

TRABAJO DE FIN DE GRADO



Facultad de Medicina
Universidad de Valladolid



ADECUACIÓN DE LAS SOLICITUDES DE LA VITAMINA D



Marta Pérez Calle

Tutor: Dr. José Luis Pérez Castrillón

Curso académico 2017-2018

ÍNDICE

1. RESUMEN.....	1
2. INTRODUCCIÓN.....	2
La vitamina D.....	2
Niveles.....	3
Métodos de determinación.....	4
Funciones.....	5
3. JUSTIFICACIÓN.....	7
4. OBJETIVOS.....	8
5. MATERIALES Y MÉTODO.....	9
6. RESULTADOS.....	11
7. DISCUSIÓN.....	14
8. CONCLUSIONES.....	15
9. BIBLIOGRAFÍA.....	16

1. RESUMEN

Justificación: En las últimas décadas ha aumentado el interés por la vitamina D en relación con su implicación en patologías como el cáncer, enfermedades autoinmunes, diabetes o cardiovasculares. La creciente relevancia de esta vitamina, el avance de las técnicas y la facilidad de acceso a las mismas se ha reflejado en un aumento de las determinaciones de la vitamina D sérica de forma llamativa en los últimos años, con la repercusión económica asociada correspondiente. Sin embargo, no hay estudios que respalden la rentabilidad del cribado poblacional actualmente, reservándose las indicaciones de determinación de la 25-(OH) vitamina D para los grupos de riesgo.

Objetivos: Analizar el incremento de las solicitudes de vitamina D revisando si cumplen las indicaciones de las guías clínicas.

Método: Se realiza un estudio descriptivo trasversal en una muestra aleatoria de 200 pacientes pertenecientes al Área de Salud Oeste de Valladolid (Hospital Río Hortega) en los que se haya realizado la petición de 25(OH)D durante 2017. En base a la historia clínica y los evolutivos de consulta, se revisa si las peticiones de la vitamina D se adecuan a las Guías de la Sociedad Americana de Endocrinología. Por último, realizamos una pequeña evaluación el impacto económico.

Resultados: Tras analizar la muestra, hemos encontrado que más de un tercio (36,5%) de las determinaciones no se ajustan a las indicaciones de las guías. Esta sobreutilización del servicio lleva asociado un gasto económico potencialmente evitable, que en 2017 ha supuesto de 13.006 euros.

Conclusiones: Ante el abuso de las peticiones de vitamina D, creemos necesario el establecimiento de protocolos, o estrategias que mejore el aprovechamiento de esta técnica. A su vez, consideramos beneficioso fomentar la realización de este tipo de estudios que con el objetivo de mejorar la gestión de recursos sanitarios.

Palabras clave: Vitamina D, indicaciones, gasto sanitario, adecuación.

2. INTRODUCCIÓN

La vitamina D

La vitamina D, es una sustancia liposoluble imprescindible para la vida que participa en múltiples funciones de nuestro organismo. En los últimos años ha aumentado el interés por esta sustancia, no solo por su implicación en el metabolismo del calcio, si no por sus efectos extra-óseos (endocrino, cardiovascular o inmunológico) (1). La vitamina D tiene dos formas de obtención, a través de la piel o por la dieta, siendo la síntesis cutánea la responsable del 80-95% de los depósitos en la población sana adulta.

Esta vitamina esteroidea se sintetiza de forma endógena a raíz de la 7-dehidrocolesterol del hígado (provitamina D3) que se transforma en la piel, mediante la luz ultravioleta, en 7-dehidrocoleciferol.

Por otro lado, en la naturaleza, encontramos esta amina en dos presentaciones: ergocalciferol o vitamina D2 (origen vegetal) y colecalciferol o vitamina D3 (origen animal). Ambas formas, biológicamente inactivas, son incorporadas mediante el aporte nutricional y son procesadas por el organismo para convertirse en calcitriol (metabolito activo).

Una vez que cualquiera de estas sustancias (tanto las absorbidas como la transformada por luz ultravioleta) están en torrente sanguíneo, se adhiere a proteínas transportadoras (DBP) para llegar al hígado. Aquí sufre su primera hidroxilación transformándose a calcidiol o 25-hidroxicolecalciferol (25-OH-D) mediante la 25-hidroxilasa. Después continúa el proceso transportándose unida de nuevo a proteínas transportadoras hasta el riñón, donde se hidroxila en posición 1 mediante la alfa-1-hidroxilasa. Se obtiene así el metabolito activo de la vitamina D también conocido como calcitriol o 1,25-dihidroxicolecalciferol (1,25-OH-D) (Figura 1).

Todo este procesamiento está solo regulado a nivel renal, siendo la producción hepática exclusivamente dependiente del sustrato. La regulación de

la síntesis de 1,25(OH) D renal está influida por la PTH, hipocalcemia e hipofosfatemia, que aumentan este metabolito. Otros factores descritos en la regulación renal son las hormonas (hormonas sexuales, prolactina, hormona del crecimiento y el factor de crecimiento similar a la insulina, IGF1).

