el desequilibrio de ligamento a través de los coeficientes Lewontin's D prime (D') y coeficiente de desequilibrio de ligamento (r^2). El desequilibrio de ligamento (LD) para cada polimorfismo se calculó a través del programa de análisis de asociación del genoma *PLINK*. El análisis de las frecuencias de haplotipos y su asociación con las respuestas analizadas en el estudio se desarrolló con los programas *HaploView* y *SNPstats*, aplicaciones web para el análisis de estudios de asociación (185-187).



RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1. Características clínicas de los pacientes

Se incluyeron en el estudio un total de 246 casos con ECV y 246 controles de origen caucásico del sur de España. Los controles se emparejaron con los casos por edad y sexo (1:1). Sus características clínicas, sociodemográficas y patológicas se detallan en la 7. La media de edad de los pacientes fue de 70 (63,25, 76) años. El grupo de casos estuvo formado por 132 mujeres (53,7%) y 114 hombres (46,3%). La mayoría de los casos eran no fumadores, no bebedores, con sobrepeso, no dislipidémicos, hipertensos y sin diabetes. En cuanto a las enfermedades cardiovasculares, 84 (34,14%) padecían arritmias cardíacas, 15 (6,10%) presentaban miocardiopatía, 15 (6,10%) enfermedad cerebrovascular, 27 (10,98%) insuficiencia cardíaca, 46 (18,70%) valvulopatía y 59 (23,98%) enfermedad vascular periférica.

El grupo control estuvo formado por 142 mujeres (142/246; 57,7%) y 104 hombres (104/246; 42,3%), con una edad media de 69,5 (63, 76) años. La mayoría de los controles eran no fumadores, no bebedores, tenían un peso saludable, no dislipidémicos, no tenían hipertensión y no tenían diabetes.

Casos y controles mostraron diferencias significativas en términos de IMC ($p = 0,0003$) y diabetes ($p < 0,001$; OR = 10,53; IC 95% = 1,32-3,03; diabetes vs no diabetes) (Tabla 7).

Tabla 7. Características clínico-patológicas de casos y controles.

	Casos		Controles		χ^2	p-valor	Referencia	OR	CI95%
	N	n (%)	N	n (%)					
Sexo	246		246						
Hombre		114 (46.3)		104 (42.3)	0.8237	0.3641			
Mujer		132 (53.7)		142 (57.7)					
Edad	246	70 [63.25, 76]	246	69.5 [63,76]					
Hábito tabáquico	233		203						
Fumadores		41 (17.6)		27 (13.3)	1.9502	0.3772			
Exfumadores		70 (30.0)		70 (34.5)					
No fumadores		122 (52.4)		106 (52.2)					
Hábito alcohólico	220		173						
Bebedores		46 (20.9)		27 (15.6)	2.0823	0.3531			
Exbebedores		8 (3.6)		5 (2.9)					
No bebedores		166 (75.5)		141 (81.5)					
Índice de masa corporal	182	29.63 ± 5.14	114	28.03 ± 4.89					
Bajopeso		1 (0.5)		1 (0.9)	0.0066 ^a	Normal (peso sano)	1.21	0.05-31.44	
Normal (peso sano)		33 (18.1)		40 (35.1)			1		
Sobrepeso		68 (37.4)		30 (26.3)			2.74	1.47-5.20	
Obesidad clase I (obesidad moderada)		46 (25.3)		32 (28.1)			1.74	0.92-3.34	
Obesidad clase II (obesidad severa)		29 (15.9)		10 (8.8)			3.51	1.53-8.57	
Obesidad clase III (obesidad muy severa)		5 (2.7)		1 (0.9)			6.06	0.92-119.19	
Dislipemia	246		246						
No		158 (64.2)		88 (35.8)	0.0790	0.7786			
Si		155 (63.0)		91 (37.0)					
Hipertensión	246		246						
No		100 (40.7)		146 (59.3)	1.8588	0.1728			
Si		115 (46.7)		131 (53.3)					
Diabetes	246		246						
No		170 (69.1)		201 (81.7)	10.5320	0.0012 ^a	No	1	
Si		76 (30.9)		45 (18.3)				1.99	1.32-3.06
Enfermedad cardiovascular	246								
Arritmias cardíacas		84 (34.15)							
Cardiomiopatías		15 (6.10)							
Enfermedad cerebrovascular		15 (6.10)							
Insuficiencia cardíaca		27 (10.98)							
Valvulopatías		46 (18.70)							
Enfermedad periférica vascular		59 (23.98)							
Variables cualitativas: número (porcentaje) Variables cuantitativas: Distribución normal: media ± desviación estándar Distribución no-normal: P ₅₀ [P ₂₅ , P ₇₅]. ^a p-valor para t test									

5.2. Distribución de genotipos

La frecuencia de genotipos para el grupo control coincidió con los valores esperados según el modelo de equilibrio de Hardy-Weinberg (Tabla S1). Los coeficientes D' y r² para la evaluación del desequilibrio de ligamiento se describen en la Tabla S2 y Figura 10. Todos los SNP tenían frecuencias de alelos menores superiores al 1%, por lo que ninguno de ellos tuvo que ser excluido del análisis (Tabla S3). Las frecuencias estimadas de haplotipos se presentan en la Tabla S4.

Tabla S1. Equilibrio de Hardy-Weinberg.

Chr	SNP	Muestra	Alelo menor	Alelo mayor	Genotipos contados	Heterocigosidad observada	Heterocigosidad esperada	p-valor
12	rs1544410	ALL	A	G	85/233/174	0.4736	0.4836	0.6419
12	rs1544410	AFF	A	G	43/116/87	0.4715	0.484	0.6936
12	rs1544410	UNAFF	A	G	42/117/87	0.4756	0.4833	0.7930
12	rs11568820	ALL	A	G	30/185/277	0.376	0.374	1
12	rs11568820	AFF	A	G	13/96/137	0.3902	0.373	0.6075
12	rs11568820	UNAFF	A	G	17/89/140	0.3618	0.375	0.6098
12	rs2228570	ALL	T	C	66/212/214	0.4309	0.4548	0.2360
12	rs2228570	AFF	T	C	45/99/102	0.4024	0.4732	0.0217
12	rs2228570	UNAFF	T	C	21/113/112	0.4593	0.4316	0.3759
12	rs7975232	ALL	C	A	118/236/138	0.4797	0.4992	0.4161
12	rs7975232	AFF	C	A	56/116/74	0.4715	0.4973	0.4420
12	rs7975232	UNAFF	C	A	62/120/64	0.4878	0.5	0.7032
12	rs731236	ALL	C	T	77/234/181	0.4756	0.4777	0.9249
12	rs731236	AFF	C	T	43/115/88	0.4675	0.4833	0.5996
12	rs731236	UNAFF	C	T	34/119/93	0.4837	0.4712	0.7866
Chr: Cromosoma								

Tabla S2. Desequilibrio de ligamiento.

Chr	BP	SNP	Chr	BP	SNP	R2	D'
12	47846052	rs1544410	12	47845054	rs7975232	0.5439	0.9175
12	47846052	rs1544410	12	47844974	rs731236	0.7131	0.9093
12	47845054	rs7975232	12	47844974	rs731236	0.5697	0.9630
Chr: Cromosoma; BP: Posición física (pares de bases)							

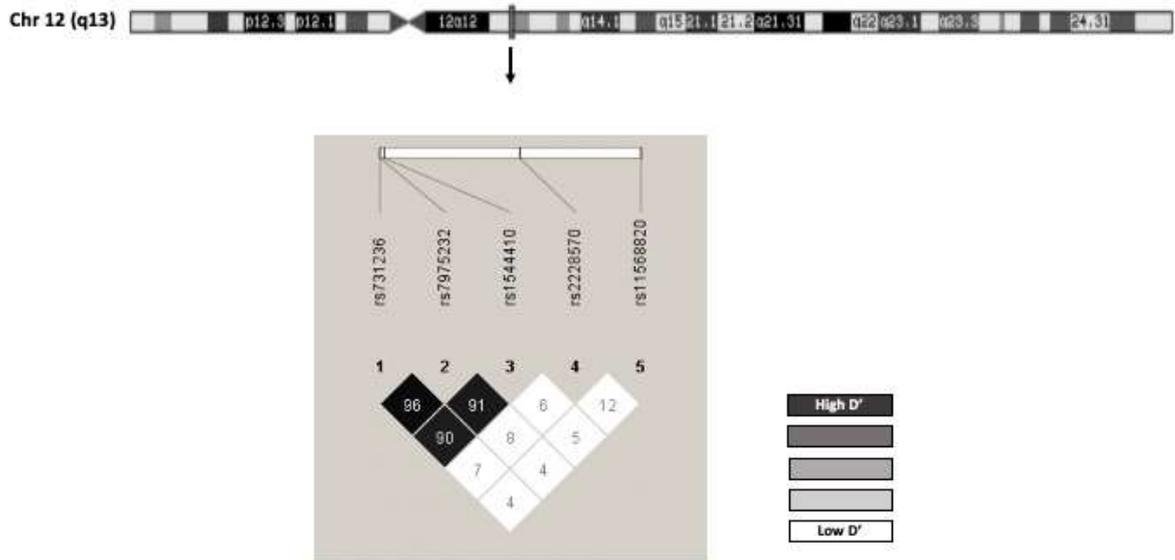


Figura 10. Localización cromosómica de VDR y desequilibrio de ligamiento (LD).

Tabla S3. Frecuencias del alelo menor de los SNPs.

Chr	SNP	Alelo menor	Alelo mayor	MAF
12	rs1544410	A	G	0.4096
12	rs11568820	A	G	0.249
12	rs2228570	T	C	0.3496
12	rs7975232	C	A	0.4797
12	rs731236	C	T	0.3943
Chr: Cromosoma; MAF: Frecuencia del alelo menor				

Tabla S4. Estimación de las frecuencias de los haplotipos.

	rs1544410	rs7975232	rs731236	Total	Grupo Control	Grupo Casos	Frecuencia acumulada
1	G	C	T	0.4613	0.4449	0.4779	0.4613
2	A	A	C	0.3685	0.3698	0.3674	0.8298
3	G	A	T	0.1079	0.1150	0.1009	0.9377
4	A	A	T	0.0251	0.0223	0.0277	0.9628
5	G	A	C	0.0189	0.0295	0.0081	0.9817
6	A	C	T	0.0114	0.0093	0.0134	0.9930
7	A	C	C	0.0046	0.0092	0	0.9977
8	G	C	C	0.0023	0	0.0046	1

Haplotipos raros coloreados con gris.

5.3. Influencia de los polimorfismos genéticos en el riesgo de ECV

El análisis bivariado se realizó de acuerdo con los siguientes modelos: genotípico, aditivo, alelo, dominante y recesivo. *VDR FokI* (rs2228570) fue el único polimorfismo que mostró una asociación con el riesgo de ECV en los modelos genotípico ($p \chi^2 = 0,0063$), aditivo ($p \chi^2 = 0,0267$), alelo ($p \chi^2 = 0,0230$) y recesivo ($p \chi^2 = 0,0015$) (Tabla S5). Esta asociación significativa también se encontró después de realizar ajustes para la prueba de Bonferroni, en la que tanto el modelo genotípico como el recesivo mostraron que los pacientes con el genotipo TT presentaban un mayor riesgo de desarrollar ECV (p corregido por Bonferroni = 0,0305; OR = 2,35; IC del 95 % = 1,33–4,28; TT frente a CC y p corregido por Bonferroni = 0,0075; OR = 2,39; IC del 95 % = 1,39–4,24; TT frente a C; Tabla 8, respectivamente). El análisis de regresión logística ajustado por IMC y diabetes reveló que el genotipo TT se asoció con un mayor riesgo de ECV tanto en el modelo genotípico ($p = 0,0430$; OR = 2,30; IC del 95 % = 1,06–5,37; TT vs. CC; Tabla 9) y el modelo recesivo ($p = 0,0099$; OR = 2,71; IC 95 % = 1,31–6,07; TT vs. C; Tabla 9). Sin embargo, no se encontró asociación en el modelo de regresión logística genotípica

ajustado por IMC y diabetes ($p = 0,2286$; OR = 0,72; IC 95% = 0,43–1,22; TC vs. CC; Tabla 9), el modelo dominante ($p = 0,8648$ OR = 0,95; IC del 95 % = 0,58–1,57; T vs. CC; Tabla 9) o el modelo aditivo ($p = 0,2151$; OR = 1,24; IC 95 % = 0,88–1,76; T vs. C; Tabla 9). Los demás polimorfismos analizados no mostraron asociaciones estadísticamente significativas con el desarrollo de ECV en ninguno de los modelos estudiados (Tabla S5). El análisis de haplotipos reveló que el haplotipo GAC ($p = 0,047$; OR = 0,34; IC del 95 % = 0,12–0,98) se asoció con un mayor riesgo de ECV (Tabla 10).

Tabla S5. Polimorfismos y la asociación con el riesgo de enfermedad cardiovascular.

SNP	Alelo menor	Alelo mayor	Modelo	Casos	Controles	χ^2	p-value χ^2	p-valor Fisher
rs1544410	A	G	Genotípico	43/116/87	42/117/87	0.0161	0.9920	1
			Aditivo	202/290	201/291	0.0041	0.9488	0.9488
			Alélico	202/290	201/291	0.0042	0.9483	1
			Dominante	159/87	159/87	0	1	1
			Recesivo	43/203	42/204	0.0142	0.9051	1
rs11568820	A	G	Genotípico	13/96/137	17/89/140	0.8307	0.6601	0.6505
			Aditivo	122/370	123/369	0.0055	0.9411	0.9411
			Alélico	122/370	123/369	0.0054	0.9412	1
			Dominante	109/137	106/140	0.0744	0.7851	0.8558
			Recesivo	13/233	17/229	0.5680	0.4511	0.5726
rs2228570	T	C	Genotípico	45/99/102	21/113/112	10.12	0.0063	0.0061
			Aditivo	189/303	155/337	4.909	0.0267	0.0267
			Alélico	189/303	155/337	5.167	0.0230	0.0273
			Dominante	144/102	134/112	0.827	0.3631	0.4131
			Recesivo	45/201	21/225	10.08	0.0015	0.0022
rs7975232	C	A	Genotípico	56/116/74	62/120/64	1.098	0.5777	0.5923
			Aditivo	228/264	244/248	1.003	0.3165	0.3165
			Alélico	228/264	244/248	1.042	0.3073	0.3385
			Dominante	172/74	182/64	1.007	0.3156	0.3665
			Recesivo	56/190	62/184	0.4013	0.5264	0.5977
rs731236	C	T	Genotípico	43/115/88	34/119/93	1.258	0.5330	0.5366
			Aditivo	201/291	187/305	0.8305	0.3621	0.3621
			Alélico	201/291	187/305	0.834	0.3611	0.3964
			Dominante	158/88	153/93	0.2185	0.6402	0.7085
			Recesivo	43/203	34/212	1.247	0.2641	0.3209
Chr: Cromosoma; NA: No aplicable								

Tabla 8. Influencia del polimorfismo del gen del VDR *FokI* (rs2228570) sobre el riesgo de enfermedad cardiovascular.

Modelos	Genotipo	Casos [n (%)]	Controles [n (%)]	p-valor ^a	p-valor ^b ajustado	OR ^c	95% CI
Genotípico	TT	45 (18.3)	21 (8.5)	0.0061	0.0305	2.35	1.33-4.28
	CT	99 (40.2)	113 (45.9)			0.96	0.66-1.41
	CC	102 (41.5)	112 (45.5)			1	
Dominante	T	144 (58.5)	134 (54.5)	0.3631	1		
	CC	102 (41.5)	112 (45.5)				
Recesivo	TT	45 (18.3)	21 (8.5)	0.0022	0.0075	2.39	1.39-4.24
	C	201 (81.7)	225 (91.5)				
Alélico	T	189 (38.41)	155 (31.50)	0.0230	0.1151		
	C	303 (61.59)	337 (68.50)				
Aditivo	-	-	-	0.02673 ^d	0.1336		

CI: Intervalo de confianza; OR: Odds ratio

^ap-valor para χ^2 -test; ^bp-valor para la Corrección de Bonferroni; ^cInajustado o crudo ORs; ^dp-valor para t test.

Tabla 9. Influencia de las características clínicas y el polimorfismo del gen *VDR FokI* (rs2228570) y el riesgo de enfermedad cardiovascular.

	Genotípico						Dominante			Recesivo			Aditivo		
	TT vs CC			CT vs CC			T vs CC			TT vs C			T vs C		
	p-valor	OR	IC95%	p-valor	OR	IC95%	p-valor	OR	IC95%	p-valor	OR	IC95%	p-valor	OR	IC95%
Índice de masa corporal	0.0265	1.06	1.01-1.12	0.0265	1.06	1.01-1.12	0.0458	1.05	1.00-1.11	0.0413	1.05	1.00-1.11	0.0634	1.05	0.99-1.10
Diabetes															
Si	0.0359	1.91	1.06-3.55	0.0359	1.91	1.06-3.55	0.0468	1.83	1.02-3.38	0.0316	1.94	1.07-3.59	0.0372	1.89	1.05-3.50
rs2228570	0.0430	2.30	1.06-5.37	0.2286	0.72	0.43-1.22	0.8648	0.95	0.58-1.57	0.0099	2.71	1.31-6.07	0.2151	1.24	0.88-1.76

Tabla 10. Asociación de haplotipos con respuesta.

	rs1544410	rs7975232	rs731236	Freq	OR (95% CI)	p-valor
1	G	C	T	0.4613	1.00	---
2	A	A	C	0.3685	0.92 (0.70 - 1.22)	0.570
3	G	A	T	0.1079	0.81 (0.52 - 1.24)	0.330
4	A	A	T	0.0251	1.11 (0.51 - 2.38)	0.800
5	G	A	C	0.0189	0.34 (0.12 - 0.98)	0.047
6	A	C	T	0.0114	1.22 (0.41 - 3.65)	0.730
raro	*	*	*	0.0069	0.54 (0.12 - 2.49)	0.430

Freq: Frecuencia de haplotipos



DISCUSIÓN

6. DISCUSIÓN

Las enfermedades cardiovasculares, que implican el corazón, el cerebro y la circulación periférica, representan un importante problema de salud en todo el mundo. Esta enfermedad es multifactorial y conlleva una interacción compleja de factores políticos, sociales, conductuales, físicos, biológicos y genéticos (188, 189).

Cada vez se presta más atención al papel de la vitamina D en la función cardiovascular y, en particular, en el efecto de los respectivos polimorfismos en el gen *VDR*; ya que modulan la expresión de múltiples genes que influyen en el desarrollo de la enfermedad. La mayoría de los estudios que describen los SNP de *VDR* se han centrado en cinco polimorfismos: *BsmI* (rs1544410), *TaqI* (rs731236), *Apal* (rs7975232), *FokI* (rs2228570) y *Cdx2* (rs11568820) (157, 190).

El polimorfismo *VDR FokI* (rs2228750) es uno de los más investigados. Es el único polimorfismo *VDR* con impacto funcional, ya que implica la pérdida de un sitio de inicio de la transcripción (164). Estudios previos han descrito resultados contradictorios, por lo que la relación entre este polimorfismo y el desarrollo de ECV no está clara (122, 191-197). En nuestro estudio, el análisis de regresión logística ajustado por índice de masa corporal y diabetes reveló que el genotipo TT del *VDR FokI* mostró una asociación con un mayor riesgo de ECV en el modelo genotípico ($p < 0,05$; Tabla 3) y en el modelo recesivo ($p < 0,05$; Tabla 3).

En la literatura existen estudios que corroboran nuestros resultados, por ejemplo, el estudio llevado a cabo por Abouzeid et al. (2021) realizado en población caucásica (procedente de Polonia) (58 casos/142 controles), en el que se encontraron diferencias estadísticamente significativas en relación con el alelo T del polimorfismo *VDR FokI*; identificándolo como factor de riesgo de insuficiencia cardíaca e hipertensión ($p = 0,03$)(198). Otro trabajo de los investigadores Mokhtar et al. (2019) en una población caucásica (de Egipto) (50 casos/50 controles) también informó una asociación entre el polimorfismo *VDR FokI* y la presencia de defectos cardíacos congénitos. En particular,

los pacientes portadores del alelo *VDR FokI*-T tenían un mayor riesgo de sufrir defectos congénitos de cardiopatías [($p = 0,006$; OR = 3; IC del 95 % = 1–8; TC frente a CC); ($p = 0,03$; OR = 10; IC 95 % = 1–97; TT frente a CC); ($p = 0,001$; OR = 3; IC del 95 % = 2–6; T frente a C)] (194).

En otro estudio realizado por Eweida et al. (2021) en una población caucásica (de Egipto) (244 casos/138 controles) demostró que la frecuencia del alelo T es mayor en pacientes con ECV (grupo A y B), lo que significa que el alelo *VDR FokI*-T aumenta el riesgo de ECV [($p < 0,001$; OR = 2,397, IC 95% = 1,518-3,786, C vs T); ($p < 0,001$; OR = 2,298; IC del 95 % = 1,443–3,660; C vs. T) (199). Además, el estudio realizado por Nakhil et al. (2019) en una población caucásica (región mediterránea) con 50 pacientes informó que la presencia del polimorfismo *VDR FokI* es mayor en comparación con el resto de la población caucásica (189).

