



**PROGRAMA DE DOCTORADO EN INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS DE LA  
SALUD**

**TESIS DOCTORAL:**

**INFLUENCIA DE LA EXPOSICIÓN SOLAR Y LA DIETA EN  
LOS NIVELES SÉRICOS DE VITAMINA D DE DOS  
POBLACIONES GEOGRÁFICAS DIFERENTES  
COMPARANDO DOS TÉCNICAS ANALÍTICAS**

Presentada por Maite Fernández Vicente para optar al grado de  
Doctor/a por la Universidad de Valladolid

Dirigida por:

Dr. Alberto Miján de la Torre

Dr. Juan Carlos Vella Ramírez

**UNIVERSIDAD DE VALLADOLID**

**FACULTAD DE MEDICINA**

## **ABREVIATURAS**

1,25(OH)<sub>2</sub>D = 1,25-dihidroxitamina D

11β-HSD 1 = 11-β hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo 1

25(OH)D = 25-hidroxitamina D

7-DHC = 7-dehidrocolesterol

AB = Área del Brazo

ACT = Agua corporal total

ADN = Ácido desoxirribonucleico

AEMET = Agencia Estatal de Meteorología

AI = Adequate Intake

AAB = Área adiposa del brazo

AGB = Área grasa del brazo

AMB = Área muscular braquial

ADN = Ácido desoxirribonucleico

ARN = Ácido ribonucleico

BEDCA = Base de Datos Española de Composición de Alimentos

BIA = Impedancia bioeléctrica

CaSR = Receptor del sensor de Calcio

CB = Circunferencia braquial

CC = Composición corporal

CCI = Coeficiente de correlación intraclase

CDK = Quinasa dependiente de ciclina

CFCA = Cuestionario de frecuencia de consumo de alimentos

CHEMICYL = Centro de Hemoterapia y Hemodonación de Castilla y León cm = Centímetro

CYP450 = Citocromo

D = Densidad

DM = Diabetes Mellitus

DS = Desviación estándar

EAR = Estimated Average Requirement

EcaC = Canal epitelial de calcio

ECLIA = Ensayo de electroquimioluminiscencia

ECV = Enfermedad cardiovascular

EGF = Factor de crecimiento epidérmico

EIA = Enzimoimmunoanálisis

ELISA = Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas

EPOC = Enfermedad pulmonar obstructiva crónica

FA = Fosfatasa Alcalina

FEV1 = Volumen espirado máximo en el primer segundo de la espiración forzada

FGF23 = Factor de crecimiento de fibroblastos 23

GC = Grasa corporal

HPLC = Cromatografía líquida de alta eficacia

HUBU = Hospital Universitario de Burgos

IFN = Interferón

IGF1 = Factor de crecimiento insulínico tipo 1

IL = Interleucina

IMC = Índice de masa corporal

IOM = Institute of Medicine Kg = Kilogramo

LC-MS/MS = Cromatografía líquida-tándem por espectrometría de masas

m = Metro

MAPK = Mitogen-activated protein kinase miRNA = MicroRNA

MG = Masa grasa

mL = Mililitro

MLG = Masa libre de grasa

MMT = Masa muscular total

µg = Microgramo

ng = Nanogramo

nm = Nanómetro

OMS = Organización Mundial de la Salud

P50 = Mediana o percentil 50

pg = Picogramo

PI3K = Fosfatidilinositol-3'quinasa

PKC = Proteinkinasa C

PT = Pliegue tricipital

PTH = Hormona paratiroidea

R = Resistencia

RANK = Receptor activador del factor nuclear kb

RANKL = Ligando del receptor activador del factor nuclear kb

RDA = Recommended Dietary Allowance

RIA = Radioinmunoanálisis

RPM = Revoluciones por minuto

RXR = Receptor del 9-cis retinoide X

SM = Síndrome metabólico

SNP = Polimorfismo de un solo nucleótido

TERT = Telomerasa transcriptasa inversa

TGFbeta = Factor de crecimiento transformante beta

Th = Linfocito T helper

TNF = Factor de necrosis tumoral UI = Unidad Internacional

UV = Ultravioleta

VDBP = Proteína transportadora de vitamina D o vitamin D-binding protein

VDDR = Raquitismos vitamina D dependientes

VDR = Receptor de vitamina D

VDRE = Elementos de respuesta a vitamina D VEGF = Factor de crecimiento endotelial