La vitamina D tras realizar su acción, sufre un proceso de desactivación en el hígado para acabar eliminándose casi en su totalidad por vía biliar.

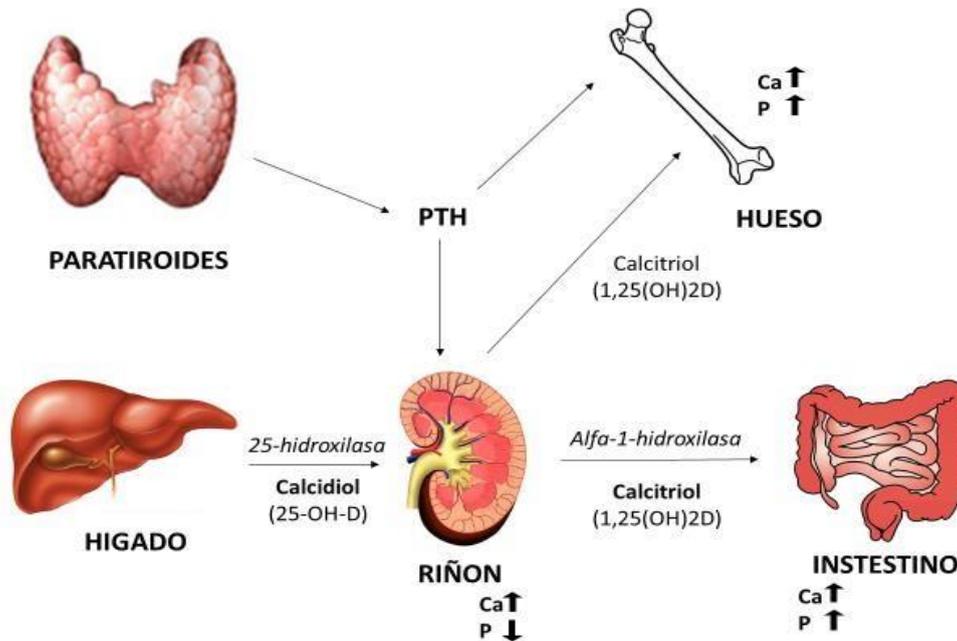


Figura 1. Esquema de la síntesis y regulación de la vitamina D

Niveles

Actualmente se considera que la mejor forma para cuantificar la vitamina D es la medición de la concentración plasmática de 25-hidroxicolecalciferol (25-OH-D). No es el metabolito activo, pero tiene una vida media mayor que el 1,25-dihidroxicolecalciferol (1,25-OH-D) y no está sujeto a la regulación de otras hormonas, por lo que se considera más representativo.

Debido a la importancia que está tomando esta vitamina, se están desarrollando avances en las técnicas del laboratorio haciéndolas más accesibles y de menor coste, lo que pueden plantear un mayor uso de este servicio. No obstante, la determinación de la vitamina D presenta la desventaja

de la variabilidad del método, que junto a la variabilidad individual de los efectos funcionales de la vitamina D, dificulta el establecimiento de puntos de corte (2).

No existe un claro consenso sobre los requerimientos necesarios, el valor límite a partir del cual hay que empezar a tratar o nivel óptimo que alcanzar con el mismo. En general, se acepta que, en relación con el metabolismo del calcio, el objetivo recomendado de los niveles séricos de 25(OH) D se sitúa en torno a 20-30 ng/ml (50 nmol/L- 75 nmol/l) (2). Los estudios se basan en la relación de la PTH con la concentración de la 25(OH)D, asumiendo que la PTH alcanza una meseta a medida que la vitamina D aumenta. Sin embargo, hay autores que defienden valores superiores para población anciana (3) o para la prevención de enfermedades crónicas como el cáncer (4).

Métodos de determinación

La determinación de los niveles de vitamina D sérica presenta hoy, un reto en investigación debido a las crecientes implicaciones de esta vitamina y a la variabilidad de las técnicas analíticas, que presentan limitaciones por las diferencias dependientes del método (5,6). Esto contribuye al problema del establecimiento de unos puntos de corte y a la controversia de los estudios.

Hay disponible múltiples métodos: la cromatografía líquida(LC), ensayo competitivo de proteínas por quimioluminiscencia, radioinmunoensayo de alta o baja frecuencia de muestreo, métodos automáticos de quimioluminiscencia y cromatografía líquida de espectrometría de masas en tándem(LC-Ms/Ms). Esta variedad de técnicas genera mucha discusión por la variabilidad interensayo e intermétodo. Esta situación ha requerido que se establezcan medidas internacionales de estandarización (5). Se ha mostrados mejores resultados con la cromatografía líquida de masas y a pesar de seguir teniendo variaciones amplias y ser operador dependiente, se considera el gold estándar (7). Sin embargo, por su complejidad, es frecuente en la práctica clínica el uso de otros métodos como la enzimoimmunoanálisis, quimioluminiscencia o ELISA, que son igualmente válidos para la atención sanitaria (8).