Los resultados de nuestro estudio concuerdan con otras investigaciones realizadas en población asiática. Por ejemplo, el estudio de Hao et al. (2019) en una población china (145 casos/90 controles), en la que encontraron diferencias estadísticamente significativas entre casos y controles en relación al alelo T del polimorfismo *VDR FokI*, identificándolo como factor de riesgo para la enfermedad [($p < 0,0001$, OR = 2,45, IC del 95 % = 1,60-3,77, T frente a C); ($p < 0,0001$; OR = 3,42; IC 95 % = 1,94–6,07; TC frente a CC); ($p = 0,02$; OR = 4,73; IC del 95 % = 1,35–16,27; TT frente a CC)] (122).

Asimismo, otro estudio realizado por Jun et al. (2017) en población asiática (procedente de China) (860 casos/862 controles) reveló que los individuos portadores del alelo *VDR FokI*-T tenían mayor riesgo de desarrollar enfermedad arterial coronaria (EAC) [($p < 0,001$; OR = 1,47, IC 95% = 1,22-1,85, CT vs CC); ($p < 0,001$; OR = 2,12; IC 95 % = 1,43–2,88; TT frente a CC); ($p < 0,001$; OR = 1,68; IC del 95 % = 1,26–2,17; TC + TT frente a CC)] (192). De igual forma, un estudio realizado por Prabhakar et al. (2015) en población asiática (procedente de India) (292 casos/219 controles) reportó una asociación estadísticamente significativa entre el genotipo T del polimorfismo *VDR*

FokI y la susceptibilidad a desarrollar ACV ($p=0,01$; OR = 1,89; IC del 95 % = 1,17–3,07; TT frente a CC) (191).

El estudio de Fronczek et al. (2021) en población caucásica (Polonia) evidenció que existían diferencias significativas entre el polimorfismo *FokI* del gen *VDR* entre personas sanas con antecedentes familiares de arteriopatía coronaria (CAD) prematura y aquellos sin antecedentes ($p = 0,024$). Además, estos investigadores mostraron que el genotipo TT del polimorfismo *FokI* fue significativamente más frecuente en el grupo de personas sanas y que el genotipo *FokI* CC fue menos frecuente en personas con antecedentes familiares de CAD prematura (52). Sin embargo, algunos estudios sugieren que no existe asociación entre *FokI* y el síndrome coronario agudo (SCA) como el realizado por Harbuzova et al. (2015) en una población ucraniana (200) y CAD en una población china realizado por Pan et al. (2009) (201).

Igualmente, según el metaanálisis realizado por Tabaei et al. (2021) en poblaciones caucásicas y asiáticas (3741 casos/1998 controles), el alelo T del *VDR FokI* SNP se asoció significativamente con el riesgo de CAD en todos los modelos genéticos, incluidos; modelo dominante ($p = 0,02$; OR = 1,47, IC 95 % 1,06–2,03), modelo recesivo ($p < 0,001$; OR = 1,39, IC 95 % 1,14–1,71), modelo alélico ($p = 0,01$; OR = 1,38, 95 % IC 1.08–1.76, $p = 0.01$), modelo TT vs. CC ($p = 0.02$; OR = 1.58, 95% IC 1.07–2.34), y modelo TC vs. TT ($p = 0,04$; OR = 1,38, IC del 95 %: 1,00–1,92), con una fuerte asociación significativa para la población asiática pero no para la caucásica (202).

Sin embargo, un estudio realizado en población caucásica (de Turquía) (54 casos/58 controles) por Huzmeli et al. (2018) evaluó la influencia del polimorfismo *VDR FokI* sobre el riesgo de fístula arteriovenosa (FAV), pero no encontró asociación estadísticamente significativa ($p = 0,168$; OR = 1,683; IC del 95 % = 0,803–3,531) (193). Otro estudio realizado por Wilke et al. (2009) en población caucásica (Estados Unidos) (205 casos/206 controles) también estudió la influencia del polimorfismo *VDR FokI* en el riesgo de insuficiencia cardíaca congestiva (ICC) en pacientes hipertensos, sin encontrar asociación estadísticamente significativa en cualquiera de los modelos analizados [($p >$

0,05 OR = 0,82; IC 95% = 0,47-1,42; TC vs. CC); ($p > 0,05$; OR = 0,85; IC del 95 % = 0,39–1,88; TT frente a CC); ($p > 0,05$; OR = 0,82; IC del 95 % = 0,49–1,39; CT + TT vs. CC)] (195).

Finalmente, un metaanálisis compuesto por seis estudios en poblaciones caucásicas y asiáticas (2725 casos/1017 controles) realizado por Alizadeh (2017) analizó la influencia del polimorfismo *VDR FokI* en el riesgo de EAC, pero no observó ninguna asociación estadísticamente significativa en ninguno de los modelos analizados [($p > 0,05$; OR = 0,93; IC 95 % = 0,76–1,10; CT + TT vs. CC); ($p > 0,05$; OR = 1,14; IC 95% = 0,86-1,43; TT vs. CT + CC); ($p > 0,05$; OR = 1,00; IC del 95 % = 0,88–1,12; T frente a C); ($p > 0,05$; OR = 0,88; IC 95% = 0,71-1,06; CT vs. CC); ($p > 0,05$; OR = 1,06; IC del 95 % = 0,77–1,35; TT frente a CC)] (196).

De acuerdo con los resultados mostrados en la mayoría de los estudios, incluido el nuestro, el *VDR FokI SNP* presenta asociación estadística con ECV en poblaciones asiáticas y caucásicas (de Europa). Sin embargo, esta significación estadística no ocurre en las poblaciones caucásicas de EE. UU. Parece indicar que la etnicidad puede influir en esta correlación.

De lo contrario, *BsmI* (rs1544410), *TaqI* (rs731236) y *Apal* (rs7975232) no dan como resultado un cambio estructural de la proteína *VDR*. No obstante, estos polimorfismos pueden modificar la expresión del gen *VDR*, afectando potencialmente la estabilidad del ARNm de *VDR* y pudiendo aumentar la susceptibilidad a desarrollar ECV (164, 180).

En nuestro estudio, el polimorfismo *VDR BsmI* no mostró asociación con la susceptibilidad a desarrollar ECV en ninguno de los modelos analizados (Tabla 2). Varios estudios en poblaciones caucásicas corroboran nuestros resultados, como los estudios realizados por Ewida et al. (2021)(203) y Nakhil et al. (2019), en el que no hubo asociación entre esos polimorfismos y ECV (189). Sin embargo, según los resultados del estudio realizado por Abouzid et al. (2021) en población caucásica (Polonia) sugieren que el genotipo *VDR BsmI* -AA protege de las enfermedades cardiovasculares ($p = 0,04$) (198) .

Además, según el metaanálisis de Tabaei et al. (2021) en poblaciones caucásicas y asiáticas (6169 casos/2392 controles), el genotipo *VDR ApaI*-CC se asoció significativamente con el riesgo de EAC en todos los modelos genéticos, incluido: modelo dominante ($p = 0,002$; OR = 1,20, IC del 95%: 1,07– 1,34), modelo alélico ($p = 0,004$; OR = 1,12, IC 95% 1,04–1,21), modelo CC versus AA ($p = 0,01$; OR = 1,22, IC 95% 1,04–1,44) y modelo AC versus AA ($p = 0,007$; OR = 1,18, IC 95% 1,05–1,33), distintos del modelo recesivo ($p = 0,17$; OR = 1,10, IC 95% 0,96–1,27) (202) .

Por último, el polimorfismo *Cdx2* (rs11568820) se encuentra en la región promotora del extremo 5' del gen *VDR* que regula la expresión génica (166). Hasta el momento, ningún estudio ha evaluado el impacto del polimorfismo *VDR Cdx2* en la susceptibilidad a desarrollar ECV. En nuestro estudio no se encontró asociación significativa entre el polimorfismo *VDR Cdx2* (rs11568820) y el riesgo de desarrollar ECV en ninguno de los modelos analizados (Tabla 2).

Bajo nuestras condiciones experimentales hay que considerar que la principal limitación de nuestro estudio fue el pequeño tamaño muestral en comparación con otros estudios, especialmente en cuanto a casos, lo que podría haber impedido la detección de determinadas asociaciones. Asimismo, los niveles séricos de 25(OH)₂D no están disponibles en nuestro estudio, al tratarse de un estudio retrospectivo y no ser una analítica de rutina. No ha sido posible correlacionar los niveles de vitamina D activa y los genotipos. Sin embargo, a pesar del tamaño de muestra limitado, después de ajustar la prueba de Bonferroni para evitar asociaciones de falsos positivos, el efecto de *VDR FokI* fue significativo. Hay de indicar como puntos fuertes de nuestro estudio la homogeneidad de la muestra, especialmente en cuanto a los casos, que se componían únicamente de pacientes del Hospital Universitario Virgen de las Nieves diagnosticados por el mismo equipo, y también de la misma zona geográfica, aumentando así la uniformidad. Además, el número de controles elegidos eran iguales al número de casos para reducir el posible sesgo de selección.

Es importante destacar que los resultados de los estudios publicados son inconsistentes y por lo tanto se necesitan profundizar más en esta línea de investigación para comprender completamente la relación entre los polimorfismos del gen *VDR* y la enfermedad cardiovascular. Las discrepancias entre los resultados de estos estudios se pueden atribuir a las diferentes etnias de las poblaciones de estudio, los diferentes tamaños de muestra y la heterogeneidad de la gravedad de la CAD y la definición de la CAD. Cabe destacar que la enfermedad cardiovascular es multifactorial y está influenciada por una combinación de factores genéticos y ambientales, por lo que la contribución de los polimorfismos del gen *VDR* puede variar en diferentes poblaciones y contextos.



CONCLUSIONES

7. CONCLUSIONES

CONCLUSION 1.- El análisis de los resultados del presente estudio y su contraste con los publicados al respecto en la literatura científica permiten, según nuestro estudio y condiciones experimentales, afirmar que el polimorfismo *VDR FokI* (rs2228570) se asoció significativamente con el desarrollo de ECV. Ello implicaría que este SNP podría utilizarse como biomarcador de riesgo para la enfermedad mencionada.

CONCLUSION 2.- No se encontró influencia de los polimorfismos *VDR BsmI* (rs1544410), *TaqI* (rs731236), *Apal* (rs7975232) y *Cdx2* (rs11568820) sobre el riesgo de desarrollar ECV en los pacientes con patología cardiovascular bajo nuestras condiciones experimentales.



REFERENCIAS

8. REFERENCIAS

1. DeLuca HF. Overview of general physiologic features and functions of vitamin D. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2004;80(6):16895–965.
2. Bover J, Egado J, Fernández-Giráldez E, Praga M, Solozábal-Campos C, Torregrosa JV, et al. Vitamina D, receptor de la vitamina D e importancia de su activación en el paciente con enfermedad renal crónica. *Nefrología*. 2015;35(1):28-45.
3. Zhao B, Zhang W, Du S, Zhou Z. Vitamin D receptor Bsm1 polymorphism and osteoporosis risk in post-menopausal women. *Archives of Medical Science (AMS)*. 2016;12(1):25-30.
4. Etten Ev, Mathieu C. Immunoregulation by 1,25-dihydroxyvitamin D3: Basic concepts. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology* 2005;97(1-2):93-101.
5. Penna G, Adorini L. $1\alpha, 25$ -Dihydroxyvitamin D3 Inhibits Differentiation, Maturation, Activation, and Survival of Dendritic Cells Leading to Impaired Alloreactive T Cell Activation. *The Journal of Immunology*. 2000;164:2405–11.
6. TD T, BL. C. Vitamin D insufficiency. *Mayo Clinic Proceedings*. 2011;86(1):50-60.
7. Rochel N, Wurtz JM, Mitschler A, Klaholz B, Moras D. The Crystal Structure of the Nuclear Receptor for Vitamin D Bound to Its Natural Ligand. *Molecular Cell*. 2000;5(1):173-9.
8. Sato T, Iwasaki Y, Kikkawa Y, Fukagawa M. An efficacy of intensive vitamin D delivery to neointimal hyperplasia in recurrent vascular access stenosis. *The Journal of Vascular Access*. 2016;17 (1):72-7.
9. Sosa-Díaz E, Hernández-Cruz EY, Pedraza-Chaverri J. The role of vitamin D on redox regulation and cellular senescence. *Free radical biology & medicine*. 2022;193(Pt 1):253-73.
10. Pilz S, Verheyen N, Grübler MR, Tomaschitz A, März W. Vitamin D and cardiovascular disease prevention. *Nature Reviews Cardiology*. 2016;13:404.
11. D'Orazio J, Jarrett S, Amaro-Ortiz A, Scott T. UV radiation and the skin. *International journal of molecular sciences*. 2013;14(6):12222-48.
12. Holick MF. Vitamin D deficiency. *The New England journal of medicine*. 2007;357(3):266-81.

13. Feldman SH, Easton DN. Chapter 17 - Occupational Health and Safety. In: Suckow MA, Weisbroth SH, Franklin CL, editors. *The Laboratory Rat (Second Edition)*. Burlington: Academic Press; 2006. p. 565-86.
14. McKenzie R, Madronich S. RADIATION TRANSFER IN THE ATMOSPHERE | Ultraviolet, Surface. In: North GR, Pyle J, Zhang F, editors. *Encyclopedia of Atmospheric Sciences (Second Edition)*. Oxford: Academic Press; 2015. p. 45-50.
15. Wacker M, Holick MF. Sunlight and Vitamin D: A global perspective for health. *Dermatoendocrinol*. 2013;5(1):51-108.
16. Schmid A, Walther B. Natural vitamin D content in animal products. *Advances in nutrition (Bethesda, Md)*. 2013;4(4):453-62.
17. Borel P, Caillaud D, Cano NJ. Vitamin D Bioavailability: State of the Art. *Critical Reviews In Food Science And Nutrition*. 2013;55(9):1193-205.
18. Ovesen L, Brot C, Jakobsen J. Food contents and biological activity of 25-hydroxyvitamin D: a vitamin D metabolite to be reckoned with? *Annals of Nutrition and Metabolism*. 2003;47(3-4):107-13.
19. Mattila PH, Piironen VI, Uusi-Rauva EJ, Koivistoinen PE. Vitamin D contents in edible mushrooms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1994;42(11):2449-53.
20. Calvo MS, Whiting SJ, Barton CN. Vitamin D fortification in the United States and Canada: current status and data needs. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2004;80(6):1710s-6s.
21. National Institutes of Health OoDS. Vitamin D 2022 [Available from: <https://ods.od.nih.gov/factsheets/VitaminD-HealthProfessional/>].
22. Pludowski P, Holick MF, Grant WB, Konstantynowicz J, Mascarenhas MR, Haq A, et al. Vitamin D supplementation guidelines. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 2018;175:125-35.
23. Ross AC, Taylor CL, Yaktine AL, Valle HBD. *Dietary Reference Intakes for Vitamin D and Calcium* Washington (DC): National Academies Press (US). Press NA, editor. Washington, DC2011.
24. Collaborators. GMAcOD. Global, regional, and national age-sex specific all-cause and cause-specific mortality for 240 causes of death, 1990-2013: a systematic analysis

for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet* (London, England). 2015;385(9963):117-71.

25. Ronco C, Cozzolino M. Mineral metabolism abnormalities and vitamin D receptor activation in cardiorenal syndromes 2011. 211-20 p.

26. Dusso AS. Kidney disease and vitamin D levels: 25-hydroxyvitamin D, 1,25-dihydroxyvitamin D, and VDR activation. *Kidney international supplements*. 2011;1(4):136-41.

27. Charoenngam N, Shirvani A, Holick MF. Vitamin D for skeletal and non-skeletal health: What we should know. *Journal of clinical orthopaedics and trauma*. 2019;10(6):1082-93.

28. Delanghe JR, Speeckaert R, Speeckaert MM. Behind the scenes of vitamin D binding protein: more than vitamin D binding. *Best practice & research Clinical endocrinology & metabolism*. 2015;29(5):773-86.

29. Bikle DD. Vitamin D metabolism, mechanism of action, and clinical applications. *Chemistry & biology*. 2014;21(3):319-29.

30. Cooke NE, Haddad JG. Vitamin D binding protein (Gc-globulin). *Endocrine reviews*. 1989;10(3):294-307.

31. Christakos S, Dhawan P, Verstuyf A, Verlinden L, Carmeliet G. Vitamin D: Metabolism, Molecular Mechanism of Action, and Pleiotropic Effects. *Physiological reviews*. 2016;96(1):365-408.

32. Chowdhury R, Kunutsor S, Vitezova A, Oliver-Williams C, Chowdhury S, Kiefte-de-Jong JC, et al. Vitamin D and risk of cause specific death: systematic review and meta-analysis of observational cohort and randomised intervention studies. *BMJ (Clinical research ed)*. 2014;348:g1903.

33. Bikle DD. Vitamin D regulated keratinocyte differentiation. *Journal of cellular biochemistry*. 2004;92(3):436-44.

34. Bouillon R, Carmeliet G, Verlinden L, van Etten E, Verstuyf A, Luderer HF, et al. Vitamin D and human health: lessons from vitamin D receptor null mice. *Endocrine reviews*. 2008;29(6):726-76.

35. OMS. Enfermedades cardiovasculares 2022 [Available from: https://www.who.int/es/health-topics/cardiovascular-diseases#tab=tab_1].

36. Guo Z-L, Xu J-L, Lai R-K, Wang S-S. Vasectomy and cardiovascular disease risk: A systematic review and meta-analysis. *Medicine*. 2017;96(34):e7852.
37. Muñoz-Aguirre P, Denova-Gutiérrez E, Flores M, Salazar-Martínez E, Salmeron J. High Vitamin D Consumption Is Inversely Associated with Cardiovascular Disease Risk in an Urban Mexican Population 2016. e0166869 p.
38. Pandya A, Sy S, Cho S, Weinstein MC, Gaziano TA. Cost-effectiveness of 10-Year Risk Thresholds for Initiation of Statin Therapy for Primary Prevention of Cardiovascular Disease. *JAMA*. 2015;314(2):142-50.
39. Estadística INd. Defunciones según la causa de muerte. Año 2022. Datos provisionales 2022 [Available from: https://www.ine.es/dyngs/INEbase/es/operacion.htm?c=Estadistica_C&cid=1254736176780&menu=ultiDatos&idp=1254735573175].
40. Estadística INd. Defunciones según la Causa de Muerte. Primer semestre 2023 (datos provisionales) y año 2022 (datos definitivos) 2023 [Available from: https://ine.es/dyngs/INEbase/es/operacion.htm?c=Estadistica_C&cid=1254736176780&menu=ultiDatos&idp=1254735573175].
41. Wang W, Jiang B, Sun H, Ru X, Sun D, Wang L, et al. Prevalence, Incidence, and Mortality of Stroke in China: Results from a Nationwide Population-Based Survey of 480 687 Adults. *Circulation*. 2017;135(8):759-71.
42. Anderson KM, Wilson PW, Odell PM, Kannel WB. An updated coronary risk profile. A statement for health professionals. *Circulation*. 1991;83(1):356-62.
43. Jeppesen J, Hein HO, Suadicani P, Gyntelberg F. Triglyceride concentration and ischemic heart disease: an eight-year follow-up in the Copenhagen Male Study. *Circulation*. 1998;97(11):1029-36.
44. Della-Morte D, Guadagni F, Palmirota R, Testa G, Caso V, Paciaroni M, et al. Genetics of ischemic stroke, stroke-related risk factors, stroke precursors and treatments 2012. 595-613 p.
45. Abbate R, Sticchi E, Fatini C. Genetics of cardiovascular disease. *Clinical cases in mineral and bone metabolism : the official journal of the Italian Society of Osteoporosis, Mineral Metabolism, and Skeletal Diseases*. 2008;5(1):63-6.

46. Reiner Z, Catapano AL, De Backer G, Graham I, Taskinen MR, Wiklund O, et al. 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). *European heart journal*. 2011;32(14):1769-818.
47. Asghar W, Khalid N. Nutrigenetics and nutrigenomics, and precision nutrition. *Nutrition and Health*. 2023;29(2):169-70.
48. Corella D, Ordovas JM. SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISMS THAT INFLUENCE LIPID METABOLISM: Interaction with Dietary Factors. *Annual review of nutrition*. 2005;25:341-90.
49. Marcum JA. Nutrigenetics/Nutrigenomics, Personalized Nutrition, and Precision Healthcare. *Current nutrition reports*. 2020;9(4):338-45.
50. Meiliana A, Wijaya AY. Nutrigenetics, Nutrigenomics and Precision Nutrition. *The Indonesian Biomedical Journal*. 2020.
51. Ferguson JF, Allayee H, Gerszten RE, Ideraabdullah F, Kris-Etherton PM, Ordovas JM, et al. Nutrigenomics, the Microbiome, and Gene-Environment Interactions: New Directions in Cardiovascular Disease Research, Prevention, and Treatment: A Scientific Statement From the American Heart Association. *Circulation Cardiovascular genetics*. 2016;9(3):291-313.
52. Fronczek M, Strzelczyk JK, Osadnik T, Biernacki K, Ostrowska Z. VDR Gene Polymorphisms in Healthy Individuals with Family History of Premature Coronary Artery Disease. *Disease markers*. 2021;2021:8832478.
53. Peña-Romero AC, Navas-Carrillo D, Marín F, Orenes-Piñero E. The future of nutrition: Nutrigenomics and nutrigenetics in obesity and cardiovascular diseases. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2018;58(17):3030-41.
54. Chen YY, Wang BN, Yu XP. Correlation between the 677C>T polymorphism in the methylene tetrahydrofolate reductase gene and serum homocysteine levels in coronary heart disease. *Genetics and molecular research : GMR*. 2016;15(1).
55. Raina JK, Sharma M, Panjaliya RK, Bhagat M, Sharma R, Bakaya A, et al. Methylene tetrahydrofolate reductase C677T and methionine synthase A2756G gene polymorphisms and associated risk of cardiovascular diseases: A study from Jammu region. *Indian heart journal*. 2016;68(3):421-30.

