

TESIS DOCTORAL

HIPOVITAMINOSIS D: RELACIÓN CON EL SÍNDROME METABÓLICO Y SUS COMPONENTES

Inka Miñambres Donaire

Directores de Tesis:

Dr. Antonio Pérez Pérez

Dr. Alberto de Leiva Hidalgo

Departamento de Medicina. Facultad de Medicina
Universitat Autònoma de Barcelona.

2013

TESIS DOCTORAL

HIPOVITAMINOSIS D: RELACIÓN CON EL SÍNDROME METABÓLICO Y SUS COMPONENTES

Departamento de Medicina. Facultad de Medicina
Universitat Autònoma de Barcelona.

2013

Directores de Tesis:

Dr. Antonio Pérez Pérez

Doctoranda:

Inka Miñambres Donaire

Dr. Alberto de Leiva Hidalgo.

AGRADECIMIENTOS:

Al Dr. Antonio Pérez, Director de Unidad del Servicio de Endocrinología y Nutrición del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau y director de esta tesis, por su paciencia y optimismo, por el tiempo dedicado a las múltiples correcciones y por dar siempre “una vuelta más” a las ideas. El verdadero mérito de este trabajo es suyo.

Al Prof. Alberto de Leiva, Director del Servicio de Endocrinología y Nutrición, Catedrático de Medicina de la U.A.B. y codirector de esta tesis, por su apoyo, por las aportaciones constructivas al trabajo realizado y porque sin su confianza esta tesis no habría sido posible.

Al Dr. Joan Sánchez-Hernández por abrir este campo de investigación. Los trabajos incluidos en esta tesis son una continuación de su investigación acerca de la hipovitaminosis D en la obesidad y los efectos de la cirugía bariátrica. Su implicación en esta tesis ha sido esencial, tanto en el diseño, como en el análisis estadístico y en la interpretación de los resultados.

Al Dr. José Rodríguez, jefe de sección del servicio de Bioquímica. Su desinteresada colaboración en las determinaciones de calcidiol y sus aclaraciones acerca de la metodología de laboratorio tienen un valor incalculable. De él he aprendido la importancia de la ilusión y del trabajo bien hecho.

Al Dr. Jose Luís Sánchez-Quesada, por toda la ayuda con las determinaciones de los parámetros lipídicos e inflamatorios, así como por sus aportaciones a la tesis y a los artículos que se han derivado de ella. Su rigurosidad y dedicación son admirables.

Al Dr. Ignasi Gich del Departamento de Epidemiología por su disposición inagotable a resolver todas y cada una de las dudas que han surgido en el análisis estadístico de los trabajos que se

incluyen en esta tesis. De él he aprendido la importancia del sentido común aplicado a la estadística.

A mis compañeros del Servicio de Endocrinología y Nutrición que me han acompañado estos últimos 6 años. Por todo lo que he aprendido de vosotros y espero seguir aprendiendo, por haberme echado una mano, y dos y tres cuando lo he necesitado, tanto en lo profesional, como en lo personal. Es imposible expresar en tan sólo unas líneas todos los aspectos que me gustaría agradecer a cada uno de vosotros.

A Diana Ovejero Crespo, por haberme acompañado en el aprendizaje de la que ahora es nuestra profesión. Ha sido una excelente compañera y mejor amiga. Gracias por todo lo compartido.

A los pacientes que aceptaron participar en los estudios incluidos en esta tesis y a todos los profesionales que los atendieron, especialmente a los residentes que colaboraron en la elaboración de los cuadernillos de estudio y la base de datos.

A mis amigos, que siempre están ahí. A Marcel, que siempre estará ahí.

A mis Padres, los verdaderos responsables de que haya llegado hasta aquí. Mi admiración y agradecimiento es tal que no se puede expresar con palabras.

A mi hermano, por darme siempre su opinión sincera. A mis sobrinos, que puedan perdonar el tiempo que no les he podido dedicar.

A David, por el camino que hemos recorrido juntos.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	1
INTRODUCCIÓN	3
I. EL SÍNDROME METABÓLICO	5
1- DEFINICIÓN DEL SÍNDROME METABÓLICO	5
2- PREVALENCIA DEL SÍNDROME METABÓLICO	7
3 – ETIOPATOGENIA DEL SÍNDROME METABÓLICO	8
4- CONDICIONES ASOCIADAS AL SÍNDROME METABÓLICO	13
4.1.- La dislipemia aterogénica	13
4.2.- La hipertensión arterial	15
4.3.- Las alteraciones del metabolismo de los carbohidratos	15
4.4.- Otras	16
5- EL SÍNDROME METABÓLICO COMO PREDICTOR DE PROBLEMAS DE SALUD	17
II. LA VITAMINA D	19
1- METABOLISMO DE LA VITAMINA D	19
2- REGULACIÓN DEL METABOLISMO DE LA VITAMINA D	20
3- ACCIONES DE LA VITAMINA D SOBRE EL METABOLISMO FOSFOCÁLCICO	21
4- MECANISMO DE ACCIÓN DE LA VITAMINA D	24
5- DETERMINACIÓN DE LAS CONCENTRACIONES DE VITAMINA D	24
6- DEFINICIÓN DE HIPOVITAMINOSIS D	26
7- PREVALENCIA DE LA HIPOVITAMINOSIS D	27
8- CONDICIONES QUE PREDISPONEN A LA HIPOVITAMINOSIS D	28
9- CONSECUENCIAS DEL DÉFICIT DE VITAMINA D Y RELACIÓN CON LA SALUD	29
9.1.- Patología osteomuscular	29
9.2.- Patología no osteomuscular	30
10- VITAMINA D, MORTALIDAD Y ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR	31
III. VITAMINA D, OBESIDAD Y SÍNDROME METABÓLICO	35
JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS DE TRABAJO	39
I. JUSTIFICACIÓN	41

II. HIPÓTESIS DE TRABAJO	43
OBJETIVOS	45
I. OBJETIVO GENERAL	47
II. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	47
MATERIAL Y MÉTODOS	49
I. ESTUDIOS INCLUIDOS	51
II. PACIENTES	52
1- PACIENTES INCLUIDOS EN EL ESTUDIO OBESIDAD-VITD	52
2- PACIENTES INCLUIDOS EN EL ESTUDIO DM2-VITD	52
3- PACIENTES INCLUIDOS EN EL ESTUDIO HFC-VITD	52
III. DISEÑO DE LOS ESTUDIOS	54
1- DISEÑO DEL ESTUDIO OBESIDAD-VITD	54
2- DISEÑO DEL ESTUDIO DM2-VITD	54
3- DISEÑO DEL ESTUDIO HFC-VITD	55
IV. METODOLOGÍA	56
1- HISTORIA CLÍNICA	56
2- RECOGIDA DE DATOS Y CREACIÓN DE LA BASE DE DATOS	56
3- MEDIDAS ANTROPOMÉTRICAS Y TENSIÓN ARTERIAL	56
4- DEFINICIÓN DE SÍNDROME METABÓLICO	57
5- DETERMINACIONES ANALÍTICAS	57
5.1.- Medición de la insulinoresistencia	58
5.2.- Determinación de la concentración de calcidiol y definición del estado de la vitamina D	58
5.3.- Determinación de los parámetros lipídicos	59
5.4.- Determinación de los marcadores de inflamación y las adipoquinas	63
6- ESTADÍSTICA	63
RESULTADOS	65
I. RESULTADOS DEL ESTUDIO OBESIDAD-VITD	67

1- COMPARACIÓN DE LOS PACIENTES CON Y SIN SÍNDROME METABÓLICO	67
2- COMPARACIÓN DE LOS PACIENTES CON HIPOVITAMINOSIS D (CALCIDIOL \leq 50 NMOL/L) Y SIN HIPOVITAMINOSIS D (CALCIDIOL $>$ 50 NMOL/L)	68
3- DISTRIBUCIÓN DEL ESTADO DE LA VITAMINA D EN FUNCIÓN DEL GRADO DE OBESIDAD Y LA PRESENCIA DE SÍNDROME METABÓLICO	68
4- FACTORES ASOCIADOS A LA HIPOVITAMINOSIS D	70
II. RESULTADOS DEL ESTUDIO DM2-VITD	75
1- RESULTADOS DEL ESTUDIO TRANSVERSAL	75
1.1- Comparación de los pacientes con hipovitaminosis D (calcidiol \leq 80 nmol/L) y sin hipovitaminosis D (calcidiol $>$ 80 nmol/L)	76
2- RESULTADOS DEL ESTUDIO LONGITUDINAL	81
III. RESULTADOS DEL ESTUDIO HFC-VITD	85
1- RESULTADOS DEL ESTUDIO TRANSVERSAL	85
1.1.-Comparación entre los pacientes con HFC y los controles	85
1.2.- Estado de la vitamina D en los pacientes con HFC	89
2- RESULTADOS DEL ESTUDIO LONGITUDINAL	91
DISCUSIÓN	93
I. RELACIÓN DE LA HIPOVITAMINOSIS D CON EL SÍNDROME METABÓLICO	97
II. RELACIÓN DE LA HIPOVITAMINOSIS D CON LOS COMPONENTES DEL SÍNDROME METABÓLICO ESTUDIADOS	101
1- RELACIÓN CON LA OBESIDAD	101
2- RELACIÓN CON LA DIABETES Y EL METABOLISMO HIDROCARBONATADO	102
2.1.-Relación con la resistencia a la insulina	102
2.2.- Relación con la diabetes	103
2.2.1.- Relación con el tiempo de evolución de la diabetes	105
2.2.2.- Relación con las complicaciones de la diabetes	105
2.2.3.- Relación con el control glucémico	106
2.2.3.1.- Efecto de la mejoría del control glucémico	107
3- RELACIÓN CON LOS MARCADORES DE INFLAMACIÓN Y LAS ADIPOQUINAS	109
4- RELACIÓN CON LOS PARÁMETROS LIPÍDICOS	112

III. FORTALEZAS Y LIMITACIONES	117
1- FORTALEZAS	117
2- LIMITACIONES	119
CONCLUSIONES	123
I. CONCLUSIÓN GENERAL	125
II. CONCLUSIONES ESPECÍFICAS	127
BIBLIOGRAFÍA	129
PUBLICACIONES Y COMUNICACIONES A CONGRESOS RELACIONADAS CON LOS TRABAJOS DE ESTA TESIS	151

ABREVIATURAS

AACE: American Association of Clinical Endocrinologists

ADA: American Diabetes Association

AGL: ácidos grasos libres

ApoAI: apolipoproteína AI

ApoAII: apolipoproteína AII

ApoB: apolipoproteína B

ATPIII: Adult Treatment Panel III

CBPA: análisis de unión competitiva a proteína

CEPT: proteína transportadora de ésteres de colesterol

cHDL: colesterol HDL

cLDL: colesterol LDL

cVLDL: colesterol VLDL

DBP: proteína transportadora de vitamina D

EGIR: European Group for the Study of Insulin Resistance

EIA: enzimoimmunoanálisis

ELISA: ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas

EVC: enfermedad vascular cerebral

EVP: enfermedad vascular periférica

HbA1c: hemoglobina glicosilada

HFC: hiperlipemia familiar combinada

HOMA: Homeostasis Model Assessment

HPLC: cromatografía líquida de alta resolución

IL-6: interleucina-6

IL-8: interleucina-8

IMC: índice de masa corporal

LC-MS: cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas

LDL-: LDL electronegativa

LDL ox: LDL oxidada

LDL glicada: LDL glicosilada

Lpa: lipoproteína a

LPL: lipoprotein lipasa

MCP1: proteína quimiotáctica de monocitos 1

NCEP: National Cholesterol Education Program

NHANES: National Health And Examination Survey

OMS: Organización Mundial de la Salud

PAI-1: inhibidor 1 del activador del plasminógeno

PCR: proteína C reactiva

PON1: paroxonasa/arilesterasa 1

PTH: paratohormona

RI: resistencia a la insulina

RANK: receptor activador para el factor nuclear κ B

RANKL: ligando del receptor activador para el factor nuclear κ B

RIA: radioinmunoanálisis

TGF β : factor de crecimiento transformante β

TNF- α : tumor necrosis factor alfa

VDR: receptor de vitamina D

25-OH-D: 25-Hidroxivitamina D o calcidiol

1,25-OH-D: 1,25-Hidroxivitamina D o calcitriol

INTRODUCCIÓN

I. EL SÍNDROME METABÓLICO

1- Definición del síndrome metabólico

El término síndrome metabólico se refiere a la presencia de una asociación compleja de factores de riesgo cardiovascular en un mismo individuo, que se supone que tienen una fisiopatología común y que se encuentran estrechamente asociados a la inactividad física, a una dieta hipercalórica y rica en grasa, a la obesidad y al envejecimiento y al futuro desarrollo de enfermedad cardiovascular y diabetes.

La primera observación de la existencia de una agrupación de distintos factores de riesgo cardiovascular fue en 1920, cuando Kylin describió la asociación de hipertensión, hiperglucemia y gota en un mismo individuo. Más adelante, Vague describió que la obesidad de distribución central se asociaba frecuentemente con las anormalidades metabólicas presentes en pacientes con enfermedad cardiovascular y diabetes ^(1,2). En 1988, Reaven ⁽³⁾ definió por primera vez el síndrome X como una asociación de factores de riesgo que presentaban la característica común de asociarse a un cierto grado de insulinoresistencia y entre los cuales se encontraban la diabetes mellitus, la hipertensión arterial y la dislipemia.

Esta constelación de factores de riesgo cardiovascular ha recibido diversas denominaciones a lo largo del tiempo; algunos ejemplos son síndrome X, síndrome de resistencia a la insulina, síndrome dismetabólico o síndrome metabólico, entre otros. Actualmente, el término más utilizado es el de síndrome metabólico y numerosas entidades u organizaciones han propuesto distintos criterios para su diagnóstico, que resumimos en la **tabla 1**.

Tabla 1: Criterios diagnósticos de Síndrome Metabólico según distintos organismos						
	OMS 1998	EGIR 1999	ATPIII 2001	AACE 2003	IDF 2005	ATPIII-MOD 2005
Resistencia a la insulina	GBA, IG, DM2 o disminución sensibilidad a la insulina+ 2 de los siguientes	Insulina en plasma > percentil 75 + 2 de los siguientes	Ninguno pero 3 de los 5 siguientes	GBA o IG + alguno de los siguientes	Ninguno	Ninguno pero 3 de los 5 siguientes
Antropometría	Índice cintura-cadera: hombres >0.9; mujeres 0.85 y/o IMC > 30 Kg/m ²	Cintura: hombres ≥94cm; mujeres ≥80cm.	Cintura: hombres ≥102cm; mujeres ≥88cm.	IMC ≥25 Kg/m ²	Cintura elevada según parámetros poblaciones	Cintura: hombres ≥102cm; mujeres ≥88cm.
Lípidos	Tg ≥150mg/dl y/o cHDL <35 mg/dL en hombres o 39 mg/dL en mujeres	Tg ≥150mg/dl y/o cHDL <35 mg/dL en hombres o mujeres	Tg ≥150mg/dl y/o cHDL <40 mg/dL en hombres o 50 mg/dL en mujeres	Tg ≥150mg/dl y/o cHDL <40 mg/dL en hombres o 50 mg/dL en mujeres	Tg ≥150mg/dl y/o cHDL <40 mg/dL en hombres o 50 mg/dL en mujeres o en tratamiento para dislipemia	Tg ≥150mg/dl y/o cHDL <40 mg/dL en hombres o 50 mg/dL en mujeres
PA	≥140/90 mmHg	≥140/90 mmHg o tratamiento	≥130/85 mmHg	≥130/85 mmHg	≥130 mmHg sistólica o ≥85 mmHg diastólica o tratamiento	≥130/85 mmHg
Glucosa	GBA, IG o DM2	GBA o IG pero no DM2	≥ 110 mg/dL (incluye DM2)	GBA o IG pero no DM2	≥100 mg/dL (incluye DM2)	≥100 mg/dL (incluye DM2)
Otros	Microalbuminuria			Otros rasgos de resistencia a la insulina**		

OMS: Organización Mundial de la Salud; EGIR: European Group for the Study of Insulin Resistance; ATPIII: Adult Treatment Panel III; AACE: American Association of Clinical Endocrinologists; IDF: International Diabetes Foundation; ATP III-MOD: ATP III-Modificado; GBA glucemia basal alterada; IG: intolerancia a la glucosa; DM2: diabetes mellitus tipo 2; IMC: índice de masa corporal; PA: presión arterial; Tg: Triglicéridos; cHDL: colesterol HDL.

** incluye historia familiar de DM2, síndrome de ovario poliquístico, estilo de vida sedentario, edad avanzada y etnias especialmente susceptibles de DM2.

Como podemos ver en la **tabla 1**, el primer intento de armonizar los criterios de Síndrome Metabólico vino por parte de la Organización Mundial de la Salud (OMS). Este grupo apoyó la presencia de insulinoresistencia como principal mecanismo patogénico subyacente y la propuso como criterio indispensable, definida por la presencia de glucemia basal alterada, intolerancia a la glucosa, diabetes mellitus o de alteraciones en el consumo de la glucosa en condiciones experimentales de hiperinsulinismo y euglucemia ⁽⁴⁾. De forma paralela, los criterios propuestos por el European Group For The Study Of Insulin Resistance (EGIR), también requerían la

presencia de insulinoresistencia como criterio indispensable, aunque esta vez, definida como unos niveles de insulina en plasma elevados ⁽⁵⁾.

En 2001, los criterios del National Cholesterol Education Program (NCEP), Adult Treatment Panel III (ATPIII) eliminaron la insulinoresistencia como criterio diagnóstico y no consideraron indispensable ningún factor de riesgo cardiovascular o condición para el diagnóstico del síndrome metabólico ⁽⁶⁾. Este cambio de enfoque fue motivado por la falta de estandarización en los métodos de medición de la insulina, y por la ausencia de evidencias que apoyasen un único elemento como factor etiopatogénico común.

Posteriormente, en 2003 apareció una nueva definición de la American Association of Clinical Endocrinologists (AACE) que, aunque no consideraba la medición de los niveles de insulinemia, exigía nuevamente la demostración de cierto grado de insulinoresistencia, definida por la presencia de glucemia basal alterada o intolerancia a la glucosa e incluyó también, como criterio diagnóstico, ciertas características clínicas sugestivas de resistencia a la insulina ⁽⁷⁾.

Finalmente, en 2005 la International Diabetes Federation (IDF) modificó de nuevo los criterios de síndrome metabólico, con el objetivo de adaptar la definición de obesidad abdominal a las distintas etnias. Así, se mantuvieron los valores de circunferencia de cintura descritos en 1998 por el National Institutes of Health ⁽⁸⁾ para población estadounidense, pero se modificaron para poblaciones de otros continentes (**tabla 2**) ^(9,10).

Por otra parte, hay que destacar que tanto los criterios de la IDF, como la modificación de los criterios de NCEP ATP III ⁽¹¹⁾, consideraron la modificación de los criterios de glucemia basal alterada de la American Diabetes Association (ADA) e incluyeron sujetos con glucemia > 100 mg/dL en lugar de la definición previa de glucemia \geq 110 mg/dL ⁽¹²⁾.

2- Prevalencia del síndrome metabólico

Distintos factores influyen en la prevalencia del síndrome metabólico. Algunos de los más importantes van a ser la localización geográfica, la etnia, la presencia de ciertas patologías e incluso, la definición usada de esta entidad ⁽¹³⁾.

A nivel mundial se estima que el síndrome metabólico afecta a un 20-25% de la población ⁽¹⁴⁾ y en Estados Unidos, según datos del National Health And Examination Survey (NHANES) realizado entre 2003 y 2006, esta prevalencia es superior y se sitúa entre el 32 y el 42 %, en función de la definición de obesidad abdominal utilizada y el sexo ⁽¹⁵⁾. Además, los datos disponibles en la población del estudio NHANES nos permiten observar que existe un aumento creciente en su prevalencia en los últimos años ⁽¹⁶⁾, probablemente debido al aumento en la prevalencia de obesidad y diabetes.

En España, si se utiliza la definición de síndrome metabólico de la OMS, la prevalencia de síndrome metabólico alcanza el 31% de la población entre 35 y 74 años con o sin enfermedad cardiovascular ⁽¹⁷⁾. Esta prevalencia, como es de esperar, va a ser diferente en función del grupo poblacional estudiado. Así, en sujetos en situación laboral activa, la prevalencia disminuye al 10,2% ⁽¹⁸⁾ y, como contraposición, la prevalencia de síndrome metabólico es del 70-90 % en sujetos con diabetes mellitus tipo 2 ⁽¹⁹⁾.

3 – Etiopatogenia del síndrome metabólico:

A pesar de la intensa investigación de los últimos años, todavía existen áreas de incertidumbre acerca de la etiopatogenia del síndrome metabólico.

En la definición inicial de Síndrome X propuesta por Reaven ⁽³⁾, la insulinoresistencia se estableció como el mecanismo patogénico común. No obstante, a pesar de que la asociación de la resistencia a la insulina con la dislipemia y la diabetes es bien conocida y documentada, la asociación con los otros componentes del síndrome metabólico como la hipertensión arterial no está tan clara ⁽²⁰⁾. Además, algunos estudios indican que hasta un tercio de los pacientes con síndrome metabólico no presentan resistencia a la insulina y por otra parte, no todos los pacientes con resistencia a la insulina cumplen los criterios de síndrome metabólico ^(21,22). Estos hallazgos ponen en duda que la resistencia a la insulina sea el mecanismo patogénico subyacente al síndrome metabólico, o al menos que sea el único mecanismo.

La obesidad podría explicar la presencia de todos los componentes del síndrome metabólico, o al menos jugar un papel central muy importante ⁽¹⁰⁾. En primer lugar, se sabe que la obesidad se asocia con la resistencia a la insulina y con la presencia de otros factores de riesgo cardiovascular ^(23,24). En segundo lugar, la obesidad se asocia con un mayor riesgo de padecer enfermedad cardiovascular y, de hecho, en 1998 la American Heart Association la incluyó en la lista de factores de riesgo modificables de padecer enfermedad coronaria ^(25,26). Por estos motivos, es muy probable que la asociación existente entre obesidad y enfermedad cardiovascular esté mediada por su asociación con las patologías que conforman el síndrome metabólico ⁽²²⁾.

La obesidad abdominal (suma de la grasa subcutánea y visceral abdominal) se ha correlacionado en diversos estudios con un mayor riesgo de sufrir enfermedad coronaria, hipertensión, enfermedad cerebrovascular y diabetes tipo 2 ⁽²⁷⁻²⁹⁾ y es la que ha mostrado una relación más fuerte con la presencia de síndrome metabólico ⁽³⁰⁾. Sabemos, pues, que la distribución de la grasa permite estimar mejor el riesgo cardiovascular que la medida global del tejido adiposo. Así, en sujetos con normopeso, la presencia de una adiposidad relativa mayor y de distribución preferentemente abdominal, equipararía el riesgo de presentar factores de riesgo cardiovascular a la de la población con sobrepeso y ayudaría a explicar la presencia de síndrome metabólico ⁽²⁶⁾. Los métodos más precisos para establecer el grado de obesidad abdominal son la tomografía y la resonancia magnética. No obstante, estas técnicas tienen un coste elevado, por lo que el perímetro de la cintura y el índice/cintura cadera son los parámetros más utilizados en la práctica clínica diaria y han demostrado que tienen una buena correlación con los hallazgos de la tomografía ⁽³¹⁾. En la **tabla 2** especificamos los valores de cintura considerados de riesgo para cada grupo étnico ⁽¹⁰⁾.



Tabla 2: Valores del perímetro de cintura considerados de riesgo, para cada etnia.

Estadounidenses	Hombres	≥ 102 cm
	Mujeres	≥ 88cm
Europeos	Hombres	≥ 94 cm
	Mujeres	≥ 80 cm
Asiáticos del sur, chinos y japoneses	Hombres	≥ 90 cm
	Mujeres	≥ 80 cm
Americanos del centro y sur	Utilizar datos de población asiática hasta mejor información disponible	
Africanos subsaharianos	Utilizar datos de población europea hasta mejor información disponible	
Árabes	Utilizar datos de población europea hasta mejor información disponible	

Los mecanismos mediante los cuales la obesidad, especialmente la abdominal, se asocia con los diferentes factores de riesgo cardiovascular y con la propia enfermedad cardiovascular y la aterosclerosis son en parte desconocidos, aunque se han descrito algunos mecanismos probables. Así, como vemos esquematizado en la **figura 1**, la obesidad, favorecida por una predisposición genética y un ambiente desfavorable, que incluye el sedentarismo y una dieta hipercalórica y con alto contenido en grasas, conduciría a diversas alteraciones intermedias que, a su vez, llevarían al desarrollo de los diferentes componentes del síndrome metabólico. Éstos, finalmente, contribuirían al desarrollo de las manifestaciones clínicas propias de la aterosclerosis.

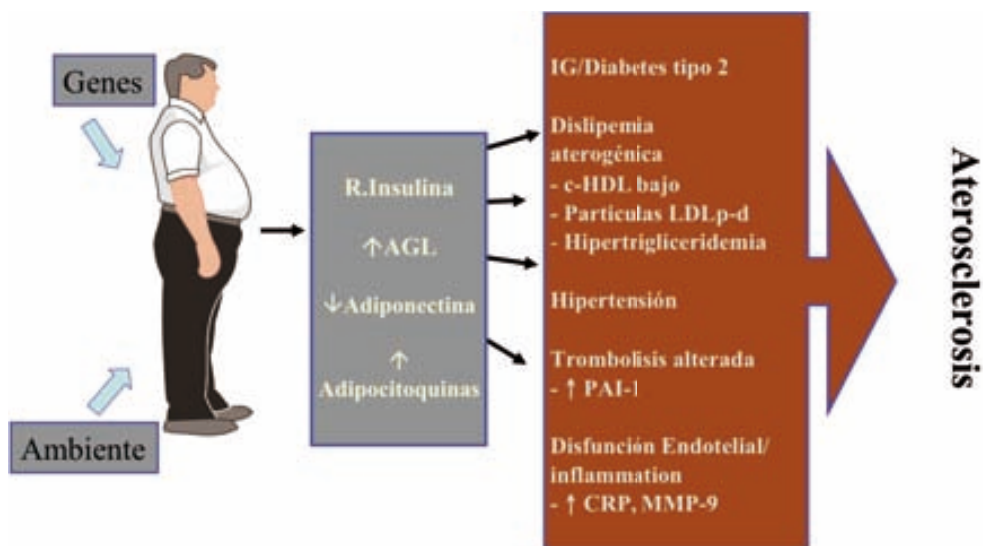


Figura 1: Consecuencias clínicas del síndrome metabólico y posibles factores patogénicos implicados. R.Insulina: resistencia a la insulina; AGL: ácidos grasos libres; IG: intolerancia a la glucosa; LDL p-d: LDL pequeñas y densas; PAI-1: inhibidor 1 del activador del plasminógeno; PCR: proteína C reactiva; MMP-9: metaloproteína-9.

En primer lugar, la presencia y las manifestaciones de la obesidad están moduladas por diversas condiciones ambientales y genéticas. Por ejemplo, la edad se acompaña de un aumento progresivo de los depósitos de grasa intraabdominal, independientemente de los cambios en la grasa corporal total ⁽³²⁾. Además, las hormonas sexuales modulan la distribución de la grasa, de manera que los hombres y las mujeres en menopausia presentan una mayor tendencia a la distribución abdominal de la grasa ^(33,34). Otros factores como la inactividad física o el aumento en los niveles plasmáticos de cortisol también pueden promover el depósito abdominal de la grasa ⁽³⁵⁾. Los factores genéticos, aunque en su mayor parte desconocidos, son también muy importantes para determinar la expresión clínica de la obesidad y se sabe que tras ajustar por edad, sexo y masa grasa total, el factor hereditario puede explicar hasta un 50% de la variación en la grasa intraabdominal ⁽³⁶⁾. Todos estos factores, entre muchos otros determinarían la aparición y la expresión clínica de la obesidad.

La relación de la obesidad, especialmente la de distribución abdominal, con los factores de riesgo cardiovascular que forman el síndrome metabólico es compleja y reúne mecanismos relacionados con la resistencia a la insulina y con la secreción de las llamadas adipoquinas ^(10,22). Es ampliamente conocido que el tejido adiposo no es únicamente un órgano almacén de energía, sino que funciona también como órgano endocrino, secretando una cantidad muy diversa de péptidos y proteínas llamadas adipoquinas que tienen funciones diversas y entre las cuales encontramos las citoquinas proinflamatorias o adipocitoquinas. Además, se sabe que el tejido graso no sólo está formado por adipocitos, sino que puede verse infiltrado por macrófagos o fibroblastos que contribuirán en gran parte a la secreción de estas adipoquinas. En la **figura 2** se muestran algunas de las diversas sustancias secretadas por el tejido adiposo ⁽³⁷⁾.

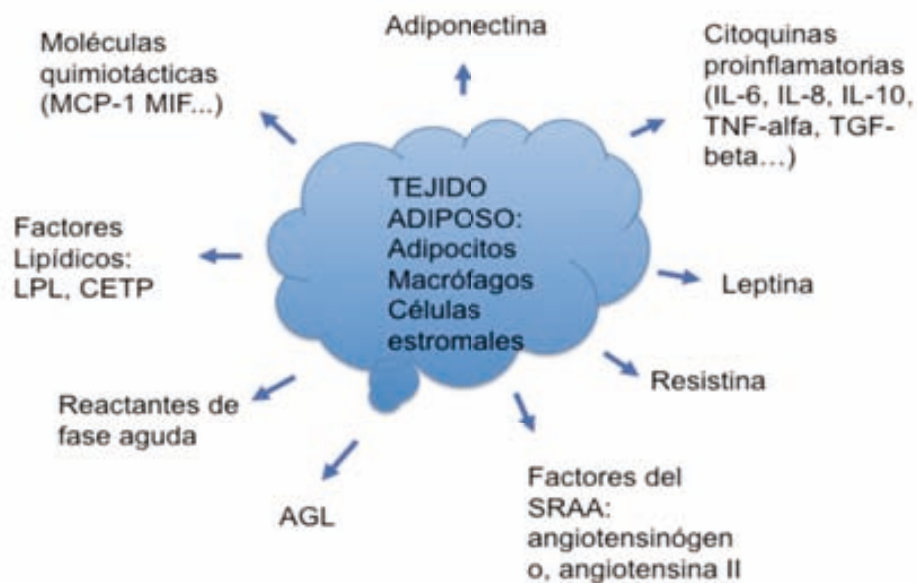


Figura 2: El tejido adiposo como órgano endocrino, secretor de sustancias diversas metabólicamente activas (MIF: migration inhibitory factor; MCP-1: proteína quimiotáctica de monocitos 1; LPL: lipoprotein lipasa; CEPT: proteína transportadora de ésteres de colesterol; AGL: ácidos grasos libres; SRAA: sistema renina-angiotensina-aldosterona; IL-6: interleucina-6; IL-8: interleucina-8; IL-10: interleucina-10; TNF-alfa: tumor necrosis factor alfa; TGF-beta: factor de crecimiento transformante beta).

Las adipoquinas que últimamente han recibido mayor atención en la literatura en cuanto a su relación con las complicaciones de la obesidad son la adiponectina, la leptina y las citoquinas proinflamatorias como la interleucina-6 (IL-6), la interleucina-8 (IL-8) o el Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α), entre otras. En general, todas estas moléculas suelen aumentar con el IMC, y se secretan en mayor medida por el tejido graso visceral si se compara con el subcutáneo. La excepción es adiponectina que se secreta en mayor parte por el tejido adiposo subcutáneo y suele disminuir con el aumento de la adiposidad ⁽³⁸⁾. En el caso de la leptina, se produce un fenómeno de resistencia, pues sus niveles aumentan con un mayor grado de obesidad, pero parece existir una actividad reducida ⁽³⁹⁾. Las funciones de las distintas adipoquinas son muy diversas, estando implicadas la mayoría de ellas en la génesis de insulinoresistencia, pero también en las funciones endoteliales o la modulación de la fibrinólisis o la hipertensión arterial, entre otras ^(1,31). Además, la

secreción de una adipoquina puede estimular la secreción de otras moléculas inflamatorias, como es el caso de IL-6 y TNF- α que tras su liberación por el tejido adiposo, estimulan la síntesis hepática de proteína C reactiva (PCR) ^(40,41).

Por otra parte, el tejido adiposo libera ácidos grasos libres (AGL) al torrente sanguíneo ⁽²²⁾, siendo la grasa visceral la que libera mayores cantidades de AGL ⁽⁴²⁾. En la obesidad, esta liberación de ácidos grasos se produce incluso en presencia de niveles elevados de insulina, reflejando una situación de resistencia a la insulina. Los AGL están implicados en la génesis de una mayor insulinoresistencia y de otros componentes del síndrome metabólico. Por ejemplo, a nivel hepático, el aflujo de ácidos grasos favorece la génesis de la llamada dislipemia aterogénica incrementando la síntesis de nuevas partículas VLDL ⁽²²⁾, mientras que a nivel muscular, el depósito de grasa inhibe la captación muscular de glucosa mediante una inhibición e internalización del receptor GLUT-4 de la membrana celular ⁽⁴³⁾.

4- Condiciones asociadas al síndrome metabólico

Además de las alteraciones antes descritas como la obesidad, la insulinoresistencia, la secreción de adipoquinas y el flujo aumentado de ácidos grasos libres, que nos ayudan a explicar los mecanismos etiopatogénicos del síndrome metabólico, existen múltiples alteraciones que pueden o no estar presentes en su definición.

4.1.- La dislipemia aterogénica

La dislipemia característica del síndrome metabólico es la llamada dislipemia aterogénica, caracterizada por un aumento de triglicéridos y un descenso en colesterol HDL (cHDL), con partículas LDL pequeñas y densas y un aumento en la concentración de Apolipoproteína B (ApoB) ⁽⁴⁴⁻⁴⁵⁾.

En la génesis de esta dislipemia, el flujo aumentado de ácidos grasos al hígado estimularía la secreción de partículas VLDL ricas en ApoB ⁽⁴⁶⁾. Posteriormente, el intercambio de triglicéridos

desde VLDL hacia LDL, gracias a la proteína transportadora de ésteres de colesterol (CEPT), conllevaría una pérdida de ésteres de colesterol y un enriquecimiento en triglicéridos. Estas partículas LDL ricas en triglicéridos, son un buen sustrato para la lipasa hepática, que las transforma en partículas LDL pequeñas y densas ⁽⁴⁷⁾, asociadas a un riesgo aumentado de enfermedad coronaria ⁽⁴⁸⁾. Además, la enzima CEPT también intercambia triglicéridos entre VLDL y HDL, de manera que aumenta el contenido en triglicéridos de HDL. Igual que sucede con las partículas LDL, las HDL ricas en triglicéridos, gracias a la acción de la lipasa hepática, se transforman en partículas HDL pequeñas y densas que pueden ser disfuncionales ⁽⁴⁷⁾. Este complejo metabolismo de las partículas transportadoras de colesterol se esquematiza en la **figura 3**.

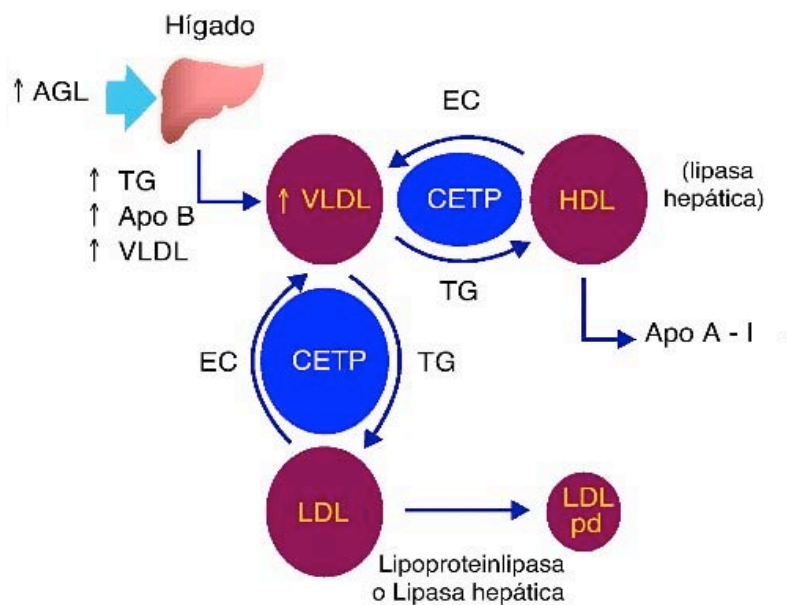


Figura 3: mecanismos que contribuyen a la génesis de la dislipemia aterogénica. (AGL: ácidos grasos libres; CEPT: proteína transportadora de ésteres de colesterol; LDLpd: LDL pequeñas y densas; TG: triglicéridos; EC: ésteres de colesterol; ApoB: apolipoproteína B; ApoA-I: Apolipoproteína A-I).