Recientes estudios hablan de la técnica de cromatografía de fluidos supercrítico (un método híbrido entre la cromatografía líquida y gaseosa) como método más rápido, eficaz y ecológico respecto a la cromatografía de fase líquida normal y que por sus ventajas podría implantarse como método analítico alternativo a esta (9,10).

Funciones

La vitamina D se ha relacionado tradicionalmente con el metabolismo óseo y la regulación del calcio. No obstante, actualmente está creciendo mucho el interés por su implicación en otros muchos procesos del organismo como la proliferación o diferenciación celular, estimulación de la producción de insulina, angiogénesis, inhibición de la producción de renina, y la estimulación de macrófagos (1). De esto se deduce que la acción de la vitamina D no queda reducida a las células implicadas con el metabolismo del cálcico, sino que participa en muchas otras.

La vitamina D está implicada en la expresión de más de 1000 genes afectando a distintos órganos y tejidos. La diabetes, el cáncer y las enfermedades cardiovasculares son algunos de los procesos donde se ha evidenciado una relación.

La *diabetes tipo 2* es una enfermedad endocrina de alta prevalencia en la sociedad actual caracterizada por altos niveles de glucosa secundarios de una resistencia de la insulina. Existen estudios que versan sobre el uso de vitamina D como prevención para el desarrollo de esta enfermedad. Los estudios parecen encontrar una asociación consistente entre deficiencia de vitamina D y el aumento de diabetes mellitus (1,11). Sin embargo, no se han explicado los mecanismos concretos de dicha relación y se necesita estudios correctamente diseñados que expliquen y demuestren esta asociación (12). Algunas hipótesis que podrían responder a este hecho, es la expresión del receptor de vitamina D (VDR) por las células beta pancreáticas. Además, las células del páncreas dependen de calcio, cuya absorción está promovido por la vitamina D. También,

se han descrito variaciones alélicas implicadas tanto en el metabolismo de la vitamina D como intolerancia a la glucosa, reducción de la secreción de insulina o procesos inflamatorios (11).

El aumento de interés en la vitamina D se debe también a su implicación con el *cáncer*. La vitamina D, ha demostrado un papel anti proliferativo e inductor de la diferenciación celular en experimentos in vitro. Interviene reduciendo la apoptosis de células cancerígenas y su proliferación.

En diversos estudios se ha hallado una asociación entre la incidencia de cáncer y la deficiencia de vitamina D (13–15). Esta evidencia, que aparece estar en aumento, sugiere que los genes que codifican para el receptor de la vitamina D (RVD), podrían condicionar la susceptibilidad a distintos cánceres. Se ha demostrado que muchos tumores malignos presentan el RVD incluyendo mama, pulmón, piel colon y hueso (11). Está descrito en estudios experimentales que la vitamina D y su receptor pueden inhibir la proliferación e inducir la diferenciación celular y la apoptosis (17,18).

No obstante, aunque parece haber una asociación estadística entre deficiencia de vitamina D y algunos cánceres; algunos autores se muestran más escépticos (19), y se requieren estudios mejor planteados, controlados y randomizados como el modelo que proponen Grant y Boucher (20).

Se ha atribuido también al déficit de la vitamina D, un aumento del riesgo *cardiovascular*. Se ha encontrado una relación estadística entre niveles bajos de esta vitamina y el aumento de enfermedades como infartos de miocardio, hipertensión, hipertrofia ventricular, que todavía requiere establecer una relación de causalidad (21).

Existe cierta controversia con autores que defienden que la relación es debida a la alta prevalencia del déficit. Sin embargo, se han propuestos diversos mecanismos de esta relación (la acción reguladora de la vitamina D del eje renina-angiotensina-aldosterona (22,23) o el efecto directo descrito sobre la estructura de los vasos (11)) y el interés por seguir estudiando este campo parece creciente.

La función más evidente y estudiada de esta vitamina es, sin lugar a duda, su papel sobre el *metabolismo del calcio*. La vitamina D produce la mayoría de sus acciones regulando la transcripción genética mediante receptores nucleares hormonales específicos (VDR).

La principal acción de la vitamina D es el aumento de la absorción de calcio y fósforo por el intestino mediante mecanismos como el reclutamiento de canales de calcio, la inducción de proteínas transportadoras (calbidinas) o la facilitación de la entrada de calcio con bombas ATP vitamina D dependientes.

Sobre el hueso, gracias a los receptores VDR, induce a la diferenciación de osteoblastos y osteoclastos movilizándolo el calcio óseo.

En el riñón aumenta también la reabsorción de calcio mediante los mismos mecanismos moleculares que en el intestino (Figura1).

Todas estas funciones más o menos estudiadas de la vitamina D (a excepción de su papel indudable en el metabolismo del calcio) parecen requerir más estudios y mejor planteados que demuestren de manera más unánime su implicación. Por ello, el cribado poblacional actualmente no parece estar indicado. No existen estudios que demuestren la rentabilidad y viabilidad de esta medida, ni tampoco se ha demostrado que sea beneficioso para la salud, por lo que la Sociedad Americana de Endocrinología solo recomienda el cribado en la población de riesgo.