56. Li WX, Liao P, Hu CY, Cheng F, Zhang T, Sun YY, et al. Interactions of Methylenetetrahydrofolate Reductase Gene Polymorphisms, Folate, and Homocysteine on Blood Pressure in a Chinese Hypertensive Population. *Clinical laboratory*. 2017;63(4):817-25.
57. Razquin C, Alfredo Martinez J, Martinez-Gonzalez MA, Corella D, Santos JM, Marti A. The Mediterranean diet protects against waist circumference enlargement in 12Ala carriers for the PPARgamma gene: 2 years' follow-up of 774 subjects at high cardiovascular risk. *The British journal of nutrition*. 2009;102(5):672-9.
58. AlSaleh A, O'Dell SD, Frost GS, Griffin BA, Lovegrove JA, Jebb SA, et al. Interaction of PPARG Pro12Ala with dietary fat influences plasma lipids in subjects at cardiometabolic risk. *Journal of lipid research*. 2011;52(12):2298-303.
59. AlSaleh A, Sanders TA, O'Dell SD. Effect of interaction between PPARG, PPARA and ADIPOQ gene variants and dietary fatty acids on plasma lipid profile and adiponectin concentration in a large intervention study. *The Proceedings of the Nutrition Society*. 2012;71(1):141-53.
60. García-Calzón S, Martínez-González MA, Razquin C, Corella D, Salas-Salvadó J, Martínez JA, et al. Pro12Ala polymorphism of the PPAR γ 2 gene interacts with a mediterranean diet to prevent telomere shortening in the PREDIMED-NAVARRA randomized trial. *Circulation Cardiovascular genetics*. 2015;8(1):91-9.
61. Aouizerat BE, Kulkarni M, Heilbron D, Drown D, Raskin S, Pullinger CR, et al. Genetic analysis of a polymorphism in the human apoA-V gene: effect on plasma lipids. *Journal of lipid research*. 2003;44(6):1167-73.
62. Endo K, Yanagi H, Araki J, Hirano C, Yamakawa-Kobayashi K, Tomura S. Association found between the promoter region polymorphism in the apolipoprotein A-V gene and the serum triglyceride level in Japanese schoolchildren. *Human genetics*. 2002;111(6):570-2.
63. Ordovas JM, Corella D, Cupples LA, Demissie S, Kelleher A, Coltell O, et al. Polyunsaturated fatty acids modulate the effects of the APOA1 G-A polymorphism on HDL-cholesterol concentrations in a sex-specific manner: the Framingham Study. *Am J Clin Nutr*. 2002;75(1):38-46.

64. Attila G, Acartürk E, Eskandari G, Akpınar O, Tuli A, Kanadaş IM, et al. Effects of apolipoprotein E genotypes and other risk factors on the development of coronary artery disease in Southern Turkey. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. 2001;312(1-2):191-6.
65. Egert S, Boesch-Saadatmandi C, Wolfram S, Rimbach G, Müller MJ. Serum lipid and blood pressure responses to quercetin vary in overweight patients by apolipoprotein E genotype. *The Journal of nutrition*. 2010;140(2):278-84.
66. Su Q, Peng M, Zhang Y, Xu W, Darko KO, Tao T, et al. Quercetin induces bladder cancer cells apoptosis by activation of AMPK signaling pathway. *American journal of cancer research*. 2016;6(2):498-508.
67. Zhang Y, Tang HQ, Peng WJ, Zhang BB, Liu M. Meta-analysis for the Association of Apolipoprotein E $\epsilon 2/\epsilon 3/\epsilon 4$ Polymorphism with Coronary Heart Disease. *Chinese medical journal*. 2015;128(10):1391-8.
68. Wang H, Zhang D, Ling J, Lu W, Zhang S, Zhu Y, et al. Gender specific effect of LIPC C-514T polymorphism on obesity and relationship with plasma lipid levels in Chinese children. *Journal of cellular and molecular medicine*. 2015;19(9):2296-306.
69. Khammissa RAG, Fourie J, Motswaledi MH, Ballyram R, Lemmer J, Feller L. The Biological Activities of Vitamin D and Its Receptor in Relation to Calcium and Bone Homeostasis, Cancer, Immune and Cardiovascular Systems, Skin Biology, and Oral Health. *Biomed Res Int*. 2018;2018:9276380.
70. A. Abu el Maaty M, Ibrahim S, M. Sleem H, Gad M. Vitamin D receptor gene polymorphisms (TaqI and ApaI) in relation to 25-hydroxyvitamin D levels and coronary artery disease incidence 2015. 391-6 p.
71. He L, Wang M. Association of vitamin d receptor-a gene polymorphisms with coronary heart disease in Han Chinese. *International journal of clinical and experimental medicine*. 2015;8(4):6224-9.
72. Wang EW, Pang MY, Siu P, Lai CK, Woo J, Collins AR, et al. Vitamin D status and cardiometabolic risk factors in young adults in Hong Kong: Associations and implications 2018. 231-7 p.
73. Mozos I, Marginean O. Links between Vitamin D Deficiency and Cardiovascular Diseases. *BioMed research international*. 2015;2015:109275-.

74. Wang TJ, Pencina MJ, Booth SL, Jacques PF, Ingelsson E, Lanier K, et al. Vitamin D deficiency and risk of cardiovascular disease. *Circulation*. 2008;117(4):503-11.
75. Kim DH, Meza CA, Clarke H, Kim JS, Hickner RC. Vitamin D and Endothelial Function. *Nutrients*. 2020;12(2).
76. Latic N, Erben RG. Vitamin D and Cardiovascular Disease, with Emphasis on Hypertension, Atherosclerosis, and Heart Failure. *International journal of molecular sciences*. 2020;21(18).
77. Somjen D, Weisman Y, Kohen F, Gayer B, Limor R, Sharon O, et al. 25-Hydroxyvitamin D3-1-Hydroxylase Is Expressed in Human Vascular Smooth Muscle Cells and Is Upregulated by Parathyroid Hormone and Estrogenic Compounds 2005. 1666-71 p.
78. Chun Li Y, Kong J, Wei M, Chen Z-F, Liu S, Cao L-P. 1,25-dihydroxyvitamin D(3) is a Negative Endocrine Regulator of the Renin-Angiotensin System 2002. 229-38 p.
79. Li YC, Qiao G, Uskokovic M, Xiang W, Zheng W, Kong J. Vitamin D: a negative endocrine regulator of the renin-angiotensin system and blood pressure. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 2004;89-90(1-5):387-92.
80. Rammos G, Tseke P, Ziakka S. Vitamin D, the renin-angiotensin system, and insulin resistance 2008. 419-26 p.
81. Tenderich G, Berthold HK, Stehle P, Koerfer R, Schleithoff SS, Zittermann A. Vitamin D supplementation improves cytokine profiles in patients with congestive heart failure: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2006;83(4):754-9.
82. Oh J, Riek AE, Darwech I, Funai K, Shao J, Chin K, et al. Deletion of macrophage Vitamin D receptor promotes insulin resistance and monocyte cholesterol transport to accelerate atherosclerosis in mice. *Cell reports*. 2015;10(11):1872-86.
83. Llorente V, Badimon L. Bases celulares y moleculares de la acumulación de colesterol en la pared vascular y su contribución a la progresión de la lesión aterosclerótica. *Revista Española de Cardiología*. 1998;51(8):633-41.
84. Kumar S, Nanduri R, Bhagyaraj E, Kalra R, Ahuja N, Chacko AP, et al. Vitamin D3-VDR-PTPN6 axis mediated autophagy contributes to the inhibition of macrophage foam cell formation. *Autophagy*. 2021;17(9):2273-89.

85. Kassi E, Adamopoulos C, Basdra EK, Papavassiliou AG. Role of vitamin D in atherosclerosis. *Circulation*. 2013;128(23):2517-31.
86. Giulietti A, van Etten E, Overbergh L, Stoffels K, Bouillon R, Mathieu C. Monocytes from type 2 diabetic patients have a pro-inflammatory profile. 1,25-Dihydroxyvitamin D(3) works as anti-inflammatory. *Diabetes research and clinical practice*. 2007;77(1):47-57.
87. Koyama T, Shibakura M, Ohsawa M, Kamiyama R, Hirosawa S. Anticoagulant effects of 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 on human myelogenous leukemia cells and monocytes. *Blood*. 1998;92(1):160-7.
88. Fu DG. Cardiac Arrhythmias: Diagnosis, Symptoms, and Treatments. *Cell biochemistry and biophysics*. 2015;73(2):291-6.
89. Graczyk S, Grzeczka A, Paśławska U, Kordowitzki P. The Possible Influence of Vitamin D Levels on the Development of Atrial Fibrillation-An Update. *Nutrients*. 2023;15(12).
90. Barsan M, Brata AM, Ismaiel A, Dumitrascu DI, Badulescu AV, Duse TA, et al. The Pathogenesis of Cardiac Arrhythmias in Vitamin D Deficiency. *Biomedicines*. 2022;10(6).
91. Burstein B, Nattel S. Atrial fibrosis: mechanisms and clinical relevance in atrial fibrillation. *Journal of the American College of Cardiology*. 2008;51(8):802-9.
92. Tamayo M, Martin-Nunes L, Val-Blasco A, Piedras MJ, Larriba MJ, Gómez-Hurtado N, et al. Calcitriol, the Bioactive Metabolite of Vitamin D, Increases Ventricular K(+) Currents in Isolated Mouse Cardiomyocytes. *Frontiers in physiology*. 2018;9:1186.
93. National Institutes of Health OoDS. Cardiomiopatía 2022 [Available from: <https://medlineplus.gov/spanish/cardiomyopathy.html>].
94. Cruickshank S. Cardiomyopathy. *Nursing standard (Royal College of Nursing (Great Britain) : 1987)*. 2004;18(23):46-52; quiz 4-6.
95. National Heart LaBI. Miocardiopatía: Causas y factores de riesgo 2022 [Available from: <https://www.nhlbi.nih.gov/es/salud/miocardiopatia/causas>].
96. Nibbelink KA, Tishkoff DX, Hershey SD, Rahman A, Simpson RU. 1,25(OH)2-vitamin D3 actions on cell proliferation, size, gene expression, and receptor localization, in the HL-1 cardiac myocyte. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 2007;103(3-5):533-7.

97. Wu J, Garami M, Cheng T, Gardner DG. 1,25(OH)₂ vitamin D₃ and retinoic acid antagonize endothelin-stimulated hypertrophy of neonatal rat cardiac myocytes. *The Journal of clinical investigation*. 1996;97(7):1577-88.
98. O'Connell TD, Simpson RU. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ regulation of myocardial growth and c-myc levels in the rat heart. *Biochemical and biophysical research communications*. 1995;213(1):59-65.
99. O'Connell TD, Giacherio DA, Jarvis AK, Simpson RU. Inhibition of cardiac myocyte maturation by 1,25-dihydroxyvitamin D₃. *Endocrinology*. 1995;136(2):482-8.
100. O'Connell TD, Berry JE, Jarvis AK, Somerman MJ, Simpson RU. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ regulation of cardiac myocyte proliferation and hypertrophy. *The American journal of physiology*. 1997;272(4 Pt 2):H1751-8.
101. Hlaing SM, Garcia LA, Contreras JR, Norris KC, Ferrini MG, Artaza JN. 1,25-Vitamin D₃ promotes cardiac differentiation through modulation of the WNT signaling pathway. *Journal of molecular endocrinology*. 2014;53(3):303-17.
102. Wang Y, De Keulenaer GW, Lee RT. Vitamin D(3)-up-regulated protein-1 is a stress-responsive gene that regulates cardiomyocyte viability through interaction with thioredoxin. *The Journal of biological chemistry*. 2002;277(29):26496-500.
103. Xiang G, Seki T, Schuster MD, Witkowski P, Boyle AJ, See F, et al. Catalytic degradation of vitamin D up-regulated protein 1 mRNA enhances cardiomyocyte survival and prevents left ventricular remodeling after myocardial ischemia. *The Journal of biological chemistry*. 2005;280(47):39394-402.
104. National Heart LaBl. Accidente cerebrovascular: ¿Qué es un accidente cerebrovascular? 2023 [Available from: <https://www.nhlbi.nih.gov/es/salud/accidente-cerebrovascular>].
105. Corazón FMd. 2023 [Available from: www.world-heart-federation.org].
106. National Heart LaBl. Accidente cerebrovascular: Causas y factores de riesgo 2023 [Available from: <https://www.nhlbi.nih.gov/es/salud/accidente-cerebrovascular/causas>].
107. Fu J, Sun J, Zhang C. Vitamin D supplementation and risk of stroke: A meta-analysis of randomized controlled trials. *Frontiers in neurology*. 2022;13:970111.

108. Silvagno F, De Vivo E, Attanasio A, Gallo V, Mazzucco G, Pescarmona G. Mitochondrial localization of vitamin D receptor in human platelets and differentiated megakaryocytes. *PLoS one*. 2010;5(1):e8670.
109. Guillot X, Semerano L, Saidenberg-Kermanac'h N, Falgarone G, Boissier MC. Vitamin D and inflammation. *Joint bone spine*. 2010;77(6):552-7.
110. Andrukhova O, Slavic S, Zeitz U, Riesen S, Heppelmann M, Ambrisko T, et al. Vitamin D Is a Regulator of Endothelial Nitric Oxide Synthase and Arterial Stiffness in Mice. *2013*.
111. Kong J, Qiao G, Zhang Z, Liu S, Chun Li Y. Target vitamin D receptor expression in juxtaglomerular cells suppresses renin expression independent of parathyroid hormone and calcium. *2009*. 1577-81 p.
112. Szeto FL, Reardon CA, Yoon D, Wang Y, Wong KE, Chen Y, et al. Vitamin D receptor signaling inhibits atherosclerosis in mice. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md)*. 2012;26(7):1091-101.
113. Yuan W, Pan W, Kong J, Zheng W, Szeto F, Wong K, et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ Suppresses Renin Gene Transcription by Blocking the Activity of the Cyclic AMP Response Element in the Renin Gene Promoter. *2007*. 29821-30 p.
114. Zhou C, Lu F, Cao K, Xu D, Goltzman D, Miao D. Calcium-independent and 1,25(OH)₂D₃-dependent regulation of the renin-angiotensin system in α 1-phosphatase knockout mice. *2008*. 170-9 p.
115. Zhang Y, Leung DY, Richers BN, Liu Y, Remigio LK, Riches DW, et al. Vitamin D inhibits monocyte/macrophage proinflammatory cytokine production by targeting MAPK phosphatase-1. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2012;188(5):2127-35.
116. Wasse H, Huang R, Naqvi N, Smith E, Wang D, Husain A. Inflammation, oxidation and venous neointimal hyperplasia precede vascular injury from AVF creation in CKD patients. *The journal of vascular access*. 2012;13(2):168-74.
117. Duque JC, Tabbara M, Martinez L, Cardona J, Vazquez-Padron RI, Salman LH. Dialysis Arteriovenous Fistula Failure and Angioplasty: Intimal Hyperplasia and Other Causes of Access Failure. *American Journal of Kidney Diseases*. 2017;69(1):147-51.

118. Ponikowski P, Voors AA, Anker SD, Bueno H, Cleland JGF, Coats AJS, et al. 2016 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure: The Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure of the European Society of Cardiology (ESC) Developed with the special contribution of the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *European heart journal*. 2016;37(27):2129-200.
119. Biernacka A, Frangogiannis NG. Aging and Cardiac Fibrosis. *Aging and disease*. 2011;2(2):158-73.
120. Braunwald E. Heart failure. *JACC Heart failure*. 2013;1(1):1-20.
121. Arrigo M, Jessup M, Mullens W, Reza N, Shah AM, Sliwa K, et al. Acute heart failure. *Nature Reviews Disease Primers*. 2020;6(1):16.
122. Hao Y, Chen Y. Vitamin D levels and vitamin D receptor variants are associated with chronic heart failure in Chinese patients. *Journal of clinical laboratory analysis*. 2019:e22847.
123. Qu H, Lin K, Wang H, Wei H, Ji B, Yang Z, et al. 1,25(OH)(2) D(3) improves cardiac dysfunction, hypertrophy, and fibrosis through PARP1/SIRT1/mTOR-related mechanisms in type 1 diabetes. *Molecular nutrition & food research*. 2017;61(5).
124. Chen S, Law CS, Grigsby CL, Olsen K, Hong TT, Zhang Y, et al. Cardiomyocyte-specific deletion of the vitamin D receptor gene results in cardiac hypertrophy. *Circulation*. 2011;124(17):1838-47.
125. Artaza JN, Norris KC. Vitamin D reduces the expression of collagen and key profibrotic factors by inducing an antifibrotic phenotype in mesenchymal multipotent cells. *The Journal of endocrinology*. 2009;200(2):207-21.
126. Bodyak N, Ayus JC, Achinger S, Shivalingappa V, Ke Q, Chen YS, et al. Activated vitamin D attenuates left ventricular abnormalities induced by dietary sodium in Dahl salt-sensitive animals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2007;104(43):16810-5.
127. Mozos I, Stoian D, Luca CT. Crosstalk between Vitamins A, B12, D, K, C, and E Status and Arterial Stiffness. *Disease markers*. 2017;2017:8784971.

128. Tishkoff DX, Nibbelink KA, Holmberg KH, Dandu L, Simpson RU. Functional vitamin D receptor (VDR) in the t-tubules of cardiac myocytes: VDR knockout cardiomyocyte contractility. *Endocrinology*. 2008;149(2):558-64.
129. Nkomo VT, Gardin JM, Skelton TN, Gottdiener JS, Scott CG, Enriquez-Sarano M. Burden of valvular heart diseases: a population-based study. *Lancet (London, England)*. 2006;368(9540):1005-11.
130. Aluru JS, Barsouk A, Saginala K, Rawla P, Barsouk A. Valvular Heart Disease Epidemiology. *Medical sciences (Basel, Switzerland)*. 2022;10(2).
131. Clinic M. Enfermedades de las válvulas cardiacas 2021 [Available from: <https://www.mayoclinic.org/es/diseases-conditions/heart-valve-disease/symptoms-causes/syc-20353727>].
132. Martinez PF, Okoshi MP. Genetic Risk in Coronary Artery Disease. *Arquivos brasileiros de cardiologia*. 2018;111(1):62-3.
133. Lemire JM. Immunomodulatory role of 1,25-dihydroxyvitamin D3. *Journal of cellular biochemistry*. 1992;49(1):26-31.
134. Craiem D, Alsac J-M, Casciaro ME, El Batti S, Mousseaux E, Sirieix M-E, et al. Asociación entre el calcio de la aorta torácica y la geometría de esta en una cohorte de sujetos asintomáticos con riesgo cardiovascular aumentado. *Revista Española de Cardiología (English Edition)*. 2016;69(9):827-35.
135. Norman PE, Powell JT. Vitamin D, shedding light on the development of disease in peripheral arteries. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2005;25(1):39-46.
136. Wong YY, Flicker L, Yeap BB, McCaul KA, Hankey GJ, Norman PE. Is hypovitaminosis D associated with abdominal aortic aneurysm, and is there a dose-response relationship? *European journal of vascular and endovascular surgery : the official journal of the European Society for Vascular Surgery*. 2013;45(6):657-64.
137. Institute TTH. Enfermedad vascular periférica 2023 [Available from: [https://www.texasheart.org/heart-health/heart-information-center/topics/enfermedad-vascular-periferica/#:~:text=La%20enfermedad%20vascular%20perif%C3%A9rica%20\(EVP,y%20los%20%C3%B3rganos%20del%20abdomen](https://www.texasheart.org/heart-health/heart-information-center/topics/enfermedad-vascular-periferica/#:~:text=La%20enfermedad%20vascular%20perif%C3%A9rica%20(EVP,y%20los%20%C3%B3rganos%20del%20abdomen)].