Además de lo mencionado, la dislipemia aterogénica suele acompañarse de alteraciones estructurales y funcionales de las partículas HDL y LDL. Las partículas HDL presentan una actividad antioxidante reducida, que se relaciona con una alteración en sus características físico-

químicas, especialmente con el enriquecimiento en triglicéridos y la depleción en ésteres de colesterol ⁽⁴⁹⁾. Por otra parte, las partículas LDL, especialmente las pequeñas y densas, presentan modificaciones como la oxidación o la glicosilación no enzimática, que les confieren un mayor poder aterogénico ⁽⁵⁰⁾.

Otras alteraciones en las lipoproteínas que se pueden encontrar en el contexto del síndrome metabólico son una disminución en la apolipoproteína AI y un aumento en las apolipoproteínas B y CIII, entre otros ⁽²⁾.

El aumento en la ApoB, especialmente el formato hipertrigliceridemia-hiperapoB, también es característico de la hiperlipemia familiar combinada, entidad genética frecuentemente asociada al síndrome metabólico, por lo que en ocasiones resulta difícil diferenciar entre dislipemia aterogénica e hiperlipemia familiar combinada. Esta última debe sospecharse cuando existen unos niveles muy elevados de ApoB, con historia familiar de dislipemia que muestre un patrón de herencia autosómica dominante ⁽⁴⁷⁾.

4.2.- La hipertensión arterial

La hipertensión arterial forma parte de los criterios diagnósticos del síndrome metabólico, sea cual sea la clasificación usada. Esto es debido al hallazgo de que las poblaciones con sobrepeso presentan mayor riesgo de desarrollar cifras de tensión arterial elevadas ⁽⁵¹⁾ y que en pacientes con diabetes tipo 2 se han demostrado beneficios clínicos con la reducción de la tensión arterial por debajo de 130/85 mmHg ⁽⁵²⁾. No obstante, a diferencia de la dislipemia aterogénica o la diabetes, la hipertensión no se correlaciona de forma tan clara con la insulinoresistencia, tal y como se mostró en el análisis prospectivo del Sant Antonio Heart Study ⁽²⁰⁾.

4.3.- Las alteraciones del metabolismo de los carbohidratos

Las alteraciones del metabolismo de los carbohidratos en el contexto del síndrome metabólico incluyen la intolerancia a los hidratos de carbono, la glucemia basal alterada o la propia diabetes,

según la definición usada. Estas alteraciones van progresando con el paso del tiempo. Así, inicialmente, existe un defecto en la acción de la insulina que resulta en una incapacidad de inhibir la producción hepática de glucosa o de facilitar la captación de glucosa por parte de los tejidos periféricos, fenómeno conocido con el nombre de resistencia a la acción de la insulina. Concomitantemente, a nivel de la célula beta pancreática, existe un fenómeno de compensación de esta resistencia a la acción de la insulina, secretando cantidades mayores de insulina. No obstante, diversos factores como la lipotoxicidad secundaria al incremento de los AGL, o el agotamiento de la célula beta pancreática a lo largo del tiempo, pueden contribuir a la reducción de la secreción de insulina, deteriorando el control glucémico ⁽²⁾.

4.4.- Otras:

Además de las alteraciones clásicas presentes en la mayoría de criterios diagnósticos del síndrome metabólico, existen toda una serie de alteraciones, que suelen asociarse con frecuencia a esta patología. Estas alteraciones incluyen el estado inflamatorio y la secreción de adipoquinas que ya hemos comentado, los estilos de vida desfavorables, el estado protrombótico, e incluso ciertas alteraciones de tipo genético, entre otras (**tabla 3**, adaptada de Bianchi et al. ⁽⁵³⁾ y de Eckel et al. ⁽²⁾).

Tabla 3: Alteraciones asociadas al síndrome metabólico y no presentes en su definición

Estilo de vida	<ul style="list-style-type: none"> - Sedentarismo - Tabaquismo - Dieta rica en azúcares y grasas saturadas
Estado protrombótico	<ul style="list-style-type: none"> - Aumento del fibrinógeno - Aumento del PAI1 - Hiperviscosidad sanguínea
Inflamación de bajo grado	<ul style="list-style-type: none"> - Aumento en el recuento de leucocitos - Aumento de IL-6 - Aumento de TNF- α - Aumento de resistina - Aumento de PCR - Aumento de leptina - Disminución de adiponectina
Estrés oxidativo	<ul style="list-style-type: none"> - Oxidación de partículas LDL - Aumento de LDL electronegativa
Alteraciones genéticas:	<ul style="list-style-type: none"> - Polimorfismos de un único nucleótido (SNP)
Otras alteraciones	<ul style="list-style-type: none"> - Microalbuminuria - Hiperuricemia - Hiperhomocisteinemia
Asociación con otras patologías	<ul style="list-style-type: none"> - Hiperlipemia familiar combinada - Esteatosis hepática - Síndrome de ovarios poliquísticos - SAHOS
<p>PAI1: inhibidor 1 del activador del plasminógeno; IL-6: interleucina-6; TNF- α: Tumor necrosis factor alfa; PCR: proteína C reactiva; SAHOS: síndrome de apnea-hipopnea</p>	

5- El síndrome metabólico como predictor de problemas de salud

El síndrome metabólico se define como una entidad que conlleva un aumento en el riesgo futuro de desarrollar diabetes y enfermedad cardiovascular.

La asociación del síndrome metabólico con un mayor riesgo de desarrollar diabetes es claro y consistente ^(54,55), y ello se justifica por ser las alteraciones de los hidratos de carbono uno de los criterios que definen el síndrome.

También es clara la asociación entre la presencia de síndrome metabólico y el mayor riesgo de enfermedad cardiovascular y mortalidad total y cardiovascular ⁽⁵⁶⁻⁵⁸⁾. Sin embargo, existe controversia acerca de si el riesgo que confiere la presencia de síndrome metabólico supera al riesgo que presenta el mismo sujeto si se tienen en cuenta los componentes del síndrome metabólico por separado. Por una parte, en algunos estudios, tras ajustar por el riesgo calculado

de acorde a las tablas de Framingham, los pacientes con síndrome metabólico siguen teniendo un mayor riesgo a 10 años de sufrir eventos coronarios que los pacientes sin síndrome metabólico, lo que sugiere un contribución independiente del síndrome metabólico sobre la suma de los factores de riesgo cardiovascular por separado ⁽⁵⁹⁾. No obstante, otros estudios consideran que el síndrome metabólico no confiere ningún beneficio adicional a las tablas tradicionales de evaluación del riesgo cardiovascular ⁽⁵⁵⁾.

II. LA VITAMINA D

La Vitamina D o calciferol es una sustancia lipídica perteneciente al grupo de los esteroides que actúa a su vez como vitamina y como hormona. Sus orígenes se remontan a más de 750 millones de años atrás cuando estaba ya presente en el fitoplancton y zooplancton que poblaba los océanos, pero no fue hasta principios del siglo XX cuando se la relacionó con la etiopatogenia del raquitismo y pasó a conocerse como una de las principales sustancias encargadas de mantener la homeostasis del calcio y fosfato sanguíneos ⁽⁶⁰⁾. Se dice que la función más primitiva de la vitamina D fue la de una citoquina que actuaba de forma paracrina en los macrófagos para modular la inmunidad y ayudar en la protección contra los microorganismos extraños. Sin embargo, la función de esta vitamina fue evolucionando hasta el momento actual, en que actúa también como hormona, principalmente regulando a distancia el metabolismo del hueso ⁽⁶¹⁾. En los últimos años, se la ha asociado con otras múltiples funciones relacionadas con el metabolismo, la inflamación, el cáncer o la patología cardiovascular, aunque los mecanismos que actúan en estas relaciones están por definir con claridad.

1- Metabolismo de la Vitamina D

Las principales fuentes de vitamina D provienen de la síntesis cutánea de vitamina D3 (colecalciferol) y de la ingesta oral de vitaminas D3 y D2 (ergosterol). De éstas, la más importante es la síntesis cutánea de la vitamina D3 gracias a la conversión del 7-dehidrocolesterol mediante el efecto de la radiación solar. Para ello es necesario que los fotones de radiación ultravioleta tipo B entre 290 y 315 nm penetren la piel para provocar la fotólisis del 7-dehidrocolesterol contenido en ella ⁽⁶²⁾. El efecto de la ingesta oral sobre las concentraciones de vitamina D suele ser mucho menor, dado que el contenido en los alimentos es reducido y limitado a pocas sustancias. Así, la vitamina D2, se obtiene principalmente de fuentes vegetales, como las setas, y la vitamina D3 suele hallarse en los pescados grasos o los productos lácteos fortificados ^(63,64).

Estas prohormonas (vitamina D₂, y vitamina D₃) todavía inactivas, son transportadas al hígado donde sufren una primera hidroxilación en posición C-25, obteniendo el calcidiol o 25-Hidroxivitamina D (25-OH-D). Posteriormente, en el riñón, la enzima 1 alfa hidroxilasa realiza una segunda hidroxilación en posición C-1, obteniéndose el calcitriol o 1,25-Hidroxivitamina D (1,25-OH-D), compuesto responsable de la mayoría de funciones de la vitamina D en el cuerpo ⁽⁶⁵⁾. La **figura 4** muestra los principales pasos necesarios para la síntesis de vitamina D activa.

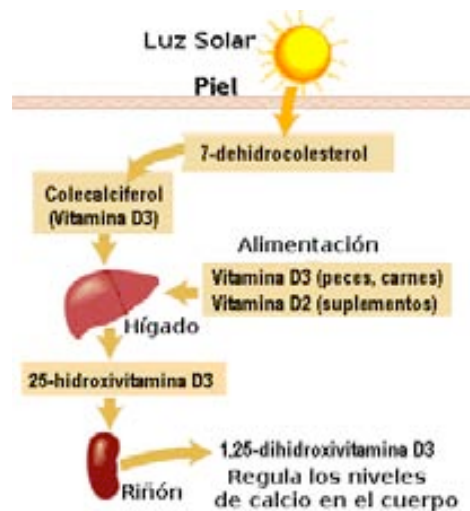


Figura 4: Metabolismo de la vitamina D, desde la síntesis cutánea o la ingesta oral a la formación de la 1,25-hidroxivitamina D en el riñón.

2- Regulación del metabolismo de la vitamina D

Varios factores intervienen en la regulación de las concentraciones de la vitamina D en los distintos puntos clave de su metabolismo.

En primer lugar, los principales determinantes del aporte de vitamina D son el contenido de esta vitamina ingerido en los alimentos y la síntesis cutánea ^(62,66). La síntesis cutánea de vitamina D está influenciada por varios factores como el tiempo de exposición a la luz ultravioleta, la latitud, el uso de cremas de protección solar o el contenido de melanina de la piel ⁽⁶⁰⁾. Así, la reducción en el tiempo de exposición solar debido a la tendencia a reducir las actividades al aire libre, el uso creciente de filtros solares para evitar lesiones cutáneas, la vida en regiones de latitud elevada o

pieles muy pigmentadas, son algunos de los principales factores que condicionan un aumento en el riesgo de déficit de vitamina D. Por otra parte, una exposición solar excesiva conduciría a fotoproductos de vitamina inactiva, para evitar un aumento excesivo en las concentraciones de esta hormona ⁽⁶⁷⁾.

En segundo lugar, a nivel hepático, la 1,25-OH-D inhibe la síntesis endógena de vitamina D, lo que evitaría intoxicaciones por esta hormona, especialmente en el caso de la administración exógena de calcitriol ⁽⁶⁸⁾.

En tercer lugar, los principales reguladores de la síntesis renal de calcitriol son la paratohormona (PTH), que estimula la síntesis de calcitriol y el propio calcitriol que la inhibe. Los iones calcio y fosfato juegan un papel importante en el efecto de PTH sobre el riñón, de manera que aumentos en el calcio sérico inhiben la secreción de PTH, y secundariamente la hidroxilación renal de la vitamina D. Por otra parte, la concentración tubular renal de fosfato es importante en la modulación del efecto de PTH sobre la hidroxilación renal de la vitamina D y, además, las concentraciones de fosfato también podrían actuar directamente sobre el riñón para asegurar una síntesis adecuada de calcitriol en condiciones de aporte disminuido de fosfatos ^(65,68,69).

Finalmente, tras la hidroxilación hepática de la la vitamina D, si las concentraciones de 1,25-OH-D son ya óptimas, el metabolismo de esta vitamina puede derivarse hacia la 24,25-hidroxilación renal, formando de esta manera un metabolito inactivo, la 24,25-Hidroxivitamina D ⁽⁶⁸⁾.

3- Acciones de la vitamina D sobre el metabolismo fosfocálcico

Como hemos comentado, la vitamina D es uno de los principales compuestos encargados de mantener la homeostasis del calcio y fosfato séricos. Esto se lleva a cabo a través de acciones a nivel del intestino, del hueso y del riñón (**Figura 5**, adaptada de Holick. ⁽⁶⁷⁾).

En el intestino, la vitamina D favorece la absorción de calcio y fosfato, de manera que, sin vitamina D, sólo un 10-15% del calcio y un 60% de fosfato de la dieta serían absorbidos, mientras que la interacción de la 1,25-OH-D con su receptor a nivel intestinal puede aumentar estos porcentajes hasta un 40 y un 80%, respectivamente ⁽⁶⁷⁾.

La acción de la vitamina D en el hueso es compleja. Al parecer 1,25-OH-D es reconocida por su receptor en los osteoblastos donde estimula la producción del ligando del receptor activador para el factor nuclear κ B (RANKL). A su vez, RANKL se une a su receptor en preosteoclastos (RANK), lo que induce su diferenciación a osteoclastos, que dirigen la resorción ósea, con la consiguiente liberación de calcio y fósforo al torrente sanguíneo. Dado que unos niveles adecuados de calcio y fosfato en sangre promueven la mineralización del esqueleto, el resultado final de unas concentraciones de vitamina D correctas es positivo para la mineralización ósea ^(65,67).

Finalmente, a nivel del riñón, los efectos de la 1,25-OH-D incluyen la autorregulación de su propia producción, mediante el control de la enzima 1 alfa hidroxilasa, la estimulación de la formación del metabolito inactivo 24,25-OH-D y también la regulación de la excreción renal de calcio y fósforo, en gran parte a través de la modulación de PTH ⁽⁶⁷⁾.

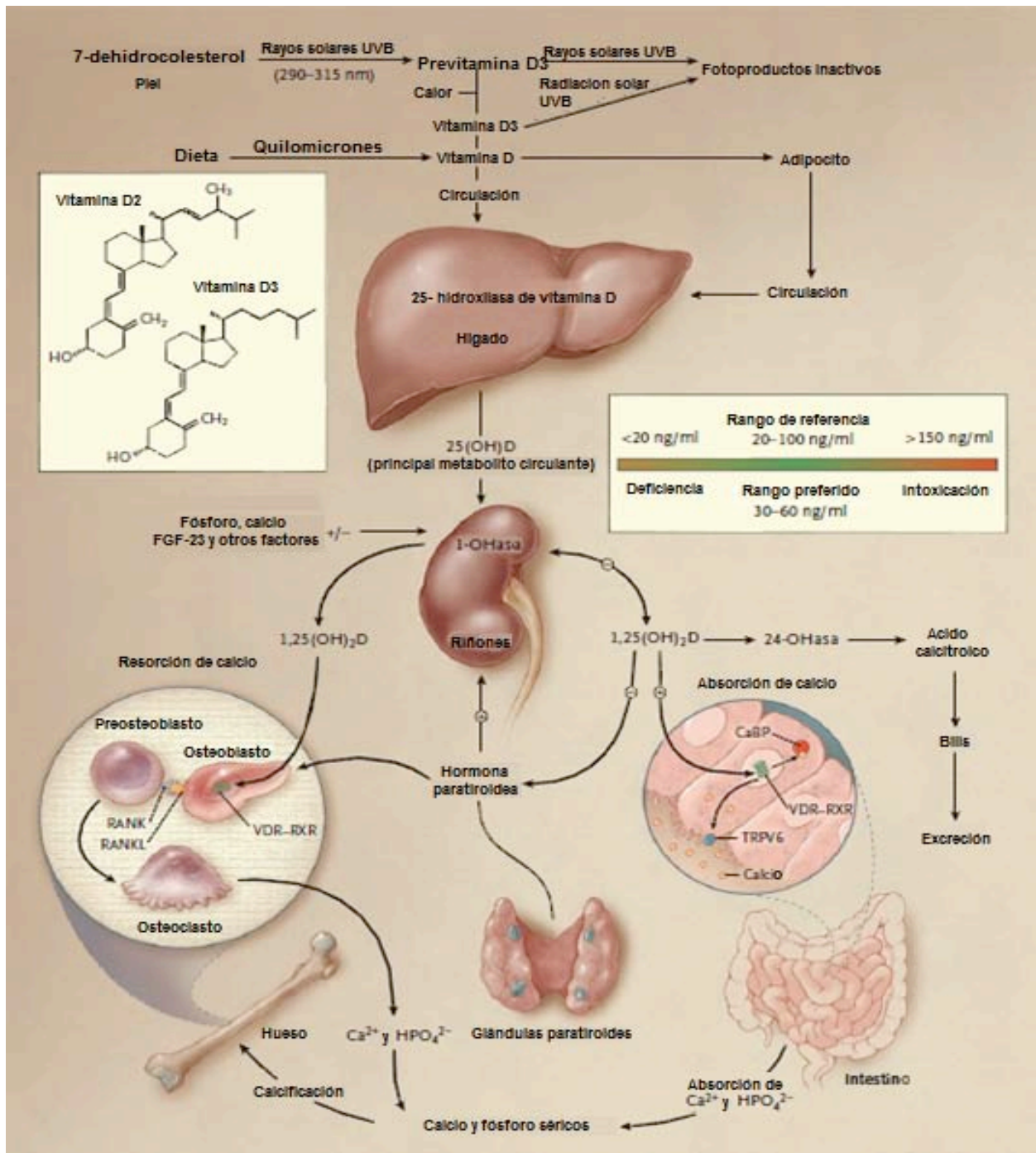


Figura 5: Síntesis y metabolismo de la vitamina D y mecanismos de acción en la regulación del metabolismo fosfocálcico. 25(OH)D: 25- hidroxivitamina D; FGF-23: fibroblast growth factor 23; RANK: receptor activador para el factor nuclear κ B; RANKL: ligando del receptor activador para el factor nuclear κ B; 1,25(OH)₂D: 1,25-hidroxivitamina D; 1-OHasa: 1 alfa hidroxilasa; VDR: receptor de vitamina D, RXR: receptor de retinoides X; 24-OHasa: 24-hidroxilasa; Ca²⁺: calcio; HPO₄²⁻: fosfato.

4- Mecanismo de acción de la vitamina D

La albúmina y la proteína transportadora de vitamina D (DBP) son las principales transportadoras de vitamina D en el plasma. La afinidad de la DBP a la vitamina D es superior a la de la albúmina y, entre los metabolitos de la vitamina D, el calcidiol es el que se une con mayor afinidad a DBP. Los niveles de DBP son iguales en ambos sexos pero pueden variar en situaciones como el embarazo, la toma de estrógenos o en enfermedades como la cirrosis o el síndrome nefrótico (70,71).

La mayoría de los efectos de 1,25-OH-D tienen lugar gracias a la unión con su receptor, el VDR. Este receptor es miembro de una larga familia de moléculas que incluyen, por ejemplo, los receptores de las hormonas esteroideas o tiroideas. Su localización es intracelular y su acción principal es la regulación de genes que tengan secuencias del DNA que reconozcan específicamente al VDR. Así, el VDR actúa en combinación con otros factores de transcripción, como el receptor de retinoides X, para estimular o inhibir la expresión genómica (72). El hallazgo de la expresión de VDR en una variedad muy amplia de tejidos y más allá de los órganos clásicamente relacionados con la vitamina D (intestino, hueso y riñón), así como el hallazgo de la enzima 1 alfa hidroxilasa en tejidos como la próstata, el colon, la glándula mamaria o los macrófagos nos ayudan a explicar la influencia e importancia de la vitamina D más allá del hueso, tal y como veremos más adelante (72,73).

Por otra parte, el descubrimiento de acciones de la vitamina D que ocurren de manera inmediata, hace pensar en la existencia de un receptor de vitamina D situado en la membrana celular y no tan bien caracterizado como el VDR, pero que actúe sin necesidad de activar la maquinaria genética (72).

5- Determinación de las concentraciones de vitamina D

El calcidiol es el metabolito de la vitamina D cuya medición se recomienda para determinar el estado de la reserva de esta vitamina en el individuo. Su larga semivida en el plasma (12 – 14

días), en comparación con la de pocos minutos del calcitriol, nos permite una estimación de los depósitos de vitamina D generados, gracias a la exposición solar y a su ingesta, durante periodos largos de tiempo ⁽⁷⁴⁾.

La determinación de la concentración en el suero del calcidiol se inició hace más de 4 décadas con el método de análisis de unión competitiva a proteína (CBPA), desarrollándose posteriormente otras técnicas de cuantificación como el radioinmunoanálisis (RIA), el enzimoimmunoanálisis (EIA), la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y, finalmente, la cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS).

CBPA y RIA forman parte de los llamados análisis de la unión competitiva a proteína y cuya diferencia fundamental estriba en el uso de una proteína de unión específica o de anticuerpos específicos, respectivamente. Por otra parte, HPLC y LC-MS forman parte de los llamados métodos de cuantificación directa de la vitamina D ⁽⁷⁵⁾.

El CBPA para la determinación de 25-OH-D se introdujo en 1971 y objetivó unos rangos de normalidad de 43-86 nmol/L, muy similares a los actuales. Esta técnica utiliza la DBP como ligando y 25-OH-D₃ marcada con isótopo radioactivo (³H o ¹³¹I) como trazador. El principal factor que dificulta la realización de esta técnica es que por la naturaleza hidrofóbica de la vitamina D, tanto el RIA como la CBPA están sujetos al llamado “efecto matriz” que puede interferir con los resultados. Por otra parte, una posible ventaja es que no diferencia entre 25-OH-D₂ y 25-OH-D₃, de manera que nos informa del pool total de vitamina D del individuo ^(76,77).

En 1977 se describió el primer ensayo de 25-OH-D por HPLC con detección UV, lo que permitió diferenciar la 25-OH-D₂ de la 25-OH-D₃ ⁽⁷⁸⁾. No obstante, la necesidad de purificación de la vitamina D mediante cromatografía como paso previo a su análisis, hacía que esta técnica fuera difícil de realizar en el laboratorio clínico ⁽⁷⁹⁾.

En 1985 se describió el primer RIA, un método de unión competitiva que no requería purificación previa ⁽⁸⁰⁾. Este RIA, dada su simplicidad y buena correlación con los resultados de la HPLC, se aprobó para su uso clínico (Diasorin, Stillwater MN, USA) y está disponible comercialmente, junto con otro RIA (IDS, Boldon, UK) muy similar. El primero de estos dos RIAs es coespecífico para las dos formas de vitamina D (D₂ y D₃), mientras que el segundo sólo reconoce el 75% de la D₂, a

pesar de lo cual la correlación entre ambos es muy buena. Las dos técnicas miden también otros metabolitos de la vitamina D (24,25-OH-D o 25,26-OH-D) que por representar solo un 6% del total, se considera poco significativo ⁽⁷⁹⁾.

Más recientemente han aparecido también técnicas de EIA ⁽⁸¹⁾ e inmunoanálisis quimioluminiscentes totalmente automatizados, también disponibles comercialmente. Uno de los principales problemas de los inmunoanálisis es que están sujetos a cambios con el transcurso del tiempo, debido a modificaciones en la estandarización o en los componentes reactivos (incluso por cambios en los anticuerpos) ⁽⁸²⁾. Estos cambios debidos a reformulaciones de sus componentes pueden dificultar la interpretación y comparación de resultados en los estudios sobre vitamina D, como ya ha sido demostrado con los datos de los distintos análisis del estudio NHANES ⁽⁸³⁾.

Finalmente, el uso de LC-MS ha ganado terreno en los últimos años, siendo, junto con los inmunoanálisis automatizados quimio y electroquimioluminiscentes y los métodos de DiaSorin e IDS, una de las técnicas más utilizadas en el laboratorio clínico. Su principal diferencia con las técnicas de RIA es que detecta por separado 25-OH-D3 y 25-OH-D2, pero se trata de una técnica muy precisa de determinación de la vitamina D. Su principal inconveniente es que es poco útil en el laboratorio clínico, cuando se trata de procesar un gran número de muestras ^(82, 84). Actualmente, dada su precisión, se han propuesto varias técnicas basadas en LC-MS como candidatas a ser el método de referencia para la medición de calcidiol en el suero, pero por el momento no existe una estandarización en cuanto a la determinación de las concentraciones de la vitamina D.

6- Definición de hipovitaminosis D

La definición de los niveles óptimos de vitamina D ha sido fruto de mucha discusión en los últimos años. Inicialmente, se fijaron como límites de la normalidad los valores extremos poblacionales. No obstante, debido a la influencia de la latitud y el tipo de piel en la síntesis de la vitamina D, esta definición quedó obsoleta. Posteriormente, se intentó establecer el límite de normalidad de la

vitamina D en función de sus efectos sobre la morfología del hueso y sobre la secreción de PTH. Así, Lips ⁽⁸⁵⁾ estableció la definición de insuficiencia de vitamina D cuando los niveles de calcidiol se situaban por debajo de los 50 nmol/L (20ng/mL) y déficit cuando estos niveles eran inferiores a 25 nmol/L (10 ng/mL), en función de los cambios óseos observados y del nivel de vitamina D a partir del cual la suplementación conducía a descensos significativos de PTH. No obstante, los datos más recientes acerca de los niveles óptimos de vitamina D, no sólo en relación a los cambios en PTH, sino también en relación a la capacidad de absorción intestinal de calcio y en relación al riesgo de caídas y de fracturas, recomiendan hablar de déficit de vitamina D cuando los niveles de calcidiol son inferiores a 50 nmol/L e insuficiencia de vitamina D cuando los niveles están entre 50 y algún punto entre 70-80 nmol/L, de manera que existe una tendencia a definir la hipovitaminosis D se define cuando los niveles son < 70-80 nmol/L ^(64,86-88). A pesar de que numerosos estudios relacionan el déficit de vitamina D con un aumento en el riesgo de cáncer o mortalidad (89), actualmente los datos que hacen referencia a niveles de vitamina D óptimos para finalidades distintas al hueso, como sería el ámbito cardiovascular, todavía no tienen suficiente solidez como para establecer recomendaciones específicas ⁽⁹⁰⁾.

7- Prevalencia de la hipovitaminosis D

La prevalencia del déficit de vitamina D va a depender, como es lógico, de la definición de déficit que se utilice. A pesar de que las técnicas de determinación de la vitamina D utilizadas a lo largo del tiempo en los estudios de NHANES no son 100% comparables ^(83,91), los datos disponibles en población americana parecen mostrar un aumento en la prevalencia del déficit de vitamina D en los últimos años ⁽⁹²⁾, observándose alrededor del 70% de la población con niveles de vitamina D inferiores a 80 nmol/L en los años 2000-2004. En Europa, los datos son semejantes y las prevalencias se sitúan entre el 27 y el 100%, dependiendo de factores como el rango de edad estudiado o la definición de déficit utilizada ⁽⁹³⁾. En España, un reciente estudio poblacional postula que un tercio de la población presenta déficit de vitamina D si se toma como referencia el punto de corte de 50 nmol/L ⁽⁹⁴⁾. Las causas de este aumento en la prevalencia de déficit de vitamina D son

varias, siendo las más relevantes la disminución en la exposición solar, el uso creciente de filtros solares y el aumento en la prevalencia de obesidad.

8- Condiciones que predisponen a la hipovitaminosis D

Existen múltiples procesos asociados al déficit de vitamina D (**Tabla 4** adaptada de Holick ⁽⁶⁷⁾).

Tabla 4: Causas de déficit de vitamina D
Síntesis cutánea reducida <ul style="list-style-type: none"> • Filtros solares • Elevada pigmentación cutánea • Edad avanzada • Invierno, latitud elevada • Injertos cutáneos, quemados
Disminución de la disponibilidad <ul style="list-style-type: none"> • Malabsorción • Obesidad
Aumento del catabolismo <ul style="list-style-type: none"> • Anticonvulsivantes • Antituberculosos • Antiretrovirales
Lactancia (pobre contenido de vitamina D en la leche materna)
Disminución de la síntesis de 25-hidroxivitamina D <ul style="list-style-type: none"> • Insuficiencia hepática
Pérdidas urinarias de 25-hidroxivitamina D <ul style="list-style-type: none"> • Síndrome nefrótico
Disminución de la síntesis de 1,25-hidroxivitamina D <ul style="list-style-type: none"> • Enfermedad renal crónica (estadio ≥ 3) • Hiperfosfatemia
Trastornos hereditarios <ul style="list-style-type: none"> • Raquitismo dependiente de vitamina D tipo 1 y 2 (mutaciones de la 1 alfa hidroxilasa renal y del receptor de vitamina D) • Raquitismo hipofosfatémico autosómico dominante • Raquitismo hipofosfatémico ligado al cromosoma X
Trastornos adquiridos <ul style="list-style-type: none"> • Osteomalacia tumoral (inducida por la secreción de FGF23) • Hiperparatiroidismo primario (aumento del catabolismo de 25-hidroxivitamina) • Enfermedades granulomatosas (tuberculosis, sarcoidosis, etcétera) • Hipertiroidismo (aumento de metabolismo del calcidiol)
FGF23: Fibroblast Growth Factor 23.

En primer lugar, dado que la síntesis cutánea de vitamina D3 es la principal fuente de aporte, las condiciones que la limiten, son factores de riesgo para presentar hipovitaminosis D. El contenido de melanina de la piel limita la síntesis cutánea de vitamina D, de manera que las razas con alta pigmentación cutánea tienen aumentado el riesgo de deficiencia de vitamina D. El ángulo de exposición solar, que depende de la latitud, de la estación del año y del momento del día, también determina la cantidad de UVB que alcanza la piel, habiéndose observado que en latitudes

situadas entorno a los 40° no se sintetiza vitamina D durante los meses de invierno. Por otra parte, la edad avanzada parece asociarse a una mayor prevalencia de déficit de vitamina D, que además de deberse a una disminución de la actividad al aire libre, también se relaciona con una disminución en las concentraciones cutáneas de 7-dehidrocolesterol ^(60, 66).

A pesar de que el aporte oral de vitamina D en sí es insuficiente para cubrir los requerimientos en ausencia de suplementación, los pacientes que padezcan malabsorción intestinal, tanto debido a patologías médicas como quirúrgicas, también tienen más riesgo de sufrir déficit de vitamina D ⁽⁶⁷⁾.

En tercer lugar, las condiciones que alteren el metabolismo de la vitamina D a sus compuestos activos o que disminuyan las concentraciones de la DBP, pueden conllevar también un déficit de esta hormona. Éste es el caso del síndrome nefrótico o la insuficiencia renal o hepática o de algunos fármacos, como los anticonvulsivantes, los antituberculosos o antiretrovirales, que pueden interferir en el metabolismo de la vitamina e incluso estimular el catabolismo de vitamina D ^(67,96,95).

Finalmente, existen causas menos frecuentes de déficit de vitamina D o alteración en su función, como algunos defectos genéticos que incluirían el raquitismo dependiente de vitamina D tipo 1 o algunos tumores con capacidad de inducir osteomalacia por efecto de citoquinas ⁽⁶⁷⁾.

9- Consecuencias del déficit de vitamina D y relación con la salud

9.1.- Patología osteomuscular

Dado que el principal papel de la vitamina D es la regulación del metabolismo óseo, desde hace ya tiempo se sabe que el déficit de vitamina D se asocia a procesos como la osteomalacia en el adulto o el raquitismo en el niño ⁽⁶⁰⁾. Además, la vitamina D parece tener un papel muy importante en el mantenimiento de la densidad mineral ósea, de manera que el mantenimiento de unos niveles correctos de calcidiol puede ser tanto o más importante que la ingesta de calcio para la prevención de la osteoporosis ⁽⁹⁷⁾. Como es de esperar, el déficit de vitamina D también parece asociarse a un aumento en las caídas y en el riesgo de fractura ^(98,99). Este riesgo aumentado de

caídas puede explicarse por la existencia de VDR en el músculo y se apoya en la relación encontrada entre niveles de vitamina D y diversos parámetros de función muscular ⁽¹⁰⁰⁾.

9.2.- Patología no osteomuscular

En los últimos años numerosos estudios han relacionado el déficit de vitamina D con patologías diferentes a las relacionadas con el hueso o la función muscular. Se ha relacionado con patologías infecciosas, autoinmunes, neoplásicas e incluso con factores de riesgo cardiovascular como la diabetes, el síndrome metabólico o la obesidad. El hallazgo de VDR y de la enzima 1 alfa hidroxilasa en una amplia variedad de tejidos distintos al hueso y al músculo hace plausible etiopatogénicamente esta asociación ⁽⁷²⁾.

En primer lugar, se ha relacionado el déficit vitamina D con un aumento de cáncer, en especial colorrectal. Desde hace algunos años, estudios ecológicos relacionaron la latitud y la exposición solar con una mayor prevalencia de enfermedad neoplásica ⁽¹⁰¹⁻¹⁰³⁾ y estudios in vitro más recientes indican que la vitamina D podría tener efectos celulares antiproliferativos y de inducción de la diferenciación celular ⁽¹⁰⁴⁾. No obstante, los estudios disponibles hasta el momento no permiten esclarecer si esta asociación es causal o si quizás el déficit de vitamina D podría ser un factor de confusión dada su asociación a la obesidad o a estilos de vida no saludables, siendo necesarios amplios estudios de intervención para esclarecer si la mejoría de los niveles de vitamina D conlleva una reducción en la incidencia de cáncer ⁽⁷²⁾.

En segundo lugar, se conoce que la vitamina D puede ejercer un papel inmunomodulador a nivel de macrófagos, células dendríticas y linfocitos, teniendo funciones como la potenciación de la lucha y el control de infecciones o la modulación de las respuestas inmunitarias adaptativas, cuya desregulación puede dar lugar a enfermedades autoinmunes ⁽¹⁰⁵⁾. Dentro de las infecciones clásicamente relacionadas con el déficit de vitamina D encontramos la tuberculosis, donde la terapia de exposición solar demostró tener beneficios en la era preantibiótica ⁽¹⁰⁶⁾. En relación a la capacidad de la vitamina D de modular la respuesta inmunitaria, se ha relacionado el déficit de vitamina D con un mayor riesgo de desarrollar enfermedades autoinmunes como la enfermedad

inflamatoria intestinal, la artritis reumatoide, la esclerosis múltiple o la diabetes mellitus tipo 1 ⁽¹⁰⁷⁾. Como ejemplos, son conocidos el aumento en la incidencia de esclerosis múltiple con mayores latitudes ⁽¹⁰⁸⁾ o la disminución en la incidencia de diabetes tipo 1 con la suplementación vitamínica en la infancia ⁽¹⁰⁹⁾.

Finalmente, el déficit de vitamina D también se ha relacionado con numerosos factores de riesgo cardiovascular. La asociación de la hipovitaminosis D con la obesidad es conocida desde hace tiempo ⁽¹¹⁰⁻¹¹²⁾ y más recientemente se ha relacionado el déficit de esta vitamina con otros componentes del síndrome metabólico como la hipertensión arterial, la diabetes o la dislipemia ^(113,114).