3. JUSTIFICACIÓN

En los últimos años, asistimos a un incremento en las determinaciones rutinarias en los Servicios de laboratorio hospitalarios. El avance de las técnicas, la accesibilidad de las solicitudes, el uso de los perfiles específicos de bioquímica, son algunos de los factores que han facilitado que se soliciten de manera inapropiada ciertas pruebas complementarias, que pudieran llevar a un exceso de información no necesaria para el proceso que se está estudiando, además del gasto innecesario que implica. El ajuste de recursos financieros

sanitarios es un tema cada día más importante en la gestión hospitalaria. El aumento de las determinaciones complementarias, a veces sin causa justificada, produce de forma directa un aumento del gasto sanitario reducible. En el caso de los perfiles en relación con enfermedades del metabolismo óseo, se ha impuesto prácticamente como rutina la determinación de Vitamina D.

La vitamina D es una vitamina liposoluble que está generando mucho interés no solo por su implicación en el conocido metabolismo del calcio sino su creciente relación con otras muchas patologías como cáncer, enfermedades cardiovasculares, procesos autoinmunes e infecciones (1,11). Con la importancia que está tomando se han multiplicado en los últimos años, en todo el mundo las determinaciones de esta vitamina, lo que conlleva un importante impacto económico asociado (24–26). No obstante, a pesar de la presencia de estudios que respalden el aumento de solicitudes, no encontramos muchos estudios que contrasten estos hechos y planteen si existe una solicitud indiscriminada que no cumplan las indicaciones adecuadas.

Con este trabajo queremos plantear si existe un exceso de solicitudes de la determinación siguiendo las guías de la Sociedad Americana de Endocrinología (8). Posteriormente se analiza la procedencia de atención especializada o de primaria, el coste añadido y ahorro que podría suponer.

4. OBJETIVOS

Principal:

Estudiar la correcta solicitud de la determinación de la vitamina D sérica en función de las guías de la Sociedad Americana de Endocrinología

Secundarios:

- Valorar el origen hospitalario u ambulatorio del posible abuso de esta técnica de laboratorio.
- Analizar el impacto económico de una posible sobreutilización de esta técnica.

5. MATERIALES Y MÉTODO

Se realiza un estudio de cohortes retrospectivo bajo la hipótesis de que parte de las solicitudes de la determinación de la 25OH vitamina D (vitamina D) no se ajustan a las indicaciones de la Guía de la Sociedad Americana de Endocrinología (por M. H. Holick) (8).

PARTICIPANTES

-Criterios de inclusión

Se incluirán en este estudio 200 pacientes mayores de edad, pertenecientes al área de salud Oeste (Hospital Universitario Río Hortega de Valladolid) en los que se haya determinado la vitamina D en el año 2017.

Se selecciona de forma aleatoria una muestra de 100 pacientes que procedan de atención primaria y 100 de atención especializada.

-Criterios de exclusión

Quedarán excluidos del estudio pacientes menores de edad, embarazadas, lactantes y solicitudes realizadas por el servicio de nefrología. Debido a que la insuficiencia renal crónica, el embarazo y la lactancia son criterios que justifican de por sí la solicitud.

COMITÉ DE ÉTICA

El periodo de recogida de datos estuvo comprendido desde la aprobación del proyecto por el comité de ética del Hospital Río Hortega en noviembre hasta abril de 2018. Al tratarse de datos analíticos retrospectivos no consideran necesario el consentimiento informado individual de todos los pacientes.

METODOLOGÍA

Se realiza un estudio de cohortes retrospectivo. Se selecciona de forma aleatoria una cohorte de 200 pacientes (100 de atención primaria y 100 de atención especializada) a los que se les ha determinado la vitamina D durante el año 2017 y que cumplen los criterios de inclusión. Del muestreo inicial, 27 fueron descartados por no poder acceder a las historias, siendo cubiertos por otra muestra aleatoria del mismo tamaño cogida de la misma población.

En base a la información de las historias clínicas hospitalarias y ambulatorias, se comprueba si la solicitud esta correctamente indicada siguiendo las guías de la Sociedad Americana de Endocrinología publicada en 2011(8) recogidos en la figura 2.

Los datos requeridos se obtuvieron en base a los evolutivos de consulta, informes de ingresos o de atención primaria de los pacientes y se registraron en una base de Excel manteniendo la confidencialidad de los datos obtenidos en todo momento.