138. Swenty CF, Hall M. Peripheral Vascular Disease. Home healthcare now. 2020;38(6):294-301.
139. National Heart LaBl. Arteriopatía periférica: Causas y factores de riesgo 2022 [Available from: <https://www.nhlbi.nih.gov/es/salud/arteriopatia-periferica/causas>.
140. de Boer IH, Kestenbaum B, Shoben AB, Michos ED, Sarnak MJ, Siscovick DS. 25-hydroxyvitamin D levels inversely associate with risk for developing coronary artery calcification. Journal of the American Society of Nephrology : JASN. 2009;20(8):1805-12.
141. Schleithoff SS, Zittermann A, Tenderich G, Berthold HK, Stehle P, Koerfer R. Vitamin D supplementation improves cytokine profiles in patients with congestive heart failure: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. Am J Clin Nutr. 2006;83(4):754-9.
142. Huybers S, Bindels RJ. Vascular calcification in chronic kidney disease: new developments in drug therapy. Kidney international. 2007;72(6):663-5.
143. Schöttker B, Ball D, Gellert C, Brenner H. Serum 25-hydroxyvitamin D levels and overall mortality. A systematic review and meta-analysis of prospective cohort studies. Ageing research reviews. 2013;12(2):708-18.
144. Haussler MR, Whitfield GK, Kaneko I, Haussler CA, Hsieh D, Hsieh J-C, et al. Molecular Mechanisms of Vitamin D Action. Calcified Tissue International. 2013;92(2):77-98.
145. Makariou S, Liberopoulos EN, Elisaf M, Challa A. Novel roles of vitamin D in disease: what is new in 2011? European journal of internal medicine. 2011;22(4):355-62.
146. Margolis RN, Christakos S. The nuclear receptor superfamily of steroid hormones and vitamin D gene regulation. An update. Annals of the New York Academy of Sciences. 2010;1192:208-14.
147. Vaidya A, Sun B, Forman JP, Hopkins PN, Brown NJ, Kolatkar NS, et al. The Fok1 vitamin D receptor gene polymorphism is associated with plasma renin activity in Caucasians. Clinical endocrinology. 2011;74(6):783-90.
148. Hajj A, Chedid R, Eliane C, Mégarbané A, Gannagé-Yared M-H. Relationship between Vitamin D receptor gene polymorphisms, cardiovascular risk factors and adiponectin in a healthy young population 2016. 1675-86 p.

149. Hong YJ, Kang ES, Ji MJ, Choi HJ, Oh T, Koong SS, et al. Association between Bsm1 Polymorphism in Vitamin D Receptor Gene and Diabetic Retinopathy of Type 2 Diabetes in Korean Population. *Endocrinology and metabolism (Seoul, Korea)*. 2015;30(4):469-74.
150. Pike JW, Meyer MB. The vitamin D receptor: new paradigms for the regulation of gene expression by 1,25-dihydroxyvitamin D(3). *Endocrinology and metabolism clinics of North America*. 2010;39(2):255-69.
151. Zella LA, Shevde NK, Kim S, Pike JW. Enhancers Located within Two Introns of the Vitamin D Receptor Gene Mediate Transcriptional Autoregulation by 1,25-Dihydroxyvitamin D3. *Molecular Endocrinology*. 2006;20(6):1231-47.
152. Kalkhoven E, Valentine JE, Heery DM, Parker MG. Isoforms of steroid receptor co-activator 1 differ in their ability to potentiate transcription by the oestrogen receptor. *The EMBO journal*. 1998;17(1):232-43.
153. Kamei Y, Xu L, Heinzl T, Torchia J, Kurokawa R, Gloss B, et al. A CBP Integrator Complex Mediates Transcriptional Activation and AP-1 Inhibition by Nuclear Receptors1996. 403-14 p.
154. Rachez C, D. Lemon B, Suldan Z, Bromleigh V, Gamble M, Näär A, et al. Ligand-dependent transcription activation by nuclear receptors requires the DRIP complex1999. 824-8 p.
155. Chen KS, DeLuca HF. Cloning of the human 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D-3 24-hydroxylase gene promoter and identification of two vitamin D-responsive elements. *Biochimica et biophysica acta*. 1995;1263(1):1-9.
156. Sangkaew B, Nuinoon M, Jeenduang N. Association of vitamin D receptor gene polymorphisms with serum 25(OH)D levels and metabolic syndrome in Thai population. *Gene*. 2018;659:59-66.
157. Serrano JCE, De Lorenzo D, Cassanye A, Martín-Gari M, Espinel A, Delgado MA, et al. Vitamin D receptor Bsm1 polymorphism modulates soy intake and 25-hydroxyvitamin D supplementation benefits in cardiovascular disease risk factors profile. *Genes & nutrition*. 2013;8(6):561-9.
158. Zhao Y, Liao S, He J, Jin Y, Fu H, Chen X, et al. Association of vitamin D receptor gene polymorphisms with metabolic syndrome: a case-control design of population-based cross-sectional study in North China. *Lipids in health and disease*. 2014;13:129-.

159. Trehan N, Afonso L, Levine DL, Levy PD. Vitamin D Deficiency, Supplementation, and Cardiovascular Health. *Critical pathways in cardiology*. 2017;16(3):109-18.
160. Dorsch MP, Nemerovski CW, Ellingrod VL, Cowger JA, Dyke DB, Koelling TM, et al. Vitamin D receptor genetics on extracellular matrix biomarkers and hemodynamics in systolic heart failure. *Journal of cardiovascular pharmacology and therapeutics*. 2014;19(5):439-45.
161. Qin G, Dong Z, Zeng P, Liu M, Liao X. Association of vitamin D receptor Bsm1 gene polymorphism with risk of osteoporosis: a meta-analysis of 41 studies. *Molecular biology reports*. 2013;40(1):497-506.
162. Chantarangsu S, Sura T, Mongkornkarn S, Donsakul K, Torrungruang K. Vitamin D Receptor Gene Polymorphism and Smoking in the Risk of Chronic Periodontitis. *Journal of Periodontology*. 2016;87(11):1343-51.
163. Zilahi E, Chen JQ, Papp G, Szanto A, Zeher M. Lack of association of vitamin D receptor gene polymorphisms/haplotypes in Sjogren's syndrome. *Clinical rheumatology*. 2015;34(2):247-53.
164. Uitterlinden AG, Fang Y, Van Meurs JB, Pols HA, Van Leeuwen JP. Genetics and biology of vitamin D receptor polymorphisms. *Gene*. 2004;338(2):143-56.
165. McGrath J, Saha S, Burne T, Eyles D. A systematic review of the association between common single nucleotide polymorphisms and 25-hydroxyvitamin D concentrations 2010. 471-7 p.
166. Arai H, Miyamoto KI, Yoshida M, Yamamoto H, Taketani Y, Morita K, et al. The Polymorphism in the Caudal-Related Homeodomain Protein Cdx-2 Binding Element in the Human Vitamin D Receptor Gene 2001. 1256-64 p.
167. Jurutka P, Remus L, Kerr Whitfield G, Thompson P, Hsieh JC, Zitzer H, et al. The Polymorphic N Terminus in Human Vitamin D Receptor Isoforms Influences Transcriptional Activity by Modulating Interaction with Transcription Factor IIB 2000. 401-20 p.
168. Colin EM, Weel AEAM, Uitterlinden AG, Buurman CJ, Birkenhäger JC, Pols HAP, et al. Consequences of vitamin D receptor gene polymorphisms for growth inhibition of cultured human peripheral blood mononuclear cells by 1,25-dihydroxyvitamin D₃. *Clinical Endocrinology*. 2000;52(2):211-6.

169. Cottone S, Guarino L, Arsena R, Scazzone C, Tornese F, Guarneri M, et al. Vitamin D receptor gene polymorphisms and plasma renin activity in essential hypertensive individuals. *Journal Of Human Hypertension*. 2014;29:483.
170. Vuolo L, Di Somma C, Faggiano A, Colao A. Vitamin D and cancer. *Frontiers in endocrinology*. 2012;3:58-.
171. Randerson-Moor JA, Taylor JC, Elliott F, Chang Y-M, Beswick S, Kukulizch K, et al. Vitamin D receptor gene polymorphisms, serum 25-hydroxyvitamin D levels, and melanoma: UK case-control comparisons and a meta-analysis of published VDR data. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)*. 2009;45(18):3271-81.
172. Kostner K, Denzer N, Muller CS, Klein R, Tilgen W, Reichrath J. The relevance of vitamin D receptor (VDR) gene polymorphisms for cancer: a review of the literature. *Anticancer research*. 2009;29(9):3511-36.
173. Abrams SA, Griffin IJ, Hawthorne KM, Chen Z, Gunn SK, Wilde M, et al. Vitamin D Receptor Fok1 Polymorphisms Affect Calcium Absorption, Kinetics, and Bone Mineralization Rates During Puberty. *Journal of Bone and Mineral Research*. 2005;20(6):945-53.
174. Ames SK, Ellis KJ, Gunn SK, Copeland KC, Abrams SA. Vitamin D Receptor Gene Fok1 Polymorphism Predicts Calcium Absorption and Bone Mineral Density in Children. *Journal of Bone and Mineral Research*. 1999;14(5):740-6.
175. Chatzipapas C, Boikos S, Drosos GI, Kazakos K, Tripsianis G, Serbis A, et al. Polymorphisms of the vitamin D receptor gene and stress fractures. *Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et metabolisme*. 2009;41(8):635-40.
176. McClung JP, Karl JP. Vitamin D and stress fracture: the contribution of vitamin D receptor gene polymorphisms. *Nutrition Reviews*. 2010;68(6):365-9.
177. Haussler MR, Whitfield GK, Haussler CA, Hsieh JC, Thompson PD, Selznick SH, et al. The nuclear vitamin D receptor: biological and molecular regulatory properties revealed. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 1998;13(3):325-49.
178. Decker CJ, Parker R. Diversity of cytoplasmic functions for the 3' untranslated region of eukaryotic transcripts. *Current Opinion in Cell Biology*. 1995;7(3):386-92.

179. Morrison NA, Qi JC, Tokita A, Kelly PJ, Crofts L, Nguyen TV, et al. Prediction of bone density from vitamin D receptor alleles. *Nature*. 1994;367(6460):284-7.
180. Gyorffy B, Vasarhelyi B, Krikovszky D, Madacsy L, Tordai A, Tulassay T, et al. Gender-specific association of vitamin D receptor polymorphism combinations with type 1 diabetes mellitus. 2002;147(6):803.
181. Yamamoto H, Miyamoto K, Li B, Taketani Y, Kitano M, Inoue Y, et al. The caudal-related homeodomain protein Cdx-2 regulates vitamin D receptor gene expression in the small intestine. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 1999;14(2):240-7.
182. Al-Oanzi ZH, Alenazy FO, Alhassan HH, Alruwaili Y, Alessa AI, Alfarm NB, et al. The Role of Vitamin D in Reducing the Risk of Metabolic Disturbances That Cause Cardiovascular Diseases. *Journal of Cardiovascular Development and Disease*. 2023;10(5):209.
183. Randolph JJF, Kristina; Manuel, Austin Kureethara; and Balloun, Joseph L. A Step-by-Step Guide to Propensity Score Matching in R. Practical Assessment, Research, and Evaluation. 2019;19(18).
184. Team RDC. R: A Language and Environment for Statistical Computing Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing; 2020 [Available from: <https://www.R-project.org/>].
185. Purcell S, Neale B, Todd-Brown K, Thomas L, Ferreira MA, Bender D, et al. PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *American journal of human genetics*. 2007;81(3):559-75.
186. Barrett JC, Fry B, Maller J, Daly MJ. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics (Oxford, England)*. 2005;21(2):263-5.
187. Solé X, Guinó E, Valls J, Iñiesta R, Moreno V. SNPStats: a web tool for the analysis of association studies. *Bioinformatics (Oxford, England)*. 2006;22(15):1928-9.
188. Gupta R, Wood DA. Primary prevention of ischaemic heart disease: populations, individuals, and health professionals. *Lancet (London, England)*. 2019;394(10199):685-96.
189. Nakhl S, Sleilaty G, Chouery E, Salem N, Chahine R, Farès N. FokI vitamin D receptor gene polymorphism and serum 25-hydroxyvitamin D in patients with

cardiovascular risk. *Archives of Medical Science – Atherosclerotic Diseases*. 2019;4(1):298-303.

190. Sygitowicz G, Pera L, Sitkiewicz D. [Vitamin D receptor (VDR) polymorphism and the risk of cardiovascular events]. *Kardiologia polska*. 2014;72(1):64-6.

191. Prabhakar P, Majumdar V, Kulkarni GB, Christopher R. Genetic variants of vitamin D receptor and susceptibility to ischemic stroke. *Biochemical and biophysical research communications*. 2015;456(2):631-6.

192. Jun M, Xue-Qiang G, Jia L, Yang-Jing X, Cheng Z, Ge J. Interactions between vitamin D receptor (VDR) gene and Interleukin-6 gene and environment factors on coronary heart disease risk in a Chinese Han population. *Oncotarget*. 2017;8(45):78419-28.

193. Huzmeli C, Bagci G, Candan F, Bagci B, Akkaya L, Kayatas M. Association of vitamin D receptor gene TaqI, FokI and ApaI variants with arteriovenous fistula failure in hemodialysis patients. *J Vasc Access*. 2018;19(3):303-10.

194. Mokhtar WA, Fawzy A, Allam RM, Amer RM, Hamed MS. Maternal vitamin D level and vitamin D receptor gene polymorphism as a risk factor for congenital heart diseases in offspring; An Egyptian case-control study. *Genes & diseases*. 2019;6(2):193-200.

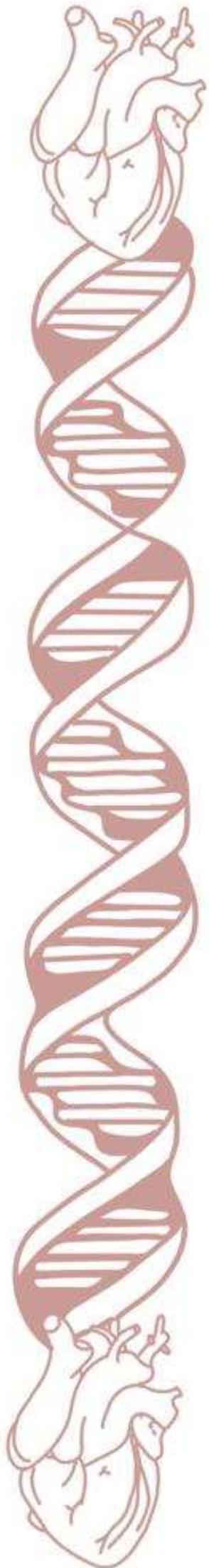
195. Wilke RA, Simpson RU, Mukesh BN, Bhupathi SV, Dart RA, Ghebranious NR, et al. Genetic variation in CYP27B1 is associated with congestive heart failure in patients with hypertension. *Pharmacogenomics*. 2009;10(11):1789-97.

196. Alizadeh S, Djafarian K, Alizadeh H, Mohseni R, Shab-Bidar S. Common Variants of Vitamin D Receptor Gene Polymorphisms and Susceptibility to Coronary Artery Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Journal of nutrigenetics and nutrigenomics*. 2017;10(1-2):9-18.

197. Lu S, Guo S, Hu F, Guo Y, Yan L, Ma W, et al. The Associations Between the Polymorphisms of Vitamin D Receptor and Coronary Artery Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Medicine (Baltimore)*. 2016;95(21):e3467.

198. Abouzid M, Kruszyna M, Burchardt P, Kruszyna Ł, Głównka FK, Karaźniewicz-Łada M. Vitamin D Receptor Gene Polymorphism and Vitamin D Status in Population of Patients with Cardiovascular Disease-A Preliminary Study. *Nutrients*. 2021;13(9).

199. Eweida SM, Salem A, Shaker YM, Samy N, Yassen I, Mohamed RH. Vitamin D levels and vitamin D receptor genetic variants in Egyptian cardiovascular disease patients with and without diabetes. *Egyptian Journal of Medical Human Genetics*. 2021;22(1):55.
200. Harbuzova V, Stroy D, Dosenko V, Obukhova O, Ataman O. Association of allelic polymorphisms of the Matrix Gla-protein system genes with acute coronary syndrome in the Ukrainian population. *Biopolymers and Cell*. 2015;31:46-56.
201. Pan XM, Li DR, Yang L, Wang EY, Chen TY, Liu YJ, et al. No association between vitamin D receptor polymorphisms and coronary artery disease in a Chinese population. *DNA and cell biology*. 2009;28(10):521-5.
202. Tabaei S, Motallebnezhad M, Tabaei SS. Vitamin D Receptor (VDR) Gene Polymorphisms and Risk of Coronary Artery Disease (CAD): Systematic Review and Meta-analysis. *Biochemical genetics*. 2021;59(4):813-36.
203. 2. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes-2019. *Diabetes care*. 2019;42(Suppl 1):S13-s28.



ANEXOS

9. ANEXOS

9.1. ANEXO 1

Dictamen Favorable por el Comité de Ética de la Investigación Biomédica de la provincia de Granada para la realización del estudio: “Riesgo enfermedad cardiovascular y vitamina D. Influencia de alteraciones genéticas en la ruta metabólica de la vitamina D y la susceptibilidad a padecer enfermedad cardiovascular” con código de protocolo: “FG-VDR-ECV-2021”.



DICTAMEN ÚNICO EN LA COMUNIDAD AUTÓNOMA DE ANDALUCIA

D. ANTONIO SALMERÓN GARCÍA, EN CALIDAD DE SECRETARIO DEL COMITÉ DE ÉTICA DE LA INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA DE LA PROVINCIA DE GRANADA (CEIM/CEI GRANADA)

CERTIFICA:

Que este Comité ha evaluado la propuesta del promotor/investigador: _____, para realizar el estudio titulado:

TÍTULO DEL ESTUDIO: *RIESGO ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR Y VITAMINA D.- INFLUENCIA DE ALTERACIONES GENÉTICAS EN LA RUTA METABÓLICA DE LA VITAMINA D Y LA SUSCEPTIBILIDAD A PADECER ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR*

Código protocolo: FG-VDR-ECV-2021

Código Portal de Ética: 0957-N-21

Investigador Principal: CRISTINA PEREZ RAMIREZ

Versión de los documentos:

Protocolo	Versión	0.0	de fecha	15/04/2021
HIP	Versión	----	de fecha	
CI	Versión	----	de fecha	

Y considera que:

- Se cumplen los requisitos necesarios de idoneidad del protocolo en relación con los objetivos del estudio y se ajusta a los principios éticos aplicables a este tipo de estudios.
- La capacidad del investigador y los medios disponibles son apropiados para llevar a cabo el proyecto.
- El protocolo del estudio contempla de forma adecuada toda la legislación aplicable
- Que los aspectos económicos involucrados en el proyecto, no interfieren con respecto a los postulados éticos.

Por lo que este Comité ha acordado emitir **DICTAMEN FAVORABLE** para la realización del dicho estudio, para lo cual corresponde a la Dirección del Centro/os correspondiente/s determinar si la capacidad y los medios disponibles son apropiados para llevarlo a cabo.

Lo que firmo en Granada

Código Seguro De Verificación:	8113bcc28da6c39fedea190955ea0b1a5e81f1d9	Fecha	30/04/2021	
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la Ley 59/2003, de 19 de diciembre, de firma electrónica			
Firmado Por	Antonio Salmerón García			
Url De Verificación	https://www.juntadeandalucia.es/salud/portaldeetica/xhtml/ayuda/verificafirmaDocumento.iframe/code/8113bcc28da6c39fedea190955ea0b1a5e81f1d9	Página	1/4	

Es responsabilidad del Investigador Principal garantizar que todos los investigadores asociados con este proyecto, conozcan las condiciones de aprobación y los documentos aprobados.

El Investigador Principal debe informar a la Secretaría del CEIm, mediante una enmienda, informe anual de seguimiento o notificación, de

- Cualquier cambio significativo en el proyecto y la razón de ese cambio, incluida una indicación de las implicaciones éticas (si las hubiera)
- Cualquier evento imprevisto o inesperado, como desviaciones de protocolo
- el cambio de Investigador Principal
- Informe anual de seguimiento
- La fecha de finalización del estudio
- Informe final del estudio y/o publicación de resultados

ANEXO I COMPOSICIÓN DEL CEI/CEIM DE GRANADA

El Comité tanto en su composición como en los PNTs, cumple con las normas de BPC (CPMP/ICH/135/95)

En dicha reunión del Comité se cumplió el quórum preceptivo legalmente.

En caso de que se evalúe algún proyecto del que un miembro sea investigador/colaborador o se detecte conflicto de interés, este se ausentará de la reunión durante la discusión del proyecto.