10- Vitamina D, mortalidad y enfermedad cardiovascular

Además del hallazgo de una asociación entre los niveles de disminuidos de vitamina D y un gran número de patologías como acabamos de ver, en los últimos años han aparecido estudios prospectivos que muestran una asociación entre el déficit de vitamina D y una mayor mortalidad. Este aumento de mortalidad se ha observado en grupos muy diversos de pacientes que incluyen la población general ⁽¹¹⁵⁾, mujeres postmenopáusicas ⁽¹¹⁶⁾, hombres de edad avanzada ⁽¹¹⁷⁾, pacientes con diabetes tipo 1, tipo 2 y síndrome metabólico ⁽¹¹⁸⁻¹²⁰⁾, pacientes con enfermedad renal crónica ⁽¹²¹⁾ e incluso en pacientes ingresados en unidades de cuidados intensivos, postoperados de cirugía cardíaca o con síndrome coronario agudo ^(81,122,123). Los últimos estudios prospectivos describen una disminución progresiva de la mortalidad con el aumento de las concentraciones de calcidiol hasta niveles de esta vitamina entre 50 y 87,5 nmol/L ⁽¹²⁴⁻¹²⁶⁾. No obstante, a pesar de que hay quien infiere de los datos disponibles hasta el momento, que doblar los niveles poblaciones de vitamina D podría disminuir la mortalidad de un 7 a un 17% ⁽¹²⁷⁾, por el momento, los estudios de intervención con vitamina D han mostrado resultados discordantes sobre la mortalidad ⁽¹²⁸⁻¹³⁰⁾.

No se conoce la relación de causalidad entre la vitamina D y la mortalidad global, pero es probable que el aumento de mortalidad global asociado al déficit de vitamina D se explique, al menos en

parte por un aumento en la mortalidad cardiovascular. El hallazgo de mayores tasas de enfermedad cardiovascular en poblaciones con latitud alta, cuya exposición solar es menor, ya hace tiempo que hizo postular una relación entre hipovitaminosis D y enfermedad cardiovascular⁽¹³¹⁾. Además, numerosos estudios epidemiológicos en poblaciones como la de los estudios NHANES o Framingham entre otros, relacionan la ingesta de vitamina D o sus concentraciones en plasma con un mayor o menor riesgo de patología y mortalidad cardiovascular⁽¹³²⁻¹⁴⁰⁾.

La asociación de la hipovitaminosis D con la enfermedad y mortalidad cardiovascular se ve reforzada por el hallazgo de receptores de vitamina D en diferentes puntos del sistema vascular, como el músculo liso arterial, los cardiomiocitos o el endotelio vascular, donde modularían la vasodilatación arterial o la proliferación del músculo liso vascular^(135,141). Además, estudios experimentales han implicado a la vitamina D en la función de la célula beta, en la resistencia a la insulina, en la modulación del sistema renina-angiotensina aldosterona y en la modulación de la actividad de los macrófagos y de la función inmunitaria^(135,141), sin olvidar que una parte de la asociación entre hipovitaminosis D y enfermedad cardiovascular podría estar mediada por el aumento secundario en las concentraciones de PTH⁽¹⁴²⁾. Entre todos los posibles mecanismos, es muy probable que contribuyan de forma importante la conocida asociación de la hipovitaminosis D con factores de riesgo cardiovascular que conforman en síndrome metabólico como la obesidad, la diabetes tipo 2, la dislipemia o la hipertensión arterial⁽¹⁴³⁾. El hallazgo de una atenuación en la relación entre hipovitaminosis D y la enfermedad cardiovascular o la mortalidad cuando se ajusta o se tienen en cuenta los factores de riesgo cardiovascular clásicos apoya este punto de vista⁽¹³²⁻¹⁴⁴⁾.

A pesar de todo lo comentado referente a la relación entre la hipovitaminosis D y la enfermedad cardiovascular, llama la atención la discordancia entre los estudios transversales, longitudinales y los de intervención. Así, mientras en los estudios transversales se observa una relación clara entre enfermedad cardiovascular e hipovitaminosis D, esta asociación muestra resultados más heterogéneos en los estudios observacionales prospectivos y en los estudios que analizan el efecto de la suplementación con vitamina D sobre la aparición de eventos cardiovasculares o la mortalidad cardiovascular, no se han obtenido beneficios^(145,146). Esta discordancia podría deberse

al hecho de que la vitamina D no sea la causa de un mayor riesgo cardiovascular, sino simplemente un marcador de una mejor salud o unos hábitos de vida más saludables, siendo la hipovitaminosis D un reflejo de la presencia de patología crónica inespecífica.

III. VITAMINA D, OBESIDAD Y SÍNDROME METABÓLICO

Hemos comentado que quizás el nexo entre hipovitaminosis D y mortalidad cardiovascular se explique por una posible asociación entre este déficit vitamínico y los distintos factores de riesgo cardiovascular que conforman el síndrome metabólico.

Desde hace ya bastante tiempo se conoce la asociación entre el déficit de vitamina D y la obesidad. De ello da idea el hecho que la determinación de los niveles de vitamina D se incluya en las recomendaciones establecidas para el manejo de los pacientes con obesidad mórbida, ya que los niveles disminuidos de vitamina D se asocian especialmente con los grados de obesidad más severos ^(111,147). Se sabe que esta asociación no es consecuencia de la cirugía de la obesidad como sería esperable, sino que hasta un 80% de pacientes con obesidad mórbida presentan niveles disminuidos de vitamina D aunque no hayan sido sometidos a una intervención de cirugía bariátrica ^(112,147,148).

Entre las posibles causas de la asociación entre obesidad e hipovitaminosis D se ha postulado una inadecuada ingesta oral de esta vitamina debido a dietas excéntricas, una reducida actividad física en el exterior que limitaría la síntesis cutánea de esta hormona, y un almacenamiento de esta vitamina en el tejido graso que disminuiría sus concentraciones en sangre ^(110,149). No obstante, también se ha postulado que la presencia de hipovitaminosis D podría modular la aparición de obesidad mediante un papel a nivel del tejido adiposo ^(72,149-151).

Dada la conocida asociación entre hipovitaminosis D y obesidad, es lógico que el síndrome metabólico, condición fuertemente asociada a la obesidad, también se caracterice por presentar concentraciones disminuidas de vitamina D y este hecho ha sido demostrado en diversas poblaciones. En Estados Unidos, la información del estudio NHANES III realizado entre 1988 y 1994 nos reveló que las concentraciones de vitamina D fueron más bajas en sujetos con síndrome metabólico que en sujetos sin esta patología (67.1 nmol/L vs. 75.9 nmol/L, respectivamente) ⁽¹⁵²⁾ y estos resultados fueron similares en posteriores análisis del estudio NHANES realizados entre 2003 y 2006 ^(153,154), a pesar de que los datos no son comparables entre los diferentes estudios por cambios en los métodos de determinación de la vitamina D. Estos hallazgos en población

americana se han confirmado también en Europa, con los estudios European Male Aging Study (155) y la 1958 British Birth Cohort ⁽¹⁵⁶⁾, y son también parecidos en el continente asiático, donde diversos estudios han objetivado asociaciones similares ^(157,158).

La asociación del déficit de vitamina D con el síndrome metabólico no sólo se ha observado en estudio transversales sino también en estudios prospectivos que analizan el riesgo de padecer síndrome metabólico tras 5-10 años de seguimiento en función de los niveles basales de vitamina D ⁽¹⁵⁹⁻¹⁶²⁾.

Por otra parte, diferentes componentes del síndrome metabólico también se han asociado de manera individual a la presencia de concentraciones disminuidas de vitamina D, siendo el caso más estudiado el de las alteraciones del metabolismo hidrocarbonado.

La relación de la hipovitaminosis D con una mayor prevalencia e incidencia de diabetes tipo 2 parece clara si consideramos la información obtenida en los primeros estudios transversales ⁽¹⁶³⁾.

Aunque existe cierta heterogeneidad en los resultados, numerosos estudios longitudinales dirigidos a investigar la asociación entre la hipovitaminosis D y el riesgo de desarrollar diabetes van en el mismo sentido y muestran una mayor incidencia de diabetes en los pacientes con menores concentraciones de vitamina D ⁽¹⁶⁴⁻¹⁶⁹⁾. Para explicar la asociación entre la hipovitaminosis D y la diabetes tipo 2 se han postulado diversos mecanismos. En primer lugar, la 1,25(OH)D podría estimular la secreción de insulina por parte de la célula beta pancreática, directamente o bien mediante un aumento en el calcio citosólico ^(164,170). Esta hipótesis se basa especialmente en los hallazgos de estudios in vitro y en animales, aunque algunos estudios también han demostrado una asociación entre distintos parámetros que miden la secreción de insulina en humanos y la hipovitaminosis D ^(171,172). Además, en la diabetes tipo 1 se ha descrito la presencia de concentraciones disminuidas de vitamina D y, aunque el principal mecanismo que explica esta relación es la modulación del sistema inmunitario por parte de la vitamina D, también se puede especular acerca de una relación directa entre la secreción de insulina y las concentraciones de vitamina D ⁽¹⁷³⁻¹⁷⁵⁾. En contra de estos resultados, tenemos algunos hallazgos de ensayos en ratones con insulinoopenia inducida por estreptozotocina, donde se encuentran concentraciones disminuidas de vitamina D y una reducción en la masa ósea, habiéndose

sugerido que el déficit de insulina podría inhibir la 1 alfa hidroxilasa renal ⁽¹⁷⁶⁾. En segundo lugar, la hipovitaminosis D podría intervenir en la génesis de la diabetes tipo 2 favoreciendo la insulinoresistencia o aumentando el estado inflamatorio de bajo grado, entre otros ^(164,171). Desafortunadamente, en la actualidad no hay evidencias sólidas sobre la mejoría del control glucémico o de los parámetros de insulinoresistencia con la suplementación con vitamina D ^(177,178) y faltan estudios de calidad que estudien el efecto de la suplementación con vitamina D sobre la prevención de la diabetes en sujetos de alto riesgo de desarrollarla ⁽¹⁷⁹⁾. Así, el conjunto de estos hallazgos no permite establecer una relación de causalidad entre hipovitaminosis D y diabetes y no justifican la suplementación con vitamina D con el objetivo de prevenir o tratar la diabetes tipo 2 ^(174,180).

La hipovitaminosis D se ha relacionado también con una mayor incidencia y prevalencia de hipertensión arterial, tanto en estudios transversales como prospectivos ⁽¹⁸¹⁾. Los mecanismos de esta asociación son en parte desconocidos, pero además de la vinculación de la hipovitaminosis D con el síndrome metabólico, se postula que la vitamina D puede actuar a través de una posible modulación del sistema renina-angiotensina-aldosterona ⁽¹⁸²⁾, del efecto sobre las citoquinas inflamatorias o sobre el endotelio vascular ^(135,183) o simplemente mediante la modulación de la secreción de PTH ⁽¹⁴⁷⁾. Sin embargo, como sucede en el caso de la diabetes u otros factores de riesgo cardiovascular, no existen estudios de calidad que demuestren una disminución en la incidencia de hipertensión o una mejoría en su control con la suplementación con vitamina D ⁽¹⁸⁴⁾.

La dislipemia también se ha relacionado con la hipovitaminosis D desde hace algunas décadas. En 1989, Wilczek et al. encontraron una mayor prevalencia de déficit de vitamina D en pacientes con hipercolesterolemia familiar heterocigota ⁽¹⁸⁵⁾. Estudios posteriores observaron asociaciones entre las concentraciones de vitamina D y los diferentes parámetros lipídicos. Así, Melamed et al. encontraron una asociación negativa entre el calcidiol y las concentraciones de colesterol en los participantes del estudio NHANES ⁽¹³⁶⁾. En poblaciones europeas y asiáticas, los parámetros lipídicos relacionados con las concentraciones de calcidiol fueron las concentraciones de triglicéridos y de cHDL ^(155,186). Globalmente, los resultados de los principales estudios muestran que la asociación de vitamina D con las concentraciones de colesterol total y LDL (cLDL) es

variable, mientras que la relación con las alteraciones características de la dislipemia aterogénica (concentraciones elevadas de triglicéridos y disminuidas de cHDL) parece más claro ⁽¹⁸⁷⁻¹⁸⁸⁾. En nuestro conocimiento, no existen datos claros que demuestren que la corrección del déficit de vitamina D se traduzca en una mejoría del perfil lipídico ⁽¹⁸⁷⁾.

Finalmente, la hipovitaminosis D se ha relacionado con algunas de las alteraciones vinculadas al síndrome metabólico pero no contempladas en su definición (**tabla 3**). Así, se ha relacionado la hipovitaminosis D con el síndrome de ovarios poliquísticos ⁽¹⁸⁹⁾ y con la esteatosis hepática no alcohólica ⁽¹⁹⁰⁾. Estas asociaciones de vitamina D más allá de los clásicos factores de riesgo cardiovascular apoyarían la existencia de un nexo entre la vitamina D y un factor etiopatogénico común a las manifestaciones del síndrome metabólico.

JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS DE TRABAJO

I. JUSTIFICACIÓN

El síndrome metabólico y la hipovitaminosis D constituyen un problema de salud a nivel mundial. Ambos procesos tienen una elevada prevalencia y se asocian con problemas de salud de gran relevancia sanitaria, como son la diabetes tipo 2 y la enfermedad cardiovascular.

Estudios epidemiológicos recientes muestran una relación consistente entre la hipovitaminosis D con los diferentes componentes del síndrome metabólico y también con el síndrome metabólico como entidad específica. Además, tanto la hipovitaminosis D como el síndrome metabólico están claramente relacionados con el estilo de vida, lo que apoyaría un origen y fisiopatología comunes. Sin embargo, el conocimiento sobre la relación entre la hipovitaminosis D y el síndrome metabólico es insuficiente.

En primer lugar, la principal evidencia de una asociación entre hipovitaminosis D y el síndrome metabólico viene de estudios observacionales, cuyo poder para establecer asociaciones causales es reducido. En este tipo de estudios, las principales dificultades que nos encontramos a la hora de extraer conclusiones referentes a la causalidad es la presencia de múltiples factores de confusión y el desconocimiento de la relación temporal de la hipovitaminosis D con el síndrome metabólico y sus componentes. En este contexto, se ha postulado que la hipovitaminosis D predice al menos algunos de los componentes del síndrome metabólico, pero también que la existencia de alguno de los componentes del síndrome metabólico sería la causa de la hipovitaminosis D.

En segundo lugar, los resultados de los estudios que han analizado la suplementación con vitamina D sobre la incidencia o la mejoría del control de los componentes del síndrome metabólico no apoyan la implicación directa de la hipovitaminosis D en la génesis del síndrome metabólico. Por otra parte, los estudios que han valorado el efecto del control de los componentes del síndrome metabólico sobre las concentraciones o el estado de la vitamina D son definitivamente escasos.

En tercer lugar, los resultados de los estudios dirigidos a establecer los posibles mecanismos que expliquen la relación entre el síndrome metabólico y la hipovitaminosis D no son consistentes.

Por tanto, el conocimiento de los mecanismos de causalidad implicados en la relación entre la hipovitaminosis D y el síndrome metabólico es limitado y existen áreas de incertidumbre, especialmente acerca del efecto del control de los componentes del síndrome metabólico sobre las concentraciones de vitamina D.

II. HIPÓTESIS DE TRABAJO

Nuestra hipótesis es que el estudio de la relación entre los diferentes componentes del síndrome metabólico y la hipovitaminosis D en diferentes situaciones clínicas, así como la evaluación del efecto de la mejoría del control de los componentes del síndrome metabólico sobre las concentraciones de la vitamina D, contribuirán al conocimiento de la relación entre el síndrome metabólico y la vitamina D.

OBJETIVOS

I. OBJETIVO GENERAL

Determinar la relación existente y los factores predictores de la asociación del déficit de vitamina D con procesos relacionados con el síndrome metabólico.

II. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Determinar la asociación de la vitamina D con el síndrome metabólico como entidad en sujetos con sobrepeso y distintos grados de obesidad.
- 2) Determinar la asociación de la vitamina D con diferentes componentes del síndrome metabólico en pacientes con diabetes mellitus tipo 2. Estudiar el efecto de la mejoría del control glucémico sobre las concentraciones de vitamina D.
- 3) Estudiar la relación existente entre la hiperlipemia familiar combinada y el déficit de vitamina D. Estudiar el efecto de la mejoría del control lipídico sobre las concentraciones de vitamina D.

MATERIAL Y MÉTODOS

I. ESTUDIOS INCLUIDOS

En esta tesis se incluyen los datos y resultados de 3 estudios destinados a valorar la relación existente entre la vitamina D y el síndrome metabólico y sus componentes:

- 1) Estudio en pacientes con sobrepeso u obesidad (estudio Obesidad-VitD): Incluye un único estudio transversal.
- 2) Estudio en pacientes con diabetes mellitus tipo 2 (Estudio DM2-VitD): Incluye un estudio transversal y un estudio longitudinal.
- 3) Estudio en pacientes con hiperlipemia familiar combinada (estudio HFC-VitD): Incluye un estudio transversal y un estudio longitudinal.

Todos los estudios fueron aprobados por el comité ético del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau y todos los pacientes firmaron un consentimiento informado.

II. PACIENTES

1- Pacientes incluidos en el estudio Obesidad-VitD

Se estudiaron 343 pacientes con sobrepeso u obesidad que acudieron consecutivamente a la consulta de obesidad durante los meses de menor exposición solar (octubre-abril) entre los años 2003 y 2006. Los criterios de exclusión incluyeron la presencia de malabsorción o cirugía bariátrica previa, alergias al sol, insuficiencia renal o hepática, alteraciones en la homeostasis del calcio, tratamiento con calcio, derivados de la vitamina D, rifampicina o antiepilépticos y mujeres en la menopausia.

2- Pacientes incluidos en el estudio DM2-VitD

Se seleccionaron a 122 pacientes consecutivos con diabetes mellitus tipo 2 que acudieron a la clínica de diabetes del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau para optimizar el control glucémico entre los años 2007 y 2008. Los pacientes inicialmente fueron incluidos en un estudio sobre el metabolismo de las lipoproteínas y la inflamación en la diabetes. En 2010, se recuperaron los pacientes con suero congelado disponible para realizar las determinaciones de calcidiol y se excluyeron aquellos pacientes que estuvieran en tratamiento con suplementos de calcio y/o vitamina D. El número final de pacientes incluidos en el análisis fue de 63.

3- Pacientes incluidos en el estudio HFC-VitD

Se seleccionaron 113 pacientes con hiperlipemia familiar combinada (HFC) que acudieron a la clínica de lípidos del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau para optimizar el control lipídico entre los años 2007 y 2008 y 54 controles sanos normoglucémicos y normolipémicos. Los sujetos fueron incluidos en un estudio acerca del metabolismo de las lipoproteínas y la inflamación en la HFC. Los criterios de selección de los pacientes con HFC fueron la presencia de concentraciones

de cLDL y triglicéridos por encima del percentil 90 de la población española de referencia, ajustado por edad y sexo y en ausencia de tratamiento para la dislipemia ⁽¹⁹¹⁾. En presencia de diabetes tipo 2 se requirió además concentraciones de cLDL > 4.14 nmol/L. Los criterios de exclusión fueron la presencia de causas secundarias de dislipemia.

En 2010, se recuperaron los sujetos con suero congelado disponible para realizar las determinaciones de calcidiol y se excluyeron aquellos pacientes que estuvieran en tratamiento con suplementos de calcio y/o vitamina D. El número final de sujetos incluidos en el análisis fue de 59 pacientes con HFC y 48 controles.

III. DISEÑO DE LOS ESTUDIOS

1- Diseño del estudio Obesidad-VitD

Las características del estudio fueron las de un estudio observacional transversal.

A los 343 pacientes incluidos se les realizó una valoración clínica en una única visita y una determinación analítica. A partir de los datos obtenidos, se clasificó a los pacientes en los distintos grupos de sobrepeso u obesidad y se determinó la presencia o no de síndrome metabólico.

Se analizó la relación del estado de la vitamina D (presencia de hipovitaminosis D o concentraciones normales de vitamina D) con el grado de obesidad y con la presencia de síndrome metabólico y la insulinoresistencia.

En este estudio no se realizó ningún tipo de intervención diagnóstica o terapéutica adicional a las propias de la práctica clínica habitual.

2- Diseño del estudio DM2-VitD

Como se ha comentado, en los pacientes con diabetes se realizó un estudio transversal y otro longitudinal.

- Estudio transversal: A los 63 pacientes incluidos en este estudio se les había realizado una visita de estudio y una determinación analítica. Se analizó la relación del estado de la vitamina D (presencia de hipovitaminosis D o concentraciones normales de vitamina D) con las características clínicas de la diabetes, y los parámetros antropométricos, inflamatorios y lipoproteicos.
- Estudio longitudinal: De los 63 pacientes incluidos en el estudio transversal, 20 pacientes con mal control crónico de su diabetes (definido como presencia de cifras de hemoglobina glicosilada (HbA1c) > 7,5%) fueron analizados antes y después de optimizar el control

glucémico durante un mínimo de 1,5 meses. Se analizaron los cambios en las concentraciones de la vitamina D tras la optimización del perfil glucémico y su relación con los cambios en los parámetros del control glucémico, antropométricos, lipídicos e inflamatorios. Las estrategias implementadas para mejorar el control glucémico fueron las propias de la práctica clínica habitual.

3- Diseño del estudio HFC-VitD

Como se ha comentado, en los pacientes con HFC se realizó un estudio transversal y otro longitudinal.

- Estudio transversal: A los 59 pacientes y los 48 controles sanos incluidos en el estudio transversal se les había realizado una visita clínica de estudio y una determinación analítica. Se analizó la influencia de la presencia o ausencia de HFC sobre las concentraciones de vitamina D. Además, se analizó la posible relación entre las concentraciones de la vitamina D y los parámetros antropométricos, lipídicos, inflamatorios y de resistencia a la insulina.
- Estudio longitudinal: Se incluyeron 20 de los 59 pacientes del estudio transversal de los que se disponía de información sobre las concentraciones de calcidiol antes y después de iniciar tratamiento para la dislipemia según la práctica clínica habitual. Se realizó una visita clínica y analítica basal (sin ningún fármaco para la dislipemia) y otra visita clínica y analítica tras un mínimo de 8 semanas de haber iniciado las medidas oportunas dirigidas a mejorar la dislipemia. Se analizaron los cambios en las concentraciones de calcidiol y su relación con los cambios en los parámetros antropométricos, lipídicos, inflamatorios y de resistencia a la insulina.

IV. METODOLOGÍA

1- Historia clínica

Se revisó la historia clínica de todos los pacientes con el objetivo de recoger datos acerca de los antecedentes personales y familiares, patologías concomitantes y tratamientos.

2- Recogida de datos y creación de la base de datos

La recogida de los datos se realizó en el momento de la visita de estudio gracias a la creación previa de cuestionarios en papel adecuados para cada una de las tres patologías objeto de estudio (sobrepeso-obesidad, diabetes tipo 2 e HFC). A posteriori, se completaron los cuestionarios con la información obtenida de la historia clínica y se traspasó la información a tres bases de datos creadas con el programa SPSS (SPSS.Inc) para su posterior explotación.

3- Medidas antropométricas y tensión arterial

Se recogieron el peso, la talla y el IMC calculado como $IMC = \text{peso (Kg)}/\text{talla (m)}^2$. El perímetro de cintura se midió tomando como referencia el borde superior de la cresta ilíaca, de acuerdo con la técnica definida por el NIH ⁽¹⁹²⁾.

En función del IMC, se clasificó a los pacientes en diferentes grados de sobrepeso-obesidad, atendiendo a la clasificación de la OMS (**Tabla 5**).

Tabla 5: Clasificación de la obesidad según la OMS

	IMC (Kg/m ²)
Peso insuficiente	< 18.5
Normal	18.5-24.9
Sobrepeso	25-29.9
Obesidad grado I	30-34.9
Obesidad grado II	35-39.9
Obesidad grado III	> 40

OMS = Organización Mundial de la Salud

IMC = índice de masa corporal

La tensión arterial se midió con esfigmomanómetro en dos ocasiones separadas y en posición de sedestación tras un descanso de 5 minutos.

4- Definición de síndrome metabólico

En el estudio Obesidad-VitD el síndrome metabólico se definió de acuerdo a los criterios del ATP III modificados ⁽¹¹⁾ (**tabla 6**).

Tabla 6: Criterios de síndrome metabólico según ATP-III modificado	
Perímetro de cintura	> 102 cm en hombres > 88 cm en mujeres
Triglicéridos	> 150 mg/dL
Colesterol HDL	< 40 mg/dL en hombres < 50 mg/dL en mujeres
Tensión arterial	> 130/85 mmHg
Glucemia plasmática en ayunas	> 100 mg/dL
Son necesarios 3 de los 5 criterios para la definición de síndrome metabólico.	
ATP-III: Adult Treatment Panel III	

5- Determinaciones analíticas

Todas las determinaciones analíticas se realizaron tras ayuno nocturno, tanto para la obtención de la bioquímica general, el calcidiol, la insulina, los parámetros lipídicos y los inflamatorios. El perfil lipídico básico y la analítica general se obtuvieron tras el análisis de muestras frescas. Todos los demás análisis se realizaron con muestras de plasma conservadas en ácido etilendiaminotetraacético y congeladas a -80 ° C.

Para minimizar la variabilidad interensayo, las muestras del mismo sujeto se analizaron en la misma tanda experimental.

Es interesante remarcar que datos de estudios previos demuestran que el calcidiol es estable durante más de 10 años almacenado en plasma congelado ⁽¹⁹³⁾.

5.1.- Medición de la insulinoresistencia

Las concentraciones de insulina en suero se midieron mediante un procedimiento automatizado quimioluminiscente de inmunoanálisis en fase sólida (Immulite 2000, Diagnostic Products Corp., Los Angeles, CA). El método presentaba menos del 8% de reactividad cruzada con la proinsulina y una imprecisión analítica total de 7,5 % para valores entre 55 y 2100 pmol/L (7,7 y 291 μ UI/mL). Como medida de insulinoresistencia se utilizó el Homeostasis Model Assessment (HOMA), calculado como $(\text{glucosa (mmol/L)} \cdot \text{insulinemia (}\mu\text{UI/mL)})/22.5$ ⁽¹⁹⁴⁾.

5.2.- Determinación de la concentración de calcidiol y definición de estado de la vitamina D

Las concentraciones de calcidiol se determinaron con métodos distintos en el primer estudio y el segundo y tercero, dado que en 2010 el laboratorio del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau cambió el método de RIA por un EIA:

- Método utilizado en el estudio Obesidad-VitD: RIA comercial (Incstar Corp., Stillwater, MN, EE.UU.), con un rango normal de 25 a 150 nmol/L. Los coeficientes de variación intra- e interensayo 25(OH)D fueron 7% y 14 %, respectivamente, para unas concentraciones medias de 47 nmol/L y un rango de normalidad entre 25 y 150 nmol/L.
- Método utilizado en los estudios DM2-VitD y HFC-VitD: EIA comercial (Immunodiagnostic Systems Ltd (IDS), Boldon, UK). Los coeficientes de variación intra- e interensayo 25(OH)D fueron <6,8 % y <8,8 %, respectivamente, para las concentraciones medias entre 38 y 164 nmol/L. La sensibilidad analítica era 5 nmol/L.

El estado de la vitamina D se definió según los criterios de Lips ⁽⁸⁵⁾ en el estudio Obesidad-VitD (**tabla 7**), considerando hipovitaminosis D (suma de déficit e insuficiencia) a los niveles de calcidiol ≤ 50 nmol/L.

Tabla 7: Clasificación del estado de la Vitamina D según Lips			
Calcidiol	Déficit	Insuficiencia	Normal
nmol/L	< 25	25-50	> 50
ng/mL	< 10	10-20	> 20

En los estudios DM2-VitD y HFC-VitD, sin embargo, se definió hipovitaminosis D como la presencia de concentraciones de calcidiol ≤ 80 nmol/L, dada la creciente literatura que en los últimos años apoya un valor entre 70 y 80 nmol/L ⁽⁸⁶⁻⁸⁷⁾.

La diferente técnica utilizada para el análisis de la vitamina D y el diferente punto de corte para la definición de hipovitaminosis D no permiten establecer comparaciones acerca de la prevalencia de hipovitaminosis D entre los pacientes incluidos en los tres estudios. Sin embargo, no afectan a la interpretación de los resultados en cada estudio individual.

5.3.- Determinación de los parámetros lipídicos

El perfil lipídico incluyó el colesterol total y los triglicéridos, el colesterol VLDL (cVLDL), colesterol LDL (cLDL), colesterol HDL (cHDL), los ácidos grasos libres (AGL), la apolipoproteína B (ApoB), las apolipoproteínas AI (ApoA-I) y AII (ApoA-II). Todos los reactivos se adquirieron de Roche Diagnostics GmbH, Basilea, Suiza, excepto AGL que fueron de Wako Chemicals, Neuss, Germany y apolipoproteína AII que fueron de Kamiya, Seattle, USA. El colesterol en las fracciones de lipoproteínas se midió utilizando un método directo para cuantificar cHDL (HDL-C plus; Roche Diagnostics GmbH) o mediante ultracentrifugación cuando la concentración de triglicéridos fue superior a 3 mmol/L, de acuerdo con las recomendaciones del NCEP (ATPIII) ⁽⁶⁾ y como se describe en un estudio previo ⁽¹⁹⁵⁾. Todos los métodos se realizaron en un autoanalizador Hitachi 917.

Para la determinación de la composición de las partículas HDL, éstas se aislaron por ultracentrifugación secuencial en el intervalo de densidad de 1.063-1.210 g/ml, utilizando soluciones de KBr. Todas las etapas se realizaron a 4 ° C y todas las soluciones de KBr contenían



1 mmol/l EDTA y 2 $\mu\text{mol/L}$ BHT para evitar la oxidación de las muestras. En la **figura 6** se muestra el proceso de esta ultracentrifugación secuencial. La composición de HDL se determinó midiendo el contenido de colesterol (Roche), triglicéridos (Roche), fosfolípidos (Wako), ApoA-I (Roche) y ApoA-II (Kamiya), usando métodos comerciales adaptados a un autoanalizador Hitachi 917.

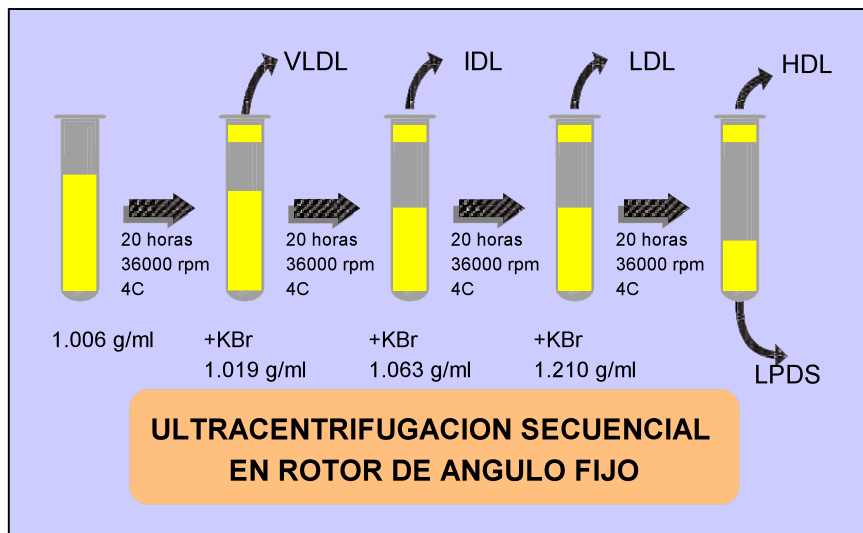


Figura 6: Proceso de ultracentrifugación secuencial utilizado para el aislamiento de las partículas HDL.

El tamaño de las LDL se determinó mediante un gel de electroforesis con gradiente de poliacrilamida no desnaturalizante (2% a 16%), usando como patrón una mezcla de suero con varias bandas de LDL de tamaño conocido, como se ha descrito previamente ⁽¹⁹⁶⁾. Un ejemplo de electroforesis en poliacrilamida para determinar este tamaño de las partículas LDL se muestra en la **figura 7**.

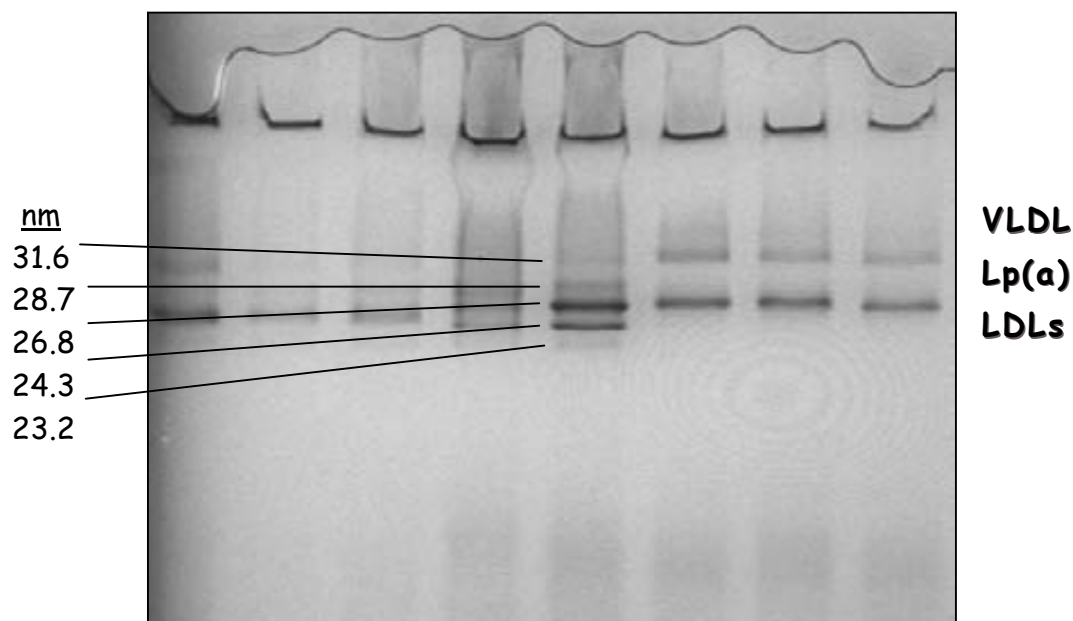


Figura 7: Electroforesis en gradiente (2-16%) de poliacrilamida utilizada en la determinación del tamaño de las partículas LDL.

El porcentaje de LDL electronegativa (LDL-) se determinó a partir de LDL total por cromatografía de intercambio aniónico en una columna MonoQ HR 5/5 (GE healthcare, Uppsala, Suecia), utilizando un gradiente de cloruro de sodio, tal como se ha descrito previamente ⁽¹⁹⁷⁾ y se muestra en la **figura 8**. En breve resumen, las partículas LDL se dializaron frente a tampón A (1 mmol/L de EDTA y 10 mmol/L de Tris-HCL (pH 7,4)) mediante cromatografía de filtración en gel (Columna PD10, G25M; Pharmacia). El tampón A y un tampón B (constituido por 1 mol/L de NaCl, 1mmol/L EDTA y 10 mmol/L de Tris-HCL (pH 7,4)), se utilizaron como eluyentes de la cromatografía. La LDL se eluyó a 1ml/min durante 10 minutos con un gradiente lineal de 0-0.1 mol/L de NaCl, seguido por un procedimiento de gradiente de varios pasos: 10-20 minutos con NaCl a 0,25 mol/L, 20-28 minutos con NaCl a 0,6 mol/L, 28-35 minutos con NaCl a 1 mol/L y 35-40 minutos a NaCl 0 mol/L. Dos formas de LDL, una mayoritaria llamada LDL(+) (elución a 0,2 mol/l) y una forma minoritaria llamada LDL- (elución a 0,3 mol/L) difirieron en la carga y se identificaron a 280 nm. Su proporción relativa se cuantificó mediante la integración por picos ^(197,198).