Indicaciones para la medición de 25(OH)D . Candidatos a cribado		
<ul style="list-style-type: none"> • Raquitismo • Osteomalacia • Osteoporosis • Enfermedad renal crónica • Insuficiencia hepática • Hiperparatiroidismo • Síndrome de malabsorción • Ancianos con antecedentes de caídas 	<ul style="list-style-type: none"> • Color oscuro de la piel • Fármacos <ul style="list-style-type: none"> ○ Anticonvulsivos ○ Glucocorticoides ○ AntiVIH ○ Antifúngicos ○ Colestiramina • Embarazadas y mujeres lactando 	<ul style="list-style-type: none"> • Ancianos con antecedentes de fracturas no traumáticas • Obesos (niños y adultos IMC>30Kg/m2) • Granulomas <ul style="list-style-type: none"> ○ Sarcoidosis ○ Tuberculosis ○ Histoplasmosis ○ Coccidioidomicosis ○ Beriliosis • Linfomas

Tabla 2. Indicaciones para la medición de la 25 (OH) D según la Sociedad Americana de Endocrinología.

Es importante mencionar, debido a la variabilidad interensayo ya comentada, que en el hospital Rio Hortega el método usado para determinar el valor de la concentración sérica de la 25 OH vitamina D es la quimioluminiscencia.

El estudio estadístico se realizó con el programa SPSS v24 con licencia de la Universidad de Valladolid. Se realizó una X² de Pearson, prueba estadística que permite medir la asociación de variables cualitativas. En nuestro caso estudiamos la asociación entre solicitudes adecuadas o inadecuadas de la vitamina D frente a la procedencia de atención primaria o especializada de las mismas o frente el sexo. Se consideró significativo una $p < 0.05$.

Posteriormente realizamos una pequeña evaluación del impacto económico del número de peticiones injustificadas y el gasto evitable asociado.

6. RESULTADOS

Desde 2009 en el Hospital Universitario Rio Hortega de Valladolid, se han multiplicado de forma exponencial las solicitudes de 25-OH vitamina D (677 en 2009 a 8.842 en 2017) como refleja la figura 3. Este hecho se refleja consecuentemente en un aumento del gasto económico que alcanzó en 2017 los 35.633 euros (Figura 4).

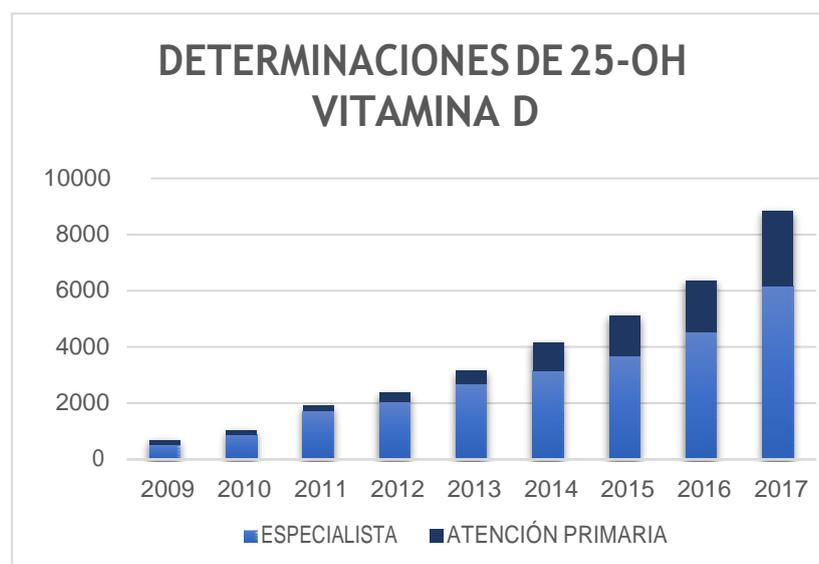


Figura 3. Determinaciones de 25(OH) D del Hospital Rio Hortega de Valladolid.

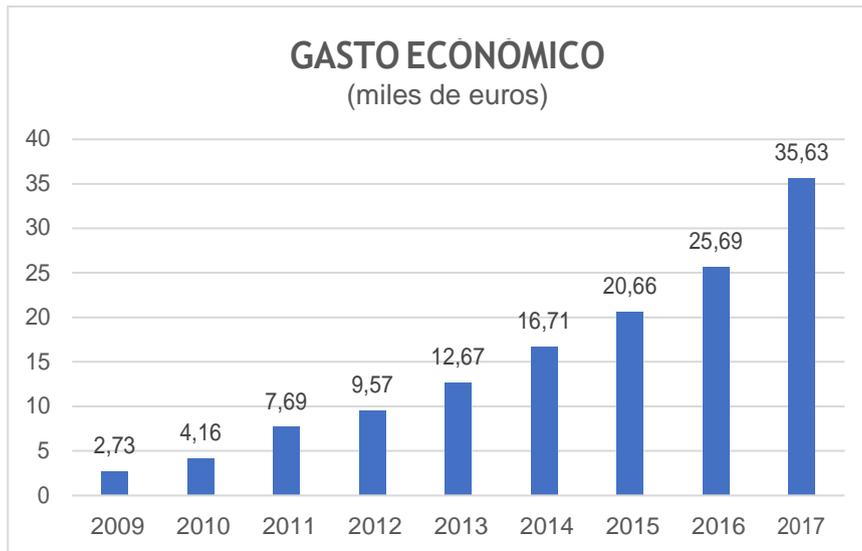


Figura 4. Gasto económico de las determinaciones en miles de euros

Tras analizar las solicitudes de manera individual revisando las historias clínicas, se ha evidenciado un uso inapropiado de la determinación de la vitamina D sérica con un 36,5 % de las solicitudes de la muestra no justificadas. En atención especializada observamos un 29% de determinaciones inadecuadas y en atención primaria alcanza un 44% (Figuras 5-8).