Que a dicha sesión asistieron los siguientes integrantes del Comité:

PRESIDENTA: D ^a Aurora Bueno Cavanillas	Catedrática M. Preventiva y S. Pública (UGR)
VICEPRESIDENTA: D ^a Paloma Muñoz de Rueda	Doctora en Ciencias Biológicas - Unidad de Apoyo Investig - HUSCC
SECRETARIO: D. Antonio Salmerón García	F.E.A Farmacia Hospitalaria.- HUCSC
VOCALES:	
Álvarez López, Miguel	F.E.A Cardiología HUVN
Arias Santiago, Salvador	F.E.A. Dermatología UGR (Vinculado HUVN)
Cardona Contreras Jesús	F.E.A. Obstetricia y Ginecología HUCSC
Cobos Vargas, Angel	Enfermero HUCSC.-Respos. Seguridad del Paciente
Cuadros Celorrrio, Marta Eugenia	Doctora en Farmacia UGR
Delgado Pérez, Juan Ramón	F.E.A. HUVN (Jefe Sección Oncología)
Del Pozo Gavilán, Esperanza	Cataedrática Farmacología Clínica UGR
Domenech Gil, Luis Miguel	Enfermero HUCSC

Código Seguro De Verificación:	8113bcc28da6c39fedea190955ea0b1a5e81f1d9	Fecha	30/04/2021
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la Ley 59/2003, de 19 de diciembre, de firma electrónica.		
Firmado Por	Antonio Salmeron Garcia		
Url De Verificación	https://www.juntadeandalucia.es/salud/portaldedeetica/xhtml/ayuda/verificarFirmaDocumento.iface/code/8113bcc28da6c39fedea190955ea0b1a5e81f1d9	Página	2/4



 Junta de Andalucía Consejería de Salud y Familias <small>SERVICIO ANDALUZ DE SALUD</small>	
Dominguez Almendros, Sonia	Metodologa/Estadística HUCSC
Espinola García Esther	Distrito Granada-Metropolitano (Farmaceutica AP)
Fernández Cabrera, Mariana	Catedrática Facultad Medicina UGR (Biomedicina)
Gálvez Martín, Patricia	Doctora en Farmacia.- BIOIBERICA S.A.U
García Lirola, M.ª Angeles	Distrito Granada-Metropolitano Farmaceutica A.P
García Valverde, M.ª Dolores	Profesora Facultad Derecho.-Doctora en Derecho
Gorlat Sánchez Berta	Enfermera/Supervisora HUVN
Guijosa Campos Pilar	Distrito Granada-Metropolitano (Epidemiología)
Jimenez Pacheco, Antonio	F.E.A Urologia.- HUCSC
López Guadalupe Miguel	Miembro LEGO – Prof. titular Hª UGR
Luque Martínez, Francisco M.	Técnico Función Adtva.- HUVN
Manzano Manzano Fco. Luis	F.E.A. Medicina Intensiva (HUVN)
Marín Jiménez, Rafael	Técnico Oficina Delegado Protección de datos del SSPA
Martin Díaz, Manuel	F.E.A. Cirugia General HOSP. SANTA ANA MOTRIL
Martínez Galán Joaquina	F.E.A. Oncología Médica HUVN
Martínez García, Encarnación	Matrona.- Hospital Alta Resolución Guadix
Martínez González Luis Javier	Doctor en Ciencias Biológicas.Investigador GENYO
Martínez Tapias Jesús	F.E.A Docum. Clínica.- HUVN
Molina Rivas, Esther	Porfesora Facultad Ciencias Salud (Enfermera)
Morales Romero Antonio	Enfermero .- Distrito Granada-Metropolitano
Moron Romero, Rocío	F.E.A Farmacia Hospitalaria HUCSC
Mozas Moreno Juan	F.E.A. Obstetricia y Ginecologia UGR Vinculado HUVN
Navarro Barrios, Juan Carlos	F.E.A. Psiquiatría.-A.G.S Sur de Granada
O`Valle Ravassa, Francisco Javier	Vicerrectorado de Investigación UGR
Pérez Fernández , Antonio Juan	C. Etica Asistencial AGS Sur
Romero Cotelo Juan	Médico de Familia Unidad del Dolor HUVN
Sánchez López, José Darío	F.E.A Cirugía Oral y Maxilofacial.- HUVN
Uberos Fernández Jose	F.E.A. Pediatría HUSC

Que dicho Comité, está constituido y actua de acuerdo con la normativa vigente y las directrices de la Conferencia Internacional de Buena Práctica Clínica.

Código Seguro De Verificación:	8113bcc28da6c39fedea190955ea0b1a5e81f1d9	Fecha	30/04/2021		
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la Ley 59/2003, de 19 de diciembre, de firma electrónica.				
Firmado Por	Antonio Salmoron Garcia				
Url De Verificación	https://www.juntadeandalucia.es/salud/portaldedeetica/xhtml/ayuda/verificafirmaDocumento.1face/code/8113bcc28da6c39fedea190955ea0b1a5e81f1d9	Página	3/4		

Lo que firmo en Granada a

Código Seguro De Verificación:	#113bcc28da6c39fedea190955ea0b1a5e81f1d9	Fecha	30/04/2021	
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la Ley 59/2003, de 19 de diciembre, de firma electrónica			
Firmado Por	Antonio Salmeron Garcia			
Url De Verificación	https://www.juntadeandalucia.es/salud/portaldeetica/xhtml/ayuda/verificarFirmaDocumento.iface/code/#113bcc28da6c39fedea190955ea0b1a5e81f1d9	Página	4/4	

9.2. ANEXO 2

Solicitud de petición de biorrecursos al Biobanco del Sistema Sanitario Público de Andalucía para la realización del proyecto: "Influencia de alteraciones genéticas en la ruta metabólica de la vitamina D y la susceptibilidad a padecer enfermedad cardiovascular".

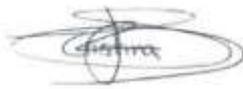
SOLICITUD DE PETICIÓN DE BIORRECURSOS Servicio de provisión de muestras y datos asociados	Código solicitud: <i>52100 168</i>
---	---------------------------------------

Datos de contacto del Investigador Principal (Solicitante)

Nombre y apellidos	Cristina Pérez Ramírez
NIF	75134079W
Servicio/Departamento	Servicio de Farmacia
Institución	Hospital Universitario Virgen de las Nieves
Dirección postal	Avenida Fuerzas Armadas, 2, 18014
Teléfono	607966508
Dirección electrónica	cperezramirez87@gmail.com
Otras personas de contacto autorizadas (nombre, teléfono, mail)	

Datos fiscales / Datos factura electrónica

Empresa	Fundación para la Investigación Biosanitaria de Andalucía Oriental (FIBAO)
CIF	G-18374199
Dirección fiscal	Av las Fuerzas Armadas, Nº 2 18014, Granada, Granada
Órgano Gestor	(Código/descripción)
Oficina Contable	(Código/descripción)
Unidad Tramitadora	(Código/descripción)
Órgano Proponente	(Código/descripción)

Firma del solicitante 	Recepción Biobanco  Biobanco del Sistema Sanitario Público de Andalucía CONSEJERÍA DE SALUD Y FAMILIAS Nodo Granada - H. U. Virgen de las Nieves Avda. De las Fuerzas Armadas, 2 Análisis clínicos - Laboratorio Especialidades 18014 - Granada
Fecha: 30/03/2021	Fecha: 14/04/2021

En cumplimiento de lo dispuesto en el Reglamento General de Protección de Datos y en la Ley Orgánica 3/2018, de 5 de diciembre, de Protección de Datos Personales y garantía de los derechos digitales, le informamos de lo siguiente: a) Los datos personales que nos proporcione serán utilizados con la finalidad de gestionar los datos de terceros clientes o proveedores con la Fundación, atender las solicitudes prestación de servicios que ofrece el Biobanco, así como comunicaciones futuras y/o poder informarle de servicios relacionados con su solicitud, quedando almacenados durante el tiempo necesario para cumplir con las obligaciones legales estipuladas. Sus datos no serán cedidos a terceros, salvo que se disponga en una obligación legal. La base jurídica de este tratamiento se basa en la relación contractual, sin la cual no podríamos cumplir con la finalidad descrita. b) El responsable de este tratamiento de sus datos personales es la Fundación Pública Andaluza Progreso y Salud, cuya dirección es av. Américo Vespucio, 15, edificio S-2. 41092 Sevilla. c) Podrá contactar con el Delegado de Protección de Datos en la dirección electrónica dpd.csalud@juntadeandalucia.es. d) Puede usted revocar su consentimiento o ejercer sus derechos de acceso, rectificación, supresión, portabilidad de sus datos, y la limitación u oposición a su tratamiento, solicitándolo por escrito, con copia del DNI, a la Fundación Pública Andaluza Progreso y Salud en avda. Américo Vespucio 15, edificio S-2. 41092 Sevilla; o mediante correo electrónico a dpd.fps@juntadeandalucia.es

**SECCIÓN A: NATURALEZA, CANTIDAD Y FORMATO DE LAS MUESTRAS QUE SE SOLICITAN.
DATOS CLÍNICOS O BIOLÓGICOS SOLICITADOS**

Indique las muestras biológicas que requiere para su proyecto de investigación. Puede describirlas mediante criterios clínicos y diagnósticos (ver información adicional de esta sección).

Las muestras se distribuyen en el formato que el investigador requiera, gracias a su procesamiento previo en el Biobanco (ver información adicional de esta sección).

Si precisa soporte para la selección de sus muestras, solicite nuestros **SERVICIOS A MEDIDA**.

Diagnóstico y naturaleza	Series poblacionales de ADN genómico
Formato	ADN extraído
Número de muestras	1485
Cantidad de muestra	50 ul
Datos clínicos requeridos	No procede

INFORMACIÓN ADICIONAL:

NATURALEZA:

- Enfermedades raras, enfermedades genéticas
- Enfermedades neurodegenerativas
- Enfermedades oncológicas
- Enfermedades infecciosas
- Series poblacionales de ADN genómico
- Tejido o fracciones celulares sanas (cordón umbilical, grasa, médula ósea, elementos celulares de sangre periférica movilizada o no, fibroblastos, queratinocitos,...)

FORMATOS DISPONIBLES:

Provisión de muestras:

- Muestras en fresco:
 - o sangre y órganos
 - o tejidos en fresco

En cumplimiento de lo dispuesto en el Reglamento General de Protección de Datos y en la Ley Orgánica 3/2018, de 5 de diciembre, de Protección de Datos Personales y garantía de los derechos digitales, le informamos de lo siguiente: a) Los datos personales que nos proporcione serán utilizados con la finalidad de gestionar los datos de terceros clientes o proveedores con la Fundación, atender las solicitudes prestación de servicios que ofrece el Biobanco, así como comunicaciones futuras y/o poder informarle de servicios relacionados con su solicitud, quedando almacenados durante el tiempo necesario para cumplir con las obligaciones legales estipuladas. Sus datos no serán cedidos a terceros, salvo que se disponga en una obligación legal. La base jurídica de este tratamiento se basa en la relación contractual, sin la cual no podríamos cumplir con la finalidad descrita. b) El responsable de este tratamiento de sus datos personales es la Fundación Pública Andaluza Progreso y Salud, cuya dirección es nv. Américo Vespucio, 15, edificio S-2. 41092 Sevilla. c) Podrá contactar con el Delegado de Protección de Datos en la dirección electrónica dpsd.esalud@juntadeandalucia.es. d) Puede usted revocar su consentimiento o ejercer sus derechos de acceso, rectificación, supresión, portabilidad de sus datos, y la limitación u oposición a su tratamiento, solicitándolo por escrito, con copia del DNI, a la Fundación Pública Andaluza Progreso y Salud en avda. Américo Vespucio 15, edificio S-2. 41092 Sevilla, o mediante correo electrónico a lopd.fps@juntadeandalucia.es

- Sección en portaobjetos fijada
- Sección en tubo fijada (sección de 10 micras)
- Sección en tubo congelada (sección de 20 micras)
- Sección en portaobjetos congelada
- Sección de matriz de muestras (TMA) de 50 muestras
- DNA
- c-DNA
- RNA
- Fluido corporal preservado
- Suero
- Plasma
- Extendido celular concentrado
- Extendido celular directo

Provisión de líneas celulares:

- Línea establecida de células madre embrionarias (HESC)
- Línea establecida de células madre mesenquimales (MSC) humanas de cordón umbilical
- Línea establecida de células madre mesenquimales (MSC) humanas de grasa
- Línea establecida de células madre pluripotentes inducidas
- Línea establecida modificada genéticamente
- Línea mínimamente pasada normal humana de fibroblastos adultos
- Línea mínimamente pasada normal humana de queratinocitos
- Línea mínimamente pasada tumoral
- Líneas inmortalizadas PBMC

Provisión de datos clínicos:

- Datos clínicos y diagnósticos disponibles Datos clínicos y diagnósticos a recoger mediante encuesta

En cumplimiento de lo dispuesto en el Reglamento General de Protección de Datos y en la Ley Orgánica 3/2018, de 5 de diciembre, de Protección de Datos Personales y garantía de los derechos digitales, le informamos de lo siguiente: a) Los datos personales que nos proporcione serán utilizados con la finalidad de gestionar los datos de terceros clientes o proveedores con la Fundación, atender las solicitudes prestación de servicios que ofrece el Biobanco, así como comunicaciones futuras y/o poder informarle de servicios relacionados con su solicitud, quedando almacenados durante el tiempo necesario para cumplir con las obligaciones legales estipuladas. Sus datos no serán cedidos a terceros, salvo que se disponga en una obligación legal. La base jurídica de este tratamiento se basa en la relación contractual, sin la cual no podríamos cumplir con la finalidad descrita. b) El responsable de este tratamiento de sus datos personales es la Fundación Pública Andaluza Progreso y Salud, cuya dirección es av. Américo Vesputio, 15, edificio S-2, 41092 Sevilla. c) Podrá contactar con el Delegado de Protección de Datos en la dirección electrónica dpo.csalud@juntadeandalucia.es. d) Puede usted revocar su consentimiento o ejercer sus derechos de acceso, rectificación, supresión, portabilidad de sus datos, y la limitación u oposición a su tratamiento, solicitándolo por escrito, con copia del DNI, a la Fundación Pública Andaluza Progreso y Salud en avda. Américo Vesputio 15, edificio S-2, 41092 Sevilla, o mediante correo electrónico a lopd.fps@juntadeandalucia.es

SECCIÓN B: Datos del proyecto.

Título:

**INFLUENCIA DE ALTERACIONES GENÉTICAS EN LA RUTA METABÓLICA DE LA
VITAMINA D Y LA SUSCEPTIBILIDAD A PADECER ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR**

En cumplimiento de lo dispuesto en el Reglamento General de Protección de Datos y en la Ley Orgánica 3/2018, de 5 de diciembre, de Protección de Datos Personales y garantía de los derechos digitales, le informamos de lo siguiente: a) Los datos personales que nos proporcione serán utilizados con la finalidad de gestionar los datos de terceros clientes o proveedores con la Fundación, atender las solicitudes prestación de servicios que ofrece el Biobanco, así como comunicaciones futuras y/o poder informarle de servicios relacionados con su solicitud, quedando almacenados durante el tiempo necesario para cumplir con las obligaciones legales estipuladas. Sus datos no serán cedidos a terceros, salvo que se disponga en una obligación legal. La base jurídica de este tratamiento se basa en la relación contractual, sin la cual no podríamos cumplir con la finalidad descrita. b) El responsable de este tratamiento de sus datos personales es la Fundación Pública Andaluza Progreso y Salud, cuya dirección es av. Américo Vespucio, 15, edificio S-2, 41092 Sevilla. c) Podrá contactar con el Delegado de Protección de Datos en la dirección electrónica dpd@salud@juntadeandalucia.es. d) Puede usted revocar su consentimiento o ejercer sus derechos de acceso, rectificación, supresión, portabilidad de sus datos, y la limitación u oposición a su tratamiento, solicitándolo por escrito, con copia del DNI, a la Fundación Pública Andaluza Progreso y Salud en avda. Américo Vespucio 15, edificio S-2, 41092 Sevilla; o mediante correo electrónico a ford.fr@juntadeandalucia.es.

SECCIÓN C: Informe favorable de un Comité de Ética de la Investigación.

El informe del comité ético deberá pertenecer a la red de comités de ética del SSPA. Se indicará el comité, la referencia del proyecto, y la fecha de inicio y de finalización. Si no se dispone de dicha evaluación, el Biobanco dispone de un Comité de Ética de la Investigación que pueden evaluar el proyecto.

En cumplimiento de lo dispuesto en el Reglamento General de Protección de Datos y en la Ley Orgánica 3/2018, de 5 de diciembre, de Protección de Datos Personales y garantía de los derechos digitales, le informamos de lo siguiente: a) Los datos personales que nos proporcione serán utilizados con la finalidad de gestionar los datos de terceros clientes o proveedores con la Fundación, atender las solicitudes prestación de servicios que ofrece el Biobanco, así como comunicaciones futuras y/o poder informarle de servicios relacionados con su solicitud, quedando almacenados durante el tiempo necesario para cumplir con las obligaciones legales estipuladas. Sus datos no serán cedidos a terceros, salvo que se disponga en una obligación legal. La base jurídica de este tratamiento se basa en la relación contractual, sin la cual no podríamos cumplir con la finalidad descrita. b) El responsable de este tratamiento de sus datos personales es la Fundación Pública Andaluza Progreso y Salud, cuya dirección es av. Américo Vespucio, 15, edificio S-2. 41092 Sevilla. c) Podrá contactar con el Delegado de Protección de Datos en la dirección electrónica dpsd.csalud@juntadeandalucia.es. d) Puede usted revocar su consentimiento o ejercer sus derechos de acceso, rectificación, supresión, portabilidad de sus datos, y la limitación u oposición a su tratamiento, solicitándolo por escrito, con copia del DNI, a la Fundación Pública Andaluza Progreso y Salud en avda. Américo Vespucio 15, edificio S-2. 41092 Sevilla, o mediante correo electrónico a lord_fps@juntadeandalucia.es

SECCIÓN D: Informe favorable de un Comité Científico.

El informe del comité científico deberá ser de agencias externas, preferiblemente agencias de evaluación de convocatorias de financiación competitivas. Se indicará la agencia, la referencia del proyecto en la convocatoria de evaluación, y la fecha de inicio y de finalización. Si no se dispone de dicha evaluación externa, el Biobanco dispone de un Comité Científico externos que pueden evaluar el proyecto.

Este formulario puede enviarse por correo ordinario o por correo electrónico a cualquiera de las siguientes direcciones:

En cumplimiento de lo dispuesto en el Reglamento General de Protección de Datos y en la Ley Orgánica 3/2018, de 5 de diciembre, de Protección de Datos Personales y garantía de los derechos digitales, le informamos de lo siguiente: a) Los datos personales que nos proporcione serán utilizados con la finalidad de gestionar los datos de terceros clientes o proveedores con la Fundación, atender las solicitudes prestación de servicios que ofrece el Biobanco, así como comunicaciones futuras y/o poder informarle de servicios relacionados con su solicitud, quedando almacenados durante el tiempo necesario para cumplir con las obligaciones legales estipuladas. Sus datos no serán cedidos a terceros, salvo que se disponga en una obligación legal. La base jurídica de este tratamiento se basa en la relación contractual, sin la cual no podríamos cumplir con la finalidad descrita. b) El responsable de este tratamiento de sus datos personales es la Fundación Pública Andaluza Progreso y Salud, cuya dirección es av. Américo Vespucio, 15, edificio S-2, 41092 Sevilla. c) Podrá contactar con el Delegado de Protección de Datos en la dirección electrónica dpd.salud@juntadeandalucia.es. d) Puede usted revocar su consentimiento o ejercer sus derechos de acceso, rectificación, supresión, portabilidad de sus datos, y la limitación u oposición a su tratamiento, solicitándolo por escrito, con copia del DNI, a la Fundación Pública Andaluza Progreso y Salud en avda. Américo Vespucio 15, edificio S-2, 41092 Sevilla; o mediante correo electrónico a dpd.fps@juntadeandalucia.es



v.11

Biobanco del Sistema Sanitario Público de Andalucía
Parque Tecnológico Ciencias de la Salud
Centro de Investigación Biomédica
Avda. del Conocimiento s/n
18016 Granada • Spain
Teléfono: 0034 958 894 672
Dirección electrónica: biobanco.sspa@juntadeandalucia.es

En cumplimiento de lo dispuesto en el Reglamento General de Protección de Datos y en la Ley Orgánica 3/2018, de 5 de diciembre, de Protección de Datos Personales y garantía de los derechos digitales, le informamos de lo siguiente: a) Los datos personales que nos proporcione serán utilizados con la finalidad de gestionar los datos de terceros clientes o proveedores con la Fundación, atender las solicitudes prestación de servicios que ofrece el Biobanco, así como comunicaciones futuras y/o poder informarle de servicios relacionados con su solicitud, quedando almacenados durante el tiempo necesario para cumplir con las obligaciones legales estipuladas. Sus datos no serán cedidos a terceros, salvo que se disponga en una obligación legal. La base jurídica de este tratamiento se basa en la relación contractual, sin la cual no podríamos cumplir con la finalidad descrita. b) El responsable de este tratamiento de sus datos personales es la Fundación Pública Andaluza Progreso y Salud, cuya dirección es av. Américo Vespucio, 15, edificio S-2. 41092 Sevilla. c) Podrá contactar con el Delegado de Protección de Datos en la dirección electrónica dpd.csalud@juntadeandalucia.es. d) Puede usted revocar su consentimiento o ejercer sus derechos de acceso, rectificación, supresión, portabilidad de sus datos, y la limitación u oposición a su tratamiento, solicitándolo por escrito, con copia del DNI, a la Fundación Pública Andaluza Progreso y Salud en avda. Américo Vespucio 15, edificio S-2. 41092 Sevilla, o mediante correo electrónico a lopl.fps@juntadeandalucia.es



PRODUCCIÓN CIENTÍFICA

10. PRODUCCIÓN CIENTÍFICA

10.1. Artículos publicados

Durante la preparación de la presente Tesis Doctoral se ha publicado el siguiente artículo original que forma parte de la investigación desarrollada en la revista *International Journal of Molecular Sciences* (JCR, Factor de impacto 2022: 6.208; Categoría: “Molecular Pathology, Diagnostics, and Therapeutics”) Cuartil 1 (Q1):

- **González Rojo P**, Pérez Ramírez C, Gálvez Navas JM, Pineda Lancheros LE, Rojo Tolosa S, Ramírez Tortosa MDC, Jiménez Morales A. Vitamin D-Related Single Nucleotide Polymorphisms as Risk Biomarker of Cardiovascular Disease. *Int J Mol Sci.* 2022 Aug 4;23(15):8686. doi: 10.3390/ijms23158686. PMID: 35955825; PMCID: PMC9368814.6.094, **6.208, Q1**



Communication

Vitamin D-Related Single Nucleotide Polymorphisms as Risk Biomarker of Cardiovascular Disease

Paula González Rojo ¹, Cristina Pérez Ramirez ^{1,2,*}, José María Gálvez Navas ^{1,2,†},
Laura Elena Pineda Lancheros ^{1,†}, Susana Rojo Tolosa ^{1,†}, María del Carmen Ramírez Tortosa ^{2,‡}
and Alberto Jiménez Morales ^{1,‡}

¹ Pharmacogenetics Unit, Pharmacy Service, University Hospital Virgen de las Nieves, 18014 Granada, Spain

² Department of Biochemistry and Molecular Biology II, Faculty of Pharmacy, Campus Universitario de Cartuja, University of Granada, 18071 Granada, Spain

* Correspondence: cperezramirez87@ugr.es

† These authors contributed equally to the work.