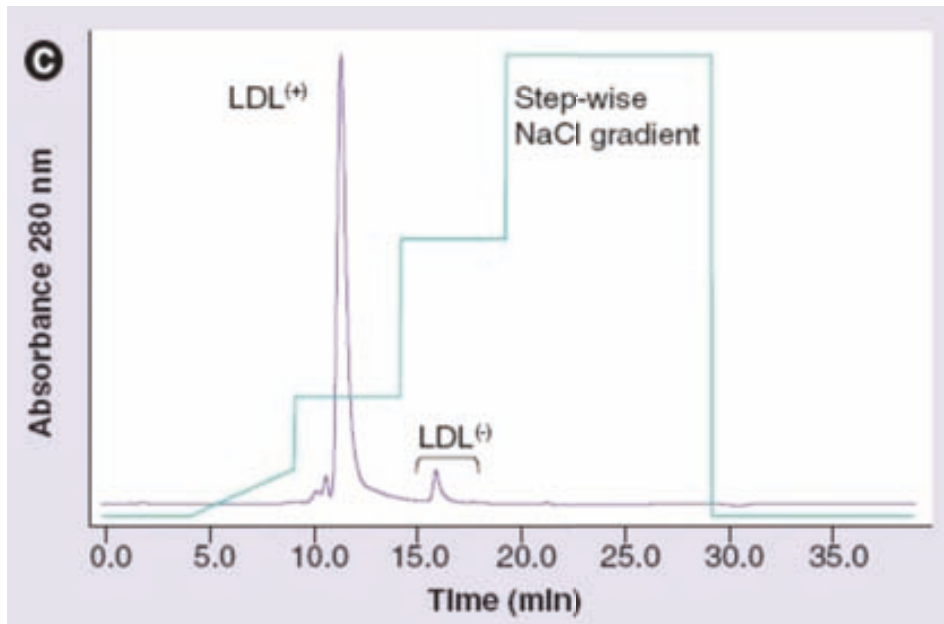


Figura 8: Cuantificación del porcentaje de LDL electronegativa en cromatografía de intercambio aniónico y utilizando un gradiente de cloruro de sodio.

La LDL oxidada (LDL ox) y la LDL glicosilada (LDL glicada) se cuantificaron mediante ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas ⁽¹⁹⁹⁾ (Oxidized LDL; Mercodia, Uppsala, Suecia y Glycacor; Exocell, Philadelphia USA, respectivamente), según las instrucciones del fabricante.

La lipoproteína a (Lp(a)) se midió mediante un ensayo turbidimétrico utilizando un método comercial (Quantia Lp(a), Abbott, Illinois, USA) con un límite de detección de 70mg/L.

Finalmente, la actividad paroxonasa/arilesterasa 1 (PON1) se cuantificó a partir de muestras conservadas en EDTA y utilizando ácido fenilacético como sustrato. En breve resumen, 2 μ L de suero se incubaron con 200 μ L de tampón (20 mmol /L de Tris-HCl, 2 mmol /L CaCl_2 , pH 8,0) que contenía 3 mmol/L de ácido fenilacético (23 μ l de ácido fenilacético en 50 mL de tampón de ensayo). Con este tampón se midió la actividad arilesterasa sensible a EDTA específica de PON1. No obstante, dado que existen en plasma otras actividades arilesterasa resistentes a EDTA, la actividad específica de PON1 se midió en paralelo, utilizando el mismo tampón pero con 2 mmol/L de EDTA en lugar de CaCl_2 . La cinética enzimática se monitorizó a 270 nm durante 10 minutos a 25°C (coeficiente de extinción molar a 270 nm del fenol $\epsilon_{270}=1,310 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) en placas de micro-

titer de 96 pocillos para la detección en UV (Greiner). La actividad se calculó a partir de la ecuación $[(\Delta\text{abs}/\text{min}) * \text{final vol}] / (1,310 * \text{sample vol})$ y se expresó como $\mu\text{mol}/\text{min} * \text{mL}$.

5.4.- Determinación de marcadores de inflamación y adipoquinas

Las determinaciones de marcadores de inflamación y adipoquinas incluyeron la proteína C reactiva (PCR), interleucina 6 (IL-6), proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MCP1), factor de crecimiento transformante β (TGF β), leptina y adiponectina. La PCR se midió por un método comercial de alta sensibilidad (hsCRP, Roche Diagnostics) en un autoanalizador Hitachi 917. IL-6, MCP1, TGF, leptina y adiponectina se cuantificaron mediante ELISA de Bender Medsystems (IL-6, MCP1 y TGF β) o de R&D (leptina y adiponectina).

6- Estadística

El análisis estadístico se realizó con los paquetes estadísticos SPSS 17.0 y 18.0 (SPSS Inc.).

La normalidad de los datos se analizó mediante el test de Kolmogorov-Smirnov para muestras con más de 30 sujetos o con el test de Shapiro-Wilk para muestras con menos de 30 sujetos. En todos los casos se estableció como umbral de significación una $p < 0.05$. Las variables cualitativas se expresan como porcentaje (%) y número de casos (n). Las variables cuantitativas de distribución normal se expresan como media y desviación estándar y las de distribución no normal se expresan como mediana y rango.

La relación entre variables cualitativas se analizó mediante la prueba Chi-cuadrado. Las pruebas T-Student y Mann-Whitney se utilizaron para estudiar las diferencias entre muestras independientes. En los casos en que se analizaron la relación entre dos variables cuantitativas, se utilizaron el coeficiente de Pearson o Spearman, en función de la distribución de las variables incluidas en el análisis.

Para estudiar la relación de varias variables independientes sobre una variable dependiente se utilizaron el análisis de regresión logística simple y múltiple (con método en pasos hacia atrás) y el análisis de la varianza (ANOVA) y de la covariancia (ANCOVA). En el análisis de regresión logística, la bondad de ajuste se evaluó según el test de Hosmer-Lemeshow y el índice de discriminación mediante la curva ROC. Por otra parte, las variables de distribución no normal fueron transformadas a logaritmo (\log_{10}) previo a la inclusión en la ANOVA. Asimismo, se comprobó la normalidad de las variables incluidas en la ANOVA mediante el test de Kolmogorov-Smirnov y se comprobó la homogeneidad de variancias mediante la prueba de contraste de Levène.

Finalmente, en el caso de los estudios longitudinales, se utilizó la prueba T para muestras pareadas, el test de Wilcoxon y los análisis de correlación de Spearman y de Pearson.

RESULTADOS

I. RESULTADOS DEL ESTUDIO OBESIDAD-VITD

Este estudio se diseñó para determinar la relación entre el síndrome metabólico, el grado de obesidad y la insulinoresistencia con la presencia de hipovitaminosis D. Para ello se estudiaron 343 sujetos con diferentes grados de sobrepeso y obesidad. Las características clínicas y bioquímicas de los pacientes se muestran en la **tabla 8**. Todos los sujetos eran caucásicos.

Disponíamos de información acerca de la edad, parámetros antropométricos, presencia de síndrome metabólico y calcidiol en la totalidad de los pacientes, mientras que la información acerca de la insulinemia y el índice HOMA estaba presente en 250 (73%) pacientes.

Tabla 8: Características clínicas y bioquímicas de los 343 pacientes con sobrepeso y obesidad.

Edad (años)	42 ± 11
Hombres (%(n))	34.1 (117)
Peso (Kg)	87 (52.8-180)
IMC (Kg/m ²)	32.1 (25.0-67.8)
-25-29.9 (%(n))	34.1 (119)
-30-34.9 (%(n))	28.9 (99)
-35-39.9 (%(n))	15.2 (52)
->40 (%(n))	21.3 (73)
Cintura (cm)	104 (78-155)
Síndrome metabólico (%(n))	13.4 (46)
Hipovitaminosis D (%(n))	52 (182)
Glicemia (nmol/L)	4.9 (3.1-16.6)
Insulinemia (uUI/mL)	10.8 (2.1-53.6)
HOMA	2.31 (0.38-15.0)
Calcidiol (nmol/L)	47.8 (10.3-189.8)

Los datos se presentan como media ± DE, mediana (rango) o % y número de pacientes.

Hipovitaminosis D se definió como niveles de calcidiol ≤ 50 nmol/L

HOMA = Homeostasis Model Assessment

1- Comparación de los pacientes con y sin síndrome metabólico

Los pacientes que presentaban síndrome metabólico (13.4%) tenían mayor edad (51 ± 9 vs. 41 ± 11 años; p= 0.000), mayor IMC (36.8 (25.0-56.9) vs. 31.6 (25.0-67.8) Kg/m²; p=0.000), mayor circunferencia de cintura (115 (92-150) vs. 103 (78-155) cm; p=0.000) y mayor índice HOMA (4.8 (1.8-15.0) vs. 2.2 (0.4-13.1); p=0.000). Por otra parte, las concentraciones de calcidiol fueron menores en los pacientes con síndrome metabólico, comparado con los pacientes sin síndrome

metabólico (37.8 (25.0-67.0) vs. 51.2 (10.3-189.8) nmol/L; $p= 0.001$) de manera que el 78.3% de los sujetos con síndrome metabólico y el 49,2% de los sujetos sin síndrome metabólico presentaron hipovitaminosis D ($p=0.000$). A pesar de que sabemos que pacientes con elevados índices de exposición solar pueden presentar concentraciones de calcidiol > 200 nmol/L ⁽²⁰⁰⁾, incluso tras excluir los dos sujetos con concentraciones de calcidiol >150 nmol/L presentes en el grupo de pacientes sin síndrome metabólico, las diferencias siguieron siendo significativas.

2- Comparación de los pacientes con hipovitaminosis D (calcidiol ≤ 50 nmol/L) y sin hipovitaminosis D (calcidiol > 50 nmol/L)

Comparado con los pacientes con niveles normales de calcidiol, los pacientes con hipovitaminosis D (52%) tenían mayor IMC (34.9 (25.0-67.8) vs. 30.6 (25.3-53.5) Kg/m²; $p=0.000$), mayor circunferencia de cintura (110 (81-155) vs. 101 (78-150) cm; $p=0.000$) y mayor índice HOMA (2.6 (0.5-13.1) vs. 2.3 (0.4-15.0); $p=0.021$). La proporción de pacientes con síndrome metabólico fue mayor en los pacientes con hipovitaminosis D que en los pacientes con niveles normales de vitamina D (19,8% vs 6,2%; $p =0.000$). No hubieron diferencias en cuanto a la edad de los pacientes con o sin hipovitaminosis D. El porcentaje de varones en el grupo de hipovitaminosis D fue superior que en el grupo de pacientes con concentraciones normales de vitamina D (47.3 vs.19.3%; $p= 0.000$).

3- Distribución del estado de la vitamina D en función del grado de obesidad y la presencia de síndrome metabólico

La distribución del estado de la vitamina D según el grado de obesidad se muestra en la **tabla 9**. Observamos que la proporción de pacientes con hipovitaminosis D aumenta a medida que se incrementa el grado de obesidad.

Tabla 9: Distribución del estado de la vitamina D según el grado de obesidad.

Grado de obesidad	Estado de la Vitamina D	
	Normal	Hipovitaminosis D
Sobrepeso	58 % (n= 69)	42 % (n=50)
Obesidad grado I	57.6 % (n=57)	42.4 % (n= 42)
Obesidad grado II	44.2 % (n=23)	55.8 % (n=29)
Obesidad grado III	16.4 % (n= 12)	83.6 % (n= 61)
Total	46.9 % (n=161)	53.1 % (n= 182)

Datos presentados como porcentaje y número de pacientes para cada grado de obesidad.

P=0.000, según test Chi-cuadrado.

Hipovitaminosis D definida como niveles de calcidiol \leq 50 nmol/L.

En la **tabla 10** se muestra la distribución del estado de la vitamina D considerando conjuntamente el grado de obesidad y la presencia o ausencia de síndrome metabólico. Como ya hemos comentado, los pacientes con síndrome metabólico presentaban mayor prevalencia de hipovitaminosis D que los pacientes sin él (78.3% vs. 49.2%; p=0.000). Además, podemos observar que en los pacientes sin síndrome metabólico la hipovitaminosis D era predominante únicamente en los pacientes con IMC $>$ 35 Kg/m²; sin embargo, en los pacientes con síndrome metabólico, la proporción de pacientes con hipovitaminosis D predominaba en todos los grupos de obesidad.

Tabla 10: Distribución del estado de la vitamina D considerando el grado de obesidad y la presencia o no de síndrome metabólico

IMC (Kg/m ²)	Ausencia de síndrome metabólico		Presencia de síndrome metabólico	
	Normal	Hipovitaminosis D	Normal	Hipovitaminosis D
25-29.9	22.9% (n=68)	15.4% (n=46)	2.2% (n=1)	8.7% (n=4)
30 -34.9	18.2% (n=54)	10.4% (n=31)	6.5% (n=3)	23.9% (n=11)
35-39.9	6.7% (n=20)	8.4% (n=25)	6.5% (n=3)	8.7% (n=4)
> 40	3.0% (n=9)	14.8% (n=44)	6.5% (n=3)	37% (n=17)
Total	50.8% (n=151)	49.2% (n=146)	21.7% (n=10)	78.3% (n=36)

Datos expresados como porcentaje total y número de pacientes para los grupos de sujetos con y sin síndrome metabólico

Hipovitaminosis D definida como niveles de calcidiol \leq 50 nmol/L.

4- Factores asociados a la hipovitaminosis D

Se realizó un análisis de regresión logística múltiple con pasos hacia atrás donde la presencia/ausencia de hipovitaminosis D fue la variable dependiente y la presencia/ausencia de SM, el grado de obesidad, el índice HOMA y el sexo fueron las variables independientes. A pesar de que la edad no fue diferente en los pacientes con o sin hipovitaminosis D, se introdujo como covariable. Para la introducción del índice HOMA en la regresión logística, se categorizó esta variable en tres grupos de acuerdo con los límites superiores de los cuartiles 1 y 3 como puntos de corte. Se analizaron las interacciones del síndrome metabólico con el grado de obesidad y el índice HOMA. Por otra parte, a pesar de que los perímetros de cintura fueron diferentes en los grupos con y sin hipovitaminosis D, esta variable no se incluyó en el análisis por presentar una elevada colinealidad con el IMC en los test de colinealidad. El análisis se llevó a cabo con los 250 pacientes de los que disponíamos de toda la información. El test de Hosmer-Lemeshow no mostró diferencias significativas entre los valores observados y los esperados ($p=0,492$), denotando una adecuada bondad de ajuste. Los resultados mostraron una ausencia de interacciones entre el síndrome metabólico y el grado de obesidad o el índice HOMA en su asociación con la hipovitaminosis D. Como observamos en la **tabla 11**, únicamente el sexo, la presencia del síndrome metabólico y el grado de obesidad fueron las variables asociadas a la presencia de hipovitaminosis D.

Tabla 11: Variables relacionadas con la presencia de hipovitaminosis D en sujetos con sobrepeso-obesidad (n=250)

	Significación (p)	Odds ratio	IC 95
Sexo:	0.010		
- Mujer (n=171)		Referencia	
- Hombre (n=79)		2,6	1.5-4.8
Síndrome metabólico	0,038		
-No (n= 219)		Referencia	
- Si (n= 31)		2.5	1.1-6.0
Grado de obesidad	0,015		
-Sobrepeso (n= 87)		Referencia	
-Obesidad grado I (n= 84)		0.8	0.4-1.6
-Obesidad grado II(n= 41)		1.3	0.6-2.9
-Obesidad grado III (n= 38)		3.7	1.5-9.5

Resultados del último paso de la regresión logística múltiple con hipovitaminosis D como variable dependiente y SM, grado de obesidad, índice HOMA, sexo y edad, como variables independientes.
Hipovitaminosis D definida como niveles de calcidiol ≤ 50 nmol/L.

Dado que la introducción de la variable HOMA en el modelo de regresión logística, limitaba nuestro análisis a 250 pacientes, procedimos a realizar de nuevo el análisis de regresión logística múltiple, introduciendo únicamente el sexo, el grado de obesidad y la presencia/ausencia de síndrome metabólico como variables independientes. Esto nos permitió poder incluir la totalidad de la muestra (n=343) en el análisis, dado que disponíamos de información acerca del grado de obesidad y de la presencia/ausencia de síndrome metabólico en todos los pacientes. En este caso, el test de Hosmer-Lemeshow también observó una bondad de ajuste buena ($p=0.514$). Los resultados de la prueba se muestran en la **tabla 12**.

Tabla 12: Variables relacionadas con la presencia de hipovitaminosis D en sujetos con sobrepeso-obesidad (n= 343)			
	Significación (p)	Odds ratio	IC 95
Sexo:	0.000		
- Mujer (n=226)		Referencia	
- Hombre (n=117)		2.8	(1.7-4.8)
Síndrome metabólico	0,011		
-No (n= 219)		Referencia	
- Si (n= 31)		2.7	1.3-6.1
Grado de obesidad	0,001		
-Sobrepeso (n= 87)		Referencia	
-Obesidad grado I (n= 84)		0.8	0.5-1.5
-Obesidad grado II(n= 41)		1.3	0.7-2.7
- Obesidad grado III (n= 38)		4.0	1.8-8,6

Resultados de la regresión logística múltiple con hipovitaminosis D como variable dependiente y SM y grado de obesidad como variables independientes.
Hipovitaminosis D definida como niveles de calcidiol ≤ 50 nmol/L.

Con el objetivo de analizar si el conocimiento del grado de obesidad y de la presencia de síndrome metabólico nos permite tener una idea fiable acerca de la presencia de hipovitaminosis D, realizamos una curva ROC (índice de discriminación), partiendo del último modelo de regresión logística que incluyó únicamente el sexo, grado de obesidad y la presencia/ausencia de síndrome metabólico como variables independientes. Esta curva ROC muestra un área bajo la curva (AUC) de 0.723 (IC 0.670-0.777). El AUC obtenido analizando el grado de obesidad por separado fue 0.657 (IC 0.600-0.715; $p=0.000$), el obtenido al analizar aisladamente el síndrome metabólico fue 0.568 (IC 0.507-0.628; $p=0.030$) y el obtenido al analizar aisladamente el sexo fue 0.640 (0.682-0.798; $p=0.000$). El resultado gráfico se muestra en la **figura 9**.

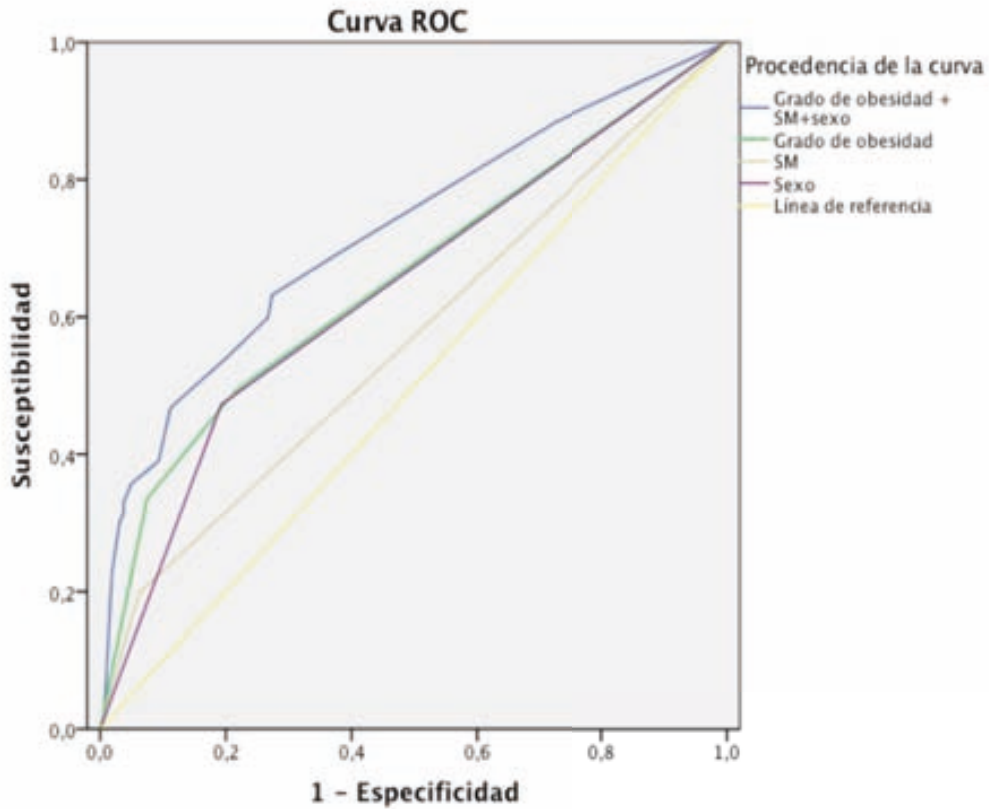


Figura 9: Curva ROC para determinar la discriminación del conocimiento del sexo, el grado de obesidad, el síndrome metabólico y de las tres variables a la vez sobre la predicción de la presencia de hipovitaminosis D. SM: síndrome metabólico.

Como hemos comentado, la variable HOMA no resultó significativa en el análisis de regresión logística múltiple, a pesar de verse asociada a la presencia de hipovitaminosis D cuando se realiza una regresión logística simple con el índice HOMA categorizado como única variable independiente (**tabla 13**).

Tabla 13: Asociación del índice HOMA con la hipovitaminosis D en sujetos con sobrepeso-obesidad (n=250)				
		Significación (p)	Odds ratio	IC 95
HOMA		0.04		
.	I (HOMA 0.4-1.5) (n=63)		Ref.	
.	II(HOMA 1.5-3.7) (n=125)		1.0	0,5-1,8
.	III(HOMA 3.7-15.0) (n=62)		2.1	1.1-4.3

Resultados de la regresión logística simple con hipovitaminosis D como variable dependiente índice HOMA categorizado en función del límite superior de los cuartiles 1 y 3 como variable independiente.

HOMA= Homeostasis Model Assessment.

Hipovitaminosis D se refiere a niveles de calcidiol ≤ 50 nmol/L.

Finalmente, con el objetivo de evaluar la influencia del perímetro de cintura en vez del grado de obesidad sobre la presencia de hipovitaminosis D, realizamos un análisis de regresión logística múltiple con la presencia/ausencia de síndrome metabólico, el perímetro de cintura y el sexo como variables independientes. Igual que en el caso del índice HOMA, para la introducción del perímetro de cintura en la regresión logística, se categorizó esta variable en tres grupos de acuerdo con el límite superior de los cuartiles 1 y 3 como puntos de corte. Se observó una asociación de las tres variables con la presencia de hipovitaminosis D, sin observarse interacción entre ellas (**tabla 14**). El test de Hosmer-Lemeshow también mostró una bondad de ajuste buena ($p=0.356$).

Tabla 14: Relación del perímetro de cintura y del síndrome metabólico con la presencia de hipovitaminosis D en sujetos con sobrepeso-obesidad (n= 343)			
	Significación (p)	Odds ratio	IC 95
Sexo:	0.000		
- Mujer (n=226)		Referencia	
- Hombre (n=117)		2.8	1.7-4.9
Síndrome metabólico	0.008		
-No (n= 219)		Referencia	
- Si (n= 31)		2.9	1.3-6.2
Perímetro de cintura	0.000		
-I (cintura 78-95) (n=76)		Referencia	
-II (cintura 95-117) (n= 178)		1.5	0.8- 2.7
- III (cintura 117-155) (n= 89)		5.1	2.4-10.7

Resultados de la regresión logística múltiple con hipovitaminosis D como variable dependiente y síndrome metabólico y perímetro de cintura como variables independientes.
El perímetro de cintura se muestra categorizado en función del límite superior de los cuartiles 1 y 3.

II. RESULTADOS DEL ESTUDIO DM2-VITD

Este estudio se diseñó para determinar la relación de la hipovitaminosis D con los parámetros relacionados con el síndrome metabólico y con el control glucémico en sujetos con diabetes tipo 2. Para ello realizamos un estudio transversal con 63 pacientes con diabetes tipo 2 y un estudio longitudinal en un subgrupo de 20 pacientes antes y después de la optimización del control glucémico.

1- Resultados del estudio transversal

Las características clínicas y antropométricas de los 63 sujetos con diabetes mellitus tipo 2 incluidos en el análisis transversal se muestran en la **tabla 15**. Todos los sujetos eran caucásicos.

Las concentraciones medias de calcidiol fueron 63.6 ± 25.5 nmol/L, de manera que un 25.4% de los sujetos presentaban concentraciones normales de vitamina D, mientras que un 74.6% presentaban hipovitaminosis D, definida ésta por concentraciones de calcidiol ≤ 80 nmol/L.

Tras dividir el año en dos periodos de 6 meses en función del grado de exposición solar, se observó que las determinaciones analíticas de estudio fueron realizadas en la época de menor exposición solar (noviembre-abril) en 48 sujetos (76.2%) y en la época de mayor exposición solar (mayo-octubre) en 15 pacientes (23.8%). No hubieron diferencias significativas en las concentraciones de calcidiol según el periodo de exposición solar, siendo la concentración media de calcidiol en la época de menor exposición solar de 62.2 ± 25.9 nmol/L y en la época de mayor exposición solar de 68.2 ± 24.4 nmol/L.

Tabla 15: Características clínicas y antropométricas de los 63 pacientes con diabetes mellitus tipo 2 incluidos en el estudio transversal

Edad (años)	60±9.8
Sexo (% hombres(n))	69.8 (44)
IMC (Kg/m ²)	30.3±5.6
Sobrepeso u obesidad %(n)	63.5 (40)
Perímetro de cintura (cm)	105.1±13.6
Duración de la diabetes (años)	11.5±9.5
HbA1c (%)	9.4±2.1
Complicaciones de la diabetes %(n):	
- Retinopatía	41.3 (26)
- Nefropatía	34.9 (22)
- Polineuropatía	38.1 (24)
- Cardiopatía isquémica	12.7 (8)
- EVC	4.8 (3)
- EVP	14.3 (9)
Tratamiento para la diabetes (%):	
- Ninguno	17 (11)
- Agentes orales	16 (10)
- Agentes orales + insulina	32 (20)
- Insulina	35 (22)
Tratamiento antihipertensivo %(n)	66.7 (42)
Fármacos hipolipemiantes %(n)	36.5 (23)

Datos expresados como media+ DE ó %(n)

IMC= índice de masa corporal

HbA1c= hemoglobina glicosilada

EVC= enfermedad vascular cerebral

EVP= enfermedad vascular periférica

1.1- Comparación de los pacientes con hipovitaminosis D (calcidiol ≤ 80 nmol/L) y sin hipovitaminosis D (calcidiol > 80 nmol/L)

Edad y Sexo:

No se observaron diferencias en la edad (59.6±10.2 vs. 61.1±8.7 años; p=0.599) y el sexo (70.2 vs. 68.8 % hombres; p=0,912) en los pacientes con o sin hipovitaminosis D.

Parámetros antropométricos:

El IMC y el porcentaje de pacientes con sobrepeso u obesidad (pacientes con IMC > 25 Kg/m²), fueron superiores en los pacientes con hipovitaminosis D frente a los pacientes con concentraciones normales de vitamina D (31.2±5.7 vs. 27.7±4.4 Kg/m²;p= 0.03 y 72.3 vs. 37.5%;

p= 0.012, respectivamente). Además, el perímetro de la cintura mostró una tendencia a ser superior en los pacientes con hipovitaminosis D (107.1 ± 15.1 vs. 100.6 ± 8.1 cm.; p=0.052).

Características de la diabetes:

La duración de la diabetes fue similar en los pacientes con y sin hipovitaminosis D (11.5 ± 9.7 vs. 11.7 ± 9.2 años; p= 0.937). Tampoco hubo diferencias en el grado de control metabólico, siendo la HbA1c media de $9.5 \pm 1.9\%$ en los pacientes con hipovitaminosis D y de $9.2 \pm 2.7\%$ en los pacientes sin hipovitaminosis D (p=0.660). En la **tabla 16** se muestra la prevalencia de complicaciones de la diabetes en función de la presencia o ausencia de hipovitaminosis D.

Tabla 16: Presencia de complicaciones de la diabetes en función de la presencia/ausencia de hipovitaminosis D (n= 63)

	Vitamina D normal (n=47)	Hipovitaminosis D (n=16)	p
Retinopatía	46.8 (22)	25 (4)	0.126
Nefropatía	38.3 (18)	25.4 (16)	0.335
Polineuropatía	36.2 (17)	43.8 (7)	0.590
Cardiopatía isquémica	14.9 (7)	6.3 (1)	0.370
EVC	6.4 (3)	0 (0)	0.300
EVP	17 (8)	6.3 (1)	0.288

Datos presentados como porcentaje y número de pacientes. Valores de p de acuerdo con la prueba Chi-cuadrado.

EVC = enfermedad vascular cerebral.

EVP= enfermedad vascular periférica.

No hubo diferencias en la prevalencia de hipovitaminosis D en función de si el paciente recibía o no tratamiento con antidiabéticos orales o insulina. Tampoco observamos diferencias en cuanto al porcentaje de pacientes que estaban tratados con hipolipemiantes o antihipertensivos.

Parámetros analíticos lipídicos, marcadores de inflamación y adipoquinas:

En las **tablas 17 y 18** se muestran las concentraciones de los parámetros lipídicos y los marcadores de inflamación y adipoquinas en la totalidad de pacientes y en los subgrupos de pacientes con y sin hipovitaminosis D.

Tabla 17: parámetros lipídicos, marcadores de inflamación y adipocinas en los pacientes con diabetes tipo 2 y en función de la presencia/ausencia de hipovitaminosis D (n= 63)

	Todos (n=63)	Hipovitaminosis D (n=47)	Vitamina D normal (n=16)	p
Colesterol total (mmol/L)	4.8±1.2	4.9±1.1	4.6±1.4	0.391
Triglicéridos (mmol/L)	1.5 (0.3-10.7)	1.5 (0.5-10.7)	1.1 (0.3-4.8)	0.050
cHDL (mmol/L)	1.2±0.3	1.1±0.3	1.3±0.3	0.051
cLDL (mmol/L)	2.9±0.9	2.9±0.9	2.8±1.1	0.596
cVLDL (mmol/L)	0.7 (0.1-3.6)	0.7 (0.2-3.6)	0.4 (0.1-1.6)	0.011
AGL (mmol/L)	0.6 (0.2-2.3)	0.6 (0.2-2.3)	0.6 (0.1-0.2)	0.641
ApoAI (g/L)	1.4±0.3	1.4±0.3	1.5±0.2	0.106
ApoAII (mg/dL)	34.4±7.0	33.9±7.3	35.8±6	0.371
ApoB (g/L)	0.9±0.3	1.0±0.2	0.9±0.3	0.214
Tamaño LDL (nm)	25.7±0.5	25.6±0.6	25.9±0.4	0.135
LDL ox (U/L)	63.0±24.0	64.9±23.9	57.8±24.0	0.313
LDL glicada (mg/dL)	2.2±1.2	2.4±1.3	1.8±0.7	0.102
LDL - (%)	7.2±2.4	7.4±2.6	6.8±1.8	0.438
PON1 (µmol/min*mL)	79.8±25.7	81.3±27.9	74.5±15.9	0.405
PCR (mg/L)	2.6 (0.2-17.7)	3.3 (0.4-17.7)	1.9 (0.2-17.5)	0.033
Leptina (ng/L)	7112 (925-54175)	7667.5 (925-54175)	6723 (1157-13550)	0.198
Adiponectina (µg/L)	2904.6±1995.1	2997.3±1895.1	2643.9±574.9	0.547
MCP-1 (ng/L)	191.5±102.6	199.3±105.9	170.0±92.8	0.332
IL-6 (ng/L)	1.2(0.0-27.0)	1.2 (0.0-19.2)	0.9 (0.0-27.0)	0.261
TGFβ (ng/L)	21.3 (1.4-209.7)	21.3 (1.4-209.7)	21.8 (1.7-109.4)	0.549

Valores de p de acuerdo con la pruebas T-student o U-Mann-Whitney según corresponda.

Hipovitaminosis D = calcidiol ≤ 80 nmol/L.

AGL= ácidos grasos libres

ApoAI y ApoAII = apolipoproteínas AI y AII.

ApoB = Apolipoproteína B

LDL ox = LDL oxidada

LDL - = LDL electronegativa

PON1= actividad arilesterasa de PON1 (paraoxonasa)

PCR = proteína C reactiva

MCP-1 = proteína quimiotáctica de monocitos 1

IL-6 = interleucina 6

TGF-β = factor de crecimiento transformante β

Tabla 18: Composición de HDL en los 50 pacientes con diabetes tipo 2 de los que disponíamos información

	Todos (n=50)	Hipovitaminosis D (n= 38)	Vitamina D normal (n= 12)	p
Colesterol (%)	16.4±2.6	15.9±2.3	17.9±2.8	0.013
Triglicéridos (%)	5.0±2.1	5.5±2.1	3.6±1.3	0.007
Fosfolípidos (%)	32.6±3.3	32.5±3.3	33.0±3.6	0.700
ApoAI (%)	32.5±5.6	32.2±5.6	33.0±5.6	0.640
ApoAII (%)	13.4±3.2	13.7±3.5	12.5±2.0	0.281

Valores de p de acuerdo con la pruebas T-student o U-Mann-Whitney, según corresponda.

Hipovitaminosis D= calcidiol ≤ 80nmol/L.

ApoAI y ApoAII = apolipoproteínas AI y AII.

Con el objetivo de evaluar la influencia de la época del año en las diferencias observadas, se realizó un análisis de la varianza de dos factores (ANOVA) con las variables en las que se encontraron diferencias entre los pacientes con y sin hipovitaminosis D en las pruebas T y Mann-Whitney, tras ajustar por la época del año (menor o mayor exposición solar). Tras incluir en el

análisis las variables IMC, cintura, triglicéridos, cVLDL, cHDL, contenido de colesterol de las HDL, contenido de triglicéridos y PCR, se observó una pérdida en la significación en el perímetro de cintura, mientras que el resto de variables mostraron diferencias con una significación de magnitud similar a la observada en la prueba T. En la **tabla 19** se muestra la significación de la relación de cada variable cuantitativa estudiada con las variables independientes (hipovitaminosis D y época del año).

Tabla 19: Variables que mostraron diferencias en las pruebas T/Mann-Whitney para la presencia/ausencia de hipovitaminosis D y su relación con las variables hipovitaminosis D y la época del año

Variables dependientes	Variables independientes	P
IMC	Hipovitaminosis D	0.027
	Época del año	0.177
Perímetro de cintura	Hipovitaminosis D	0.112
	Época del año	0.642
Triglicéridos	Hipovitaminosis D	0.041
	Época del año	0.021
cHDL	Hipovitaminosis D	0.052
	Época del año	0.754
cVLDL	Hipovitaminosis D	0.005
	Época del año	0.120
Contenido de colesterol de HDL	Hipovitaminosis D	0.033
	Época del año	0.034
Contenido de triglicéridos de HDL	Hipovitaminosis D	0.009
	Época del año	0.563
PCR	Hipovitaminosis D	0.035
	Época del año	0.910

Se muestran los niveles de significación atendiendo a ANOVA de dos factores tomando hipovitaminosis D y época del año como variables independientes.

IMC = índice de masa corporal.

PCR = proteína C reactiva.

Las medias estimadas de cada variable en función de la presencia o ausencia de hipovitaminosis D que se derivan del resultado de la ANOVA de dos factores se muestran en la **tabla 20**. Las variables que fueron transformadas en logaritmo para su inclusión en la ANOVA se muestran reconvertidas a su magnitud habitual.

Tabla 20: Medias estimadas de las variables que mostraron diferencias en las pruebas T/Mann-Whitney para la presencia/ausencia de hipovitaminosis D, tras su ajuste por la época del año

variables	Hipovitaminosis D	Medias estimadas ± error típico
IMC	Si	31.7 ± 0.9
	No	28.2 ± 1.4
Perímetro de cintura	Si	107.7 ± 2.6
	No	101.1 ± 3.5
Triglicéridos	Si	1.9 ± 1.1
	No	1.3 ± 1.2
cHDL	Si	1.1 ± 0.0
	No	1.3 ± 0.1
cVLDL	Si	0.8 ± 1.1
	No	0.5 ± 1.2
Contenido de colesterol de HDL	Si	15.3 ± 1.0
	No	17.0 ± 1.0
Contenido de triglicéridos de HDL	Si	5.6 ± 0.4
	No	3.8 ± 0.6
PCR	Si	3.4 ± 1.2
	No	1.8 ± 1.3

Resultados obtenidos con la ANOVA de dos factores tomando hipovitaminosis D y época del año como variables independientes.
 IMC = índice de masa corporal.
 PCR = proteína C reactiva.

Seguidamente, se realizó un análisis de la covarianza (ANCOVA), para ajustar no sólo por la época del año, sino también por el IMC (variable que mostró la asociación más fuerte con la hipovitaminosis D en la prueba T). En este caso, sólo las variables cVLDL y contenido de triglicéridos de las HDL, permanecieron significativas. En la **tabla 21** se muestra la significación de la relación de cVLDL y contenido en triglicéridos de HDL con las variables independientes (hipovitaminosis D, época del año e IMC).