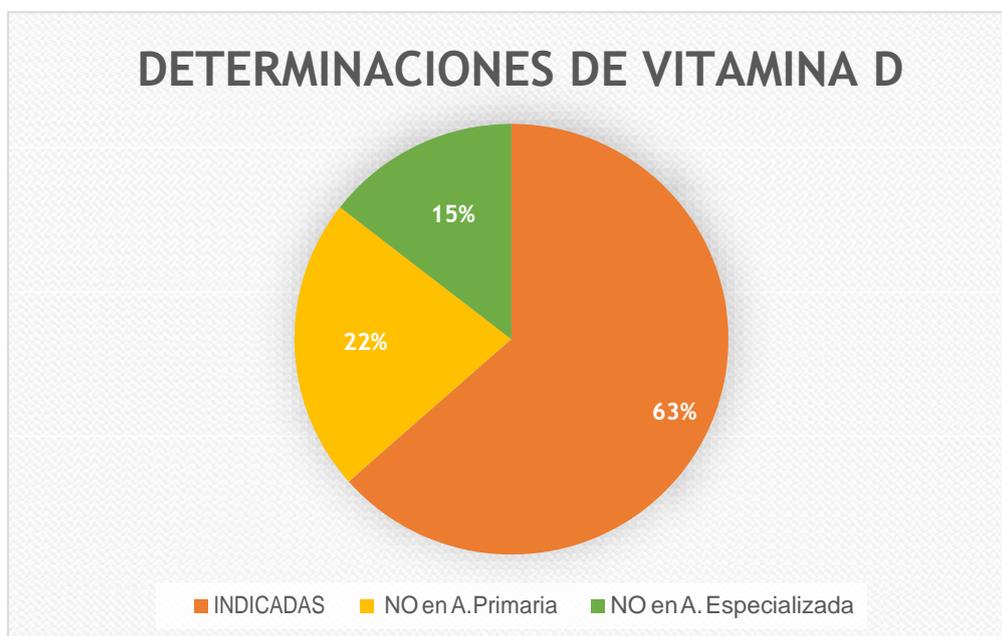


Figura 5. Porcentajes de determinaciones de vitamina D según cumplimiento de indicaciones y procedencia de la derivación.

		INDICACIÓN		Total
		NO	SI	
DERIVACION	A. PRIMARIA	44	56	100
	ESPECIALISTA	29	71	100
Total		73	127	200

Figura 6. Tabla cruzada. Indicación de la solicitud vs procedencia de la derivación.



Figuras 7,8. Diagrama circular que representa la proporción de solicitudes que cumplen o no las indicaciones de atención primaria (derecha) y de otros especialistas (Izquierda).

Existen diferencias estadísticamente significativas ($p= 0.028$) entre primaria y demás atención especializada, con una peor indicación por parte de atención primaria. También hubo diferencias en relación al sexo de las solicitudes, con un predominio de mujeres en primaria ($p= 0.006$). No hubo diferencias por sexo en relación a la adecuación de la petición ($p= 0.707$).

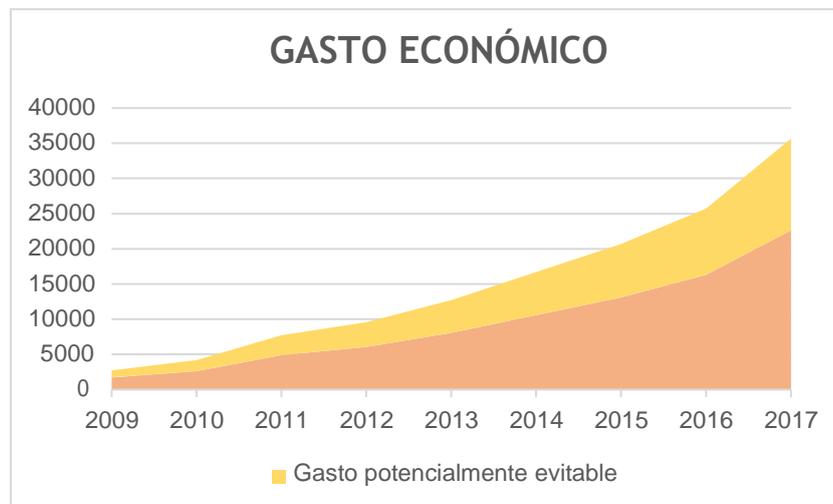


Figura 10. Evolución del gasto económico de las determinaciones de la vitamina D

Se realiza también una evaluación del impacto económico que supone este exceso de determinaciones. El precio de una determinación de 25-OH vitamina D en nuestro hospital es de 4,03 euros. Teniendo en cuenta que en el área oeste de Valladolid se realizaron en 2017, 8.842 determinaciones y asumiendo que un 36,5% no siguen las indicaciones de las guías, se podrían haber ahorrado 13.006 euros en ese año, y 49.458 euros desde 2009 (Figura 10).