‡ These authors contributed equally to the work.

Abstract: Cardiovascular diseases (CVDs) are a group of disorders of the heart and blood vessels. In addition to environmental risk factors, genetic predisposition increases the risk; this includes alterations in the vitamin D receptor gene (*VDR*). These alterations play a key role in modifying vitamin D uptake, being able to modify its function and increasing susceptibility to cardiovascular disorders. The aim of this study was to evaluate the association of polymorphisms in the *VDR* gene and risk of CVD in a Caucasian population. A retrospective case-control study was conducted comprising 246 CVD patients and 246 controls of Caucasian origin from Southern Spain. The genetic polymorphisms *BsmI* (rs1544410), *TaqI* (rs731236), *Apal* (rs7975232), *FokI* (rs2228570) and *Cdx2* (rs11568820) were determined by means of real-time polymerase chain reaction (PCR) for allelic discrimination using TaqMan[®] probes. The logistic regression analysis adjusted for body mass index and diabetes revealed that the TT genotype was associated with a higher risk of CVD in both the genotypic model ($p = 0.0430$; OR = 2.30; 95% CI = 1.06–5.37; TT vs. CC) and the recessive model ($p = 0.0099$; OR = 2.71; 95% CI = 1.31–6.07; TT vs. C). Haplotype analysis revealed that the haplotype GAC ($p = 0.047$; OR = 0.34; 95% CI = 0.12–0.98) was associated with increased risk of CVD. The *VDR* polymorphisms *FokI* (rs2228570) was significantly associated with the development of CVD. No influence was observed of the *VDR* polymorphisms *BsmI* (rs1544410), *TaqI* (rs731236), *Apal* (rs7975232) and *Cdx2* (rs11568820) on the risk of developing CVD in the patients studied.

Keywords: cardiovascular disease; risk; *VDR*; polymorphisms; biomarkers



Citation: González Rojo, P.; Pérez Ramirez, C.; Gálvez Navas, J.M.; Pineda Lancheros, L.E.; Rojo Tolosa, S.; Ramírez Tortosa, M.d.C.; Jiménez Morales, A. Vitamin D-Related Single Nucleotide Polymorphisms as Risk Biomarker of Cardiovascular Disease. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 8686. <https://doi.org/10.3390/ijms23158686>

Academic Editor: Alessandro Di Minno

Received: 14 July 2022

Accepted: 1 August 2022

Published: 4 August 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Cardiovascular diseases (CVDs) are a group of disorders of the heart and blood vessels. They are classified into coronary heart disease, cerebrovascular disease, peripheral arteriopathies, rheumatic heart disease, congenital heart disease, deep vein thrombosis, and pulmonary embolism. According to the World Health Organization, CVD is the leading cause of death worldwide. It is estimated that in 2015 (the last year for which data have been published) 17.7 million people died from CVDs, representing 31% of all registered global deaths. Of these deaths, more than 80% take place in low- and middle-income countries, affecting men and women almost equally [1]; hence the utmost importance of identifying the risk factors involved in the development of this disease, given the enormous social and economic implications [2].

Although the etiology of CVD has not been clearly established, it has been shown that the causes of these disorders are multi-factorial, due to the combination of environmental risk factors, such as smoking, lack of physical activity, eating habits, high blood pressure, type 2 diabetes, and dyslipidemias, with genetic predisposition [3–5]. The search for genes

that predispose to CVD has led to the identification of human variations of deoxyribonucleic acid (DNA), evaluation of the risk profile and adoption of preventive or therapeutic measures [4]. The vitamin D receptor (*VDR*) gene and its single nucleotide polymorphisms (SNPs) have received special attention due to their association with a cardiometabolic risk profile. The precise mechanism underlying its influence on pathogenesis is still unclear and may be the result of different factors [6–8]. Firstly, the *VDR* gene is found in vascular smooth muscle cells and endothelial cells, potentially affecting their growth and proliferation [9]. In addition, *VDR* activation induces an increase dependent on nitric oxide concentration in endothelial cells, and enhances the angiogenic properties of endothelial progenitor cells [10,11]. Secondly, vitamin D could regulate immune cells, inhibiting the release of pro-inflammatory cytokines and increasing the release of anti-inflammatory cytokines, thus playing a role in blood vessel protection [12]. Thirdly, vitamin D is an important regulator of the renin-angiotensin-system (RAS). Vitamin D deficiency would involve activation of the renin gene, producing an increase in angiotensin II, which can lead to hypertension and ventricular hypertrophy [13,14]. Additionally, it would prompt an increase in the production of reactive oxygen species (ROS) and the activation of G proteins such as Rho A, resulting in the inhibition of the pathways necessary for intracellular glucose transport and, therefore, the development of insulin resistance and the onset of metabolic syndrome [15]. Finally, vitamin D is associated with an atherogenic lipid profile that includes increased serum LDL and decreased HDL levels. The biologically active form of vitamin D suppresses foam cell formation, decreases cholesterol uptake by macrophages, and induces LDL autophagy through gene regulation through *VDR*. However, short-term replenishment of 25-hydroxyvitamin D levels does not improve the lipid profile in humans [16,17]. In short, vitamin D can lower blood pressure values and have anti-inflammatory, anti-proliferative, anti-hypertrophic, anti-fibrotic, anti-diabetic, and anti-thrombotic effects, beneficially modulating classic cardiovascular risk factors [18].

Vitamin D can be obtained from 7-dehydrocholesterol after exposure to sunlight and through food [19–21]. Vitamin D is hydroxylated to 25-hydroxyvitamin D₃ (25(OH)D₃) in the liver and 1 α -hydroxylated in the kidney, forming the active hormone 1,25-dihydroxyvitamin D₃ (1,25(OH)₂D₃) [22,23]. This active metabolite binds to the *VDR* ligand-binding domain (LBD), forming a heterodimer with the retinoid X receptor (RXR) that binds to vitamin D response elements (VDRE) in the promoter region of target genes modulating transcriptional activation [24,25]. The *VDR* is expressed almost ubiquitously regulating approximately 3% of the genome; more than 900 genes participate in many physiological processes [26,27].

The gene encoding the nuclear vitamin D receptor is a large gene more than 100 Kb in length [28], found in the long arm of chromosome 12 (locus 12q13.1) [29]. It has at least five promoter regions, eight coding exons and at least six non-coding exons that are alternately spliced [30]. It encodes a protein that contains 427 amino acids [26] belonging to the family of steroid receptors for retinoic acid, thyroid hormone, sex hormones, and adrenal steroids [31]. To date, 470 SNPs have been identified at the *VDR* locus [32], but there are five common polymorphisms that have been widely studied due to their effects on various physiological and pathological phenotypes; *Cdx2* (rs11568820), *FokI* (rs2228570), *TaqI* (rs731236), *BsmI* (rs1544410) and *ApaI* (rs7975232) [33,34].

Recently, the importance of these polymorphisms and their haplotypes has been increasingly recognized as more studies have linked them to different diseases [35]. Some SNPs play a key role in modifying 1,25(OH)₂D₃ uptake, due to their capacity to modify vitamin D function [36]. However, the exact molecular mechanism explaining the association between *VDR* polymorphisms and serum levels of 25(OH)₂D₃ remains unknown [37]. The *VDR* SNP *FokI* (rs2228570, exon 2, C > T, formerly known as rs10735810) is characterized by the presence of two ATG start codons separated by six nucleotides, modifying the length and functional activity of the protein. Thus, *FokI* is the only *VDR* polymorphism with functional impact, as it involves the loss of a transcription start site. It is not in linkage disequilibrium with other SNPs, so the associations with the *VDR* genotype *FokI* are considered independent markers of the *VDR* gene [29]. The C allele results in a shorter variant

of the VDR protein (424 amino acids) and a longer variant associated with the T allele (427 amino acids) [38]. Although no significant differences have been reported in ligand affinity, DNA binding or transactivation activity between the two allelic forms of *FokI*, the shorter variant shows greater receptor activity than the longer variant as it appears to interact more efficiently with the transcription factor TFIIB [39,40]. The SNPs *BsmI* (rs1544410, intron 8, G > A), *TaqI* (rs731236, exon 9, T > C) and *ApaI* (rs7975232, intron 8, C > A) are found near the 3'UTR region of the VDR gene [6,27,35]. This region contains many polymorphisms and therefore a strong linkage disequilibrium could explain the associations observed with *Bsm-Apa-Taq*. These polymorphisms are involved in the regulation of VDR expression, notably through regulation of messenger ribonucleic acid (mRNA) stability [41,42]. Therefore, they can influence the expression of the protein without altering its structure or function [43]. The polymorphism *Cdx2* (rs11568820, exon 1, G > A) is located in the promoter region of the 5' end of the VDR gene. The VDR specifically interacts with functional enhancer elements in the VDR gene in the small intestine, regulating its gene expression and therefore calcium absorption [44,45]. The transcriptional activity of the VDR promoter with the G allele is lower compared to the A allele, decreasing intestinal absorption of calcium [44] and potentially influencing central obesity [27].

Numerous studies have been carried out under this conceptual framework to investigate the association of these polymorphisms with the risk of developing CVD. However, the results obtained are contradictory and further studies are required in different populations to obtain more information about the influence of these SNPs on the susceptibility of developing CVD. Based on the foregoing, we carried out this study to evaluate the association of these polymorphisms in the VDR gene (*BsmI* (rs1544410), *TaqI* (rs731236), *ApaI* (rs7975232), *FokI* (rs2228570) and *Cdx2* (rs11568820)) and CVD risk in a Caucasian population.

2. Results

2.1. Patients Characteristics

A total of 246 cases with CVD and 246 controls of Caucasian origin from Southern Spain were included in the study. Controls were matched to cases on age and sex (1:1). Their clinical, socio-demographic, and pathological characteristics are detailed in Table 1. The median age of the patients was 70 (63.25, 76) years. The group of cases consisted of 132 women (53.7%) and 114 men (46.3%). Most of the cases were non-smokers, non-drinkers, overweight, not dyslipidemic, hypertensive and did not have diabetes. As regards cardiovascular disease, 84 (34.14%) suffered from cardiac arrhythmias, 15 (6.10%) presented cardiomyopathy, 15 (6.10%) cerebrovascular disease, 27 (10.98%) heart failure, 46 (18.70%) valvular heart disease and 59 (23.98%) vascular peripheral disease.

Table 1. Clinico-pathologic characteristics of cardiology cases and controls.

	N	Cases n (%)	N	Controls n (%)	χ^2	p-Value	Reference	OR	95% CI
Gender	246		246						
Male		114 (46.3)		104 (42.3)	0.8237	0.3641			
Female		132 (53.7)		142 (57.7)					
Age	246	70 (63.25, 76)	246	69.5 (63, 76)					
Tobacco consumption	233		203						
Current-smokers		41 (17.6)		27 (13.3)	1.9502	0.3772			
Former-smokers		70 (30.0)		70 (34.5)					
Non-smokers		122 (52.4)		106 (52.2)					
Alcohol consumption	220		173						
Current-drinkers		46 (20.9)		27 (15.6)	2.0823	0.3531			
Former-drinkers		8 (3.6)		5 (2.9)					
Non-drinkers		166 (75.5)		141 (81.5)					
Body Mass Index	182	29.63 ± 5.14	114	28.03 ± 4.89					

Table 1. Cont.

	Cases		Controls		χ^2	p-Value	Reference	OR	95% CI
	N	n (%)	N	n (%)					
Underweight		1 (0.5)		1 (0.9)		0.0066 ^a	Normal (healthy weight)	1.21	0.05–31.44
Normal (healthy weight)		33 (18.1)		40 (35.1)				1	
Overweight		68 (37.4)		30 (26.3)				2.74	1.47–5.20
Obese Class I (Moderately obese)		46 (25.3)		32 (28.1)				1.74	0.92–3.34
Obese Class II (Severely obese)		29 (15.9)		10 (8.8)				3.51	1.53–8.57
Obese Class III (Very severely obese)		5 (2.7)		1 (0.9)				6.06	0.92–119.19
Dyslipidemia	246		246						
No		158 (64.2)		155 (63.0)	0.0790	0.7786			
Yes		88 (35.8)		91 (37.0)					
Hypertension	246		246						
No		100 (40.6)		115 (46.8)	1.8588	0.1728			
Yes		146 (48)		131 (53.2)					
Diabetes	246		246						
No		170 (69.1)		201 (81.7)	10.5320	0.0012 ^a	No	1	1.32–3.06
Yes		76 (30.9)		45 (18.3)		1.99			
Disease	246								
Cardiac Arrhythmias		84 (34.15)							
Cardiomyopathy		15 (6.10)							
Cerebrovascular disease		15 (6.10)							
Heart failure		27 (10.98)							
Heart valve disease		46 (18.70)							
Peripheral vascular disease		59 (23.98)							

Shade means the value is significant. ^a p-value for *t* test.

The control group consisted of 142 women (142/246; 57.7%) and 104 men (104/246; 42.3%), with a mean age of 69.5 (63, 76) years. Most of the controls were non-smokers, non-drinkers, had a healthy weight, not dyslipidemic, did not have hypertensive and did not have diabetes.

Cases and controls showed significant differences in terms of BMI ($p = 0.0003$) and diabetes ($p < 0.001$; OR = 10.53; 95% CI = 1.32–3.03; diabetes vs. non-diabetes).

2.2. Genotype Distribution

The genotype frequency for the control group coincided with the expected values according to the Hardy-Weinberg equilibrium model (Table S1). The coefficients D' and r^2 for the evaluation of linkage disequilibrium are described in Table S2 and Figure 1. All SNPs had minor allele frequencies above 1%, so none of them had to be excluded from the analysis (Table S3). The estimated haplotype frequencies are presented in Table S4.

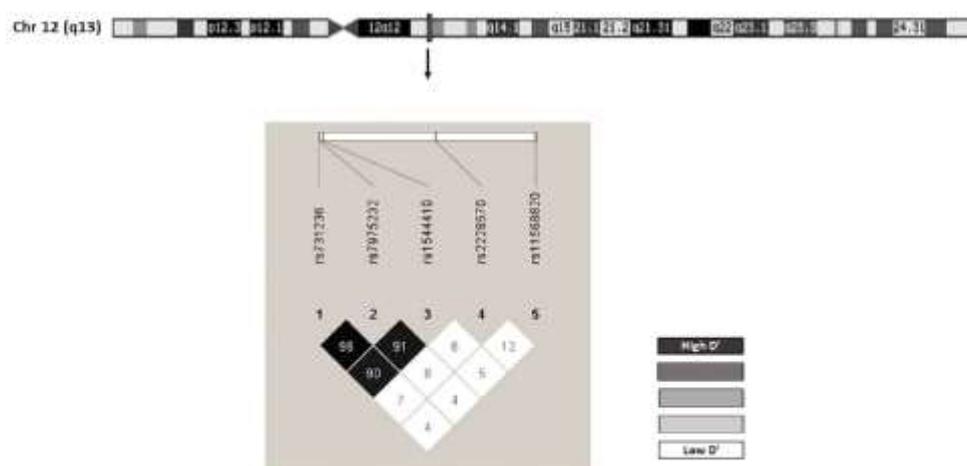


Figure 1. Chromosomal location for (vitamin D receptor) VDR, and linkage disequilibrium (LD).

2.3. Influence of Genetic Polymorphisms on CVD Risk

Bivariate analysis was performed according to the following models: genotypic, additive, allelic, dominant, and recessive. *VDR FokI* (rs2228570) was the only polymorphism to show an association with CVD risk in the genotypic ($p_{\chi^2} = 0.0063$), additive ($p_{\chi^2} = 0.0267$), allelic ($p_{\chi^2} = 0.0230$) and recessive ($p_{\chi^2} = 0.0015$) models (Table S5). This significant association was also found after making adjustments for the Bonferroni test, in which both the genotypic and recessive models showed that patients with the TT genotype presented a higher risk of developing CVD ($p_{\text{Bonferroni-corrected}} = 0.0305$; OR = 2.35; 95% CI = 1.33–4.28; TT vs. CC and $p_{\text{Bonferroni-corrected}} = 0.0075$; OR = 2.39; 95% CI = 1.39–4.24; TT vs. C; Table 2, respectively). The logistic regression analysis adjusted for BMI and diabetes revealed that the TT genotype was associated with a higher risk of CVD in both the genotypic model ($p = 0.0430$; OR = 2.30; 95% CI = 1.06–5.37; TT vs. CC; Table 3) and the recessive model ($p = 0.0099$; OR = 2.71; 95% CI = 1.31–6.07; TT vs. C; Table 3). However, no association was found in either the genotypic logistic regression model adjusted for BMI and diabetes ($p = 0.2286$; OR = 0.72; 95% CI = 0.43–1.22; TC vs. CC; Table 3), the dominant model ($p = 0.8648$ OR = 0.95; 95% CI = 0.58–1.57; T vs. CC; Table 3) or the additive model ($p = 0.2151$; OR = 1.24; 95% CI = 0.88–1.76; T vs. C; Table 3). The other polymorphisms analyzed did not show statistically significant associations with the development of CVD in any of the models studied (Table S5). Haplotype analysis revealed that the GAC haplotype ($p = 0.047$; OR = 0.34; 95% CI = 0.12–0.98) was associated with an increased risk of CVD (Table 4).

Table 2. Influence of *VDR FokI* (rs2228570) gene polymorphism on risk of cardiovascular disease.

Models	Genotype	Cases [n (%)]	Controls [n (%)]	p-Value ^a	Adjusted p-Value ^b	OR ^c	95% CI
Genotypic	TT	45 (18.3)	21 (8.5)	0.0061	0.0305	2.35	1.33–4.28
	CT	99 (40.2)	113 (45.9)			0.96	0.66–1.41
	CC	102 (41.5)	112 (45.5)			1	
Dominant	T	144 (58.5)	134 (54.5)	0.3631	1		
	CC	102 (41.5)	112 (45.5)				
Recessive	TT	45 (18.3)	21 (8.5)	0.0022	0.0075	2.39	1.39–4.24
	C	201 (81.7)	225 (91.5)				
Allelic	T	189 (38.41)	155 (31.50)	0.0230	0.1151		
	C	303 (61.59)	337 (68.50)				
Additive	-	-	-	0.02673 ^d	0.1336		

CI: confidence interval; OR: odds ratio. ^a p-value for χ^2 -test. ^b p-value for Bonferroni correction. ^c Unadjusted or crude ORs. ^d p-value for *t* test. Shade means the value is significant.

Table 3. Influence of clinical characteristic and *VDR FokI* (rs2228570) gene polymorphism on risk of cardiovascular disease.

	Genotypic			Dominant			Recessive			Additive					
	TT vs. CC		CT vs. CC	T vs. CC		T vs. CC	TT vs. C		T vs. C	T vs. C		T vs. C			
	p-Value	OR	95% CI	p-Value	OR	95% CI	p-Value	OR	95% CI	p-Value	OR	95% CI			
Body Mass Index	0.0265	1.06	1.01–1.12	0.0265	1.06	1.01–1.12	0.0458	1.05	1.00–1.11	0.0413	1.05	1.00–1.11	0.0634	1.05	0.99–1.10
Diabetes Yes	0.0359	1.91	1.06–3.55	0.0359	1.91	1.06–3.55	0.0468	1.83	1.02–3.38	0.0316	1.94	1.07–3.59	0.0372	1.89	1.05–3.50
<i>VDR FokI</i> (rs2228570)	0.0430	2.30	1.06–5.37	0.2286	0.72	0.43–1.22	0.8648	0.95	0.58–1.57	0.0099	2.71	1.31–6.07	0.2151	1.24	0.88–1.76

Shade means the value is significant.

Table 4. Haplotype association with response.

	Rs1544410	Rs7975232	Rs731236	Freq	OR (95% CI)	p-Value
1	G	C	T	0.4613	1.00	—
2	A	A	C	0.3685	0.92 (0.70–1.22)	0.570
3	G	A	T	0.1079	0.81 (0.52–1.24)	0.330
4	A	A	T	0.0251	1.11 (0.51–2.38)	0.800
5	G	A	C	0.0189	0.34 (0.12–0.98)	0.047
6	A	C	T	0.0114	1.22 (0.41–3.65)	0.730
Rare	*	*	*	0.0069	0.54 (0.12–2.49)	0.430

Freq: haplotype frequency. Shade means the value is significant. * reference to rare haplotypes as there is no symbol to identify the group.