Tabla 21: Variables que se asociaron a la hipovitaminosis D tras ajustar por la época del año y el IMC

Variables dependientes	Variables independientes	p
cVLDL	Hipovitaminosis D	0.029
	Época del año	0.232
	IMC	0.026
Contenido en triglicéridos de HDL	Hipovitaminosis D	0.018
	Época del año	0.660
	IMC	0.432

Se muestran los niveles de significación para las variables independientes introducidas en la ANCOVA (hipovitaminosis D, época del año e IMC).

Las medias estimadas de cVLDL y contenido en triglicéridos de HDL en función de la presencia o ausencia de hipovitaminosis D que se derivan del resultado de la ANCOVA se muestran en la

tabla 22. Las variables que fueron transformadas en logaritmo para su inclusión en la ANCOVA se muestran reconvertidas a su magnitud habitual.

Tabla 22: Medias estimadas de cVLDL y Contenido en triglicéridos de HDL tras realizar el ajuste por época del año e IMC

Variables	Hipovitaminosis D	Medias estimadas \pm error típico
cVLDL	Si	0.7 \pm 1.1
	No	0.5 \pm 1.2
Contenido en triglicéridos de HDL	Si	5.5 \pm 0.4
	No	3.8 \pm 0.6

Resultados derivados de la ANCOVA de dos factores con hipovitaminosis D, época del año e IMC como variables independientes.

2- Resultados del estudio longitudinal

En los 20 pacientes con diabetes tipo 2 y control glucémico deficiente incluidos en el estudio transversal, evaluamos el efecto de la optimización del control glucémico sobre las concentraciones de calcidiol. Las medidas implementadas fueron las propias de la práctica clínica habitual, según las características del paciente y de la diabetes. Las características clínicas de este subgrupo de pacientes se muestran en la **tabla 23**.

Tabla 23: Características basales de los sujetos con diabetes tipo 2 incluidos en el estudio longitudinal (n=20)

Edad (años)	63.6 \pm 10.5
Sexo (% hombres(n))	65 (13)
IMC inicial (Kg/m ²)	28.9 \pm 5
Sobrepeso u obesidad (%(n))	75 (15)
Tiempo de evolución de la diabetes	15.9 \pm 10.2
HbA1c (%)	10.0 \pm 2.0
Tratamiento para la diabetes (%(n)):	
- Nada	5 (1)
- Agentes orales (AO)	5 (1)
- AO+insulina	35 (7)
- Insulina	55 (11)
Calcidiol (nmol/L)	72.7 \pm 33.3
Hipovitaminosis D (%)	55 (11)

Datos expresados como media + DE ó %(n)

IMC= índice de masa corporal.

La duración media del seguimiento fue de 4,9 \pm 2.9 meses. Tras este periodo de tiempo, la HbA1c disminuyó de 9.4 (7.6-14.8) a 7.3 (6.3-8.7) % (p=0.000). Al final del periodo de

seguimiento, 3 pacientes (15%) estaban en tratamiento con antidiabéticos orales, 2 pacientes (10%) con antidiabéticos orales e insulina y el resto (75%) únicamente con insulina, siendo en la mayoría pautas de insulina bolo-basal.

En la **tabla 24** mostramos la evolución de los parámetros antropométricos, la HbA1c, el calcidiol y del resto de parámetros analíticos determinados antes y después de la mejoría del control glucémico. Aunque los parámetros antropométricos no se modificaron, como era de esperar, la HbA1c y los parámetros lipídicos relacionados con la dislipemia diabética mejoraron. Las concentraciones de calcidiol también se redujeron de forma significativa después de la optimización del control glucémico.

Tabla 24: Características clínicas y bioquímicas de los 20 pacientes con diabetes tipo 2 antes y después de la mejoría del control glucémico

	Antes	Después	p
HbA1c (%)	9.4 (7.6-14.8)	7.3 (6.2-8.7)	0.000
Calcidiol (nmol/L)	72.7±33.3	59.0±21.0	0.035
IMC (Kg/m ²)	28.8±5.1	28.7±5.5	0.946
Cintura (cm)	105.3±13.8	106.1±16.7	0.670
Colesterol total (mmol/L)	4.5 (3.6-7.7)	4.4 (3.4-5.7)	0.926
Triglicéridos (mmol/L)	1.1 (0.5-10.5)	0.9 (0.5-2.8)	0.167
cLDL (mmol/L)	2.7±0.5	2.6±0.6	0.605
cHDL (mmol/L)	1.3±0.4	1.4±0.4	0.055
cVLDL (mmol/L)	0.5 (0.2-4.7)	0.4 (0.2-1.5)	0.156
AGL (mmol/L)	0.7±0.4	0.5±0.2	0.020
ApoAI (g/L)	1.4 ±0.3	1.5 ±0.2	0.012
ApoAII (g/L)	33.0±6.3	36.9±5.7	0.019
ApoB (g/L)	0.9±0.2	0.8±0.2	0.049
Tamaño LDL (nm)	25.9 (23.7-26.7)	25.7 (24.9-26.4)	0.546
LDL- (%)	6.2 (4.4-18.3)	5.9 (3.3-12.5)	0.184
LDLox (U/L)	61.4±20.8	56.4±19.7	0.369
LDL glicada (mg/dL)	2.2±0.9	2.0±0.8	0.277
PON1 (µmol/min*mL)	81.5±25.1	93.0±20.6	0.127
PCR (mg/L)	1.5 (0.2-9.2)	1.5 (0.2-8.3)	0.314
Leptina (ng/L)	5852.7±3078.8	6672.5±4408.0	0.307
Adiponectina (µg/L)	2750 (625-8028)	2400 (826-11495)	0.747
MCP-1 (ng/L)	227.3 (127.3-393.8)	201.2 (122.7-795.0)	0.507
IL-6 (ng/L)	0.7 (0.4-6.2)	1.0 (0.5-2.7)	0.872
TGFβ (ng/L)	35.5 (5.5-122.7)	14.4 (1.6-81.7)	0.018

Diferencias estudiadas de acuerdo con las pruebas T para datos pareados o Test de Wilcoxon según corresponda.

HbA1c= hemoglobina glicosilada

IMC = índice de masa corporal

AGL= ácidos grasos libres

ApoAI y ApoAII = apolipoproteínas AI y AII

ApoB = Apolipoproteína B

LDL - = LDL electronegativa

LDL ox = LDL oxidada

PON1= actividad arilesterasa de PON1 (paraoxonasa)

PCR = proteína C reactiva

MCP-1 = proteína quimiotáctica de monocitos 1

IL-6 = interleucina 6

TGFβ = factor de crecimiento transformante β



Con el objetivo de determinar los factores asociados con el cambio en las concentraciones de calcidiol, evaluamos su relación con el cambio en otras variables, tanto clínicas como bioquímicas, y el posible efecto de la época del año en que se realizaron las determinaciones.

En el análisis de correlación los cambios en las concentraciones de calcidiol se correlacionaron con los cambios en la HbA1c ($r -0.482$; $p=0.032$) (**figura 10**). No se observó ninguna correlación con los cambios en el resto de variables analizadas.

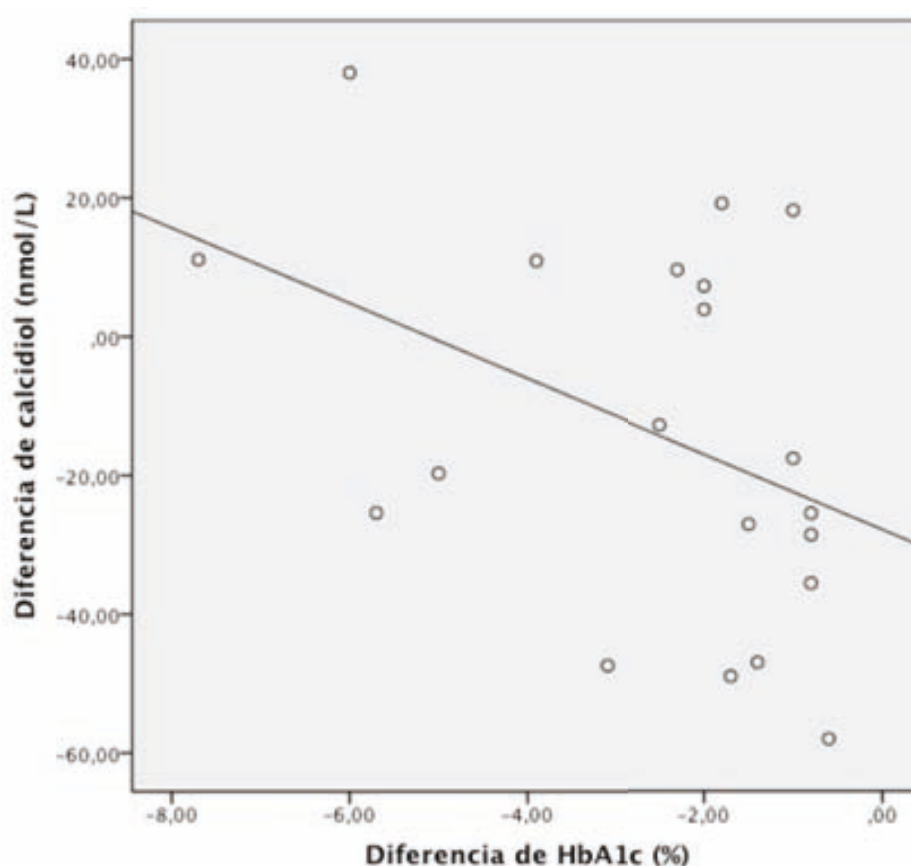


Figura 10: Correlación de Spearman entre los cambios de calcidiol y de HbA1c ($r -0.482$; $p=0.032$).

Por otra parte, si se analizan los periodos del año en que se realizaron las determinaciones analíticas (noviembre-abril: época de menor exposición solar; mayo-octubre: época de mayor exposición solar), observamos que, de los 20 pacientes que fueron incluidos en el análisis, en 9

pacientes las determinaciones se realizaron en el mismo periodo del año antes y después de mejorar el control. De los restantes, 5 pasaron de la época de menor exposición solar a la de mayor y lo contrario, en 6 pacientes. Al eliminar éstos últimos 6 pacientes del análisis, se observa que las concentraciones de calcidiol disminuyen de 76.3 ± 32.9 a 63.3 ± 22.4 nmol/L ($p=0.073$) tras la mejoría del control glucémico.

III. RESULTADOS DEL ESTUDIO HFC-VITD

Este estudio se diseñó con el objetivo estudiar las concentraciones de vitamina D en los pacientes con HFC y, especialmente, la relación de las concentraciones de vitamina D con los diferentes parámetros lipídicos. Para ello realizamos un estudio transversal con 59 pacientes con HFC y 48 controles sanos y un estudio longitudinal en un subgrupo de 23 pacientes con HFC que evaluamos antes y después de la optimización del control lipídico durante un periodo mínimo de 1,9 meses.

1- Resultados del estudio transversal

1.1.-Comparación entre los pacientes con HFC y los controles

Las características clínicas y bioquímicas de los 59 pacientes con HFC y los 48 controles se muestran en la **tabla 25**.

Entre los pacientes con HFC, 5 sujetos (8.5%) tenían diabetes tipo 2, y 21 sujetos (35.6%) tenían hipertensión arterial. Veintitrés pacientes estaban tratados con fármacos hipolipemiantes, 17 (28.8%) con estatinas y 6 (10.2%) con fibratos.

Tabla 25: Características clínicas y bioquímicas de los pacientes con HFC y los controles			
	HFC (n= 59)	Controles (n=48)	p
Edad (años)	50.2± 11.6	46.5± 17.2	0.210
Sexo (% hombres)	57.6	62.5	0.609
IMC(Kg/m ²)	27.9 ± 4.1	25.4 ± 4.	0.005
Cintura (cm)	95.6±10.7	90.3±11.7	0.026
Colesterol total (mmol/L)	6.7±1.6	4.8±0.8	0.000
Triglicéridos (mmol/L)	2.3 (1.1-15.8)	0.7 (0.3-2.6)	0.000
cLDL (mmol/L)	4.1±1.3	2.8±0.7	0.000
cHDL (mmol/L)	1.2±0.4	1.6±0.4	0.000
cVLDL (mmol/L)	1.0 (0.5-7.6)	0.4 (0.1-1.2)	0.000
AGL (mmol/L)	0.7 (0.2-4.3)	0.4 (0.1-1.1)	0.000
ApoAI (g/L)	1.5±0.3	1.6±0.4	0.126
ApoAII (g/L)	39.4±7.4	35.0±5.1	0.001
ApoB (g/L)	1.3±0.3	0.8±0.2	0.000
LDL _{ox} (U/L)	84.9±23.6	50.0±20.9	0.000
LDL - (%)	6.3±2.5	6.4±1.8	0.815
PON1(μmol/min*mL)	75.6 ± 26.4	79.5±27.8	0.474
Glucemia (mmol/L)	5.3±0.6	5.0±0.7	0.013
PCR (mg/L)	1.6 (0.2-21.5)	1.0 (0.2-15.0)	0.133
Leptina (ng/L)	5094.5 (157-64586)	6450 (564-27800)	0.487
Adiponectina (μg/L)	2599 (491-7852)	3973 (590-14563)	0.000
MCP-1 (ng/L)	167.4(47.1-420.2)	121.8 (46.9-427.3)	0.003
IL-6 (ng/L)	1.4±1.2	1.2±1.0	0.376
TGFβ (ng/L)	21.8 (1.8-153.0)	28.8 (1.6-112-7)	0.136
Calcidiol (nmol/L)	58.9±24.5	69.1±30.0	0.057
Hipovitaminosis D (%)	78.8	68.8	0.281

Valores de p de acuerdo con la pruebas T-student, U-Mann-Whitney o Chi-cuadrado según corresponda.

IMC = índice de masa corporal

AGL= ácidos grasos libres

ApoAI y ApoAII = apolipoproteínas AI y AII

ApoB = Apolipoproteína B

LDL ox = LDL oxidada

LDL - = LDL electronegativa

PON1= actividad arilesterasa de PON1 (paraoxonasa)

PCR = proteína C reactiva

MCP-1 = proteína quimiotáctica de monocitos 1

IL-6 = interleucina 6

TGFβ = factor de crecimiento transformante β

Hipovitaminosis D = calcidiol ≤ 80 nmol/L.

Como era de esperar, todos los parámetros lipídicos estaban más elevados en los pacientes con HFC que en los controles, exceptuando el cHDL, que era inferior en los pacientes con HFC (**tabla 25**). Los sujetos con HFC mostraron una tendencia a presentar concentraciones disminuidas de calcidiol, y esto se confirmó en el análisis de covarianza. Este análisis de covarianza (ANCOVA) de diseño para detectar diferencias en las concentraciones de calcidiol entre pacientes y controles, tras ajustar por IMC y estacionalidad (determinación analítica realizada en invierno, primavera, verano u otoño). Los resultados mostraron que la presencia de HFC (p= 0.021) y la estacionalidad (p=0.007) eran predictores o estaban asociados con las concentraciones de calcidiol, mientras que no se observaron asociaciones con el IMC. Las medias ajustadas (error

?

estándar) del calcidiol, teniendo en cuenta la estacionalidad y el IMC fueron 62.8 (3.6) nmol/L para los pacientes con HFC y 74.8 (4.1) nmol/L para los controles.

En los análisis de correlación, no se observó ninguna correlación entre el calcidiol y los parámetros antropométricos, lipídicos o inflamatorios en los controles. Sin embargo, en los pacientes con HFC, las concentraciones de calcidiol se correlacionaron con el cLDL ($r = 0.257; P=0.049$), con la LDL- ($r = 0.320; P=0.022$) y con las concentraciones de triglicéridos ($r = 0.265; P=0.042$) (**figuras 11-13**).

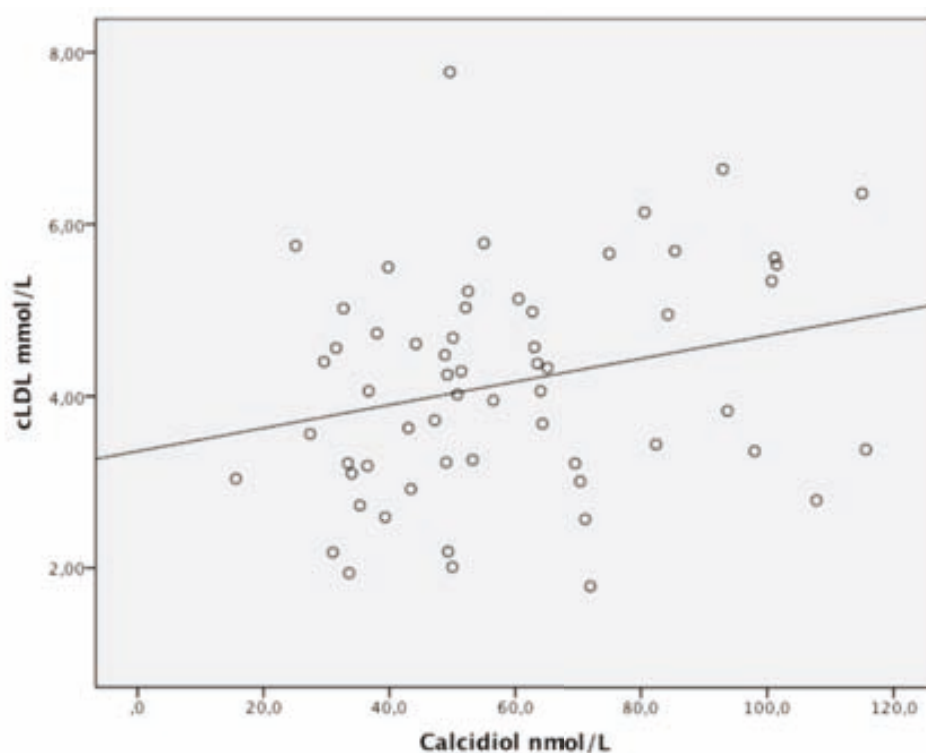


Figura 11: Correlación de Pearson entre las concentraciones de calcidiol y de cLDL ($r = 0.257; p=0.049$).

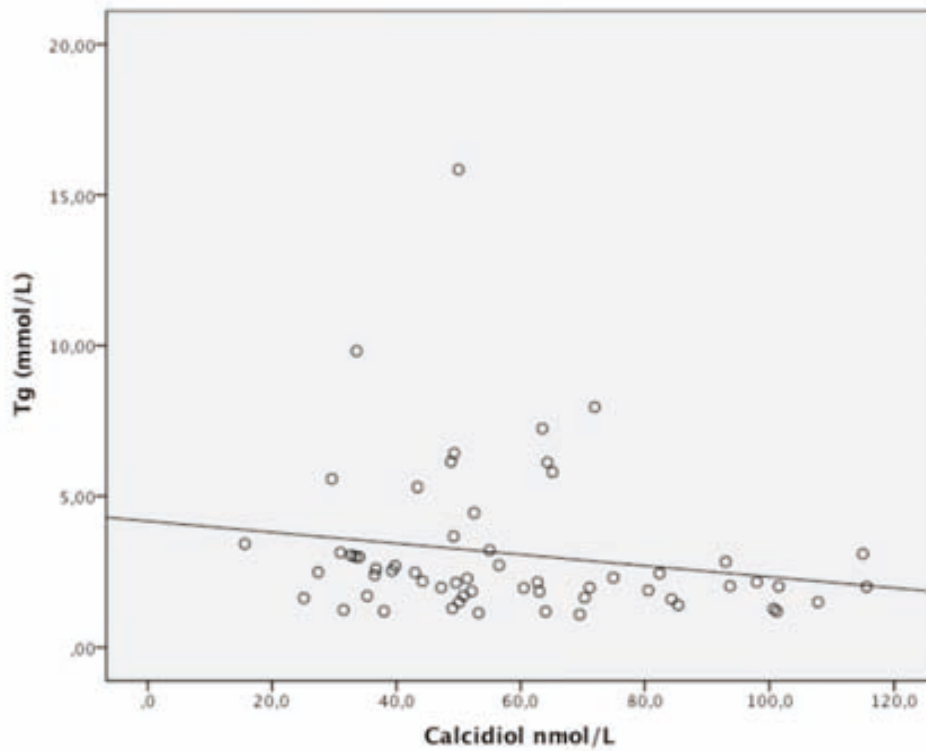


Figura 12: Correlación de Spearman entre las concentraciones de calcidiol y de triglicéridos ($r=0.265$; $p=0.042$).

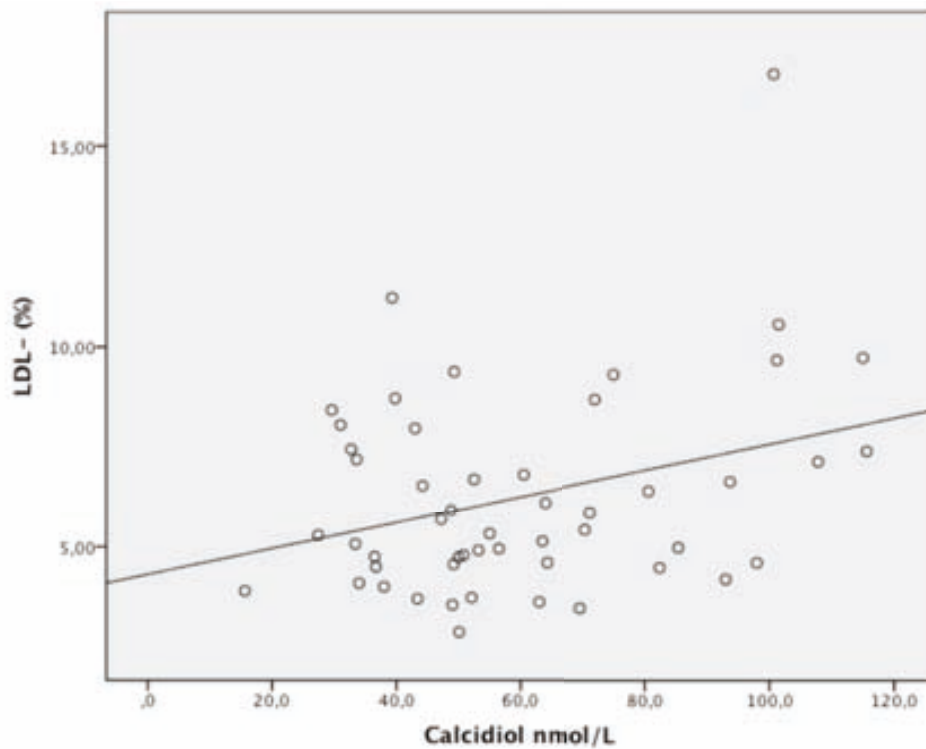


Figura 13: Correlación de Pearson entre las concentraciones de calcidiol y de LDL electronegativa (LDL-) ($r=0.320$; $p=0.022$).

1.2.- Estado de la vitamina D en los pacientes con HFC

En la **tabla 26** se muestran las características de los pacientes con HFC según el estado de la vitamina D. Entre los pacientes con HFC, 46 (78.8%) presentaron hipovitaminosis D (concentraciones de calcidiol ≤ 80 nmol/L). Los pacientes con hipovitaminosis D presentaron concentraciones mayores de triglicéridos y AGL y menores de cHDL y cLDL.

Tabla 26: Características clínicas y bioquímicas de los pacientes con HFC según el estado de la vitamina D			
	HIPOVITAMINOSIS D (n= 46)	VITAMINA D NORMAL (n=13)	p
Calcidiol (nmol/L)	48.2±14.3	96.9±11.7	0.000
Edad (años)	51.7±10.3	44.9±14.5	0.061
IMC (Kg/m ²)	28.2±4.1	26.8±4.0	0.289
Cintura (cm)	96.2±10.1	93.3±12.8	0.412
Colesterol total (mmol/L)	6.6±1.6	7.1±1.4	0.335
Triglicéridos (mmol/L)	2.5 (1.1-15.8)	2.0 (1.2-3.1)	0.041
cLDL (mmol/L)	3.9±1.2	4.8±1.3	0.025
cHDL (mmol/L)	1.1±0.4	1.3±0.3	0.051
cVLDL (mmol/L)	1.1 (0.5-7.6)	0.9 (0.6-1.3)	0.079
AGL (mmol/L)	0.7 (0.3-4.3)	0.5 (0.2-1.1)	0.015
ApoAI (g/L)	1.4±0.3	1.5±0.3	0.255
ApoAII (g/L)	39.8±7.9	38.2±5.5	0.513
ApoB (g/L)	1.3±0.3	1.4±0.3	0.116
LDLox (U/L)	83.7±24.0	89.3±22.7	0.457
LDL- (%)	5.8±2.0	7.7±3.6	0.105
Tamaño de LDL (nm)	25.4±0.7	25.7±0.4	0.184
PON1 (µmol/min*mL)	77.3±27.0	70.2±24.5	0.401
HbA1c (%)	5.6±0.5	5.6±0.4	0.838
HOMA	2.7±2.4	1.8±0.9	0.838
PCR (mg/L)	1.6 (0.3-21.1)	1.5 (0.2-21.5)	0.901
Leptina (ng/L)	5229 (157-64586)	4960 (1575-22871)	0.526
Adiponectina (µg/L)	3.4±0.3	3.5±0.2	0.233
MCP-1 (ng/L)	187.0±86.2	200.6±114	0.644
IL6 (ng/L)	1.3±1.1	1.6±1.4	0.554
TGFβ (ng/L)	21.3 (2.2-153.0)	22-3 (1.8-111.7)	0.591

Valores de p de acuerdo con las pruebas T-student o U-Mann-Whitney, según corresponda.

Hipovitaminosis D = calcidiol ≤ 80 nmol/L.

IMC= índice de masa corporal

AGL= ácidos grasos libres

ApoAI y ApoAII = apolipoproteínas AI y AII.

ApoB = Apolipoproteína B

LDL ox = LDL oxidada

LDL - = LDL electronegativa

PON1= actividad arilesterasa de PON1 (paraoxonasa)

PCR = proteína C reactiva

MCP-1 = proteína quimiotáctica de monocitos 1

IL-6 = interleucina 6

TGFβ = factor de crecimiento transformante β

Se realizó un análisis ANCOVA con las variables en las que se encontraron diferencias entre los pacientes con y sin hipovitaminosis D en las pruebas T y Mann-Whitney, con la intención de comprobar la persistencia de diferencias tras ajustar por la estacionalidad y el IMC. Se observó

que las diferencias en cuanto a triglicéridos y AGL en los pacientes con y sin hipovitaminosis D permanecieron significativas tras ajustar por IMC y estacionalidad (**tabla 27**).

Tabla 27: Variables que se asociaron a Hipovitaminosis D tras ajustar por la estacionalidad y el IMC

Variables dependientes	Variables independientes	p
Triglicéridos	Hipovitaminosis D	0.024
	Época del año	0.308
	IMC	0.030
AGL	Hipovitaminosis D	0.036
	Época del año	0.760
	IMC	0.143
cHDL	Hipovitaminosis D	0.128
	Época del año	0.516
	IMC	0.003
cLDL	Hipovitaminosis D	0.133
	Época del año	0.818
	IMC	0.037

Se muestran los niveles de significación para las variables independientes introducidas en la ANCOVA (hipovitaminosis D, época del año e IMC).
 Hipovitaminosis D = calcidiol \leq 80 nmol/L.
 IMC= índice de masa corporal
 AGL= ácidos grasos libres

Las medias estimadas de las variables que mostraron una asociación significativa con la presencia de hipovitaminosis D tras haber ajustado por la estacionalidad y el IMC se muestran en la **tabla 28**. Las variables que fueron transformadas a su logaritmo para su inclusión en la ANOVA se muestran reconvertidas a su magnitud habitual.

Tabla 28: Medias estimadas de triglicéridos y AGL tras realizar el ajuste por la estacionalidad y el IMC.

Variables	Hipovitaminosis D	Medias estimadas \pm error típico
Triglicéridos	Si	2.8 \pm 1.1
	No	1.9 \pm 1.2
AGL	Si	0.7 \pm 1.1
	No	0.5 \pm 1.1

Resultados derivados de la ANCOVA de dos factores con hipovitaminosis D, estacionalidad e IMC como variables independientes.
 Hipovitaminosis D = calcidiol \leq 80 nmol/L.
 AGL= ácidos grasos libres

Finalmente, analizamos las diferencias en las concentraciones de vitamina D según los niveles de triglicéridos. Observamos que los pacientes con HFC que tenían concentraciones de triglicéridos > 2.25 mmol/L (200 mg/dL), tenían menores concentraciones de calcidiol que los pacientes con triglicéridos < 2.25 mmol/L (50.6 \pm 21.3 vs 67.5 \pm 2 nmol/L; p=0.007). No se hallaron diferencias en

las concentraciones de calcidiol entre los pacientes que estaban con/sin tratamiento para la dislipemia.

2- Resultados del estudio longitudinal

Del grupo de pacientes con HFC, 23 se estudiaron antes y después de iniciar tratamiento para la dislipemia según la práctica clínica habitual. La edad media de estos pacientes fue de 50.1 ± 10.2 años y un 65.2% eran hombres.

El seguimiento fue de 2.5 (1.9-12.9) meses. Tres pacientes fueron tratados únicamente con modificaciones del estilo de vida (dieta y ejercicio), 11 se trataron con estatinas, 5 con fibratos, 3 con estatina y fibrato y un paciente con fibrato y ezetimibe.

Como era de esperar, todos los parámetros lipídicos mejoraron con el tratamiento. No se observaron cambios en los parámetros antropométricos, el índice HOMA, los marcadores de inflamación o en las adipoquinas (**tabla 29**). Sin embargo, las concentraciones de calcidiol aumentaron de 51.0 ± 31.3 nmol/L a 58.9 ± 24.6 nmol/L tras el tratamiento hipolipemiante ($p=0.022$). Los cambios en las concentraciones de calcidiol no se correlacionaron con los cambios en el resto de variables.

Tabla 29: Características clínicas y bioquímicas de los 23 sujetos incluidos en el estudio longitudinal, antes y después del tratamiento para su dislipemia

	Sin tratamiento	Con tratamiento	p
Calcidiol (nmol/L)	51.0 ± 31.3	58.9± 24.6	0.022
IMC (Kg/m ²)	26.6 ± 2.5	26.6 ±2.6	0.778
Cintura (cm)	92.7 ± 9.2	93.1 ± 8.8	0.518
Colesterol total (mmol/L)	7.4 (5.1-16.1)	5.1 (3.8-8.9)	0.000
Triglicéridos (mmol/L)	2.8 (1.2-10.7)	1.9 (0.8-3.8)	0.000
cLDL (mmol/L)	4.3 (1.4-7.8)	3.0 (2.0-5.8)	0.007
cHDL(mmol/L)	1.2±0.4	1.3±0.3	0.000
cVLDL (mmol/L)	1.3 (0.6-8.6)	0.9 (0.4-3.3)	0.000
AGL (mmol/L)	0.6 (0.3-1.6)	0.6 (0.3-1.4)	0.313
ApoAI (g/L)	1.4±0.3	1.6 ±0.3	0.000
ApoAII (g/L)	39.1± 6.4	42.0 ±8.6	0.157
ApoB (g/L)	1.4±0.3	1±0.2	0.000
Lp(a) (mg/L)	109 (70-1437)	115 (70-1500)	0.332
Tamaño LDL (nm)	25.3 (23.2-26.2)	25.7 (24.8-26.5)	0.058
LDL- (%)	6.9 (3.1-19.6)	6.9 (3.6-14.6)	0.845
LDL _{ox} (U/L))	89.4 ± 22.0	69.6 ± 19.1	0.001
PON1(μmol/min*mL)	71.2 ± 28.4	80.0 ± 29.8	0.088
HbA1c (%)	5.6 (5.1-6.5)	5.6 (5.2-6.8)	0.230
HOMA	1.7 (0.4-4.3)	1.9 (0.7-7.0)	0.715
PCR (mg/L)	2.0 (0.1-21.1)	1.27 (0.31-12.2)	0.823
Leptina (ng/L)	4414 (975-23260)	4030 (825-20660)	0.974
Adiponectina (μg/L)	3678 (811-9021)	3043 (1424-7493)	0.031
MCP-1 (ng/L)	158.3 (89.6-403.5)	172.7 (44.1-334.4)	1.000
IL6 (ng/L)	0.74 (0.01-6.2)	0.6 (0.01-8.2)	0.538
TGFβ (ng/L)	18.4 (2.2-133.2)	22.9 (1.6-156.7)	0.615

Valores de p de acuerdo con la pruebas T para datos apareados o Wilcoxon, según corresponda.

IMC= índice de masa corporal

AGL= ácidos grasos libres

ApoAI y ApoAII = apolipoproteínas AI y AII.

ApoB = Apolipoproteína B

Lp(a) = lipoproteína a.

LDL ox = LDL oxidada

LDL - = LDL electronegativa

PON1= actividad arilesterasa de PON1 (paraoxonasa)

PCR = proteína C reactiva

MCP-1 = proteína quimiotáctica de monocitos 1

IL-6 = interleucina 6

TGFβ = factor de crecimiento transformante β

Se consideró el período del año en que se realizaron las analíticas de estudio: época de menor exposición solar (noviembre-abril) y época de mayor exposición solar (mayo-octubre). En 20 pacientes ambas determinaciones de calcidiol (antes y después del tratamiento) se realizaron en la misma época del año. En 3 pacientes la primera determinación se realizó en la época de menor exposición solar y la segunda en la época de mayor exposición solar. Al eliminar éstos tres sujetos del análisis, las concentraciones de calcidiol antes y después del tratamiento fueron de 53.3±22.0 nmol/L y 59.3±25 nmol/L, respectivamente (p=0.065).

DISCUSIÓN

La hipovitaminosis D se ha asociado a un aumento en la mortalidad global y, especialmente, la de etiología cardiovascular. Las causas de esta asociación son actualmente desconocidas, pero el aumento en la mortalidad cardiovascular en los sujetos con hipovitaminosis D podría explicarse, al menos en parte, por la asociación entre la hipovitaminosis D y los distintos factores de riesgo cardiovascular que conforman el síndrome metabólico, como la obesidad, la diabetes o la dislipemia, entre otros ⁽¹¹¹⁻¹¹⁴⁾. Dado el potencial impacto que el conocimiento de los mecanismos de estas asociaciones podría tener sobre el desarrollo de estrategias de prevención y tratamiento de la patología cardiovascular, en los últimos años hemos asistido a un aumento creciente en el número de publicaciones dirigidas a estudiar la relación de la vitamina D con los distintos factores de riesgo cardiovascular. No obstante, existen todavía muchas áreas de incertidumbre.

La principal área de incertidumbre radica en el mecanismo fisiopatológico mediante el cual las concentraciones disminuidas de vitamina D se asocian con patologías como la diabetes, la hipertensión o la dislipemia. Por una parte, se ha postulado que la hipovitaminosis D podría estar directamente implicada en la génesis del síndrome metabólico y sus componentes, habiéndose postulado un papel de la vitamina D sobre la resistencia a la insulina, sobre la función de la célula beta o sobre el sistema renina-angiotensina-aldosterona ^(162,171,201,202). No obstante, estos mecanismos no han sido bien demostrados en todos los estudios y no explican todas las alteraciones asociadas a la hipovitaminosis D. Además, los estudios de intervención con vitamina D por el momento no han demostrado que mejoren el control de los distintos factores de riesgo cardiovascular ^(184,187,177). Una segunda hipótesis es que, dada la conocida asociación de la obesidad con la hipovitaminosis D y que la obesidad está relacionada con los distintos factores de riesgo cardiovascular, la relación entre la hipovitaminosis D y los distintos componentes del síndrome metabólico podría ser debida a una mayor adiposidad. Sin embargo, por el momento, no todos los estudios publicados que relacionan la hipovitaminosis D con el síndrome metabólico o sus componentes han analizado si esta asociación persiste si se elimina el efecto de la obesidad o del índice de masa corporal.