7. DISCUSIÓN

En las últimas décadas se ha evidenciado un aumento de interés por la vitamina D en relación con su implicación en procesos extraóseos (enfermedades inflamatorias, autoinmunes, tumorales, diabetes, etc). Este hecho, junto con los avances de las técnicas y la accesibilidad a las peticiones, ha repercutido en un aumento de las determinaciones en todo mundo (25). Nuestro estudio respalda estos datos con un crecimiento progresivo que se ha multiplicado por más de diez respecto a 2009.

Al estudiar si este incremento de las mediciones es justificado, hemos observado que existe un 36,5 % de solicitudes de nuestra muestra que no se ajustan a las Guías de la Sociedad Americana de Endocrinología. Por lo que deducimos que sí parece existir un abuso de las determinaciones de la vitamina D en el Área de Salud de Valladolid Oeste. Nuestros resultados son similares a los obtenidos en un estudio realizado por el servicio de análisis clínicos del Hospital de Badajoz, donde se revisó la apropiada determinación de la vitamina D durante el año 2013 (n=3.907 pacientes) con un resultado de 32% solicitudes inadecuadas según las indicaciones internacionales (27).

Este exceso de análisis, que encontramos tanto en atención primaria (con un 44% de las solicitudes inadecuadas) como especializada (29%), implica un coste económico evitable. En el año 2017 se podría haber reducido 13.000 euros

teniendo en cuenta solo el exceso de determinaciones de la vitamina D que, probablemente, si se extendiese a otras pruebas analíticas podría suponer un gasto económico importante. La gestión de recursos sanitarios es una pieza clave dentro del sistema sanitario público y los recursos limitados que presenta, como consecuencia, este tipo de estudios pueden ser de gran utilidad y servir para plantear estrategias de formación o soluciones a este tipo de problemática.

Los resultados obtenidos parecen mostrar un claro abuso de la determinación de la vitamina D, no obstante, hay que considerar las limitaciones que presenta este estudio. El tamaño muestral es pequeño, formado por 200 pacientes y todos circunscritos al Área Oeste de Valladolid. Hay que tener en cuenta también que se excluyeron los pacientes menores de edad, embarazadas, lactantes y las solicitudes realizadas por el servicio de nefrología. Otro aspecto a destacar es que la recogida de datos se hace en base a las historias clínicas que no siempre están tan completas como sería necesario.

8. CONCLUSIONES

Existe un aumento progresivo del número de peticiones de la vitamina D sérica en el Área de Salud Oeste de Valladolid desde 2009, que ha multiplicado su cifra por más de diez alcanzando las 8.842 determinaciones en 2017.

Tras analizar, en una muestra aleatorizada de 200 pacientes, si las solicitudes de adecuación a las Guías de la Sociedad Americana de Endocrinología, hallamos que un 36,5% de las determinaciones no se ajustan a las indicaciones.

Como toda muestra procesada en el laboratorio, cada determinación lleva un gasto económico asociado, que en el caso de la técnica de la quimioluminiscencia utilizada en el Hospital Río Hortega supone 4,03 euros. Teniendo en cuenta la proporción de estudios no indicados, se podría haber reducido el gasto de determinación de la vitamina D en 13.006 euros durante 2017, y 49.458 euros desde 2007.

Este abuso de las peticiones injustificadas supone un reto para la gestión de recursos. Concluimos la necesidad de fomentar este tipo de estudio sobre exceso de solicitudes no solo de vitamina D sino de otras determinaciones para un mejor aprovechamiento del gasto sanitario. Planteamos también la posibilidad de desarrollar estrategias frente al abuso de la vitamina D, como el establecimiento de protocolos respecto a la solicitud de determinación de la vitamina D.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Rosas-Peralta M, Holick MF, Borrayo-Sánchez G, Madrid-Miller A, Ramírez-Árias E, Arizmendi-Urbe E. Review article: Dysfunctional immunometabolic effects of vitamin D deficiency, increased cardiometabolic risk. Potential epidemiological alert in America? *Endocrinolo, Diabetes y Nutr (English ed)*. 2017;64: 162-73.
2. Pramyothin P, Holick MF. Vitamin D supplementation: guidelines and evidence for subclinical deficiency.. *Cur Op in Gastroenterology*. 2012;28: 139-50.
3. Vieth R, Ladak Y, Walfish PG. Age-related changes in the 25-hydroxyvitamin D versus parathyroid hormone relationship suggest a different reason why older adults require more vitamin D. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003; 88:185-91.
4. McDonnell SL, Baggerly C, French CB, Baggerly LL, Garland CF, Gorham ED, et al. Serum 25-Hydroxyvitamin D Concentrations ≥ 40 ng/ml Are Associated with $>65\%$ Lower Cancer Risk: Pooled Analysis of Randomized Trial and Prospective Cohort Study. *PLoS ONE*. 2016;11: e0152441.
5. Carter GD. Accuracy of 25-hydroxyvitamin D assays: confronting the issues. *Curr Drug Targets*. 2011; 12:19-28.
6. Stokes CS, Lammert F, Volmer DA. Analytical Methods for Quantification of Vitamin D and Implications for Research and Clinical Practice. *Anticancer Res*. 2018;38:1137-44.
7. Mata-Granados JM, Ferreiro-Verab C, Luque de Castro MD, Quesada Gómez JM. Determinación de los metabolitos principales de vitamina D en suero mediante extracción en fase sólida en línea con cromatografía líquida espectrometría de masas en tándem. *Rev de Osteopor y Metab Miner* 2010;2: 55-61