VIF = Variance inflation

Xc = Reactancia

Z = Impedancia corporal

## ÍNDICE

### 1. INTRODUCCIÓN

- 1.1. Historia de la vitamina D
- 1.2. Estructura química de la vitamina D
- 1.3. Origen de la vitamina D
  - 1.3.1. Síntesis y metabolismo
  - 1.3.2. Síntesis cutánea
  - 1.3.3. Dieta
    - 1.3.3.1. Ingesta recomendada de vitamina D
- 1.4. Regulación de los niveles de vitamina D
- 1.5. Acciones de la vitamina D
  - 1.5.1. Receptor de vitamina D (VDR) y mecanismo de acción
  - 1.6.2. Calcio y fósforo
  - 1.6.3. Fuerza muscular
  - 1.6.4. Sistema inmunitario
- 1.6. Déficit de vitamina D
  - 1.6.1. Hiperparatiroidismo secundario y osteoporosis
  - 1.7.2. Osteomalacia
  - 1.7.3. Raquitismo
  - 1.7.4. Enfermedad cardiovascular e hipertensión arterial
  - 1.7.5. Diabetes mellitus
  - 1.7.6. Síndrome metabólico
  - 1.7.7. Neoplasias
  - 1.7.8. Debilidad muscular y caídas
  - 1.7.9. Enfermedades respiratorias
- 1.7. Obesidad y vitamina D
  - 1.8.1. Evaluación antropométrica
- 1.8. Determinación analítica
  - 1.8.1. Valoración de los niveles de vitamina D
  - 1.9.2. VDBP
  - 1.9.3. Niveles óptimos de vitamina D
  - 1.9.4. Cuantificación de la vitamina D
  - 1.9.5. Determinación de 25(OH)D libre

### 2. JUSTIFICACIÓN

### 3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

3.2. Objetivos específicos

### 4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. Diseño del estudio y ámbito de actuación

4.2. Muestra

4.2.1. Tamaño muestral

4.2.2. Selección de la muestra

4.3. Calendario y planificación

4.4. Encuestas

4.4.1. Encuesta sobre los hábitos de exposición solar

4.4.2. Cuestionario de frecuencia de consumo de alimentos

4.5. Estudio antropométrico

4.5.1. Medidas antropométricas clásicas

4.5.1.1. Estimación de la grasa corporal a partir del pliegue tricipital

4.5.1.2. Estimación de la grasa corporal a partir de la circunferencia braquial y el pliegue tricipital

4.5.2. Impedancia bioeléctrica

4.5.2.1. Aparato utilizado para determinar la BIA

4.5.2.2. Limitaciones del BIA

4.6. Análisis bioquímico

4.6.1. Tratamiento de las muestras

4.6.2. Técnicas analíticas

4.6.2.1. Determinación de 25(OH)D libre mediante un ELISA

4.6.2.2. Determinación de la vitamina D total mediante ensayo inmunoquimioluminiscente

4.7. Análisis estadístico

4.8. Fuentes de financiación

### 5. RESULTADOS

5.1. Datos perdidos y participación

5.2. Datos demográficos

5.3. Estudio antropométrico

5.4. Hábitos de exposición solar

5.5. Ingesta de vitamina D

5.6. Análisis bioquímico

5.7. Influencia de las distintas variables en los niveles séricos de vitamina D

5.7.1. Influencia de la estacionalidad

5.7.2. Influencia del clima

5.7.3. Influencia de la latitud

5.7.4. Relación entre el IMC y los %GC, y los niveles séricos de vitamina D

5.7.5. Influencia de los hábitos de exposición solar

5.7.6. Influencia de la ingesta de vitamina D en sus niveles séricos

6. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

7. CONCLUSIONES



## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. HISTORIA DE LA VITAMINA D <sup>(1-4)</sup>

La historia de la vitamina D comienza hace más de 500 millones de años. Aunque no hay una evidencia absoluta sobre su origen, probablemente se obtuvo primero en el plancton, pues aún hoy es capaz de sintetizar vitamina D cuando recibe la suficiente exposición a la luz solar. Del plancton, y gracias a la cadena alimentaria, pasó a los animales, más concretamente a los peces, donde se almacenó y concentró. Estos peces adquieren importancia en la alimentación del hombre cuando este inicia la bipedestación y se produce el desarrollo esquelético.