La hipótesis de la presente tesis es que el estudio de la relación de los componentes del síndrome metabólico con la hipovitaminosis D en diferentes situaciones clínicas, así como la evaluación del

efecto de la mejoría del control de estos componentes sobre las concentraciones de la vitamina D, pueden contribuir al conocimiento de la relación entre el síndrome metabólico y la vitamina D. Los trabajos incluidos en esta tesis van dirigidos a explorar la relación entre la hipovitaminosis D y el síndrome metabólico y se centran en el estudio de tres patologías prevalentes en las unidades de endocrinología y cuya asociación con el síndrome metabólico es bien conocida: el sobrepeso y la obesidad, la diabetes y la HFC. En los sujetos con sobrepeso y obesidad se ha estudiado la influencia de la adiposidad en la relación entre la hipovitaminosis D y el síndrome metabólico. En los sujetos con diabetes tipo 2 e HFC, se ha analizado la asociación de la hipovitaminosis D con los diferentes componentes del síndrome metabólico, centrándonos en los parámetros antropométricos, los parámetros de control glucémico, los parámetros lipídicos y los marcadores de inflamación y adipoquinas. Finalmente, se ha analizado el efecto del tratamiento de la diabetes y de la dislipemia sobre las concentraciones de vitamina D y los posibles factores que intervienen en este efecto.

Los principales hallazgos de los trabajos incluidos han sido los siguientes. En primer lugar, confirmamos la asociación de la hipovitaminosis D con el síndrome metabólico y demostramos que esta relación es independiente del grado de obesidad. En segundo lugar, confirmamos la relación entre hipovitaminosis D y diabetes tipo 2 y establecemos que los sujetos con HFC presentan concentraciones disminuidas de vitamina D. En tercer lugar, demostramos que tanto en los pacientes con diabetes tipo 2 como en los pacientes con HFC, la hipovitaminosis D se relaciona con la dislipemia aterogénica. A continuación discutiremos conjuntamente los hallazgos de los tres estudios sobre la relación de la hipovitaminosis D con el síndrome metabólico y sus componentes.

I. RELACIÓN DE LA HIPOVITAMINOSIS D CON EL SÍNDROME METABÓLICO

En sujetos caucásicos con distintos grados de sobrepeso y obesidad, hemos encontrado una asociación entre la hipovitaminosis D (definida como concentraciones de calcidiol ≤ 50 nmol/L) y el síndrome metabólico, que es independiente de la adiposidad. Estos hallazgos se han basado en los análisis de regresión logística que demuestran la existencia de una asociación entre el síndrome metabólico y la hipovitaminosis D que es independiente de la influencia del grado de obesidad y del perímetro de cintura. Además, la mayor proporción de pacientes con hipovitaminosis D en todos los grados de obesidad en los sujetos con síndrome metabólico, algo que en los sujetos sin síndrome metabólico sólo ocurre cuando el IMC es superior a 35 Kg/m², refuerza esta relación. Por tanto, globalmente, estos resultados apoyan que la relación entre hipovitaminosis D y síndrome metabólico no se explica totalmente por la adiposidad.

La existencia de una relación entre la hipovitaminosis D y el síndrome metabólico se conoce desde hace algunos años. En el estudio NHANES III, realizado en más de 8000 sujetos de USA entre 1988 y 1994, se observó que las concentraciones de vitamina D eran más bajas en sujetos con síndrome metabólico que en sujetos sin esta patología (67.1 nmol/L vs. 75.9 nmol/L, respectivamente) ⁽¹⁵²⁾. En Europa, los datos de la cohorte británica de casi 7000 sujetos nacidos en 1958 (1958 British Birth Cohort) ⁽¹⁵⁶⁾, analizados entre 2002 y 2004, también mostraron que los que presentaban concentraciones más disminuidas de vitamina D tenían una mayor prevalencia de síndrome metabólico. El “European Male Aging Study” también confirmó en más de 3000 sujetos esta asociación ⁽¹⁵⁵⁾. Sin embargo, en estos estudios no se analizó si la asociación entre el síndrome metabólico y la hipovitaminosis D persistía tras eliminar el efecto del IMC.

Estudios más recientes y que coinciden en el tiempo con el proceso de desarrollo de los trabajos incluidos en esta tesis, sí han tenido en cuenta la obesidad al analizar la relación entre la hipovitaminosis D y el síndrome metabólico ^(153,154,203). Aunque los resultados no son uniformes en todos los estudios, la mayoría concuerdan con los obtenidos por nosotros. Así, Reis et al. ⁽¹⁵⁴⁾ estudiaron una muestra de más de 1500 sujetos del estudio NHANES entre 2003 y 2004 y observaron que la asociación entre las concentraciones de vitamina D y la prevalencia de

síndrome metabólico permanecía tras tener en cuenta tanto el IMC, como el grado de obesidad. No obstante, en el estudio posterior del NHANES entre 2005 y 2006 la relación entre hipovitaminosis D y síndrome metabólico desapareció cuando se ajustó por el IMC ⁽²⁰³⁾. Además de estos amplios estudios poblacionales, estudios más reducidos en grupos concretos de población como niños, adolescentes o mujeres posmenopáusicas, también encuentran una asociación entre los niveles de vitamina D y la prevalencia de síndrome metabólico, incluso tras tener en cuenta el IMC ⁽²⁰⁴⁻²⁰⁶⁾. Es interesante el estudio de Ganji et al. ⁽²⁰⁷⁾ que tiene la particularidad de realizar un ajuste de las concentraciones de vitamina D en relación a los cambios en los métodos de determinación a lo largo del tiempo ⁽⁸³⁾, lo que evita infra- o sobre-estimaciones en las concentraciones de calcidiol. Este estudio también muestra que, en más de 5000 adolescentes del estudio NHANES, la relación entre el síndrome metabólico y la hipovitaminosis D no se explica en su totalidad por el grado de adiposidad.

Desde el punto de vista de las repercusiones en la salud, además del grado de obesidad, es importante considerar la distribución de la grasa. La obesidad de distribución abdominal es la que se asocia más estrechamente con el síndrome metabólico y nosotros demostramos que la relación entre hipovitaminosis D y el síndrome metabólico, también es independiente del perímetro de cintura. Estos hallazgos se han confirmado en el estudio de la población NHANES entre 2003 y 2006 ⁽¹⁵³⁾ y en un estudio realizado recientemente en más de 4000 sujetos de estudio AusDiab (Australian Diabetes, Obesity, and Lifestyle Study), que demuestra que la presencia de hipovitaminosis D se relaciona con la incidencia de síndrome metabólico a 5 años de seguimiento, independientemente del perímetro de cintura ⁽¹⁶¹⁾.

Los resultados de los estudios que analizan la relación entre la hipovitaminosis D y el síndrome metabólico en sujetos con distintos grados de obesidad son algo más heterogéneos. En un estudio realizado en 73 pacientes con $IMC > 40 \text{ Kg/m}^2$, se encuentra una asociación entre las concentraciones disminuidas de vitamina D y una mayor prevalencia de síndrome metabólico, a pesar de tener todos los pacientes un IMC similar ⁽²⁰⁸⁾. En contraposición, algunos estudios similares realizados posteriormente en sujetos con obesidad no encuentran asociación entre la hipovitaminosis D y el síndrome metabólico en sujetos con obesidad ⁽²⁰⁹⁻²¹¹⁾. Entender el porqué de

las diferencias encontradas es complejo, pero probablemente influyan factores como el método de determinación del calcidiol (EIA o RIA principalmente), la selección de los pacientes, la definición de síndrome metabólico y de hipovitaminosis D utilizadas, o el ajuste por los diversos factores de confusión. Nuestros resultados se ven apoyados por el ajuste por la estacionalidad, el IMC y el perímetro de cintura y por una rigurosa selección de pacientes, excluyendo todas aquellas condiciones que puedan influir en las concentraciones de vitamina D, como la toma de diversos fármacos o la presencia de patologías que se asocien a concentraciones disminuidas de vitamina D, sea por falta de absorción intestinal o de síntesis de los compuestos activos.

Los hallazgos obtenidos en los estudios realizados en sujetos con diabetes tipo 2 e HFC refuerzan la asociación entre la hipovitaminosis D y el síndrome metabólico observada en el estudio Obesidad-VitD. Ambas situaciones están estrechamente relacionadas con el síndrome metabólico y en ambas hemos observado unas concentraciones disminuidas de calcidiol, de manera que la prevalencia de hipovitaminosis D alcanza el 74.6% en sujetos con diabetes tipo 2 y el 78.8% en sujetos con HFC. Además, en los dos grupos de pacientes, la hipovitaminosis D se asocia con la dislipemia aterogénica, un importante componente del síndrome metabólico. Se sabe que otras alteraciones comúnmente asociadas al síndrome metabólico, como la esteatosis hepática no alcohólica o el síndrome de ovarios poliquísticos también se asocian con una mayor prevalencia de hipovitaminosis D ^(189,190). El hallazgo de concentraciones disminuidas de vitamina D en todos aquellos procesos que se asocien al síndrome metabólico, apoya la existencia de una asociación entre hipovitaminosis D y síndrome metabólico.

II. RELACIÓN DE LA HIPOVITAMINOSIS D CON LOS COMPONENTES DEL SÍNDROME METABÓLICO ESTUDIADOS

Además de la relación de la hipovitaminosis D con el síndrome metabólico como entidad, también hemos estudiado la relación con algunos de sus componentes. En concreto, hemos estudiado la asociación con la obesidad, la diabetes y sus características, la dislipemia y con los marcadores del estado inflamatorio de bajo grado. A continuación comentamos los principales hallazgos.

1- Relación con la obesidad

Nuestros resultados confirman la presencia de una asociación entre hipovitaminosis D y obesidad, ya descrita por otros autores ^(111,112,147). En el estudio Obesidad-VitD, al categorizar a los sujetos en los distintos grados de obesidad, podemos ver que son los grados más severos de obesidad (obesidad grado III) los que se asocian de forma más fuerte a la hipovitaminosis D. En el estudio DM2-VitD, la presencia de sobrepeso o obesidad y el IMC también se asocian con la presencia de hipovitaminosis D.

Además de demostrar la relación entre hipovitaminosis D y el grado de obesidad, los datos de los estudios Obesidad-VitD y DM2-VitD también muestran una asociación entre la hipovitaminosis D y la obesidad abdominal, evaluada mediante el perímetro de la cintura. Sin embargo, al existir una elevada colinealidad entre cintura e IMC, no hemos podido evaluar si el perímetro de cintura aporta mayor información que el propio IMC o el grado de obesidad en la predicción de hipovitaminosis D. Nuestros hallazgos coinciden con la mayoría de estudios que han analizado la presencia de hipovitaminosis D en función de la distribución de la grasa y que muestran que los distintos índices de adiposidad como el IMC, el perímetro de cintura o la medición del tejido graso subcutáneo o visceral mediante tomografía se relacionan con las concentraciones de vitamina D, sin poder dar mayor importancia a una u otra medida ⁽²¹²⁻²¹³⁾. Así, a pesar de que la distribución de la grasa en la región abdominal es la que más se relaciona con las complicaciones

cardiovasculares y metabólicas asociadas a la obesidad ^(27-29,214) y que algunos autores indican que el tejido adiposo visceral es el que presenta una asociación más fuerte con la hipovitaminosis D ⁽²¹⁵⁾, no podemos concluir que la distribución abdominal de la grasa contribuya en mayor medida que la obesidad global a la presencia de hipovitaminosis D.

Finalmente, en los pacientes con HFC no hemos encontrado relación entre la presencia de hipovitaminosis D y el IMC o el perímetro de cintura. Esta ausencia de relación podría deberse al hecho de que los pacientes con HFC presentan un IMC y un perímetro de cintura medios menores y con menor variabilidad comparados con los pacientes con diabetes tipo 2. Sin embargo, no podemos descartar que en estos pacientes existan otras variables, como la propia dislipemia, que tengan mayor peso que la adiposidad en la determinación de las concentraciones de vitamina D.

2- Relación con la diabetes y el metabolismo hidrocarbonatado

2.1.-Relación con la resistencia a la insulina

En los sujetos con sobrepeso y obesidad hemos encontrado que los pacientes con concentraciones de calcidiol ≤ 50 nmol/L presentaban valores de HOMA superiores al grupo con concentraciones de calcidiol > 50 nmol/L. Además, como ya hemos comentado, fueron los pacientes con un índice HOMA en el cuartil superior los que se asociaron de manera más fuerte con la presencia de hipovitaminosis D (Odds ratio de presentar hipovitaminosis D del cuartil superior respecto al cuartil inferior de 2.1 (1.1-4.3)). En el estudio HFC-VitD, los sujetos con HFC e hipovitaminosis D tendían a tener mayor índice HOMA que los sujetos con un estado de la vitamina D normal (2.7 ± 2.4 vs. 1.8 ± 0.9), aunque las diferencias no fueron significativas. No disponemos de estudios previos que hayan analizado la relación entre la resistencia insulínica y la hipovitaminosis D en sujetos con HFC, pero nuestros hallazgos en esta población van en la misma dirección que los de estudios previos realizados en población sana o con riesgo de diabetes y que

demuestran una asociación entre el estado de la vitamina D y diversos parámetros de insulinoresistencia e insulinosensibilidad ^(162,171,172,201).

Se desconocen los mecanismos mediante los cuales la hipovitaminosis D se asocia a la insulinoresistencia, pero la asociación se apoya en los hallazgos de VDR en el músculo, en la posible estimulación de la expresión del receptor de insulina o del receptor PPAR- δ por parte de la vitamina D, o en el efecto que tiene esta vitamina sobre la secreción de diversas citoquinas inflamatorias ^(164,201).

A pesar de que la resistencia a la insulina se postula como uno de los principales mecanismos etiopatogénicos del síndrome metabólico, los resultados de la regresión logística múltiple en el estudio Obesidad-VitD no permiten concluir que el índice HOMA explique toda la asociación existente entre la hipovitaminosis D y el síndrome metabólico. Estos hallazgos están en consonancia con los resultados obtenidos en varios estudios poblacionales que muestran que, aunque el índice HOMA puede explicar parte de la asociación del síndrome metabólico con la hipovitaminosis D, no la justifica en su totalidad ^(154,155).

2.2.- Relación con la diabetes

La asociación entre la hipovitaminosis D y la diabetes tipo 2, como se ha comentado, es conocida tras los hallazgos de numerosos estudios tanto transversales como longitudinales ^(163,165,166). En la actualidad existen datos que apoyan la existencia de plausibilidad biológica para la relación de causalidad entre la hipovitaminosis D y la génesis de la diabetes tipo 2. Así estudios experimentales han encontrado receptores de vitamina D o la propia enzima 1 alfa hidroxilasa en la célula beta pancreática, donde el metabolito activo de la vitamina D podría regular el flujo de calcio hacia el interior de la célula. También parecen existir, como se ha comentado, receptores de vitamina D a nivel muscular y a nivel del sistema inmunitario, donde esta hormona podría regular la secreción de ciertas citoquinas implicadas en la génesis de la diabetes tipo 2. Todos estos mecanismos podrían explicar el potencial papel de la vitamina D en la modulación de la

insulinorresistencia y de la secreción de insulina ^(164,201). Con el objetivo de confirmar esta plausibilidad biológica, en los últimos años se han publicado numerosos estudios que investigan si la suplementación con vitamina D mejora el control glucémico. Sin embargo, como hemos comentado con anterioridad, los resultados han sido desalentadores ⁽¹⁷⁷⁾. Acerca del efecto del control glucémico sobre las concentraciones de vitamina D, la información es muy escasa. Para clarificar este aspecto, hemos estudiado la relación de la hipovitaminosis D y las concentraciones de calcidiol con las distintas características de la diabetes y hemos determinado el efecto de la mejoría del control glucémico sobre las concentraciones de vitamina D.

Nuestro estudio confirma la elevada prevalencia de hipovitaminosis D (74.6%) en la población con diabetes tipo 2. Aunque es difícil comparar esta prevalencia con la de población sana debido a diferencias en el método de medición de la vitamina D o en la propia definición de hipovitaminosis D, parece ser más elevada a la encontrada en la población española ⁽⁹⁴⁾. Estos hallazgos están en consonancia con la mayoría de estudios publicados que también observan una asociación entre las concentraciones disminuidas de vitamina D y una mayor prevalencia o incidencia de diabetes tipo 2 ^(163,165,166). Por otra parte, a pesar de haber encontrado una prevalencia elevada de hipovitaminosis D en los pacientes con diabetes, no hemos encontrado una asociación entre la hipovitaminosis D y algunas características propias de la diabetes como la presencia de complicaciones, el tiempo de evolución, el tipo de tratamiento hipoglucemiante o el grado de control glucémico. Un hallazgo sorprendente en el estudio longitudinal fue que la mejoría del control glucémico en aquellos pacientes mal controlados se acompañó de una disminución en las concentraciones de vitamina D, y que los cambios en las concentraciones de vitamina D se relacionaron de manera inversa con el grado de descenso de la hemoglobina glicosilada. A continuación procedemos a analizar, uno por uno, estos hallazgos.

2.2.1.- Relación con el tiempo de evolución de la diabetes

En nuestro estudio no hemos encontrado una asociación entre la hipovitaminosis D y la duración de la diabetes. Los estudios que han analizado este aspecto muestran resultados contradictorios y ninguno se ha diseñado con la finalidad de estudiar esta asociación en concreto. Así, algunos estudios objetivan una asociación entre una mayor duración de la diabetes y unas concentraciones disminuidas de vitamina D ⁽²¹⁶⁻²¹⁸⁾, mientras que otros no objetivan ninguna asociación ⁽²¹⁹⁻²²¹⁾. Para complicar más las cosas, Jorgensen et al. ⁽¹¹⁸⁾ muestran que los pacientes con niveles de calcidiol por debajo del percentil 10 presentan una mayor duración de la diabetes tipo 2, pero sin embargo no encuentran ninguna asociación lineal entre los niveles de vitamina D y la duración de la diabetes. Existen diversos factores que pueden contribuir a explicar esta disparidad de resultados. En primer lugar, la definición de hipovitaminosis D podría jugar un papel, ya que si consideramos los resultados de Joergensen et al. ⁽¹¹⁸⁾, se objetiva una asociación utilizando el percentil 10 de las concentraciones de calcidiol (13.9 nmol/L) como punto de corte, mientras que Targher et al. ⁽²²¹⁾ no observan ninguna asociación al utilizar como punto de corte concentraciones de 37.5 nmol/L. En segundo lugar, como indicamos previamente, ningún estudio tiene como objetivo principal el estudio de la asociación entre la hipovitaminosis D y la duración de la diabetes. Por último, la mayoría no ajustan por factores de confusión como por ejemplo, la edad o la etnia y el estudio de Suzuki et al. ⁽²²⁰⁾, tras ajustar por factores como la edad, la HbA1c o el tipo de tratamiento para la diabetes, no encuentra ninguna asociación entre la hipovitaminosis D y la duración de la diabetes. Los datos disponibles, por lo tanto, no permiten apoyar la existencia de una clara relación entre la duración de la diabetes tipo 2 y la presencia de hipovitaminosis D.

2.2.2.- Relación con las complicaciones de la diabetes

En este caso, tampoco hemos encontrado una asociación entre la presencia de complicaciones de la diabetes y la hipovitaminosis D. Sin embargo, el escaso número de pacientes con complicaciones de la diabetes que encontramos en nuestro estudio es una clara limitación para

detectar si existe esta asociación. Al revisar la literatura existente, encontramos escasos estudios que hayan analizado esta cuestión y los resultados son heterogéneos. En cuanto a las complicaciones macroangiopáticas, en primer lugar y parecido a lo observado en la población general, los pacientes con diabetes tipo 2 con hipovitaminosis D parecen presentar a una mayor mortalidad global y cardiovascular ⁽¹¹⁸⁾. Por otra parte, algunos estudios señalan que los sujetos con diabetes e hipovitaminosis D presentan mayor prevalencia de enfermedad cardiovascular ^(222,223), aunque estos hallazgos no han podido ser confirmados en todos los estudios ⁽²²⁴⁾. Hay que remarcar, sin embargo, que el hallazgo de una asociación entre la hipovitaminosis D y los marcadores subclínicos de aterosclerosis como el aumento del grosor de la íntima media carotídea, la rigidez arterial o el contenido de calcio coronario, apoyaría la existencia de una asociación ^(217,219,225). En cuanto a las complicaciones microangiopáticas, la asociación con la hipovitaminosis D no es tan clara. Es ampliamente sabido que la enfermedad renal crónica se acompaña de un descenso progresivo en la síntesis de 1,25(OH)D y parece existir también un déficit relativo de calcidiol en esta población ⁽²²⁶⁾. No obstante, aunque el análogo de vitamina D paricalcitol parece haber demostrado tener efectos antiproteinúricos ⁽²²⁷⁾, el papel de la vitamina D en la nefropatía diabética no está tan claro y por el momento y no se ha demostrado una relación clara entre la presencia de hipovitaminosis D y el filtrado glomerular o la microalbuminuria ^(118,222,226). En cuanto a la neuropatía y la retinopatía en pacientes con diabetes tipo 2 y su relación con la hipovitaminosis D, aunque en algún artículo se encontró una asociación, la existencia de la misma precisa confirmarse en estudios con un número mayor de pacientes y ajustando por los múltiples factores de confusión relacionados con la hipovitaminosis D o con un riesgo aumentado de sufrir complicaciones de la diabetes ⁽²²⁹⁻²³¹⁾.

2.2.3.- Relación con el control glucémico

En los dos estudios en que analizamos este aspecto (estudios DM2-VitD e HFC-VitD), no hemos encontrado una asociación entre la presencia de hipovitaminosis D y el grado de control

glucémico. Si comparamos nuestros resultados con la literatura existente, observamos que también en este caso existen resultados discordantes. En la cohorte británica de sujetos nacidos en 1958 ⁽²³²⁾ y en los sujetos sometidos a cateterismo que se incluyeron en el estudio LURIC (233), se observó una asociación entre la presencia de hipovitaminosis D y un peor control glucémico. Si nos centramos en sujetos con diabetes tipo 2, Cigolini et al. ⁽²²²⁾ encontró que los pacientes con diabetes tipo 2 que tenían hipovitaminosis D (calcidiol < 50 nmol/L), presentaban la HbA1c un 0,4 % más elevada. Targher et al. ⁽²²¹⁾ también encontró una media de HbA1c 0,3% superior en los sujetos con diabetes e hipovitaminosis D, definida esta vez como concentraciones de calcidiol < 37,5 nmol/L. Hutchinson et al. ⁽²³⁴⁾ en uno de los estudios más amplios que examinan las concentraciones de vitamina D y su relación con el control glucémico en sujetos con diabetes y prediabetes, también encontraron una relación inversa entre HbA1c y calcidiol. Por último, algunos estudios en poblaciones asiáticas, confirman estos hallazgos ⁽²²⁸⁾. En contraposición, y de acuerdo con nuestros hallazgos, Joergensen et al. ⁽¹¹⁸⁾ Bonakdaran et al. ⁽²³⁵⁾ y Inukai et al. ⁽²³⁶⁾ no encuentran ninguna asociación entre la hipovitaminosis D y la HbA1c en poblaciones diversas. Al menos en parte, las diferencias entre los distintos estudios podrían justificarse por factores relacionados con la metodología aplicada. Entre estos factores podemos destacar las diferencias en el número de pacientes incluidos en los estudios, los métodos de determinación del calcidiol, el umbral utilizado para definir hipovitaminosis D, el ajuste o no ajuste por la época de exposición solar y otros factores que sabemos que influyen en las concentraciones de vitamina D, como es el IMC. Finalmente, también hay que tener en cuenta que el tratamiento para la hiperglucemia en los pacientes con alteraciones del metabolismo hidrocarbonatado también podría sesgar la posible relación existente entre la hipovitaminosis D y la HbA1c.

2.2.3.1.- Efecto de la mejoría del control glucémico

En el estudio longitudinal realizado en los pacientes con diabetes tipo 2 con mal control glucémico, la implementación de medidas dirigidas a mejorar el mismo, consiguió reducir la HbA1c de 9.45 %

(7.6-14.8) a 7.3 % (6.2-8.7). Esta mejoría del control glucémico se acompañó de un descenso en las concentraciones de vitamina D. No obstante, observamos una correlación negativa entre los cambios de HbA1c y los cambios en el calcidiol, es decir, los pacientes con mayor disminución de la HbA1c, fueron los que mostraron un aumento en las concentraciones de calcidiol.

Existen pocos estudios que hayan analizado el efecto de la mejoría del control glucémico sobre las concentraciones o el estado de la vitamina D. Nagasaka et al. ⁽²³⁷⁾ observaron que en 28 pacientes con mal control glucémico, la glucosuria se correlacionaba positivamente con la excreción renal de calcio y fosfato. La mejoría del control glucémico en estos pacientes se acompañó de una disminución en la excreción renal de estos iones y de una disminución en los niveles de parathormona (PTH). Este estudio analizó los niveles de 1,25(OH)D, los cuales no mostraron ningún cambio, pero las concentraciones de calcidiol no fueron analizadas. En otro estudio, en 16 pacientes con diabetes tipo 1 y tipo 2, la mejoría del control glucémico se acompañó de aumento en un parámetro de formación ósea como es la osteocalcina, aunque tampoco se estudió si esto se asociaba a cambios en la vitamina D ⁽²³⁸⁾. Gregorio et al. ⁽²³⁹⁾ también analizaron la asociación del control glucémico con diversos parámetros del metabolismo fosfocálcico en sujetos con diabetes tipo 2 y confirmaron la asociación entre el mal control glucémico, la hipercalciuria y un aumento en PTH. Al comparar los pacientes con buen y mal control de la diabetes (HbA1c media 7.74 ± 1.05 % vs. 11.56 ± 1.22 %), las concentraciones de calcidiol, tendían a ser mayores en los pacientes con buen control glucémico (24.33 ± 2.78 vs. 18.94 ± 3.24 ng/ml), aunque las diferencias no fueron significativas. Además observaron que la mejoría del control glucémico en el subgrupo de 50 pacientes con mal control inicial, se acompañó de una disminución en la excreción renal de calcio y de los niveles de PTH, pero no ofrecen información sobre la existencia de cambios en las concentraciones de calcidiol. Estos hallazgos en conjunto sugieren que el control glucémico parece tener repercusiones en cuanto a los principales reguladores del metabolismo óseo, pero no permiten definir el efecto sobre las concentraciones de calcidiol. Los potenciales mecanismos que podrían estar implicados en los efectos del control glucémico sobre el metabolismo óseo no son bien conocidos, pero algún estudio ha objetivado que cambios en el estado inflamatorio se acompañan de modificaciones rápidas de las

concentraciones de vitamina D ⁽²⁴⁰⁾. Además, la mejoría del control glucémico se acompaña de un descenso en las concentraciones de PTH ^(237,239), lo que podría inhibir la conversión de calcidiol en calcitriol, aumentando secundariamente las concentraciones plasmáticas de calcidiol.

Por diversas razones nuestros resultados deben tomarse con precaución. El escaso número de pacientes en que se pudo realizar el análisis, la variedad de estrategias utilizadas para mejorar el control glucémico, incluyendo los cambios en el estilo de vida, los fármacos orales y la insulina y sobretodo, la falta de un control estricto del posible efecto de la exposición solar, dificultan la interpretación de los resultados. En consecuencia éstos deben considerarse preliminares y deberían confirmarse en estudios controlados, con un número mayor de sujetos, que controlen bien el efecto de la estacionalidad sobre las concentraciones de vitamina D y que analicen si existen cambios en el estilo de vida, como un aumento en la actividad física en el exterior o un aumento en el consumo de pescado o lácteos, que pudieran explicar los resultados obtenidos.

3- Relación con los marcadores de inflamación y las adipocinas

En los estudios DM2-VitD y HFC-VitD, se evaluó la relación entre la hipovitaminosis D y los diversos marcadores de inflamación (IL-6, PCR, MCP-1, TGF- β), la leptina y la adiponectina, todos ellos parámetros que han demostrado tener un papel en la obesidad, la insulinorresistencia, la diabetes o el síndrome metabólico ⁽²⁴¹⁻²⁴⁶⁾. La única asociación que hemos encontrado ha sido entre la PCR y la hipovitaminosis D en el estudio DM2-VitD. Así, los pacientes con diabetes tipo 2 e hipovitaminosis D presentaron unas concentraciones de PCR superiores a los pacientes con concentraciones normales de vitamina D (3.3 (0.4-17.7) vs. 1.9 (0.2-17.5) mg/L; p= 0.033). No obstante, esta diferencia desapareció al introducir el IMC en el análisis, sugiriendo que las diferencias en PCR están vinculadas al grado de obesidad.

Como ya hemos comentado, es conocida desde hace tiempo la asociación entre las concentraciones disminuidas de vitamina D y una prevalencia aumentada de ciertas patologías de naturaleza autoinmune, como la artritis reumatoide, la esclerosis múltiple, la enfermedad

inflamatoria intestinal o la diabetes tipo 1 ⁽¹⁰⁷⁾. La posible implicación de la vitamina D en la regulación del sistema inmunitario apoyaría estos hallazgos. Por una parte, se ha encontrado la presencia tanto del VDR, como de las enzimas que la metabolizan la vitamina D, en las distintas células del sistema inmunitario y se postula que la vitamina D puede acumularse en los órganos linfoides, donde ejercería efectos auto- o paracrinós a concentraciones mucho superiores a las sistémicas, evitando efectos indeseables como la hipercalcemia. Además, la síntesis de los compuestos activos de la vitamina D en el seno de las células inmunitarias no está regulado por el calcio o la paratohormona, sino por otros factores como el interferon- γ o los lipopolisacáridos ⁽²⁴⁷⁾. En cuanto a la función de la vitamina D en el sistema inmunitario, parece ser que estimularía al sistema inmunitario innato en la lucha contra los agentes patógenos, mientras que inhibiría el sistema inmunitario adaptativo ⁽²⁴⁸⁾. Así, la vitamina D activa promovería la diferenciación y la síntesis de prostaglandinas con capacidad inmunosupresora en los macrófagos, mientras que, a nivel de los linfocitos y de las células dendríticas, inhibiría las respuestas Th1 y potenciaría las respuestas Th2, es decir inhibiría la producción de citoquinas proinflamatorias como IL-2, IL-6 y TNF- α y estimularía la producción de citoquinas antiinflamatorias como IL-4, IL-5 e IL-10 ^(247,249). Este papel de la vitamina D en la modulación del sistema inmunitario, no sólo explicaría la asociación de la hipovitaminosis D con patologías de tipo autoinmune, sino que también podría explicar una posible asociación de la hipovitaminosis D con el estado de inflamación de bajo grado característico de las condiciones asociadas al síndrome metabólico ⁽²⁵⁰⁾.

En estos últimos años, se han publicado diversos trabajos observacionales enfocados a estudiar la posible existencia de una asociación entre la hipovitaminosis D y el estado inflamatorio de bajo grado característico del síndrome metabólico. En primer lugar, tanto las adipoquinas y citoquinas inflamatorias estudiadas, como las poblaciones objeto de estudio han sido muy diversas. En segundo lugar, los resultados han sido discordantes, de manera que algunos han objetivado una asociación entre la hipovitaminosis D y un aumento en las adipoquinas ^(138,251-255), mientras otros no han observado ninguna asociación ^(207,256,257). Nos encontramos un escenario similar con los estudios de intervención que analizan posibles efectos de la suplementación con vitamina D sobre las adipoquinas y los marcadores de inflamación; algunos estudios han demostrado una mejoría

sobre ciertos parámetros mediante la suplementación, mientras que otros no han encontrado resultados positivos. En este caso también existe gran heterogeneidad, no sólo en referencia a la población estudiada, que incluye desde pacientes sanos, a pacientes con sobrepeso o en diálisis, sino también en relación a la dosis y formulación de vitamina D administrada, al tiempo de seguimiento, etc...⁽²⁵⁸⁻²⁶³⁾.

Si nos centramos en los estudios realizados en sujetos con diabetes tipo 2, los resultados son variables, mostrando una asociación entre hipovitaminosis D y PCR en algunos estudios^(221,222,235), mientras que otros estudios no la encuentran^(219,264). No obstante, estas publicaciones no esclarecen si la adiposidad puede estar implicada en la posible relación entre hipovitaminosis D y la PCR. Nosotros hemos observado que la asociación de la hipovitaminosis D con unas concentraciones aumentadas de PCR, desaparece si se tiene en cuenta el IMC. Estos resultados están en concordancia con los recientemente publicados de Al-Daghri et al.⁽²⁶⁵⁾. Estos autores además, son de los pocos que han analizado la relación entre la vitamina D y otras adipoquinas como la adiponectina, TNF- α , leptina y resistina en la diabetes tipo 2 y observaron una correlación positiva entre las concentraciones de calcidiol y la adiponectina, que a diferencia de lo que sucede con PCR, es independiente del IMC. Aunque desconocemos el porqué de los diferentes hallazgos entre la población de Al-daghri y la nuestra, las diferencias étnicas de las poblaciones estudiadas podrían tener un papel, ya que pueden existir diferencias en parámetros como la distribución de la grasa. En este contexto, merece la pena comentar que en los sujetos con HFC no observamos ninguna relación entre la presencia de hipovitaminosis D y un estado de inflamatorio de bajo grado. Si es cierto, como sucede en la diabetes, que la adiposidad media la relación entre la inflamación de bajo grado y la hipovitaminosis D, esta ausencia de relación podría justificarse por la ausencia de diferencias en cuanto al IMC y al perímetro de cintura entre los pacientes con y sin hipovitaminosis D.

Finalmente, en los estudios longitudinales incluidos en esta tesis, también se ha evaluado el efecto del control de la hiperglucemia (estudio DM2-VitD) y de la dislipemia (estudio HFC-VitD) sobre los parámetros de inflamación y las adipoquinas. La mejoría del control glucémico se acompañó de una disminución en las concentraciones de TGF- β (35.5 (5.5-122.7) vs. 14.4 (1.63-

81.7) ng/L), y la mejoría del control lipídico de un descenso de la adiponectina (3678 (811-9021) vs. 3043 (1424-7493) μ g/L). Estos cambios no se correlacionaron con los cambios observados en las concentraciones de calcidiol. Nuestros hallazgos sobre el TGF- β coinciden y refuerzan los hallazgos de algunos estudios que muestran una asociación entre los niveles intraglomerulares de mRNA de TGF-b y la HbA1c y con el hecho que la hiperglucemia es capaz de estimular la transcripción de esta citoquina a nivel de las células mesangiales ⁽²⁶⁶⁾. El descenso de la adiponectina paralelo a la mejoría del control lipídico en los pacientes con HFC es más difícil de interpretar en ausencia de cambios en el peso y en el perímetro de cintura y los datos publicados acerca del efecto del tratamiento hipolipemiante sobre las adipoquinas no son congruentes entre los diferentes estudios ⁽²⁶⁷⁻²⁷⁰⁾.

4- Relación con los parámetros lipídicos

Los resultados obtenidos en los estudios DM2-VitD y HFC-VitD apoyan una asociación entre la hipovitaminosis D y el perfil lipídico adverso característico de los pacientes con diabetes tipo 2, síndrome metabólico e HFC. Además, el tratamiento de la dislipemia parece asociarse con un aumento en las concentraciones de calcidiol que no se correlaciona con los cambios observados en los parámetros lipídicos.

En el primer estudio, los pacientes con diabetes tipo 2 e hipovitaminosis D tenían mayores concentraciones de triglicéridos y cVLDL y menores de cHDL. Así mismo, el contenido en triglicéridos de HDL estaba aumentado y el contenido en colesterol estaba disminuido. Todos estos cambios son característicos de la dislipemia aterogénica que suelen presentar los individuos con diabetes tipo 2 o síndrome metabólico ⁽⁴⁶⁻⁴⁹⁾. Además, parte de estas alteraciones persistían tras ajustar por el IMC, lo que sugiere una relación independiente de la adiposidad. En el estudio HFC-VitD, observamos que las concentraciones de calcidiol se correlacionaron negativamente con las concentraciones de triglicéridos y positivamente con las concentraciones de cLDL y los pacientes con hipovitaminosis D presentaron concentraciones mayores de triglicéridos y AGL y

menores de cHDL y cLDL. Las diferencias en los triglicéridos y AGL persistieron tras ajustar por el IMC y la estacionalidad. Para reforzar estos hallazgos, observamos que los pacientes con concentraciones de triglicéridos > 200 mg/dL, presentaban también concentraciones disminuidas de vitamina D.