8. Holick MF, Binkley NC, Bischoff-Ferrari HA, Gordon CM, Hanley DA, Heaney RP, et al. Evaluation, Treatment, and Prevention of Vitamin D Deficiency: an Endocrine Society Clinical Practice Guideline. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011;96:1911-30.
9. Andri B, Dispas A, Klinkenberg R, Streel B, Marini RD, Ziémons E, et al. Is supercritical fluid chromatography hyphenated to mass spectrometry suitable for the quality control of vitamin D3 oily formulations? *J Chromatogr A.* 2017; 1515:209-17.
10. Andri B, Lebrun P, Dispas A, Klinkenberg R, Streel B, Ziemons E, et al. Optimization and validation of a fast supercritical fluid chromatography method for the quantitative determination of vitamin D3 and its related impurities. *J Chromatogr A.* 2017; 1491:171-81.
11. Wranicz J, Szostak-Węgierek D. Health outcomes of vitamin D. Part II. Role in prevention of diseases. *Rocz Panstw Zakl Hig.* 2014;65:273-9.
12. Khan H, Kunutsor S, Franco OH, Chowdhury R. 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.
13. Holick MF. Vitamin D and sunlight: strategies for cancer prevention and other health benefits. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2008;3:1548-54.
14. Kim Y, Je Y. Vitamin D intake, blood 25(OH)D levels, and breast cancer risk or mortality: a meta-analysis. *Br J Cancer.* 2014;110: 2772-84.
15. Zhao Y, Chen C, Pan W, Gao M, He W, Mao R, et al. Comparative efficacy of vitamin D status in reducing the risk of bladder cancer: A systematic review and network meta-analysis. *Nutrition.* 2016; 32:515-23.
16. Li A, Zhang W, Zhang H, Yi B. [Vitamin D/vitamin D receptor, autophagy and inflammation relevant diseases]. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban.* 2017;42:979-85.
17. Kriebitzsch C, Verlinden L, Eelen G, Tan BK, Van Camp M, Bouillon R, et al. The impact of 1,25(OH)2D3 and its structural analogs on gene expression in cancer cells--a microarray approach. *Anticancer Res.* 2009;29:3471-83.
18. Thorne J, Campbell MJ. The vitamin D receptor in cancer. *Proc Nutr Soc.* 2008;67: 115-27.
19. Irving AA, Duchow EG, Plum LA, DeLuca HF. Vitamin D deficiency in the ApcPirc/+rat does not exacerbate colonic tumorigenesis, while low dietary calcium might be protective. *Dis Model Mech.* 2018;11.
20. Grant WB, Boucher BJ. Randomized controlled trials of vitamin D and cancer incidence: A modeling study. *PLoS One* 2017 12.
21. Parker J, Hashmi O, Dutton D, Mavrodaris A, Stranges S, Kandala N-B, et al. Levels of vitamin D and cardiometabolic disorders: systematic review and meta-analysis. *Maturitas.* 2010;65:225-36.

22. Li YC, Kong J, Wei M, Chen Z-F, Liu SQ, Cao L-P. 1,25- Dihydroxyvitamin D(3) is a negative endocrine regulator of the renin- angiotensin system. *J Clin Invest.* 2002;110:229-38.
23. 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.
24. Zhao S, Gardner K, Taylor W, Marks E, Goodson N. Vitamin D assessment in primary care: changing patterns of testing. *London J Prim Care (Abingdon).* 2015;7:15-22.
25. Lanzoni M, Fornili M, Felicetta I, Maiavacca R, Biganzoli E, Castaldi S. Three-year analysis of repeated laboratory tests for the markers total cholesterol, ferritin, vitamin D, vitamin B₁₂, and folate, in a large research and teaching hospital in Italy. *J Eval Clin Pract.* 2017;23:654-61.
26. Clinical Utility of Vitamin D Testing. *Ont Health Technol Assess Ser.* 2010;1: 1-93.
27. Valero Chávez FJ, Pérez LML, Juárez JC. Adecuación de las peticiones de los niveles de vitamina D al laboratorio. *Nutr Hospitalaria* 2016;33:1159-1163.