La vitamina D en el hombre es tan relevante que ciertas teorías asocian cambios evolutivos en la cantidad de melanina de la piel con la necesidad de obtención de una cantidad suficiente de vitamina D: Cuando el Homo Sapiens, originario de regiones cercanas al Ecuador y de tez oscura, inició su migración a regiones en latitudes más alejadas, tanto al norte como al sur, su melanina fue descendiendo como consecuencia de la disminución de la intensidad de los rayos ultravioleta (UV) solares. Esto significa que la necesidad de protección frente a la radiación UV disminuía a medida que aumentaba la de la síntesis de vitamina D.

La historia de la vitamina D va pareja a la del raquitismo y la osteomalacia. Ya en el siglo V a.C. en Grecia, distintos historiadores se percatan de diferencias óseas al comparar huesos de individuos de distinta etnia. Entre ellos destaca Herodoto (484 ó 485?- 425 a 426?), que afirmó que los cráneos de los persas eran más frágiles que los de los egipcios, atribuyendo esto al hecho de que los egipcios tenían sus cabezas descubiertas al sol, mientras que los persas llevaban turbantes. Es posible que esta sea la primera observación que se hizo en referencia a la importancia del sol en la salud ósea.

El raquitismo es descrito por primera vez en 1650 por Glisson, quien escribe un tratado sobre esta enfermedad y le da nombre. Lo hace como consecuencia de la aparición brusca de esta enfermedad en dos regiones inglesas: Somerset y Darsen, entre 1612-1620, que acaba evidenciándose en gran parte de Inglaterra, y que él asocia a las condiciones insanas y antihigiénicas del hábitat donde vivían los pacientes. Esta situación obliga al Colegio de Médicos de Londres a nombrar una comisión de expertos, entre ellos Glisson, para investigar esta enfermedad.

En 1861, Trousseau plantea la posible relación entre raquitismo y carencia de exposición solar junto con una dieta defectuosa, que pensaba, podía resolver con aceite de hígado de bacalao.

A raíz de la descripción clínica desarrollada por Glisson, distintos investigadores intentan ampliar los conocimientos que poseían hasta entonces sobre el raquitismo. En 1917, Leonard Findlay relaciona, como Glisson, el raquitismo con unas condiciones higiénicas poco apropiadas, consecuencia de la industrialización. Poco después, en 1922, Dick es el primer científico en relacionar la ausencia de radiaciones solares y ejercicio físico con la etiología del raquitismo.

En 1919 Huldsky, en Berlín, analizó los posibles efectos beneficiosos de las radiaciones solares, la luz ultravioleta artificial y el aceite de hígado de bacalao en el tratamiento del raquitismo, publicándolo en su artículo "Heilung von Rachitidurch Künstliche Höhensonne". Lo que fue corroborado poco después, en 1922, en Viena, por Chick et al.

En 1919, Edward Mellanby realiza una publicación donde demuestra, a nivel experimental, que el raquitismo se produce por la deficiencia de ciertos nutrientes de la dieta, mostrando que algunas grasas, presentes en el aceite de hígado de bacalao, poseen un efecto preventivo e incluso curativo frente a la enfermedad. Denominó a esta sustancia “factor antirraquítico”: “vitamina A soluble en grasa”. Tres años después de la publicación de este estudio, Elmer Verner McCollum demuestra la existencia de un segundo factor soluble en grasa, al que posteriormente se le denominó vitamina D, que resultaba básico en la calcificación de los huesos. Siguiendo la secuencia del descubrimiento de las vitaminas, este verdadero “factor antirraquítico” era el cuarto, y de ahí su nombre.

Otro investigador fundamental en la historia de la vitamina D fue Adolf Windaus, que inició su andanza con esta vitamina estudiando la estructura del colesterol y esteroides relacionados. En 1925 comienza el estudio de la estructura de la vitamina D<sub>2</sub> y D<sub>3</sub>, y deduce que la forma activa de estas vitaminas se forma por acción de la radiación UV sobre el ergosterol y el 7-dehidrocolesterol respectivamente. Estas afirmaciones le hacen ser merecedor del Premio Nobel de Química en 1928.