3. Discussion

Cardiovascular disease, which involves the heart, brain, and peripheral circulation, represents a major health problem throughout the world. It has multiple genetic and environmental components that contribute to the observed phenotype [46]. The role played by vitamin D in cardiovascular function is receiving more and more attention and, in particular, the effect of the respective polymorphisms in the *VDR* gene. Most studies describing *VDR* SNPs have focused on five polymorphisms: *BsmI* (rs1544410), *TaqI* (rs731236), *Apal* (rs7975232), *FokI* (rs2228570) and *Cdx2* (rs11568820) [32,33].

The *VDR FokI* polymorphism (rs2228750) is one of the most researched. It is the only *VDR* polymorphism with functional impact, as it involves the loss of a transcription start site [29]. Previous studies have reported contradictory results, so the relationship between this polymorphism and the development of CVD is not clear [47–54]. In our study, the logistic regression analysis adjusted for body mass index and diabetes revealed that the *VDR FokI* TT genotype showed an association with increased risk of CVD in the genotypic model ($p < 0.05$; Table 3) and in the recessive model ($p < 0.05$; Table 3). Several studies are consistent with our results, for example one study conducted in a Caucasian population (from Poland) (58 cases/142 controls), in which statistically significant differences were found in relation to the T allele of the *VDR FokI* polymorphism, identifying it as a risk factor for heart failure and hypertension ($p = 0.03$) [55]. Another study in a Caucasian population (from Egypt) (50 cases/50 controls) also reported an association between the *VDR FokI* polymorphism and the presence of congenital heart disease defects. In particular, patients carrying the *VDR FokI*-T allele were at greater risk of suffering congenital heart disease defects [($p = 0.006$; OR = 3; 95% CI = 1–8; TC vs. CC); ($p = 0.03$; OR = 10; 95% CI = 1–97; TT vs. CC); ($p = 0.001$; OR = 3; 95% CI = 2–6; T vs. C)] [50]. Another study in a Caucasian population (from Egypt) (244 cases/138 controls) shows that allele T frequency is higher in patients with CVD (group A and B) which means *VDR FokI*-T allele increase CVD risk [($p < 0.001$; OR = 2.397; 95% CI = 1.518–3.786; C vs. T); ($p < 0.001$; OR = 2.298; 95% CI = 1.443–3.660; C vs. T)] [56]. Furthermore, the study carried out by Nakhil et al. (2019) in a Caucasian population (Mediterranean region) with 50 patients reported that the presence of *VDR FokI* polymorphisms is higher compared to the rest of the Caucasian population [46]. Moreover, the results of our study are in accord with others conducted in an Asian population. For example, the study of Hao et al. (2019) in a Chinese population (145 cases/90 controls), in which statistically significant differences were found between cases and controls in relation to the T allele of the *VDR FokI* polymorphism, identifying it as a risk factor for the disease [($p < 0.0001$; OR = 2.45; 95% CI = 1.60–3.77; T vs. C); ($p < 0.0001$; OR = 3.42; 95% CI = 1.94–6.07; TC vs. CC); ($p = 0.02$; OR = 4.73; 95% CI = 1.35–16.27; TT vs. CC)] [47]. Likewise, another study carried out in an Asian pop-

ulation (from China) (860 cases/862 controls) showed that individuals carrying the VDR *FokI*-T allele were at a higher risk of developing coronary artery disease (CAD) [($p < 0.001$; OR = 1.47; 95% CI = 1.22–1.85; CT vs. CC); ($p < 0.001$; OR = 2.12; 95% CI = 1.43–2.88; TT vs. CC); ($p < 0.001$; OR = 1.68; 95% CI = 1.26–2.17; TC + TT vs. CC)] [48]. Similarly, a study carried out in an Asian population (from India) (292 cases/219 controls) reported a statistically significant association between the T genotype of the VDR *FokI* polymorphism and susceptibility to developing ischemic cerebrovascular accident (CVA) ($p = 0.01$; OR = 1.89; 95% CI = 1.17–3.07; TT vs. CC) [49]. Furthermore, according to the meta-analysis conducted by Tabaei et al. (2021) in Caucasian and Asian populations (3741 cases/1998 controls), the T allele of the VDR *FokI* SNP was significantly associated with the CAD risk in all genetic models including: dominant model ($p = 0.02$; OR = 1.47, 95% CI 1.06–2.03), recessive model ($p < 0.001$; OR = 1.39, 95% CI 1.14–1.71), allelic model ($p = 0.01$; OR = 1.38, 95% CI 1.08–1.76, $p = 0.01$), TT vs. CC model ($p = 0.02$; OR = 1.58, 95% CI 1.07–2.34), and TC vs. TT model ($p = 0.04$; OR = 1.38, 95% CI 1.00–1.92), having a strong significant association for the Asian population but not the Caucasian [57].

However, a study carried out in a Caucasian population (from Turkey) (54 cases/58 controls) evaluated the influence of the VDR *FokI* polymorphism on the risk of arteriovenous fistula (AVF), but found no statistically significant association ($p = 0.168$; OR = 1.683; 95% CI = 0.803–3.531) [52]. Another study carried out in a Caucasian population (United States) (205 cases/206 controls) also evaluated the influence of the VDR *FokI* polymorphism on the risk of congestive heart failure (HF) in patients with hypertension, without finding any statistically significant association in any of the analyzed models [($p > 0.05$; OR = 0.82; 95% CI = 0.47–1.42; TC vs. CC); ($p > 0.05$; OR = 0.85; 95% CI = 0.39–1.88; TT vs. CC); ($p > 0.05$; OR = 0.82; 95% CI = 0.49–1.39; CT + TT vs. CC)] [53]. Finally, a meta-analysis composed of six studies in Caucasian and Asian populations (2725 cases/1017 controls) evaluated the influence of the VDR *FokI* polymorphism on the risk of CAD, but did not observe any statistically significant association in any of the models analyzed [($p > 0.05$; OR = 0.93; 95% CI = 0.76–1.10; CT + TT vs. CC); ($p > 0.05$; OR = 1.14; 95% CI = 0.86–1.43; TT vs. CT + CC); ($p > 0.05$; OR = 1.00; 95% CI = 0.88–1.12; T vs. C); ($p > 0.05$; OR = 0.88; 95% CI = 0.71–1.06; CT vs. CC); ($p > 0.05$; OR = 1.06; 95% CI = 0.77–1.35; TT vs. CC)] [54].

According to the results shown in the majority of the studies, including ours, the VDR *FokI* SNP presents statistical association with CVD in Asian and Caucasian (from Europe) populations. However, this statistical significance does not occur in US Caucasian populations. It seems to indicate that ethnicity may influence this correlation.

Otherwise, *BsmI* (rs1544410), *TaqI* (rs731236) and *Apal* (rs7975232) do not result in a structural change of the VDR protein. However, these polymorphisms can modify the expression of the VDR gene and increase susceptibility to developing CVD [29,43]. In our study, the VDR *BsmI* polymorphism did not show an association with susceptibility to developing CVD in any of the models analyzed (Table 2). Various studies in Caucasian populations are consistent with our results, such as the studies conducted by Ewida et al. (2021) [58] and Nakhil et al. (2019), in which there were no association between those polymorphisms and CVD [46]. However, according to the results of the study carried out by Abouzid et al. (2021) they suggest that VDR *BsmI*-AA genotype is protective of CVD ($p = 0.04$) [53]. Moreover, according to the meta-analysis by Tabaei et al. (2021) in Caucasian and Asian populations (6169 cases/2392 controls), VDR *Apal*-CC genotype was significantly associated with CAD risk in all genetic models, including: dominant model ($p = 0.002$; OR = 1.20, 95% CI 1.07–1.34), allelic model ($p = 0.004$; OR = 1.12, 95% CI 1.04–1.21), CC vs. AA model ($p = 0.01$; OR = 1.22, 95% CI 1.04–1.44), and AC vs. AA model ($p = 0.007$; OR = 1.18, 95% CI 1.05–1.33), other than the recessive model ($p = 0.17$; OR = 1.10, 95% CI 0.96–1.27) [57].

Finally, the *Cdx2* polymorphism (rs11568820) is located in the promoter region of the 5' end of the VDR gene regulating gene expression [44]. So far, no study has evaluated the impact of the VDR *Cdx2* polymorphism on the susceptibility for developing CVD. In

our study, no significant association was found between the *VDR Cdx2* polymorphism (rs11568820) and the risk of developing CVD in any of the models analyzed (Table 2).

The main limitation of this study was the limited sample size compared to other studies, especially in terms of cases, which could have prevented the detection of certain associations. Another limitation of our study is that serum levels of 25(OH)D are not available as it is a retrospective study. Thus, it has not been possible to correlate the levels of active vitamin D and the genotypes. However, despite the limited sample size, after adjusting for the Bonferroni test to avoid false-positive associations, the effect of *VDR FokI* remained. The strengths of our study were the homogeneity of the sample, especially in terms of the cases, which consisted of only University Hospital Virgen de las Nieves patients diagnosed by the same team, and also from the same geographical area, thus increasing uniformity. In addition, the controls chosen were older than the cases to reduce potential selection bias.

4. Materials and Methods

4.1. Study Design

A retrospective case-control study was carried out.

4.2. Study Subjects

This included 246 patients with CVD and 246 controls of Caucasian origin from Southern Spain, with a case/control ratio 1. The cases were recruited at the University Hospital Virgen de las Nieves, Granada, Spain, from March 2013 to October 2022. Controls were individuals over 18 years of age who had resided in the same geographic area, with no personal history of CVD, recruited at the same hospital. This sample size has been chosen based on previous studies and the prevalence of these gene polymorphisms in a Spanish Caucasian population.

This case-control study was approved by the Ethics Committee of the Andalusian Health System (SAS) and carried out in accordance with the Declaration of Helsinki (code: 0957-N-21). All subjects participating in the study signed a written informed consent for the extraction of saliva or blood samples and their donation to the biobank. The samples were coded and treated confidentially.

4.3. Socio-Demographic and Clinical Variables

The socio-demographic data collected and included in the study were sex, age, smoking, alcoholic habit, body mass index (BMI), dyslipidemia, hypertension, diabetes, and cardiovascular disease suffered by the patients. Individuals were classified as non-smokers if they had never smoked or smoked < 100 cigarettes in their life, as ex-smokers if they had smoked ≥ 100 cigarettes in their life but were not currently smoking, and as active smokers if they had smoked ≥ 100 cigarettes in their life and were currently smoking. The individuals were classified according to standard drinking units (SDU) as non-drinkers if they were abstainers or did not consume alcohol regularly, as active drinkers if their alcohol consumption >4 SDU/day in men and >2.5 SDU/day in women, and as ex-drinkers if their alcohol consumption was >4 SDU units/day in men and >2.5 SDU/day in women, but they were not currently drinking [59]. For BMI, following Spanish Society for the Study of Obesity criteria, individuals were classified as underweight (BMI < 18.5), healthy weight (18.5 < BMI < 24.9), overweight (25 < BMI < 29.9), class I obese (30 < BMI < 34.9), class II obese (35 < BMI < 39.9) and class III obese (BMI > 40) [60]. The following criteria are based on the guidelines created by the working group of the European Society of Cardiology and the European Society of Atherosclerosis. For dyslipidemia, individuals were classified as dyslipidemic [triglycerides > 150 mg/dL; high-density lipoprotein (HDL) < 40 mg/dL in men and HDL < 48 mg/dL in women; low-density lipoprotein (LDL) > 100 mg/dL; total cholesterol > 200 mg/dL] and not dyslipidemic. For hypertension, individuals were classified as hypertensive [systolic blood pressure (SBP) > 140 mmHg and diastolic blood pressure (DBP) > 90 mmHg] and non-hypertensive [61]. For diabetes,

patients were classified according to American Diabetes Association Criteria into diabetics [steroid diabetes (glucocorticoid-induced hyperglycemia), type I diabetes (fasting blood glucose > 126 mg/dL produced by an autoimmune reaction against insulin-producing cells) and type II diabetes (fasting blood glucose > 126 mg/dL caused by insulin resistance)] and non-diabetics [58]. Both patients with type I and II diabetes have been grouped in the group of cases and controls with diabetes, without excluding any patient. As regards cardiovascular disease, individuals were classified into those with arterial thromboembolism, atrial fibrillation, heart failure, valvular heart disease or venous thromboembolism.

4.4. Genetic Variables

4.4.1. DNA Isolation

The DNA samples, isolated from blood or saliva, were obtained from the University Hospital Virgen de las Nieves Biobank, which belongs to the Biobank of the Andalusian Public Health Systems. Blood samples were collected in BD Vacutainer® tubes with EDTA K3 as anticoagulant (3 mL). Saliva samples were collected in 50-mL BD Falcon™ conical tubes (BD, Plymouth, UK). DNA extraction was performed using the DNA QIAamp DNA Mini extraction kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany), in accordance with the specifications provided by the manufacturer, from DNA purification from blood or saliva, and stored at -40°C . DNA concentration and purity were measured using a UV NanoDrop 2000 spectrophotometer™ with the absorbance ratio at 280/260 and 280/230.

4.4.2. Genotyping and Quality Control

The genetic polymorphisms *BsmI* (rs1544410), *TaqI* (rs731236), *Apal* (rs7975232), *FokI* (rs2228570) and *Cdx2* (rs11568820) were determined by means of real-time polymerase chain reaction (PCR) for allelic discrimination using TaqMan® probes (ABI Applied Biosystems, 7300 Real-Time PCR System), in accordance with the manufacturer's instructions. The ID assays used for the polymorphisms were as follows: C__2404008_10 for *TaqI* (rs731236), C__28977635_10 for *Apal* (rs7975232), C__12060045_20 for *FokI* (rs2228570) and C__2880808_10 for *Cdx2* (rs11568820). The *BsmI* polymorphism (rs1544410) was analyzed using an assay customized by ThermoFisher Scientific (Waltham, MA, USA) coded as AN324M4. The criteria for SNPs quality control were: (1) missing genotype rate per SNP < 0.05; (2) minor allele frequency > 0.01; (3) p value > 0.05 in Hardy-Weinberg equilibrium test; (4) missing genotype rate between cases and control < 0.05.

4.4.3. Statistical Analysis

Cases and controls were matched by age and gender with 1:1 propensity score matching method. Quantitative data were expressed as the results (\pm standard deviation) for variables with normal distribution and medians or percentiles (25 and 75) for variables with non-normal distribution. The Shapiro-Wilks test was used to verify normality.

Hardy-Weinberg equilibrium and pairwise haplotype frequencies were estimated, and Lewontin's D prime (D') and the linkage disequilibrium coefficient (r^2) were calculated. The bivariate association analysis between CVD risk and polymorphisms was performed with multiple models (genotypic, additive, allelic, dominant, and recessive) using Pearson's Chi-square test and Fisher's exact test, providing Odds ratio (OR) values and the corresponding 95% confidence interval (95% CI). The models were defined as follows: allelic (D vs. d), dominant ((DD, Dd) vs. dd), recessive (DD vs. (Dd, dd)), genotypic (DD vs. dd, and Dd vs. dd) and additive, with D being the minor allele and d, the major allele. The Bonferroni correction was used for multiple comparisons. Unconditional multiple logistic regression models (genotypic, dominant, and recessive) were considered to determine the influence of possible confounding variables on CVD risk. All tests were two-tailed with a significant level of $p < 0.05$ and were performed using free access software for the PLINK whole genome association analysis toolset and the statistical program R 3.2.2 [62,63]. Linkage disequilibrium was performed with Haploview 4.2 software and haplotype analysis with SNPStats, a web tool for the analysis of association studies [64,65].

5. Conclusions

The *VDR FokI* polymorphism (rs2228570) was significantly associated with the development of CVD. According to it, this SNP could be used as a risk biomarker for the disease mentioned. Otherwise, no influence was found of the polymorphisms *VDR BsmI* (rs1544410), *TaqI* (rs731236), *Apal* (rs7975232) and *Cdx2* (rs11568820) on the risk of developing CVD in our patients. Further studies should be done in order to understand and to confirm the role of *VDR* polymorphisms in the CVD.

Supplementary Materials: The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/ijms23158686/s1>.

Author Contributions: P.G.R. and C.P.R. designed and conceived the experiments; P.G.R. performed the experiments; P.G.R. and J.M.G.N. collected samples; P.G.R. and L.E.P.L. analyzed the data; J.M.G.N. and S.R.T. contributed materials and analysis tools; P.G.R. prepared the original draft; C.P.R., J.M.G.N., L.E.P.L. and M.d.C.R.T. reviewed and edited the draft; P.G.R., C.P.R., and S.R.T. reviewed the analysis and interpretation; A.J.M. supervised funding acquisition. Every author participated in reviewing the manuscript and improving the intellectual content. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the ERDF funds (EU) from the Instituto de Salud Carlos III (PT13/0010/0039) by cofounding grants the Virgen de las Nieves University Hospital Biobank.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki, and approved by the Ethics and Research Committee of the Sistema Andaluz de Salud (code: 0957-N-21).

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Acknowledgments: The results of this study are part of the doctoral thesis presented by Paula González Rojo at the University of Granada.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. WHO. *Cardiovascular Diseases*; World Health Organization: Ginebra, Switzerland, 2017; Available online: [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds)) (accessed on 3 June 2022).
2. Wang, W.; Jiang, B.; Sun, H.; Ru, X.; Sun, D.; Wang, L.; Wang, L.; Jiang, Y.; Li, Y.; Wang, Y.; et al. Prevalence, incidence, and mortality of stroke in China: Results from a nationwide population-based survey of 480687 adults. *Circulation* **2017**, *135*, 759–771. [CrossRef] [PubMed]
3. Della-Morte, D.; Guadagni, F.; Palmirota, R.; Testa, G.; Caso, V.; Paciaroni, M.; Abete, P.; Rengo, F.; Ferroni, P.; Sacco, R.L.; et al. Genetics of ischemic stroke, stroke-related risk factors, stroke precursors and treatments. *Pharmacogenomics* **2012**, *13*, 595–613. [CrossRef] [PubMed]
4. Abbate, R.; Sticchi, E.; Fatini, C. Genetics of cardiovascular disease. *Clin. Cases Min. Bone Metab.* **2008**, *5*, 63–66.
5. Reiner, Z.; Catapano, A.L.; De Backer, G.; Graham, I.; Taskinen, M.R.; Wiklund, O.; Agewall, S.; Alegria, E.; Chapman, M.J.; Durrington, P.; et al. 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*, 1769–1818.
6. Abu el Maaty, M.A.; Hassanein, S.I.; Sleem, H.M.; Gad, M.Z. Vitamin D receptor gene polymorphisms (*TaqI* and *Apal*) in relation to 25-hydroxyvitamin D levels and coronary artery disease incidence. *J. Recept. Signal Transduct. Res.* **2015**, *35*, 391–396. [CrossRef]
7. He, L.; Wang, M. Association of vitamin d receptor- α gene polymorphisms with coronary heart disease in Han Chinese. *Int. J. Clin. and Exp. Med.* **2015**, *8*, 6224–6229.
8. Wang, E.W.-L.; Pang, M.Y.; Siu, P.M.; Lai, C.K.; Woo, J.; Collins, A.R.; Benzie, I.F. Vitamin D status and cardiometabolic risk factors in young adults in Hong Kong: Associations and implications. *Asia Pac. J. Clin. Nutr.* **2018**, *27*, 231–237.
9. Somjen, D.; Weisman, Y.; Kohen, F.; Gayer, B.; Limor, R.; Sharon, O.; Jaccard, N.; Knoll, E.; Stern, N. 25-hydroxyvitamin D3-1 α -hydroxylase is expressed in human vascular smooth muscle cells and is upregulated by parathyroid hormone and estrogenic compounds. *Circulation* **2005**, *111*, 1666–1671. [CrossRef]
10. Grundmann, M.; Haidar, M.; Placzko, S.; Niendorf, R.; Darashchonak, N.; Hubel, C.A.; von Versen-Höyneck, F. Vitamin D improves the angiogenic properties of endothelial progenitor cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **2012**, *303*, 954–962. [CrossRef]
11. Molinari, C.; Uberti, F.; Grossini, E.; Vacca, G.; Carda, S.; Invernizzi, M.; Cisari, C. 1 α ,25-Dihydroxycholecalciferol Induces Nitric Oxide Production in Cultured Endothelial Cells. *Cell. Physiol. Biochem.* **2011**, *27*, 661–668. [CrossRef]