Todos estos datos confirman y amplían el conocimiento previo sobre la asociación entre la hipovitaminosis D y las alteraciones características de la dislipemia aterogénica observada en diferentes poblaciones. Así, en población general, observamos que Melamed et al. ⁽¹³⁶⁾ encontraron una relación directa entre las concentraciones de calcidiol y las de colesterol total en la población perteneciente al estudio NHANES. Otros trabajos demuestran una asociación entre la hipovitaminosis D y la presencia de concentraciones aumentadas de triglicéridos y disminuidas de cHDL en sujetos Europeos y Asiáticos ⁽¹⁸⁶⁾. El estudio de Ponda et al. ⁽¹⁸⁷⁾, a pesar de tener algunas limitaciones metodológicas, es el estudio más amplio que analiza la relación entre la hipovitaminosis D y los parámetros lipídicos en población americana. En este estudio también encuentran una asociación entre la hipovitaminosis D y un perfil lipídico desfavorable en cuanto a cHDL y triglicéridos y, a diferencia del estudio de Melamed, muestran que las concentraciones de colesterol total y también de cLDL están aumentadas en los pacientes con hipovitaminosis D. Como resumen de los distintos estudios tenemos el metaanálisis publicado por Jorde et al. ⁽¹⁸⁸⁾, que concluye que la hipovitaminosis D se asocia con un perfil lipídico desfavorable caracterizado por unas concentraciones aumentadas de triglicéridos y disminuidas de cHDL, mientras no queda clara la presencia y dirección de una posible asociación con el colesterol total y cLDL. Los autores de este metaanálisis concluyen que no todos los estudios incluidos tienen en cuenta posibles factores de confusión, con lo que las conclusiones deben tomarse con precaución.

Por otra parte, los estudios que han evaluado la relación entre las concentraciones de calcidiol y los parámetros lipídicos en sujetos con diabetes tipo 2 son escasos y no concluyentes. En 2006, Targher et al. ⁽²²¹⁾, en una cohorte de 390 pacientes con diabetes tipo 2, no objetivó diferencias en cuanto a cHDL, triglicéridos o cLDL entre los pacientes con concentraciones de calcidiol < ó > de 37,5 nmol/L. Estudios posteriores tampoco encontraron ninguna asociación entre las concentraciones de calcidiol y las fracciones lipídicas en los pacientes con diabetes tipo 2

(118,216,219,235,264). Por el contrario, y de acuerdo con nuestros datos, Cigolini et al. ⁽²²²⁾, sí observaron una relación entre la presencia de hipovitaminosis D y un aumento en las concentraciones de triglicéridos en una población de 459 pacientes con diabetes tipo 2. Las diferencias metodológicas entre estos estudios son importantes y probablemente contribuyan a la falta de uniformidad en los resultados. Es importante destacar que estudios recientes en los que se tiene en cuenta la adiposidad confirman nuestros resultados. Así, Alam et al. ⁽²²⁴⁾, en un estudio realizado en UK con 563 sujetos con diabetes, muestran que las concentraciones de vitamina D se relacionan con las concentraciones de triglicéridos y cHDL y que la relación con el cHDL permanece significativa tras ajustar por el IMC. Yu et al. ⁽²²⁸⁾ objetivan, por otra parte, una asociación significativa e inversa entre las concentraciones de calcidiol y las de triglicéridos y cLDL, tras ajustar por la altura, la función renal y la HbA1c, aunque no tienen en cuenta el IMC. Finalmente, es interesante comentar el artículo de Guasch et al. ⁽²⁷¹⁾, realizado en este caso en población obesa, y que revela que las concentraciones disminuidas de vitamina D se asocian con una mayor probabilidad de presentar dislipemia aterogénica independientemente del IMC.

Si bien tanto los datos de la literatura como los nuestros muestran una clara asociación entre la hipovitaminosis D y la dislipemia aterogénica, los mecanismos de esta asociación no están esclarecidos. Se ha postulado que las concentraciones de vitamina D podrían influenciar la actividad de la lipoprotein lipasa, de manera que sujetos con concentraciones disminuidas de vitamina D podrían tener una menor actividad de esta enzima, favoreciendo el aumento en los triglicéridos plasmáticos típico de la dislipemia aterogénica ⁽²⁷²⁾. Otros posibles mecanismos incluirían la modulación de la síntesis de triglicéridos con los cambios en el calcio plasmático o los efectos ya comentados de la vitamina D sobre la insulinoresistencia, entre otros ⁽¹⁸⁸⁾.

En el estudio VitD-HFC, hemos observado que el tratamiento para la dislipemia se acompaña de un aumento en las concentraciones de calcidiol que no se correlaciona con los cambios observados en los parámetros lipídicos, lo que sugiere una posible relación indirecta entre lípidos y vitamina D. En este sentido, se ha postulado que el tratamiento con estatinas podría tener efectos beneficiosos sobre el hueso mediante un aumento en las concentraciones de vitamina D ⁽²⁷³⁾. De hecho, algunos estudios han observado un aumento en las concentraciones de calcidiol

con el uso de estatinas, aunque existe cierta heterogeneidad en los resultados que podría deberse a efectos diferenciales entre las distintas estatinas ⁽²⁷⁴⁻²⁸³⁾. A diferencia de estos estudios previos, los pacientes incluidos en nuestro estudio fueron tratados según la práctica clínica habitual, de manera que a pesar que la mayoría de ellos recibieron estatinas, algunos fueron tratados también o exclusivamente con otros fármacos como los fibratos. La información referente a los efectos de otros fármacos hipolipemiantes sobre las concentraciones de vitamina D es escasa, pero no se puede descartar que el ezetimibe o los fibratos puedan tener un papel ^(199,284).

III. FORTALEZAS Y LIMITACIONES

1- Fortalezas

Selección de pacientes:

Consideramos que una de las principales fortalezas de la presente tesis es la selección de los pacientes. En primer lugar, se eliminó del análisis a los pacientes que estuvieran en tratamiento con suplementos de calcio o vitamina D. Esto nos parece imprescindible si se quieren evitar interferencias en el estado de la vitamina D que no sean debidas a los posibles factores de estudio. En segundo lugar, en todos los estudios, los sujetos incluidos fueron exclusivamente caucásicos. Si bien esto puede parecer una limitación al debilitar la generalización de los resultados a distintas etnias, dada la conocida influencia de la raza en las concentraciones de vitamina D, el hecho de restringir el análisis a una etnia concreta es una manera de evitar posibles sesgos. Las conclusiones de esta tesis, deberán, pues corroborarse con otros estudios en las distintas etnias diferentes a la caucásica. En tercer lugar, en el estudio obesidad-VitD, dado que disponíamos de un elevado número potencial de pacientes para incluir en el estudio, pudimos ser todavía más selectivos. Así, seleccionamos a los pacientes que atendieron la consulta durante los meses de menor exposición solar. Además, se excluyeron a los pacientes que pudieran tener condiciones que interfirieran con el metabolismo de la vitamina D. Las mujeres postmenopáusicas también fueron excluidas debido a que los cambios en las concentraciones de estrógenos pueden afectar a la biodisponibilidad de vitamina D. Este hecho, junto con la utilización de los criterios de síndrome metabólico del ATP III, que tiene en cuenta los perímetros de cintura adaptados a la población americana para definir la obesidad abdominal, puede ayudar a explicar la baja prevalencia de síndrome metabólico observada en nuestro estudio.

Ajuste por la estacionalidad y el índice de masa corporal:

Otro de los puntos fuertes de la presente tesis ha sido el ajuste de los resultados por dos variables que sabemos que influyen las concentraciones de vitamina D, como son la estacionalidad y el IMC.

Ya hemos comentado que todos aquellos factores que condicionen la exposición de la piel a los rayos solares pueden afectar a las concentraciones de calcidiol de un individuo. Barcelona se encuentra a una latitud de 41.23 °N, equiparable a la latitud de Boston, donde sabemos que pasado agosto se experimenta una disminución brusca en la síntesis cutánea de colecalciferol, la cual llega a ser indetectable desde noviembre a febrero y que empieza a despuntar de nuevo en marzo ⁽⁶⁰⁾. Conociendo estos datos, en el estudio Obesidad-VitD se seleccionaron únicamente a los pacientes atendidos entre octubre y abril para minimizar el efecto de la exposición solar. En los estudios DM2-VitD y HFC-VitD, dada la menor disposición de pacientes, esta cuidadosa selección no pudo realizarse, pero en el análisis estadístico se tuvo en cuenta la época de exposición solar o la estacionalidad, de manera que en ningún caso se ha descuidado el efecto que la exposición solar puede tener sobre las concentraciones de vitamina D.

Por otra parte, dado que se conoce la asociación de la obesidad o el IMC, tanto con la hipovitaminosis D, como con los componentes del síndrome metabólico, tuvimos en cuenta la adiposidad en todos los análisis realizados. Este aspecto es uno de las principales fortalezas de la presente tesis, y de hecho diversos autores remarcan la falta de ajuste por la adiposidad como una de las debilidades de una gran cantidad de estudios que analizan la relación entre el déficit de vitamina D y los factores de riesgo cardiovascular ⁽¹⁶⁴⁾.

Enfoque global:

La presente tesis ha pretendido realizar un enfoque global centrado en los componentes del síndrome metabólico que han mostrado una relación más estrecha con la insulinorresistencia propia de este síndrome, que son la obesidad, la dislipemia, la diabetes y el estado inflamatorio de

bajo grado y las adipoquinas, a diferencia de otros componentes como la hipertensión arterial, en la que la relación no es tan estrecha ⁽²⁰⁾. Este enfoque global permite detectar posibles interrelaciones entre estos componentes en caso de haberlas y amplía la capacidad de detectar asociaciones desconocidas.

2- Limitaciones

Naturaleza de los estudios:

Los estudios incluidos en la presente tesis han sido de tipo transversal y de tipo longitudinal prospectivo. Dada la naturaleza observacional de todos ellos las conclusiones acerca de mecanismos causales son limitadas. Sin embargo, el hallazgo de asociaciones en este tipo de diseños debe entenderse como un punto de partida para explorar posibles asociaciones y diseñar posteriormente estudios randomizados que permitan esclarecer cuál es la verdadera dirección causal entre ellas.

Número de pacientes:

El número de pacientes incluidos en los estudios DM2-VitD y HFC-VitD es reducido ya que partíamos de estudios diseñados para otros objetivos y además teníamos la limitación añadida de la disponibilidad de muestras congeladas de los pacientes para realizar la determinación de calcidiol, pero nos ha permitido analizar variables inasequibles en grandes poblaciones. La limitación en cuanto al número de pacientes puede reducir, en parte, la capacidad de detectar asociaciones o de realizar análisis estadísticos complejos donde se incluyan un amplio número de variables. Este hecho se debe tener en cuenta en la interpretación de los resultados, pero en sí mismo no es un motivo para refutar los hallazgos. En las conclusiones tenemos en cuenta este aspecto en todo momento y se ha considerado, asimismo, la plausibilidad biológica de los

resultados, su magnitud y significado clínico y el apoyo dado por resultados similares en otras poblaciones.

Heterogeneidad de los tratamientos instaurados en los estudios longitudinales:

En el caso de los estudios DM2-VitD y HFC-VitD, se realizó un análisis longitudinal tras la implementación de medidas dirigidas a la mejoría del control glucémico y lipídico, respectivamente. Dado que estas medidas fueron las propias de la práctica clínica habitual, los tratamientos aplicados fueron heterogéneos, es decir, distintos de paciente a paciente. Esto significa que no se evaluó un único fármaco en concreto sino varios fármacos a la vez, además del consejo sobre estilos de vida. Este hecho tiene consecuencias en cuanto a la interpretación de resultados. Hay que tener en cuenta que si el efecto sobre las concentraciones de vitamina D es secundario a la toma de un fármaco en concreto, el uso simultáneo de otras medidas, puede reducir la capacidad de observar un efecto verdadero. Por otra parte, no debería haber problema si el mecanismo verdadero del cambio en las concentraciones de vitamina D es la mejoría del control glucémico o lipídico per se y no las estrategias utilizadas para ello. Nuestro estudio no permite esclarecer la causa del cambio en las concentraciones de calcidiol en los estudios longitudinales y para ello, se necesitan estudios prospectivos, a poder ser randomizados frente a placebo y utilizando los diferentes tratamientos por separado.

Variables no analizadas:

Es muy difícil que un estudio pueda incluir o tener en cuenta todas las variables que potencialmente puedan interferir en los resultados, bien por la dificultad en la medición de ciertas variables, bien por falta de recursos.

En nuestro caso, en primer lugar, hay que remarcar que no hemos recogido información acerca de los hábitos dietéticos y de exposición solar de cada individuo por separado. No hay que descartar un posible sesgo debido a este hecho. No obstante, si tenemos en cuenta que la alimentación

supone una fuente muy escasa de las concentraciones de calcidiol, el efecto de la dieta es limitado. En cuanto al posible efecto de las diferencias interindividuales de exposición solar, éste queda suprimido en el estudio Obesidad-VitD, debido a que las determinaciones de calcidiol se realizaron en una época del año en que no hay síntesis cutánea de vitamina D. En los estudios DM2-VitD y HFC-VitD, especialmente en los estudios longitudinales, no podemos descartar alguna influencia de la exposición solar sobre las concentraciones de calcidiol. Este hecho es importante tenerlo en cuenta en los estudios longitudinales, pues las estrategias de mejoría del control glucémico y lipídico a menudo incluyen recomendaciones de hábitos de vida como la práctica de ejercicio al aire libre.

Finalmente, hay que remarcar que no hemos analizado otros marcadores del metabolismo óseo, como serían las concentraciones de PTH o el calcio. Se sabe que las concentraciones aumentadas de PTH se relacionan con una mayor incidencia de hipertensión e incluso de mortalidad cardiovascular ⁽¹⁴²⁾. No obstante, la mayoría de estudios no demuestran un efecto de PTH sobre la relación entre la hipovitaminosis D y el síndrome metabólico ^(154,155,203). En cuanto al calcio, existe controversia acerca de si calcio contenido en la dieta o en suplementos puede tener algún efecto sobre la enfermedad cardiovascular y el síndrome metabólico, mientras que los efectos del calcio plasmático han sido menos estudiados ^(285,286). Nosotros no hemos analizado el posible efecto del calcio plasmático pero hemos excluido de nuestros análisis aquellos pacientes que estuvieran tomando suplementos de calcio, como ya se ha comentado.

CONCLUSIONES

I. CONCLUSIÓN GENERAL

El estudio de la relación entre la hipovitaminosis D y los diferentes componentes del síndrome metabólico, así como la evaluación del efecto de la mejoría del control de los componentes del síndrome metabólico sobre las concentraciones de la vitamina D, demuestra la existencia de una asociación de la hipovitaminosis D con el síndrome metabólico y sus componentes. Aún en ausencia de causalidad definida, por la elevada prevalencia y la estrecha relación, la hipovitaminosis D podría considerarse un elemento más del síndrome metabólico.

II. CONCLUSIONES ESPECÍFICAS

- 1) La hipovitaminosis D se relaciona con el grado de obesidad y el síndrome metabólico.
- 2) La relación existente entre la hipovitaminosis D y el síndrome metabólico es independiente del grado de obesidad.
- 3) La prevalencia de hipovitaminosis D está elevada en los pacientes con diabetes tipo 2, independientemente de la duración de la diabetes, de la presencia de complicaciones y del grado de control glucémico.
- 4) Los pacientes con hiperlipemia familiar combinada presentan concentraciones disminuidas de vitamina D.
- 5) La adiposidad explica algunas de las asociaciones entre la hipovitaminosis D y los componentes del síndrome metabólico.
- 6) Las alteraciones lipídicas propias de la dislipemia aterogénica se asocian con la hipovitaminosis D. Esta relación es independiente de la obesidad, tanto en los sujetos con diabetes tipo 2 como en los sujetos con hiperlipemia familiar combinada.
- 7) Los pacientes con hipovitaminosis D presentan una resistencia a la insulina aumentada.
- 8) La resistencia a la insulina y el estado inflamatorio de bajo grado no explican la relación entre la hipovitaminosis D y el síndrome metabólico.
- 9) El tratamiento de la dislipemia en los pacientes con hiperlipemia familiar combinada aumenta las concentraciones de vitamina D por mecanismos desconocidos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Emanuela F, Grazia M, Marco de R, et al. Inflammation as a Link between Obesity and Metabolic Syndrome. *J Nutr Metab* 2012;2012:476380.
2. Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ. The metabolic syndrome. *Lancet* 2005;365:1415-28.
3. Reaven GM. Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes* 1988;37:1595-607.
4. Alberti KG, Zimmet PZ. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. *Diabet Med* 1998;15:539-53.
5. Balkau B, Charles MA. Comment on the provisional report from the WHO consultation. European Group for the Study of Insulin Resistance (EGIR). *Diabet Med* 1999;16:442-3.
6. Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report. *Circulation* 2002;106:3143-421.
7. Einhorn D, Reaven GM, Cobin RH, et al. American College of Endocrinology position statement on the insulin resistance syndrome. *Endocr Pract* 2003;9:237-52.
8. Clinical Guidelines on the Identification, Evaluation, and Treatment of Overweight and Obesity in Adults--The Evidence Report. National Institutes of Health. *Obes Res* 1998;6 Suppl 2:51S-209S.
9. Zimmet P, Alberti G, Shaw J. A new IDF worldwide definition of the metabolic syndrome: the rationale and the results. *Diabetes Voice* 2005; 50:32.
10. Lois K, Young J, Kumar S. Obesity; epiphenomenon or cause of metabolic syndrome? *Int J Clin Pract* 2008;62:932-8.
11. Grundy SM, Cleeman JI, Daniels SR, et al. Diagnosis and management of the metabolic syndrome: an American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute Scientific Statement. *Circulation* 2005;112:2735-52.
12. Genuth S, Alberti KG, Bennett P, et al. Follow-up report on the diagnosis of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2003;26:3160-7.
13. Cameron AJ, Magliano DJ, Zimmet PZ, et al. The metabolic syndrome in Australia: prevalence using four definitions. *Diabetes Res Clin Pract* 2007;77:471-8.
14. Grundy SM. Metabolic syndrome: connecting and reconciling cardiovascular and diabetes worlds. *J Am Coll Cardiol* 2006;47:1093-100.
15. Ford ES, Li C, Zhao G. Prevalence and correlates of metabolic syndrome based on a harmonious definition among adults in the US. *J Diabetes* 2010;2:180-93.

16. Mozumdar A, Liguori G. Persistent increase of prevalence of metabolic syndrome among U.S. adults: NHANES III to NHANES 1999-2006. *Diabetes Care* 2011;34:216-9.
17. Fernandez-Berges D, Cabrera de Leon A, Sanz H, et al. Metabolic syndrome in Spain: prevalence and coronary risk associated with harmonized definition and WHO proposal. DARIOS study. *Rev Esp Cardiol (Engl)* 2012;65:241-8.
18. Alegria E, Cordero A, Laclaustra M, et al. Prevalence of metabolic syndrome in the Spanish working population: MESYAS registry. *Rev Esp Cardiol* 2005;58:797-806.
19. Rodriguez Bernardino A, Garcia Polavieja P, Reviriego Fernandez J, et al. [Prevalence of metabolic syndrome and consistency in its diagnosis in type 2 diabetic patients in Spain]. *Endocrinol Nutr* 2010;57:60-70.
20. Haffner SM, Valdez RA, Hazuda HP, et al. Prospective analysis of the insulin-resistance syndrome (syndrome X). *Diabetes* 1992;41:715-22.
21. Kahn R. Metabolic syndrome: is it a syndrome? Does it matter? *Circulation* 2007;115:1806-10.
22. Grundy SM. Obesity, metabolic syndrome, and cardiovascular disease. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:2595-600.
23. Bonora E, Coscelli C, Butturini U. Relationship between insulin resistance, insulin secretion and insulin metabolism in simple obesity. *Int J Obes* 1985;9:307-12.
24. Malnick SD, Knobler H. The medical complications of obesity. *QJM* 2006;99:565-79.
25. Must A, Spadano J, Coakley EH, et al. The disease burden associated with overweight and obesity. *JAMA* 1999;282:1523-9.
26. Eckel RH, Krauss RM. American Heart Association call to action: obesity as a major risk factor for coronary heart disease. AHA Nutrition Committee. *Circulation* 1998;97:2099-100.
27. Nakamura T, Tokunaga K, Shimomura I, et al. Contribution of visceral fat accumulation to the development of coronary artery disease in non-obese men. *Atherosclerosis* 1994;107:239-46.
28. Folsom AR, Kaye SA, Sellers TA, et al. Body fat distribution and 5-year risk of death in older women. *JAMA* 1993;269:483-7.
29. Larsson B, Svardsudd K, Welin L, et al. Abdominal adipose tissue distribution, obesity, and risk of cardiovascular disease and death: 13 year follow up of participants in the study of men born in 1913. *Br Med J (Clin Res Ed)* 1984;288:1401-4.
30. Carr DB, Utzschneider KM, Hull RL, et al. Intra-abdominal fat is a major determinant of the National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III criteria for the metabolic syndrome. *Diabetes* 2004;53:2087-94.

31. Shirai K. Obesity as the core of the metabolic syndrome and the management of coronary heart disease. *Curr Med Res Opin* 2004;20:295-304.
32. Borkan GA, Hulth DE, Gerzof SG, et al. Age changes in body composition revealed by computed tomography. *J Gerontol* 1983;38:673-7.
33. Lemieux S, Prud'homme D, Bouchard C, et al. Sex differences in the relation of visceral adipose tissue accumulation to total body fatness. *Am J Clin Nutr* 1993;58:463-7.
34. Haarbo J, Marslew U, Gotfredsen A, et al. Postmenopausal hormone replacement therapy prevents central distribution of body fat after menopause. *Metabolism* 1991;40:1323-6.
35. Wajchenberg BL. Subcutaneous and visceral adipose tissue: their relation to the metabolic syndrome. *Endocr Rev* 2000;21:697-738.
36. Perusse L, Despres JP, Lemieux S, et al. Familial aggregation of abdominal visceral fat level: results from the Quebec family study. *Metabolism* 1996;45:378-82.
37. Sharma AM, Staels B. Review: Peroxisome proliferator-activated receptor gamma and adipose tissue--understanding obesity-related changes in regulation of lipid and glucose metabolism. *J Clin Endocrinol Metab* 2007;92:386-95.
38. Fain JN, Madan AK, Hiler ML, et al. Comparison of the release of adipokines by adipose tissue, adipose tissue matrix, and adipocytes from visceral and subcutaneous abdominal adipose tissues of obese humans. *Endocrinology* 2004;145:2273-82.
39. Enriori PJ, Evans AE, Sinnayah P, et al. Leptin resistance and obesity. *Obesity* 2006;14 Suppl 5:254S-258S.
40. Inadera H. The usefulness of circulating adipokine levels for the assessment of obesity-related health problems. *Int J med Sci* 2008;5:248-62.
41. Flores M. A role of vitamin D in low-intensity chronic inflammation and insulin resistance in type 2 diabetes mellitus? *Nutr Res Rev* 2005;18:175-82.
42. Weiss R. Fat distribution and storage: how much, where, and how? *Eur J Endocrinol* 2007;157 Suppl 1:S39-45.
43. Griffin ME, Marcucci MJ, Cline GW, et al. Free fatty acid-induced insulin resistance is associated with activation of protein kinase C theta and alterations in the insulin signaling cascade. *Diabetes* 1999;48:1270-4.
44. Wagner AM, Perez A, Calvo F, et al. Apolipoprotein(B) identifies dyslipidemic phenotypes associated with cardiovascular risk in normocholesterolemic type 2 diabetic patients. *Diabetes Care* 1999;22:812-7.
45. Wagner AM, Perez A. Diabetic dyslipidemia: assessment and treatment. *Med Clin (Barc)* 2002;119:260-4.

46. Marsh JB. Lipoprotein metabolism in obesity and diabetes: insights from stable isotope kinetic studies in humans. *Nutr Rev* 2003;61:363-75.
47. Carr MC, Brunzell JD. Abdominal obesity and dyslipidemia in the metabolic syndrome: importance of type 2 diabetes and familial combined hyperlipidemia in coronary artery disease risk. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:2601-7.
48. Austin MA, King MC, Vranizan KM, et al. Atherogenic lipoprotein phenotype. A proposed genetic marker for coronary heart disease risk. *Circulation* 1990;82:495-506.
49. Hansel B, Giral P, Nobecourt E, et al. Metabolic syndrome is associated with elevated oxidative stress and dysfunctional dense high-density lipoprotein particles displaying impaired antioxidative activity. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:4963-71.
50. Chapman MJ, Guerin M, Bruckert E. Atherogenic, dense low-density lipoproteins. Pathophysiology and new therapeutic approaches. *Eur Heart J* 1998;19 Suppl A:A24-30.
51. Wilson PW, D'Agostino RB, Sullivan L, et al. Overweight and obesity as determinants of cardiovascular risk: the Framingham experience. *Arch Intern Med* 2002;162:1867-72.
52. Wilson PW, Grundy SM. The metabolic syndrome: a practical guide to origins and treatment: Part II. *Circulation* 2003;108:1537-40.
53. Bianchi S, Maffei S, Prontera C, et al. Preanalytical, analytical (DiaSorin LIAISON) and clinical variables potentially affecting the 25-OH Vitamin D estimation. *Clin Biochem* 2012;45: 1652-7.
54. Hanson RL, Imperatore G, Bennett PH, et al. Components of the "metabolic syndrome" and incidence of type 2 diabetes. *Diabetes* 2002;51:3120-7.
55. Laaksonen DE, Lakka HM, Niskanen LK, et al. Metabolic syndrome and development of diabetes mellitus: application and validation of recently suggested definitions of the metabolic syndrome in a prospective cohort study. *Am J Epidemiol* 2002;156:1070-7.
56. Ninomiya JK, L'Italien G, Criqui MH, et al. Association of the metabolic syndrome with history of myocardial infarction and stroke in the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Circulation* 2004;109:42-6.
57. Klein BE, Klein R, Lee KE. Components of the metabolic syndrome and risk of cardiovascular disease and diabetes in Beaver Dam. *Diabetes Care* 2002;25:1790-4.
58. Lakka HM, Laaksonen DE, Lakka TA, et al. The metabolic syndrome and total and cardiovascular disease mortality in middle-aged men. *JAMA* 2002;288:2709-16.
59. Girman CJ, Rhodes T, Mercuri M, et al. The metabolic syndrome and risk of major coronary events in the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S) and the Air Force/Texas Coronary Atherosclerosis Prevention Study (AFCAPS/TexCAPS). *Am J Cardiol* 2004;93:136-41.
60. Holick MF. McCollum Award Lecture, 1994: vitamin D--new horizons for the 21st century. *Am J Clin Nutr* 1994;60:619-30.

61. Adams JS, Hewison M. Update in vitamin D. *J Clin Endocrinol Metab* 2010;95:471-8.
62. Holick MF. Environmental factors that influence the cutaneous production of vitamin D. *Am J Clin Nutr* 1995;61:638S-645S.
63. Holick MF. Vitamin D: a d-lightful solution for health. *J Investig Med* 2011;59:872-80.
64. Holick MF, Binkley NC, Bischoff-Ferrari HA, et al. Evaluation, treatment, and prevention of vitamin D deficiency: an Endocrine Society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab* 2011;96:1911-30.
65. Reichel H, Koeffler HP, Norman AW. The role of the vitamin D endocrine system in health and disease. *N Engl J Med* 1989;320:980-91.
66. Chen TC, Chimeh F, Lu Z, et al. Factors that influence the cutaneous synthesis and dietary sources of vitamin D. *Arch Biochem Biophys* 2007;460:213-7.
67. Holick MF. Vitamin D deficiency. *N Engl J Med* 2007;357:266-81.
68. Bell NH. Vitamin D-endocrine system. *J Clin Invest* 1985;76:1-6.
69. Haussler MR, McCain TA. Basic and clinical concepts related to vitamin D metabolism and action (first of two parts). *N Engl J Med* 1977;297:974-83.
70. Chun RF, Adams JS, Hewison M. Back to the future: a new look at 'old' vitamin D. *J Endocrinol* 2008;198:261-9.
71. Speeckaert M, Huang G, Delanghe JR, et al. Biological and clinical aspects of the vitamin D binding protein (Gc-globulin) and its polymorphism. *Clin Chim Acta* 2006;372:33-42.
72. Rosen CJ, Adams JS, Bikle DD, et al. The nonskeletal effects of vitamin D: an endocrine society scientific statement. *Endocr Rev* 2012;33:456-92.
73. Holick MF, Chen TC. Vitamin D deficiency: a worldwide problem with health consequences. *Am J Clin Nutr* 2008;87:1080S-6S.
74. Holick MF. The use and interpretation of assays for vitamin D and its metabolites. *J Nutr* 1990;120 Suppl 11:1464-9.
75. Hollis BW. Assessment of vitamin D status and definition of a normal circulating range of 25-hydroxyvitamin D. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 2008;15:489-94.
76. Belsey R, Deluca HF, Potts JT, Jr. Competitive binding assay for vitamin D and 25-OH vitamin D. *J Clin Endocrinol Metab* 1971;33:554-7.
77. Haddad JG, Chyu KJ. Competitive protein-binding radioassay for 25-hydroxycholecalciferol. *J Clin Endocrinol Metab* 1971;33:992-5.

78. Eisman JA, Shepard RM, DeLuca HF. Determination of 25-hydroxyvitamin D2 and 25-hydroxyvitamin D3 in human plasma using high-pressure liquid chromatography. *Anal Biochem* 1977;80:298-305.
79. Zerwekh JE. The measurement of vitamin D: analytical aspects. *Ann Clin Biochem* 2004;41:272-81.
80. Hollis BW, Napoli JL. Improved radioimmunoassay for vitamin D and its use in assessing vitamin D status. *Clin Chem* 1985;31:1815-9.
81. Correia LC, Sodre F, Garcia G, et al. Relation of severe deficiency of vitamin D to cardiovascular mortality during acute coronary syndromes. *Am J Cardiol* 2013;111:324-7.
82. Carter GD. 25-Hydroxyvitamin D assays: the quest for accuracy. *Clin Chem* 2009;55:1300-2.
83. Yetley EA, Pfeiffer CM, Schleicher RL, et al. NHANES monitoring of serum 25-hydroxyvitamin D: a roundtable summary. *J Nutr* 2010;140:2030S-45S.
84. Chen H, McCoy LF, Schleicher RL, et al. Measurement of 25-hydroxyvitamin D3 (25OHD3) and 25-hydroxyvitamin D2 (25OHD2) in human serum using liquid chromatography-tandem mass spectrometry and its comparison to a radioimmunoassay method. *Clin Chim Acta* 2008;391:6-12.
85. Lips P. Vitamin D deficiency and secondary hyperparathyroidism in the elderly: consequences for bone loss and fractures and therapeutic implications. *Endocr Rev* 2001;22:477-501.
86. Hollis BW. Circulating 25-hydroxyvitamin D levels indicative of vitamin D sufficiency: implications for establishing a new effective dietary intake recommendation for vitamin D. *J Nutr* 2005;135:317-22.
87. Grant WB, Holick MF. Benefits and requirements of vitamin D for optimal health: a review. *Altern Med Rev* 2005;10:94-111.
88. Cherniack EP, Levis S, Troen BR. Hypovitaminosis D: a widespread epidemic. *Geriatrics* 2008;63:24-30.
89. Bischoff-Ferrari HA. The 25-hydroxyvitamin D threshold for better health. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2007;103:614-9.
90. Holick MF, Binkley NC, Bischoff-Ferrari HA, et al. Guidelines for preventing and treating vitamin D deficiency and insufficiency revisited. *J Clin Endocrinol Metab* 2012;97:1153-8.
91. Yetley EA. Assessing the vitamin D status of the US population. *Am J Clin Nutr* 2008;88:558S-564S.
92. Ginde AA, Liu MC, Camargo CA, Jr. Demographic differences and trends of vitamin D insufficiency in the US population, 1988-2004. *Arch Intern Med* 2009;169:626-32.

93. Holick MF. High prevalence of vitamin D inadequacy and implications for health. *Mayo Clin Proc* 2006;81:353-73.
94. Gonzalez-Molero I, Morcillo S, Valdes S, et al. Vitamin D deficiency in Spain: a population-based cohort study. *Eur J Clin Nutr* 2011;65:321-8.
95. Hahn TJ. Drug-induced disorders of vitamin D and mineral metabolism. *Clin Endocrinol Metab* 1980;9:107-27.
96. Brodie MJ, Boobis AR, Hillyard CJ, et al. Effect of rifampicin and isoniazid on vitamin D metabolism. *Clin Pharmacol Ther* 1982;32:525-30.
97. Bischoff-Ferrari HA, Kiel DP, Dawson-Hughes B, et al. Dietary calcium and serum 25-hydroxyvitamin D status in relation to BMD among U.S. adults. *J Bone Miner Res* 2009;24:935-42.
98. Bischoff-Ferrari HA, Dawson-Hughes B, Willett WC, et al. Effect of Vitamin D on falls: a meta-analysis. *JAMA* 2004;291:1999-2006.
99. Bischoff-Ferrari HA, Willett WC, Wong JB, et al. Prevention of nonvertebral fractures with oral vitamin D and dose dependency: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Arch Intern Med* 2009;169:551-61.
100. Bischoff-Ferrari HA. Relevance of vitamin D in muscle health. *Rev Endocr Metab Disord* 2012;13:71-7.
101. Garland CF, Garland FC. Do sunlight and vitamin D reduce the likelihood of colon cancer? *Int J Epidemiol* 1980;9:227-31.
102. Lefkowitz ES, Garland CF. Sunlight, vitamin D, and ovarian cancer mortality rates in US women. *Int J Epidemiol* 1994;23:1133-6.
103. Schwartz GG, Hulka BS. Is vitamin D deficiency a risk factor for prostate cancer? (Hypothesis). *Anticancer Res* 1990;10:1307-11.
104. Gombart AF, Luong QT, Koeffler HP. Vitamin D compounds: activity against microbes and cancer. *Anticancer Res* 2006;26:2531-42.
105. Cutolo M, Pizzorni C, Sulli A. Vitamin D endocrine system involvement in autoimmune rheumatic diseases. *Autoimmun Rev* 2011;11:84-7.
106. Scragg R. Vitamin D and public health: an overview of recent research on common diseases and mortality in adulthood. *Public Health Nutr* 2011;14:1515-32.
107. Holick MF. The vitamin D deficiency pandemic and consequences for nonskeletal health: mechanisms of action. *Mol Aspects Med* 2008;29:361-8.
108. McLeod JG, Hammond SR, Hallpike JF. Epidemiology of multiple sclerosis in Australia. With NSW and SA survey results. *Med J Aust* 1994;160:117-22.

109. Zipitis CS, Akobeng AK. Vitamin D supplementation in early childhood and risk of type 1 diabetes: a systematic review and meta-analysis. *Arch Dis Child* 2008;93:512-7.
110. Wortsman J, Matsuoka LY, Chen TC, et al. Decreased bioavailability of vitamin D in obesity. *Am J Clin Nutr* 2000;72:690-3.
111. Compston JE, Vedi S, Ledger JE, et al. Vitamin D status and bone histomorphometry in gross obesity. *Am J Clin Nutr* 1981;34:2359-63.
112. Ybarra J, Sanchez-Hernandez J, Gich I, et al. Unchanged hypovitaminosis D and secondary hyperparathyroidism in morbid obesity after bariatric surgery. *Obes Surg* 2005;15:330-5.
113. Vacek JL, Vanga SR, Good M, et al. Vitamin D deficiency and supplementation and relation to cardiovascular health. *Am J Cardiol* 2012;109:359-63.
114. Martins D, Wolf M, Pan D, et al. Prevalence of cardiovascular risk factors and the serum levels of 25-hydroxyvitamin D in the United States: data from the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Arch Intern Med* 2007;167:1159-65.
115. Skaaby T, Husemoen LL, Pisinger C, et al. Vitamin D status and incident cardiovascular disease and all-cause mortality: a general population study. *Endocrine* 2012;66: 1309-14.
116. Eaton CB, Young A, Allison MA, et al. Prospective association of vitamin D concentrations with mortality in postmenopausal women: results from the Women's Health Initiative (WHI). *Am J Clin Nutr* 2011;94:1471-8.
117. Michaelsson K, Baron JA, Snellman G, et al. Plasma vitamin D and mortality in older men: a community-based prospective cohort study. *Am J Clin Nutr* 2010;92:841-8.
118. Joergensen C, Gall MA, Schmedes A, et al. Vitamin D levels and mortality in type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2010;33:2238-43.
119. Joergensen C, Hovind P, Schmedes A, et al. Vitamin D levels, microvascular complications, and mortality in type 1 diabetes. *Diabetes Care* 2011;34:1081-5.
120. Thomas GN, o Hartaigh B, Bosch JA, et al. Vitamin D levels predict all-cause and cardiovascular disease mortality in subjects with the metabolic syndrome: the Ludwigshafen Risk and Cardiovascular Health (LURIC) Study. *Diabetes Care* 2012;35:1158-64.
121. Pilz S, Tomaschitz A, Friedl C, et al. Vitamin D status and mortality in chronic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant* 2011;26:3603-9.
122. Venkatram S, Chilimuri S, Adrish M, et al. Vitamin D deficiency is associated with mortality in the medical intensive care unit. *Crit Care* 2011;15:R292.
123. Zittermann A, Kuhn J, Dreier J, et al. Vitamin D status and the risk of major adverse cardiac and cerebrovascular events in cardiac surgery. *Eur Heart J* 2013. doi: 10.1093/eurheartj/ehs468.