Una de las grandes contribuciones, también en los inicios del siglo XX, a la historia de la vitamina D la realizó Gowland Hopkins cuando relacionó los niveles de calcio y fósforo con los de vitamina D, todo ello en el estudio del tejido óseo.

Las funciones de la vitamina D se describieron a lo largo del siglo XX a raíz de descubrir su implicación en el metabolismo del calcio y el fósforo. Nicolaysen entre los años 1937 y 1967 demostró que la vitamina D incrementa la reabsorción de calcio en el intestino, valiéndose para ello de ratas con raquitismo, y confirmó así la hipótesis de Orr et al., que ya la habían formulado en 1923. Con este punto de partida, diversos equipos de investigadores ampliarán los conocimientos sobre el metabolismo y fisiología de la vitamina D.

## 1.2. ESTRUCTURA QUÍMICA DE LA VITAMINA D

Bajo el nombre de “vitamina D” se engloba una familia de 9,10-secoesteroides que se caracteriza por un sistema triénico conjugado derivado de la apertura electrocíclica del anillo B del tetracicloesteroidal. Los miembros de esta familia se diferencian entre sí por la estructura de la cadena lateral.

Deriva del 7-dehidrocolesterol (7-DHC), y se presenta bajo dos formas: el colecalciferol o vitamina D3, que principalmente se obtiene de forma endógena por síntesis cutánea, y el ergocalciferol o vitamina D2, que proviene del ergosterol, que se encuentra en plantas y algunos peces. Ambas formas difieren solamente en la presencia de un doble enlace y un grupo metilo presente en la larga cadena lateral de la vitamina D2.

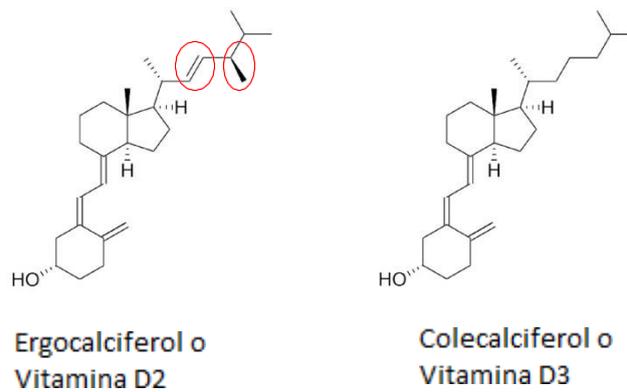


Figura 1.2.1. Estructura química del ergocalciferol (vitamina D2) y del colecalciferol (vitamina D3)

### 1.3. ORIGEN DE LA VITAMINA D

#### 1.3.1. SÍNTESIS Y METABOLISMO <sup>(5-7)</sup>

Aunque diversos alimentos naturales son responsables de aportar vitamina D a nuestra dieta, su fuente de origen más importante es endógena.

Cuando los rayos UV procedentes de la exposición solar, con longitud de onda entre 290-315 nm inciden sobre la piel, se produce la transformación de un metabolito presente de forma natural en la dermis y epidermis: el 7-DHC. Como consecuencia, el anillo B de esta molécula se abre, en concreto, se rompe la unión entre los carbonos 9 y 10 del anillo B del ciclo pentanoperhidrofenantreno, formando el precalciferol o previtamina D3, que es termoinestable y sufre una reacción de isomerización inducida por el calor, formando el colecalciferol o vitamina D3 <sup>(8)</sup>. A medida que esto ocurre, el colecalciferol se libera al espacio extracelular y penetra en el lecho vascular de la dermis. En este momento, se unirá a unas proteínas transportadoras que lo conducirán al hígado.

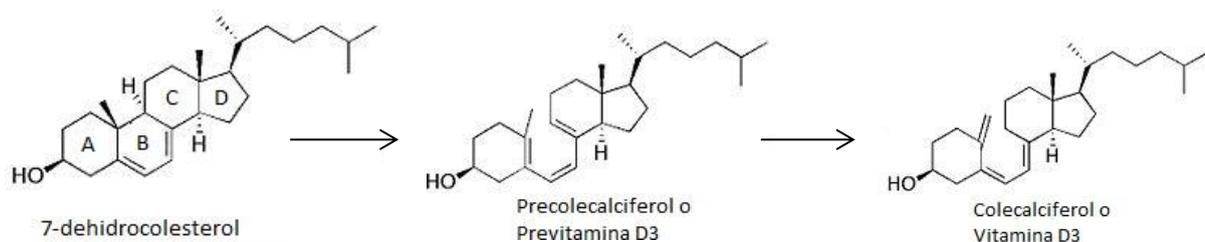


Figura 1.2.2. Transformaciones metabólicas producidas en la piel desde 7-DHC hasta colecalciferol o vitamina D3