12. Tenderich, G.; Berthorid, H.K.; Stehle, P.; Koerfer, R.; Schleithoff, S.S.; Zittermann, A. Vitamin D supplementation improves cytokine profiles in patients with congestive heart failure: A double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *Am. J. Clin. Nutr.* **2006**, *83*, 754–759.
13. Li, Y.C.; Kong, J.; Wei, M.; Chen, Z.-F.; Liu, S.Q.; Cao, L.-P. 1,25-Dihydroxyvitamin D(3) is a negative endocrine regulator of the renin-angiotensin system. *J. Clin. Investig.* **2002**, *110*, 229–238. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Li, Y.C.; 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*, 387–392. [[CrossRef](#)]
15. Rammos, G.; Tseke, P.; Ziakka, S. Vitamin D, the renin-angiotensin system, and insulin resistance. *Int. Urol. Nephrol.* **2008**, *40*, 419–426. [[CrossRef](#)]
16. Oh, J.; Riek, A.E.; Darwech, I.; Funai, K.; Shao, J.; Chin, K.; Sierra, O.L.; Carmeliet, G.; Ostlund, R.E., Jr.; Bernal-Mizrachi, C. Deletion of macrophage Vitamin D receptor promotes insulin resistance and monocyte cholesterol transport to accelerate atherosclerosis in mice. *Cell Rep.* **2015**, *10*, 1872–1886. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Kumar, S.; Nanduri, R.; Bhagyaraj, E.; Kalra, R.; Ahuja, N.; Chacko, A.P.; Tiwari, D.; Sethi, K.; Saini, A.; Chandra, V.; et al. Vitamin D3-VDR-PTPN6 axis mediated autophagy contributes to the inhibition of macrophage foam cell formation. *Autophagy* **2020**, *17*, 2273–2289. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Mozos, I.; Marginean, O. Links between vitamin D deficiency and cardiovascular diseases. *Biomed. Res. Int.* **2015**, *2015*, 109275. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Pineda Lancheros, L.E.; Pérez Ramirez, C.; Sánchez Martín, A.; Gálvez Navas, J.M.; Martínez Martínez, F.; Ramírez Tortosa, M.d.C.; Jiménez Morales, A. Impact of Genetic Polymorphisms on the Metabolic Pathway of Vitamin D and Survival in Non-Small Cell Lung Cancer. *Nutrients* **2021**, *13*, 3783. [[CrossRef](#)]
20. Wacker, M.; Holick, M.F. Sunlight and vitamin D: A global perspective for health. *Dermato-Endocrinology* **2013**, *5*, 51–108. [[CrossRef](#)]
21. Borel, P.; Caillaud, D.; Cano, N. Vitamin D bioavailability: State of the art. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2013**, *55*, 1193–1205. [[CrossRef](#)]
22. Pilz, S.; Verheyen, N.; Grubler, M.R.; Tomaschitz, A.; März, W. Vitamin D and cardiovascular disease prevention. *Nat. Rev. Cardiol.* **2016**, *13*, 404.
23. Christakos, S.; Dhawan, P.; Verstuyf, A.; Verlinden, L.; Carmeliet, G. Vitamin D: Metabolism, molecular mechanism of action, and pleiotropic effects. *Physiol. Rev.* **2016**, *96*, 365–408. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Haussler, M.R.; Whitfield, G.K.; Kaneko, I.; Haussler, C.A.; Hsieh, D.; Hsieh, J.-C.; Jurutka, P.W. Molecular Mechanisms of Vitamin D Action. *Calcif. Tissue Int.* **2013**, *92*, 77–98. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Rachez, C.; Lemon, B.D.; Suldan, Z.; Bromleigh, V.; Gamble, M.J.; Näär, A.M.; Erdjument-Bromage, H.; Tempst, P.; Freedman, L.P. Ligand-dependent transcription activation by nuclear receptors requires the DRIP complex. *Nature* **1999**, *398*, 824–828. [[CrossRef](#)]
26. Bouillon, R.; Carmeliet, G.; Verlinden, L.; van Etten, E.; Verstuyf, A.; Luderer, H.F.; Lieben, L.; Mathieu, C.; Demay, M. Vitamin D and human health: Lessons from vitamin D receptor null mice. *Endocr. Rev.* **2008**, *29*, 726–776. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Sangkaew, B.; Nuinon, M.; Jeendum, N. Association of vitamin D receptor gene polymorphisms with serum 25(OH)D levels and metabolic syndrome in Thai population. *Gene* **2018**, *659*, 59–66. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Vaidya, A.; Sun, B.; Forman, J.P.; Hopkins, P.N.; Brown, N.J.; Kolatkar, N.S.; Williams, G.H.; Williams, J.S. The Fok1 vitamin D receptor gene polymorphism is associated with plasma renin activity in Caucasians. *Clin. Endocrinol.* **2011**, *74*, 783–790. [[CrossRef](#)]
29. Uitterlinden, A.G.; Fang, Y.; Van Meurs, J.B.; Pols, H.A.; Van Leeuwen, J.P. Genetics and biology of vitamin D receptor polymorphisms. *Gene* **2004**, *338*, 143–156. [[CrossRef](#)]
30. Hong, Y.J.; Kang, E.S.; Ji, M.J.; Choi, H.J.; Oh, T.; Koong, S.-S.; Jeon, H.J. Association between *Bsm1* Polymorphism in Vitamin D Receptor Gene and Diabetic Retinopathy of Type 2 Diabetes in Korean Population. *Endocrinol. Metab.* **2015**, *30*, 469–474. [[CrossRef](#)]
31. Margolis, R.N.; Christakos, S. The nuclear receptor superfamily of steroid hormones and vitamin D gene regulation. An update. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2010**, *1192*, 208–214. [[CrossRef](#)]
32. Sygitowicz, G.; Pera, L.; Sitkiewicz, D. Vitamin D receptor (VDR) polymorphism and the risk of cardiovascular events. *Kardiol Pol.* **2014**, *72*, 64–66. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Serrano, J.C.E.; De Lorenzo, D.; Cassanye, A.; Martin-Gari, M.; Espinel, A.; Delgado, M.A.; Pamplona, R.; Portero-Otin, M. Vitamin D receptor *Bsm1* polymorphism modulates soy intake and 25-hydroxyvitamin D supplementation benefits in cardiovascular disease risk factors profile. *Genes Nutr.* **2013**, *8*, 561–569. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Zhao, Y.; Liao, S.; He, J.; Jin, Y.; Fu, H.; Chen, X.; Fan, X.; Xu, H.; Liu, X.; Jin, J.; et al. Association of vitamin D receptor gene polymorphisms with metabolic syndrome: A case-control design of population-based cross-sectional study in North China. *Lipids Health Dis.* **2014**, *13*, 129. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Dorsch, M.P.; Nemerovski, C.W.; Ellingrod, V.L.; Cowger, J.A.; Dyke, D.B.; Koelling, T.M.; Wu, A.H.; Aaronson, K.D.; Simpson, R.U.; Bleske, B.E. Vitamin D Receptor Genetics on Extracellular Matrix Biomarkers and Hemodynamics in Systolic Heart Failure. *J. Cardiovasc. Pharmacol. Ther.* **2014**, *19*, 439–445. [[CrossRef](#)]

36. Mahjoubi, I.; Kallel, A.; Sbaï, M.H.; Ftouhi, B.; Ben Halima, M.; Jemaa, Z.; Moncef, F.; Hedia, S.; Riadh, J.; Naziha, K. Lack of association between *FokI* polymorphism in vitamin D receptor gene (VDR) & type 2 diabetes mellitus in the Tunisian population. *Indian J. Med. Res.* **2016**, *144*, 46–51.
37. Hajj, A.; Chedid, R.; Chouery, E.; Megarbané, A.; Gannagé-Yared, M.-H. Relationship between vitamin D receptor gene polymorphisms, cardiovascular risk factors and adiponectin in a healthy young population. *Pharmacogenomics* **2016**, *17*, 1675–1686. [CrossRef]
38. Bhakat, R.; Chandra, L.; Saxena, A.; Sarda, A.K.; Krishnamurthy, K.; Yadav, P. Evaluation of metabolic syndrome and vitamin D receptor gene polymorphism in male factor infertility. *Indian J. Clin. Biochem.* **2017**, *32*, 468–472. [CrossRef] [PubMed]
39. Vuolo, L.; Di Somma, C.; Faggiano, A.; Colao, A. Vitamin D and cancer. *Front. Endocrinol.* **2012**, *3*, 1–13. [CrossRef]
40. Jurutka, P.W.; Remus, L.S.; Whitfield, G.K.; Thompson, P.D.; Hsieh, J.C.; Zitzer, H.; Tavakkoli, P.; Galligan, M.A.; Dang, H.T.; Haussler, C.A. The polymorphic N terminus in human vitamin D receptor isoforms influences transcriptional activity by modulating interaction with transcription factor IIB. *Mol. Endocrinol.* **2000**, *14*, 401–420. [CrossRef]
41. Decker, C.J.; Parker, R. Diversity of cytoplasmic functions for the 3' untranslated region of eukaryotic transcripts. *Curr Opin Cell Biol.* **1995**, *7*, 386–392. [CrossRef]
42. Morrison, N.A.; Qi, J.C.; Tokita, A.; Kelly, P.J.; Crofts, L.; Nguyen, T.V.; Sambrook, P.N.; Eisman, J.A. Prediction of bone density from vitamin D receptor alleles. *Nature* **1994**, *367*, 284–287. [CrossRef] [PubMed]
43. Györfy, B.; Vászárhelyi, B.; Krikovszky, D.; Madácsy, L.; Tordai, A.; Tulassay, T.; Szabó, A. Gender-specific association of vitamin D receptor polymorphism combinations with type 1 diabetes mellitus. *Eur. J. Endocrinol.* **2002**, *147*, 803–808. [CrossRef] [PubMed]
44. Arai, H.; Miyamoto, K.I.; Yoshida, M.; Yamamoto, H.; Taketani, Y.; Morita, K.; Kubota, M.; Yoshida, S.; Ikeda, M.; Watabe, F.; et al. The Polymorphism in the caudal-related homeodomain protein Cdx-2 binding element in the human vitamin D receptor gene. *J. Bone Min. Res.* **2001**, *16*, 1256–1264. [CrossRef]
45. Yamamoto, H.; Miyamoto, K.-I.; Li, B.; Taketani, Y.; Kitano, M.; Inoue, Y.; Morita, K.; Pike, J.W.; Takeda, E. The Caudal-Related Homeodomain Protein Cdx-2 Regulates Vitamin D Receptor Gene Expression in the Small Intestine. *J. Bone Miner. Res.* **1999**, *14*, 240–247. [CrossRef] [PubMed]
46. Nakhl, S.; Sleilat, G.; Chouery, E.; Salem, N.; Chaïne, R.; Farès, N. *FokI* vitamin D receptor gene polymorphism and serum 25-hydroxyvitamin D in patients with cardiovascular risk. *Arch. Med. Sci. Atheroscler. Dis.* **2019**, *4*, e298–e303. [CrossRef]
47. Hao, Y.; Chen, Y. Vitamin D levels and vitamin D receptor variants are associated with chronic heart failure in Chinese patients. *J. Clin. Lab. Anal.* **2019**, *33*, e22847. [CrossRef]
48. Jun, M.; Xue-Qiang, G.; Jia, L.; Yang-Jing, X.; Cheng, Z.; Ge, J. Interactions between vitamin D receptor (VDR) gene and Interleukin-6 gene and environment factors on coronary heart disease risk in a Chinese Han population. *Oncotarget* **2017**, *8*, 78419–78428. [CrossRef]
49. Prabhakar, P.; Majumdar, V.; Kulkarni, G.B.; Christopher, R. Genetic variants of vitamin D receptor and susceptibility to ischemic stroke. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2015**, *456*, 631–636. [CrossRef]
50. Mokhtar, W.A.; Fawzy, A.; Allam, R.M.; Amer, R.M.; Hamed, M.S. Maternal vitamin D level and vitamin D receptor gene polymorphism as a risk factor for congenital heart diseases in offspring; An Egyptian case-control study. *Genes Dis.* **2018**, *6*, 193–200. [CrossRef]
51. Lu, S.; Guo, S.; Hu, F.; Guo, Y.; Yan, L.; Ma, W.; Wang, Y.; Wei, Y.; Zhang, Z.; Wang, Z. The associations between the polymorphisms of vitamin D receptor and coronary artery disease: A systematic review and meta-analysis. *Medicine* **2016**, *95*, e3467. [CrossRef]
52. Huzmeli, C.; Bagci, G.; Candan, F.; Bagci, B.; Akkaya, L.; Kayatas, M. Association of vitamin D receptor gene *TaqI*, *FokI* and *Apal* variants with arteriovenous fistula failure in hemodialysis patients. *J. Vasc. Access* **2018**, *19*, 303–310. [CrossRef] [PubMed]
53. Wilke, R.A.; Simpson, R.U.; Mukesh, B.N.; Bhupathi, S.V.; Dart, R.A.; Ghebranos, N.R.; McCarty, C.A. Genetic variation in *CYP27B1* is associated with congestive heart failure in patients with hypertension. *Pharmacogenomics* **2009**, *10*, 1789–1797. [CrossRef] [PubMed]
54. Alizadeh, S.; Djafarian, K.; Alizadeh, H.; Mohseni, R.; Shab-Bidar, S. Common variants of vitamin D receptor gene polymorphisms and susceptibility to coronary artery disease: A systematic review and meta-analysis. *J. Nutr. Nutr.* **2017**, *10*, 9–18. [CrossRef] [PubMed]
55. Abouzid, M.; Kruszyna, M.; Burchardt, P.; Kruszyna, L.; Glówka, F.K.; Karazniewicz-Lada, M. Vitamin D Receptor Gene Polymorphism and Vitamin D Status in Population of Patients with Cardiovascular Disease—A Preliminary Study. *Nutrients* **2021**, *13*, 3117. [CrossRef]
56. Ewida, S.M.; Salem, A.; Shaker, Y.M.; Samy, N.; Yassen, I.; Hassan-Mohamed, R. Vitamin D levels and vitamin D receptor genetic variants in Egyptian cardiovascular disease patients with and without diabetes. *Egypt. J. Med. Hum. Genet.* **2021**, *22*, 55. [CrossRef]
57. Tabaei, S.; Motallebnezhad, M.; Tabaei, S.S. Vitamin D Receptor (VDR) Gene Polymorphisms and Risk of Coronary Artery Disease (CAD): Systematic Review and Meta-analysis. *Biochem. Genetics* **2021**, *59*, 813–836. [CrossRef]
58. The American Diabetes Association (ADA). Classification and diagnosis of diabetes: Standards of medical care in diabetes—2019. *Diabetes Care* **2019**, *42* (Suppl. S1), S13–S28. [CrossRef]
59. Ochoa Mangado, E.; Madoz-Gúrpide, A.; Vicente Muelas, N. Diagnóstico y tratamiento de la dependencia de alcohol. *Med. Segur. Trab.* **2009**, *55*, 26–40. [CrossRef]

60. Salas-Salvadó, J.; Rubio, M.A.; Barbany, M.; Moreno, B. Consenso SEEDO 2007 para la evaluación del sobrepeso y la obesidad y el establecimiento de criterios de intervención terapéutica. *Med. Clin.* **2007**, *128*, 184–196. [[CrossRef](#)]
61. Catapano, A.L.; Graham, I.; De Backer, G.; Wiklund, O.; Chapman, M.J.; Drexel, H.; Hoes, A.; Jennings, C.; Landmesser, U.; Pedersen, T. Guía ESC/EAS 2016 sobre el tratamiento de las dislipemias. *Rev. Esp. Cardiol.* **2017**, *70*, 1151–11564. [[CrossRef](#)]
62. R Development Core Team. *R: A Language and Environment for Statistical Computing*; R Foundation for Statistical Computing: Vienna, Austria, 2020; Available online: <https://www.R-project.org/> (accessed on 6 May 2022).
63. Purcell, S.; Neale, B.; Todd-Brown, K.; Thomas, L.; Ferreira, M.A.; Bender, D.; Maller, J.; Sklar, P.; de Bakker, P.L.; Daly, M.J.; et al. PLINK: A tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *Am. J. Hum. Genet.* **2007**, *81*, 559–575. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Solé, X.; Guinó, E.; Valls, J.; Iniesta, R.; Moreno, V. SNPStats: A web tool for the analysis of association studies. *Bioinformatics* **2006**, *22*, 1928–1929. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Barrett, J.C.; Fry, B.; Maller, J.; Daly, M.J. Haploview: Analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics* **2005**, *21*, 263–265. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

10.2. Comunicaciones a congresos

Durante la preparación de la presente Tesis Doctoral se ha presentado la siguiente Comunicación a Congresos, que forman parte de la investigación desarrollada:

- **González Rojo P**, Pérez Ramírez C. “ASOCIACIÓN DE LOS POLIMORFISMOS DEL GEN DEL RECEPTOR DE LA VITAMINA D CON LA ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR”. I Congreso de Estudiantes de Doctorado de la Universidad Miguel Hernández, España. 2 de febrero de 2021.



El profesor Miguel Ángel Sogorb Sánchez, Vicerrector Adjunto de Investigación para Doctorado de la Universidad Miguel Hernández de Elche

INFORMA A QUIEN PUEDA INTERESAR QUE

don/doña **PAULA GONZÁLEZ ROJO**, con documento de identificación personal **04632184F**, presentó al Primer Congreso Anual de Estudiantes de Doctorado de la Universidad Miguel Hernández de Elche celebrado por vía telemática el día 2 de febrero de 2021 la comunicación titulada:

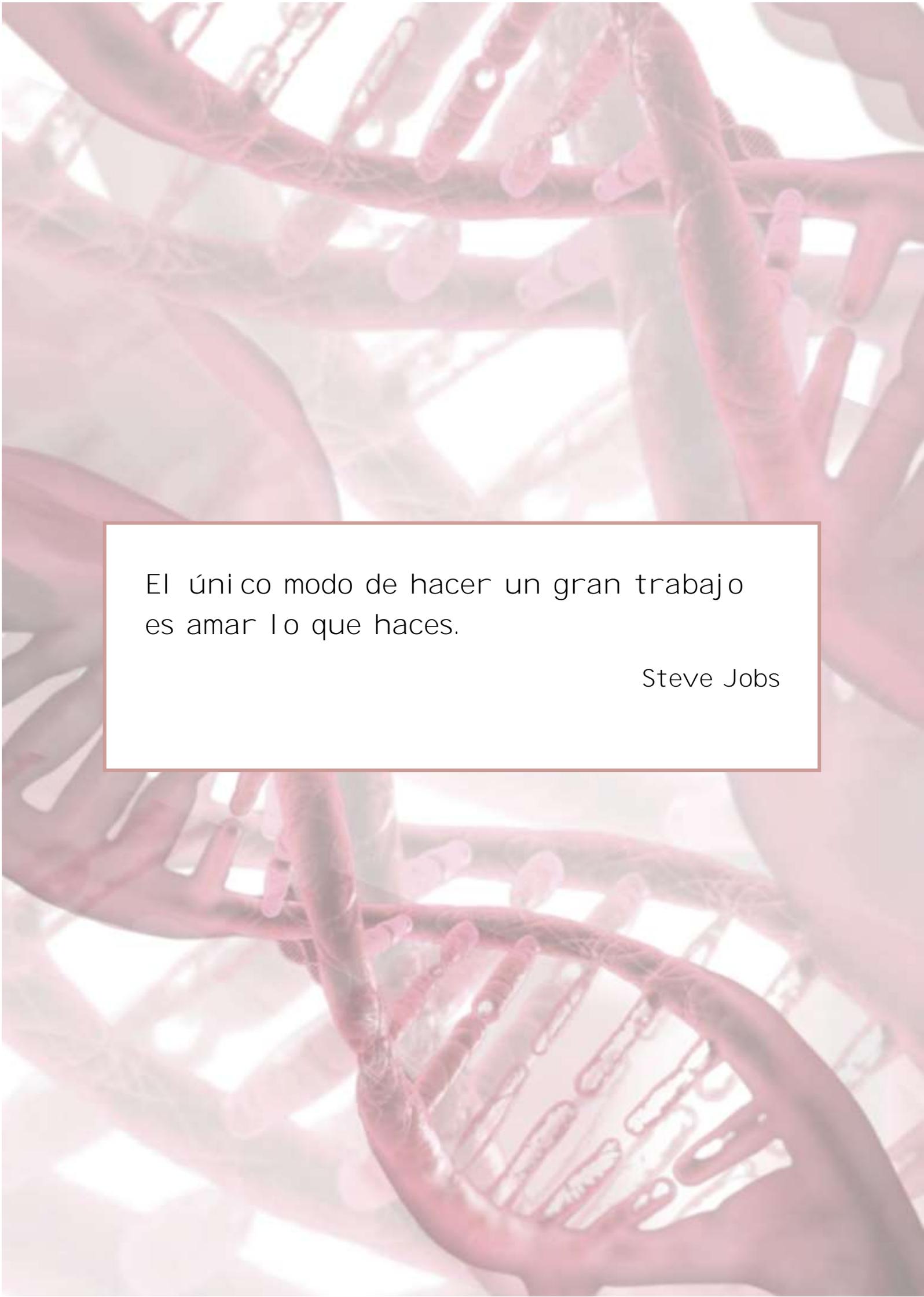
ASOCIACIÓN DE LOS POLIMORFISMOS DEL GEN DEL RECEPTOR DE LA VITAMINA D CON LA ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR

cuyos autores fueron:

PAULA GONZÁLEZ ROJO Y CRISTINA PÉREZ RAMÍREZ



Código Seguro de Verificación(CSV): PFUMHYWUyODdiNDktOWZiNi0
Copia auténtica de documento firmado digitalmente. Puede verificar su integridad en <https://sede.umh.es/csv>
Firmado por MIGUEL ANGEL SOGORB SANCHEZ el día 2021-06-04



El único modo de hacer un gran trabajo
es amar lo que haces.

Steve Jobs