124. Zittermann A, Iodice S, Pilz S, et al. Vitamin D deficiency and mortality risk in the general population: a meta-analysis of prospective cohort studies. *Am J Clin Nutr* 2012;95:91-100.
125. Schottker B, Haug U, Schomburg L, et al. Strong associations of 25-hydroxyvitamin D concentrations with all-cause, cardiovascular, cancer, and respiratory disease mortality in a large cohort study. *Am J Clin Nutr* 2013;97:782-93.
126. Wang L, Song Y, Manson JE, et al. Circulating 25-hydroxy-vitamin d and risk of cardiovascular disease: a meta-analysis of prospective studies. *Circ Cardiovasc Qual Outcomes* 2012;5:819-29.
127. Grant WB. An estimate of the global reduction in mortality rates through doubling vitamin D levels. *Eur J Clin Nutr* 2011;65:1016-26.
128. Rejnmark L, Avenell A, Masud T, et al. Vitamin d with calcium reduces mortality: patient level pooled analysis of 70,528 patients from eight major vitamin d trials. *J Clin Endocrinol Metab* 2012;97:2670-81.
129. Autier P, Gandini S. Vitamin D supplementation and total mortality: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Arch Intern Med* 2007;167:1730-7.
130. Bjelakovic G, Gluud LL, Nikolova D, et al. Vitamin D supplementation for prevention of mortality in adults. *Cochrane Database Syst Rev* 2011. doi:10.1002/14651858.CD007470.pub2.
131. Zittermann A, Schleithoff SS, Koerfer R. Putting cardiovascular disease and vitamin D insufficiency into perspective. *Br J Nutr* 2005;94:483-92.
132. Fan C, Nieto FJ, Bautista LE, et al. Vitamin D intake and cardiovascular mortality in the NHANES I epidemiological follow-up study cohort. *J Diet Suppl* 2012;9:79-89.
133. Parker J, Hashmi O, Dutton D, et al. Levels of vitamin D and cardiometabolic disorders: systematic review and meta-analysis. *Maturitas* 2010;65:225-36.
134. Schierbeck LL, Jensen TS, Bang U, et al. Parathyroid hormone and vitamin D--markers for cardiovascular and all cause mortality in heart failure. *Eur J Heart Fail* 2011;13:626-32.
135. Wang TJ, Pencina MJ, Booth SL, et al. Vitamin D deficiency and risk of cardiovascular disease. *Circulation* 2008;117:503-11.
136. Melamed ML, Michos ED, Post W, et al. 25-hydroxyvitamin D levels and the risk of mortality in the general population. *Arch Intern Med* 2008;168:1629-37.
137. Giovannucci E, Liu Y, Hollis BW, et al. 25-hydroxyvitamin D and risk of myocardial infarction in men: a prospective study. *Arch Intern Med* 2008;168:1174-80.
138. Dobnig H, Pilz S, Scharnagl H, et al. Independent association of low serum 25-hydroxyvitamin d and 1,25-dihydroxyvitamin d levels with all-cause and cardiovascular mortality. *Arch Intern Med* 2008;168:1340-9.

139. Anderson JL, May HT, Horne BD, et al. Relation of vitamin D deficiency to cardiovascular risk factors, disease status, and incident events in a general healthcare population. *Am J Cardiol* 2010;106:963-8.
140. Karakas M, Thorand B, Zierer A, et al. Low levels of serum 25-hydroxyvitamin D are associated with increased risk of myocardial infarction, especially in women: results from the MONICA/KORA Augsburg case-cohort study. *J Clin Endocrinol Metab* 2013;98:272-80.
141. Pittas AG, Chung M, Trikalinos T, et al. Systematic review: Vitamin D and cardiometabolic outcomes. *Ann Intern Med* 2010;152:307-14.
142. Pilz S, Tomaschitz A, Marz W, et al. Vitamin D, cardiovascular disease and mortality. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2011;75:575-84.
143. Lavie CJ, Lee JH, Milani RV. Vitamin D and cardiovascular disease will it live up to its hype? *J Am Coll Cardiol* 2011;58:1547-56.
144. Ford ES, Zhao G, Tsai J, et al. Vitamin D and all-cause mortality among adults in USA: findings from the National Health and Nutrition Examination Survey Linked Mortality Study. *Int J Epidemiol* 2011;40:998-1005.
145. Wang L, Manson JE, Song Y, et al. Systematic review: Vitamin D and calcium supplementation in prevention of cardiovascular events. *Ann Intern Med* 2010;152:315-23.
146. Elamin MB, Abu Elnour NO, Elamin KB, et al. Vitamin D and cardiovascular outcomes: a systematic review and meta-analysis. *J Clin Endocrinol Metab* 2011;96:1931-42.
147. Snijder MB, van Dam RM, Visser M, et al. Adiposity in relation to vitamin D status and parathyroid hormone levels: a population-based study in older men and women. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90:4119-23.
148. Carlin AM, Rao DS, Meslemani AM, et al. Prevalence of vitamin D depletion among morbidly obese patients seeking gastric bypass surgery. *Surg Obes Relat Dis* 2006;2:98-103.
149. Earthman CP, Beckman LM, Masodkar K, et al. The link between obesity and low circulating 25-hydroxyvitamin D concentrations: considerations and implications. *Int J Obes (Lond)* 2012;36:387-96.
150. Gonzalez-Molero I, Rojo-Martinez G, Morcillo S, et al. Hypovitaminosis D and incidence of obesity: a prospective study. *Eur J Clin Nutr* 2013. doi: 10.1038/ejcn.2013.48.
151. Ding C, Gao D, Wilding J, et al. Vitamin D signalling in adipose tissue. *Br J Nutr* 2012;108:1915-23.
152. Ford ES, Ajani UA, McGuire LC, et al. Concentrations of serum vitamin D and the metabolic syndrome among U.S. adults. *Diabetes Care* 2005;28:1228-30.

153. Maki KC, Fulgoni VL, 3rd, Keast DR, et al. Vitamin D intake and status are associated with lower prevalence of metabolic syndrome in U.S. adults: National Health and Nutrition Examination Surveys 2003-2006. *Metab Syndr Relat Disord* 2012;10:363-72.
154. Reis JP, von Muhlen D, Miller ER, 3rd. Relation of 25-hydroxyvitamin D and parathyroid hormone levels with metabolic syndrome among US adults. *Eur J Endocrinol* 2008;159:41-8.
155. Lee DM, Rutter MK, O'Neill TW, et al. Vitamin D, parathyroid hormone and the metabolic syndrome in middle-aged and older European men. *Eur J Endocrinol* 2009;161:947-54.
156. Hypponen E, Boucher BJ, Berry DJ, et al. 25-hydroxyvitamin D, IGF-1, and metabolic syndrome at 45 years of age: a cross-sectional study in the 1958 British Birth Cohort. *Diabetes* 2008;57:298-305.
157. Kim MK, Il Kang M, Won Oh K, et al. The association of serum vitamin D level with presence of metabolic syndrome and hypertension in middle-aged Korean subjects. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2010;73:330-8.
158. Moy FM, Bulgiba A. High prevalence of vitamin D insufficiency and its association with obesity and metabolic syndrome among Malay adults in Kuala Lumpur, Malaysia. *BMC Public Health* 2011;11:735.
159. Ahmadi S, Sinclair PJ, Foroughi N, et al. Monitoring muscle oxygenation after eccentric exercise-induced muscle damage using near-infrared spectroscopy. *Appl Physiol Nutr Metab* 2008;33:743-52.
160. Skaaby T, Husemoen LL, Pisinger C, et al. Vitamin D status and changes in cardiovascular risk factors: a prospective study of a general population. *Cardiology* 2012;123:62-70.
161. Gagnon C, Lu ZX, Magliano DJ, et al. Low serum 25-hydroxyvitamin D is associated with increased risk of the development of the metabolic syndrome at five years: results from a national, population-based prospective study (The Australian Diabetes, Obesity and Lifestyle Study: AusDiab). *J Clin Endocrinol Metab* 2012;97:1953-61.
162. Forouhi NG, Luan J, Cooper A, et al. Baseline serum 25-hydroxy vitamin d is predictive of future glycemic status and insulin resistance: the Medical Research Council Ely Prospective Study 1990-2000. *Diabetes* 2008;57:2619-25.
163. Scragg R, Sowers M, Bell C. Serum 25-hydroxyvitamin D, diabetes, and ethnicity in the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Diabetes Care* 2004;27:2813-8.
164. Pittas AG, Lau J, Hu FB, et al. The role of vitamin D and calcium in type 2 diabetes. A systematic review and meta-analysis. *J Clin Endocrinol Metab* 2007;92:2017-29.
165. Forouhi NG, Ye Z, Rickard AP, et al. Circulating 25-hydroxyvitamin D concentration and the risk of type 2 diabetes: results from the European Prospective Investigation into Cancer (EPIC)-Norfolk cohort and updated meta-analysis of prospective studies. *Diabetologia* 2012;55:2173-82.

166. Mitri J, Muraru MD, Pittas AG. Vitamin D and type 2 diabetes: a systematic review. *Eur J Clin Nutr* 2011;65:1005-15.
167. Khan H, Kunutsor S, Franco OH, et al. Vitamin D, type 2 diabetes and other metabolic outcomes: a systematic review and meta-analysis of prospective studies. *Proc Nutr Soc* 2013;72:89-97.
168. Schottker B, Herder C, Rothenbacher D, et al. Serum 25-hydroxyvitamin D levels and incident diabetes mellitus type 2: a competing risk analysis in a large population-based cohort of older adults. *Eur J Epidemiol* 2013; 28:267-75.
169. Tsur A, Feldman BS, Feldhammer I, et al. Decreased Serum Concentrations of 25-Hydroxycholecalciferol Are Associated With Increased Risk of Progression to Impaired Fasting Glucose and Diabetes. *Diabetes Care* 2013;36: 1361-67.
170. Mathieu C, Gysemans C, Giulietti A, et al. Vitamin D and diabetes. *Diabetologia* 2005;48:1247-57.
171. Chiu KC, Chu A, Go VL, et al. Hypovitaminosis D is associated with insulin resistance and beta cell dysfunction. *Am J Clin Nutr* 2004;79:820-5.
172. Kayaniyil S, Vieth R, Retnakaran R, et al. Association of vitamin D with insulin resistance and beta-cell dysfunction in subjects at risk for type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2010;33:1379-81.
173. Hypponen E. Vitamin D and increasing incidence of type 1 diabetes-evidence for an association? *Diabetes Obes Metab* 2010;12:737-43.
174. Brouwer-Brolsma EM, Bischoff-Ferrari HA, Bouillon R, et al. Vitamin D: do we get enough? : A discussion between vitamin D experts in order to make a step towards the harmonisation of dietary reference intakes for vitamin D across Europe. *Osteoporos Int* 2012;24: 1567-77.
175. Wolden-Kirk H, Overbergh L, Christesen HT, et al. Vitamin D and diabetes: its importance for beta cell and immune function. *Mol Cell Endocrinol* 2011;347:106-20.
176. Palomer X, Gonzalez-Clemente JM, Blanco-Vaca F, et al. Role of vitamin D in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Obes Metab* 2008;10:185-97.
177. George PS, Pearson ER, Witham MD. Effect of vitamin D supplementation on glycaemic control and insulin resistance: a systematic review and meta-analysis. *Diabet Med* 2012;29:e142-50.
178. Davidson MB, Duran P, Lee ML, et al. High-dose vitamin D supplementation in people with prediabetes and hypovitaminosis D. *Diabetes Care* 2013;36:260-6.
179. Barengolts E. Vitamin D role and use in prediabetes. *Endocr Pract* 2010;16:476-85.
180. Cangoz S, Chang YY, Chempakaseril SJ, et al. Vitamin D and type 2 diabetes mellitus. *J Clin Pharm Ther* 2013;38:81-4.

181. Burgaz A, Orsini N, Larsson SC, et al. Blood 25-hydroxyvitamin D concentration and hypertension: a meta-analysis. *J Hypertens* 2011;29:636-45.
182. Yuan W, Pan W, Kong J, 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. *J Biol Chem* 2007;282:29821-30.
183. Schleithoff SS, Zittermann A, Tenderich G, et al. Vitamin D supplementation improves cytokine profiles in patients with congestive heart failure: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *Am J Clin Nutr* 2006;83:754-9.
184. Witham MD, Nadir MA, Struthers AD. Effect of vitamin D on blood pressure: a systematic review and meta-analysis. *J Hypertens* 2009;27:1948-54.
185. Wilczek H, Sobra J, Justova V, et al. Iatropathogenic effect of Mevacor on vitamin D metabolism. *Cas Lek Cesk* 1989;128:1254-6.
186. Lu L, Yu Z, Pan A, et al. Plasma 25-hydroxyvitamin D concentration and metabolic syndrome among middle-aged and elderly Chinese individuals. *Diabetes Care* 2009;32:1278-83.
187. Ponda MP, Huang X, Odeh MA, et al. Vitamin D may not improve lipid levels: a serial clinical laboratory data study. *Circulation* 2012;126:270-7.
188. Jorde R, Grimnes G. Vitamin D and metabolic health with special reference to the effect of vitamin D on serum lipids. *Prog Lipid Res* 2011;50:303-12.
189. Thomson RL, Spedding S, Buckley JD. Vitamin D in the aetiology and management of polycystic ovary syndrome. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2012;77:343-50.
190. Barchetta I, Angelico F, Del Ben M, et al. Strong association between non alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and low 25(OH) vitamin D levels in an adult population with normal serum liver enzymes. *BMC Med* 2011;9:85.
191. Gomez-Gerique JA, Gutierrez-Fuentes JA, Montoya MT, et al. Lipid profile of the Spanish population: the DRECE (diet and risk of cardiovascular disease in Spain) study. DRECE study group. *Med Clin (Barc)* 1999;113:730-5.
192. The practical guide identification, evaluation, and treatment of overweight and obesity in adults. Bethesda: National Institutes of Health, 2000.
193. Hollis BW. Measuring 25-hydroxyvitamin D in a clinical environment: challenges and needs. *Am J Clin Nutr* 2008;88:507S-510S.
194. Wallace TM, Levy JC, Matthews DR. Use and abuse of HOMA modeling. *Diabetes Care* 2004;27:1487-95.
195. Wagner AM, Perez A, Zapico E, et al. Non-HDL cholesterol and apolipoprotein B in the dyslipidemic classification of type 2 diabetic patients. *Diabetes Care* 2003;26:2048-51.

196. Sanchez-Quesada JL, Benitez S, Otal C, et al. Density distribution of electronegative LDL in normolipemic and hyperlipemic subjects. *J Lipid Res* 2002;43:699-705.
197. Sanchez-Quesada JL, Perez A, Caixas A, et al. Electronegative low density lipoprotein subform is increased in patients with short-duration IDDM and is closely related to glycaemic control. *Diabetologia* 1996;39:1469-76.
198. Sanchez-Quesada JL, Perez A, Caixas A, et al. Effect of glycemie optimization on electronegative low-density lipoprotein in diabetes: relation to nonenzymatic glycosylation and oxidative modification. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:3243-9.
199. Liberopoulos EN, Makariou SE, Moutzouri E, et al. Effect of Simvastatin/Ezetimibe 10/10 mg Versus Simvastatin 40 mg on Serum Vitamin D Levels. *J Cardiovasc Pharmacol Ther* 2013;18: 229-33.
200. Vieth R. Vitamin D supplementation, 25-hydroxyvitamin D concentrations, and safety. *Am J Clin Nutr* 1999;69:842-56.
201. Alvarez JA, Ashraf A. Role of vitamin d in insulin secretion and insulin sensitivity for glucose homeostasis. *Int J Endocrinol* 2010;2010:351385.
202. Cheng Q, Boucher BJ, Leung PS. Modulation of hypovitaminosis D-induced islet dysfunction and insulin resistance through direct suppression of the pancreatic islet renin-angiotensin system in mice. *Diabetologia* 2013;56:553-62.
203. Ford ES, Zhao G, Li C, et al. Serum concentrations of vitamin D and parathyroid hormone and prevalent metabolic syndrome among adults in the United States. *J Diabetes* 2009;1:296-303.
204. Reis JP, von Muhlen D, Miller ER, 3rd, et al. Vitamin D status and cardiometabolic risk factors in the United States adolescent population. *Pediatrics* 2009;124:e371-9.
205. Chacko SA, Song Y, Manson JE, et al. Serum 25-hydroxyvitamin D concentrations in relation to cardiometabolic risk factors and metabolic syndrome in postmenopausal women. *Am J Clin Nutr* 2011;94:209-17.
206. Pacifico L, Anania C, Osborn JF, et al. Low 25(OH)D3 levels are associated with total adiposity, metabolic syndrome, and hypertension in Caucasian children and adolescents. *Eur J Endocrinol* 2011;165:603-11.
207. Ganji V, Zhang X, Shaikh N, et al. Serum 25-hydroxyvitamin D concentrations are associated with prevalence of metabolic syndrome and various cardiometabolic risk factors in US children and adolescents based on assay-adjusted serum 25-hydroxyvitamin D data from NHANES 2001-2006. *Am J Clin Nutr* 2011;94:225-33.
208. Botella-Carretero JJ, Alvarez-Blasco F, Villafruela JJ, et al. Vitamin D deficiency is associated with the metabolic syndrome in morbid obesity. *Clin Nutr* 2007;26:573-80.

209. Rueda S, Fernandez-Fernandez C, Romero F, et al. Vitamin D, PTH, and the metabolic syndrome in severely obese subjects. *Obes Surg* 2008;18:151-4.
210. McGill AT, Stewart JM, Lithander FE, et al. Relationships of low serum vitamin D3 with anthropometry and markers of the metabolic syndrome and diabetes in overweight and obesity. *Nutr J* 2008;7:4.
211. Hjelmessaeth J, Hofso D, Aasheim ET, et al. Parathyroid hormone, but not vitamin D, is associated with the metabolic syndrome in morbidly obese women and men: a cross-sectional study. *Cardiovasc Diabetol* 2009;8:7.
212. Rodriguez-Rodriguez E, Navia-Lomban B, Lopez-Sobaler AM, et al. Associations between abdominal fat and body mass index on vitamin D status in a group of Spanish schoolchildren. *Eur J Clin Nutr* 2010;64:461-7.
213. Caron-Jobin M, Morisset AS, Tremblay A, et al. Elevated serum 25(OH)D concentrations, vitamin D, and calcium intakes are associated with reduced adipocyte size in women. *Obesity (Silver Spring)* 2011;19:1335-41.
214. Jensen MD. Role of body fat distribution and the metabolic complications of obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 2008;93:S57-63.
215. Cheng S, Massaro JM, Fox CS, et al. Adiposity, cardiometabolic risk, and vitamin D status: the Framingham Heart Study. *Diabetes* 2010;59:242-8.
216. Yilmaz H, Kaya M, Sahin M, et al. Is vitamin D status a predictor glycaemic regulation and cardiac complication in type 2 diabetes mellitus patients? *Diabetes Metab Syndr* 2012;6:28-31.
217. Liu JX, Xiang J, Bu RF, et al. Serum 25-hydroxyvitamin D concentration is negatively related to carotid artery intima-media thickness in type 2 diabetic patients. *Zhonghua Xin Xue Guan Bing Za Zhi* 2012;40:115-9.
218. Brennan AM, Lee JH, Tsiodras S, et al. r-metHuLeptin improves highly active antiretroviral therapy-induced lipoatrophy and the metabolic syndrome, but not through altering circulating IGF and IGF-binding protein levels: observational and interventional studies in humans. *Eur J Endocrinol* 2009;160:173-6.
219. Lee JI, Oh SJ, Ha WC, et al. Serum 25-hydroxyvitamin D concentration and arterial stiffness among type 2 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract* 2012;95:42-7.
220. Suzuki A, Kotake M, Ono Y, et al. Hypovitaminosis D in type 2 diabetes mellitus: Association with microvascular complications and type of treatment. *Endocr J* 2006;53:503-10.
221. Targher G, Bertolini L, Padovani R, et al. Serum 25-hydroxyvitamin D3 concentrations and carotid artery intima-media thickness among type 2 diabetic patients. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2006;65:593-7.

222. Cigolini M, Iagulli MP, Miconi V, et al. Serum 25-hydroxyvitamin D3 concentrations and prevalence of cardiovascular disease among type 2 diabetic patients. *Diabetes Care* 2006;29:722-4.
223. Chonchol M, Cigolini M, Targher G. Association between 25-hydroxyvitamin D deficiency and cardiovascular disease in type 2 diabetic patients with mild kidney dysfunction. *Nephrol Dial Transplant* 2008;23:269-74.
224. Alam U, Najam O, Al-Himdani S, et al. Marked vitamin D deficiency in patients with diabetes in the UK: ethnic and seasonal differences and an association with dyslipidaemia. *Diabet Med* 2012;29:1343-5.
225. Joergensen C, Reinhard H, Schmedes A, et al. Vitamin D levels and asymptomatic coronary artery disease in type 2 diabetic patients with elevated urinary albumin excretion rate. *Diabetes Care* 2012;35:168-72.
226. Al-Badr W, Martin KJ. Vitamin D and kidney disease. *Clin J Am Soc Nephrol* 2008;3:1555-60.
227. de Zeeuw D, Agarwal R, Amdahl M, et al. Selective vitamin D receptor activation with paricalcitol for reduction of albuminuria in patients with type 2 diabetes (VITAL study): a randomised controlled trial. *Lancet* 2010;376:1543-51.
228. Yu JR, Lee SA, Lee JG, et al. Serum vitamin d status and its relationship to metabolic parameters in patients with type 2 diabetes mellitus. *Chonnam Med J* 2012;48:108-15.
229. Payne JF, Ray R, Watson DG, et al. Vitamin D insufficiency in diabetic retinopathy. *Endocr Pract* 2012;18:185-93.
230. Shehab D, Al-Jarallah K, Mojiminiyi OA, et al. Does Vitamin D deficiency play a role in peripheral neuropathy in Type 2 diabetes? *Diabet Med* 2012;29:43-9.
231. Soderstrom LH, Johnson SP, Diaz VA, et al. Association between vitamin D and diabetic neuropathy in a nationally representative sample: results from 2001-2004 NHANES. *Diabet Med* 2012;29:50-5.
232. Hypponen E, Power C. Vitamin D status and glucose homeostasis in the 1958 British birth cohort: the role of obesity. *Diabetes Care* 2006;29:2244-6.
233. Hartaigh B, Thomas GN, Silbernagel G, et al. Association of 25-hydroxyvitamin D with type 2 diabetes among patients undergoing coronary angiography: Cross-sectional findings from the LUdwigshafen RIsk and Cardiovascular Health (LURIC) Study. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2012. doi: 10.1111/cen.12024.
234. Hutchinson MS, Figenschau Y, Almas B, et al. Serum 25-hydroxyvitamin D levels in subjects with reduced glucose tolerance and type 2 diabetes - the Tromso OGTT-study. *Int J Vitam Nutr Res* 2011;81:317-27.

235. Bonakdaran S, Varasteh AR. Correlation between serum 25 hydroxy vitamin D3 and laboratory risk markers of cardiovascular diseases in type 2 diabetic patients. *Saudi Med J* 2009;30:509-14.
236. Inukai T, Fujiwara Y, Tayama K, et al. Alterations in serum levels of 1 alpha,25(OH)2 D3 and osteocalcin in patients with early diabetic nephropathy. *Diabetes Res Clin Pract* 1997;38:53-9.
237. Nagasaka S, Murakami T, Uchikawa T, et al. Effect of glycemic control on calcium and phosphorus handling and parathyroid hormone level in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Endocr J* 1995;42:377-83.
238. Sayinalp S, Gedik O, Koray Z. Increasing serum osteocalcin after glycemic control in diabetic men. *Calcif Tissue Int* 1995;57:422-5.
239. Gregorio F, Cristallini S, Santeusano F, et al. Osteopenia associated with non-insulin-dependent diabetes mellitus: what are the causes? *Diabetes Res Clin Pract* 1994;23:43-54.
240. Reid D, Toole BJ, Knox S, et al. The relation between acute changes in the systemic inflammatory response and plasma 25-hydroxyvitamin D concentrations after elective knee arthroplasty. *Am J Clin Nutr* 2011;93:1006-11.
241. Chagas CE, Borges MC, Martini LA, et al. Focus on vitamin D, inflammation and type 2 diabetes. *Nutrients* 2012;4:52-67.
242. Goldberg RB. Cytokine and cytokine-like inflammation markers, endothelial dysfunction, and imbalanced coagulation in development of diabetes and its complications. *J Clin Endocrinol Metab* 2009;94:3171-82.
243. Rasouli N, Kern PA. Adipocytokines and the metabolic complications of obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 2008;93:S64-73.
244. Coppari R, Bjorbaek C. Leptin revisited: its mechanism of action and potential for treating diabetes. *Nat Rev Drug Discov* 2012;11:692-708.
245. Konner AC, Bruning JC. Selective insulin and leptin resistance in metabolic disorders. *Cell Metab* 2012;16:144-52.
246. Aihara K, Ikeda Y, Yagi S, et al. Transforming Growth Factor-beta1 as a Common Target Molecule for Development of Cardiovascular Diseases, Renal Insufficiency and Metabolic Syndrome. *Cardiol Res Pract* 2010;2011:175381.
247. Borges MC, Martini LA, Rogero MM. Current perspectives on vitamin D, immune system, and chronic diseases. *Nutrition* 2011;27:399-404.
248. Sung CC, Liao MT, Lu KC, et al. Role of vitamin D in insulin resistance. *J Biomed Biotechnol* 2012;2012:634195.
249. Guillot X, Semerano L, Saidenberg-Kermanac'h N, et al. Vitamin D and inflammation. *Joint Bone Spine* 2010;77:552-7.

250. Pradhan A. Obesity, metabolic syndrome, and type 2 diabetes: inflammatory basis of glucose metabolic disorders. *Nutr Rev* 2007;65:S152-6.
251. Jablonski KL, Chonchol M, Pierce GL, et al. 25-Hydroxyvitamin D deficiency is associated with inflammation-linked vascular endothelial dysfunction in middle-aged and older adults. *Hypertension* 2011;57:63-9.
252. Peterson CA, Heffernan ME. Serum tumor necrosis factor-alpha concentrations are negatively correlated with serum 25(OH)D concentrations in healthy women. *J Inflamm (Lond)* 2008;5:10.
253. Ngo DT, Sverdlov AL, McNeil JJ, et al. Does vitamin D modulate asymmetric dimethylarginine and C-reactive protein concentrations? *Am J Med* 2010;123:335-41.
254. Bellia A, Garcovich C, D'Adamo M, et al. Serum 25-hydroxyvitamin D levels are inversely associated with systemic inflammation in severe obese subjects. *Intern Emerg Med* 2013; 8:33-40.
255. Murr C, Pilz S, Grammer TB, et al. Vitamin D deficiency parallels inflammation and immune activation, the Ludwigshafen Risk and Cardiovascular Health (LURIC) study. *Clin Chem Lab Med* 2012;50: 2205-12.
256. Hypponen E, Berry D, Cortina-Borja M, et al. 25-Hydroxyvitamin D and pre-clinical alterations in inflammatory and hemostatic markers: a cross sectional analysis in the 1958 British Birth Cohort. *PLoS ONE* 2010;5:e10801.
257. Vilarrasa N, Vendrell J, Maravall J, et al. Is plasma 25(OH) D related to adipokines, inflammatory cytokines and insulin resistance in both a healthy and morbidly obese population? *Endocrine* 2010;38:235-42.
258. Zittermann A, Frisch S, Berthold HK, et al. Vitamin D supplementation enhances the beneficial effects of weight loss on cardiovascular disease risk markers. *Am J Clin Nutr* 2009;89:1321-7.
259. Bjorkman MP, Sorva AJ, Tilvis RS. C-reactive protein and fibrinogen of bedridden older patients in a six-month vitamin D supplementation trial. *J Nutr Health Aging* 2009;13:435-9.
260. Jean G, Souberbielle JC, Chazot C. Monthly cholecalciferol administration in haemodialysis patients: a simple and efficient strategy for vitamin D supplementation. *Nephrol Dial Transplant* 2009;24:3799-805.
261. Matias PJ, Jorge C, Ferreira C, et al. Cholecalciferol supplementation in hemodialysis patients: effects on mineral metabolism, inflammation, and cardiac dimension parameters. *Clin J Am Soc Nephrol* 2010;5:905-11.
262. Bucharles S, Barberato SH, Stingham AE, et al. Impact of cholecalciferol treatment on biomarkers of inflammation and myocardial structure in hemodialysis patients without hyperparathyroidism. *J Ren Nutr* 2012;22:284-91.

263. Pittas AG, Harris SS, Stark PC, et al. The effects of calcium and vitamin D supplementation on blood glucose and markers of inflammation in nondiabetic adults. *Diabetes Care* 2007;30:980-6.
264. Luo C, Wong J, Brown M, et al. Hypovitaminosis D in Chinese type 2 diabetes: lack of impact on clinical metabolic status and biomarkers of cellular inflammation. *Diab Vasc Dis Res* 2009;6:194-9.
265. Al-Daghri NM, Al-Attas OS, Alokail MS, et al. Hypovitaminosis D Associations with Adverse Metabolic Parameters Are Accentuated in Patients with Diabetes Mellitus Type 2: A BMI-Independent Role of Adiponectin? *J Endocrinol Invest* 2013;36:1-6.
266. Sharma K, McGowan TA. TGF-beta in diabetic kidney disease: role of novel signaling pathways. *Cytokine Growth Factor Rev* 2000;11:115-23.
267. Buldak L, Dulawa-Buldak A, Labuzek K, et al. Effects of 90-day hypolipidemic treatment on insulin resistance, adipokines and proinflammatory cytokines in patients with mixed hyperlipidemia and impaired fasting glucose. *Int J Clin Pharmacol Ther* 2012;50:805-13.
268. Otto C, Otto B, Frost RJ, et al. Short-term therapy with atorvastatin or fenofibrate does not affect plasma ghrelin, resistin or adiponectin levels in type 2 diabetic patients with mixed hyperlipoproteinaemia. *Acta Diabetol* 2007;44:65-8.
269. Lazich I, Sarafidis P, de Guzman E, et al. Effects of combining simvastatin with rosiglitazone on inflammation, oxidant stress and ambulatory blood pressure in patients with the metabolic syndrome: the SIROCO study. *Diabetes Obes Metab* 2012;14:181-6.
270. Balasubramanyam A, Coraza I, Smith EO, et al. Combination of niacin and fenofibrate with lifestyle changes improves dyslipidemia and hypo adiponectinemia in HIV patients on antiretroviral therapy: results of "heart positive," a randomized, controlled trial. *J Clin Endocrinol Metab* 2011;96:2236-47.
271. Guasch A, Bullo M, Rabassa A, et al. Plasma vitamin D and parathormone are associated with obesity and atherogenic dyslipidemia: a cross-sectional study. *Cardiovasc Diabetol* 2012;11:149.
272. Huang Y, Li X, Wang M, et al. Lipoprotein lipase links vitamin D, insulin resistance, and type 2 diabetes: a cross-sectional epidemiological study. *Cardiovasc Diabetol* 2013;12:17.
273. Rejnmark L, Vestergaard P, Mosekilde L. Statin but not non-statin lipid-lowering drugs decrease fracture risk: a nation-wide case-control study. *Calcif Tissue Int* 2006;79:27-36.
274. Perez-Castrillon JL, Vega G, Abad L, et al. Effects of Atorvastatin on vitamin D levels in patients with acute ischemic heart disease. *Am J Cardiol* 2007;99:903-5.
275. Wilczek H, Sobra J, Ceska R, et al. Monitoring plasma levels of vitamin D metabolites in simvastatin (Zocor) therapy in patients with familial hypercholesterolemia. *Cas Lek Cesk* 1994;133:727-9.

276. Sathyapalan T, Shepherd J, Arnett C, et al. Atorvastatin increases 25-hydroxy vitamin D concentrations in patients with polycystic ovary syndrome. *Clin Chem* 2010;56:1696-700.
277. Rejnmark L, Vestergaard P, Heickendorff L, et al. Simvastatin does not affect vitamin d status, but low vitamin d levels are associated with dyslipidemia: results from a randomised, controlled trial. *Int J Endocrinol* 2010;2010:957174.
278. Beltowski J, Atanassova P, Chaldakov GN, et al. Opposite effects of pravastatin and atorvastatin on insulin sensitivity in the rat: role of vitamin D metabolites. *Atherosclerosis* 2011;219:526-31.
279. Grimes DS. Statins and vitamin D : editorial to: "increased levels of 25 hydroxyvitamin D and 1,25-dihydroxyvitamin D after rosuvastatin treatment: a novel pleiotropic effect of statins?" by Bunyamin Yavuz et al. *Cardiovasc Drugs Ther* 2009;23:261-2.
280. Yavuz B, Ertugrul DT, Cil H, et al. Increased levels of 25 hydroxyvitamin D and 1,25-dihydroxyvitamin D after rosuvastatin treatment: a novel pleiotropic effect of statins? *Cardiovasc Drugs Ther* 2009;23:295-9.
281. Aloia JF, Li-Ng M, Pollack S. Statins and vitamin D. *Am J Cardiol* 2007;100:1329.
282. Ott C, Raff U, Schneider MP, et al. 25-Hydroxyvitamin D insufficiency is associated with impaired renal endothelial function and both are improved with rosuvastatin treatment. *Clin Res Cardiol* 2013; 102: 299-304.
283. Sathyapalan T, Shepherd J, Atkin SL, et al. The effect of atorvastatin and simvastatin on vitamin D, oxidative stress and inflammatory marker concentrations in patients with type 2 diabetes: a crossover study. *Diabetes Obes Metab* 2013. doi: 10.1111/dom.12074.
284. Wilczek H, Sobra J, Ceska R, et al. Therapy with fibrates and vitamin D metabolism. *Cas Lek Cesk* 1993;132:630-2.
285. Wang L, Manson JE, Sesso HD. Calcium intake and risk of cardiovascular disease: a review of prospective studies and randomized clinical trials. *Am J Cardiovasc Drugs* 2012;12:105-16.
286. van Meijl LE, Vrolix R, Mensink RP. Dairy product consumption and the metabolic syndrome. *Nutr Res Rev* 2008;21:148-57.

PUBLICACIONES Y COMUNICACIONES A CONGRESOS RELACIONADAS CON LOS TRABAJOS DE ESTA TESIS

Publicaciones

- Miñambres I, Sánchez-Hernández J, Sánchez-Quesada JL, Rodríguez J, De Leiva A; Pérez A. The association of hypovitaminosis D with the metabolic syndrome is independent of the degree of obesity. ISRN Endocrinology 2012: 691803.
- Miñambres I, Sánchez-Hernández J, Sánchez-Quesada JL, Rodríguez J, de Leiva A, Pérez A. Vitamin D concentrations in familial combined hiperlipidemias. (Enviado para publicación).
- Miñambres I, Sánchez-Quesada JL, Vinagre I, Sánchez-Hernández J, Urgell E, Pérez A. Hypovitaminosis D is related to features of the metabolic syndrome in type 2 diabetes. (Enviado para publicación).

Comunicaciones

- Miñambres I, Sanchez-Hernández J, Vinagre I, Ovejero D, Rodríguez J, Pérez A. Vitamina D en la diabetes tipo 2. Relación con los componentes del síndrome metabólico y el control glucémico. Av. Diabetol. 2011; 27: 93 (abstract).
- Miñambres I, Sánchez-Hernández J, Cubero JM, Sánchez-Quesada JL, Rodríguez J, Pérez A. Hipovitaminosis D en la Hiperlipemia familiar combinada. Endocrinol Nutr. 2012; 59: 83.