Estas proteínas transportadoras son en su mayoría específicas del transporte de vitamina D y sus distintos metabolitos: Proteína transportadora de vitamina D o vitamina D-binding protein (VDBP). En general, tan sólo un 3-5% del total de estas proteínas está ocupado por un metabolito de la vitamina D, por lo que su transporte no se satura. Esto hace que no sea un factor limitante en el metabolismo de la vitamina D, a no ser que grandes cantidades de estas proteínas se pierdan por la orina, cosa que ocurre, por ejemplo, en el síndrome nefrótico.

Las VDBP transportan el 85-88% de los metabolitos séricos de la vitamina D, mientras que un 10-15% se transporta junto con la albúmina, y tan sólo un 0.03% circula libre <sup>(9,10)</sup>.

El colecalciferol procedente de la epidermis y dermis es aún inactivo y necesitará de diversas transformaciones enzimáticas para poder desarrollar sus acciones en el organismo.

En el hígado, el colecalciferol sufre una primera transformación enzimática que consiste en la adición de un grupo hidroxilo en la posición 25 de su molécula, a través de la enzima hepática 25-hidroxilasa, formándose la 25-hidroxivitamina D (25(OH)D) o calcidiol. Se trata de una enzima microsomal de la familia del citocromo P450 (CYP450), denominada CYP2R1. Este metabolito es el que mayor vida media tiene: de dos a tres semanas <sup>(8,11)</sup>.

El calcidiol sintetizado se unirá a las proteínas transportadoras que lo conducirán hasta el glomérulo renal, donde será filtrado y posteriormente reabsorbido en el túbulo renal. Será en este órgano donde el metabolito sufrirá las transformaciones enzimáticas que lo convertirán en una molécula activa <sup>(12)</sup>.

En el túbulo renal, la entrada a las células del tándem 25-(OH)D – VDBP se produce por endocitosis mediada por receptor. En este proceso hay dos proteínas más involucradas: cubilina y megalina. Ambas se expresan en el túbulo proximal. Son proteínas multiligando que facilitan la entrada de ligandos extracelulares. La deficiencia de cualquiera de las dos puede llevar al incremento de la excreción de 25(OH)D por la orina <sup>(10)</sup>.

En las células tubulares la 25-(OH)D se separa de su proteína transportadora. Las células del túbulo renal cuentan con dos enzimas: 1-alfa-hidroxilasa (CYP27B1) y 24-alfa-hidroxilasa (CYP24A1), que pueden actuar sobre la 25(OH)D generando, respectivamente: 1,25-dihidroxitamina D (1,25(OH)<sub>2</sub>D) o calcitriol, que es la forma activa de la vitamina D, y 24,25-dihidroxitamina D (24,25(OH)<sub>2</sub>D), que se trata de un metabolito inactivo.

Además de la síntesis cutánea, la vitamina D puede obtenerse con la dieta. Los alimentos de origen animal ricos en esta vitamina, la aportan en forma de colecalciferol (vitamina D3), mientras que los de origen vegetal lo hacen en forma de ergocalciferol (vitamina D2). Puesto que se trata de una vitamina liposoluble, necesita de sales biliares para poder absorberse en el intestino. En concreto, esto ocurre mayoritariamente en el yeyuno, y en menor medida, en el duodeno. En el transporte de la vitamina también intervienen las proteínas fijadoras de vitamina D.

Del total de vitamina D ingerida con la dieta, se absorbe aproximadamente el 80%.

Puesto que el metabolito absorbido en el intestino es colecalciferol o ergocalciferol, para convertirse en calcitriol y ser así la forma activa de la vitamina D, estas moléculas necesitarán las mismas transformaciones enzimáticas que las explicadas anteriormente.

Una vez que el calcitriol ha ejercido su acción se inactiva en el hígado, sufriendo una gluco y sulfoconjugación, para eliminarse a continuación por vía biliar.

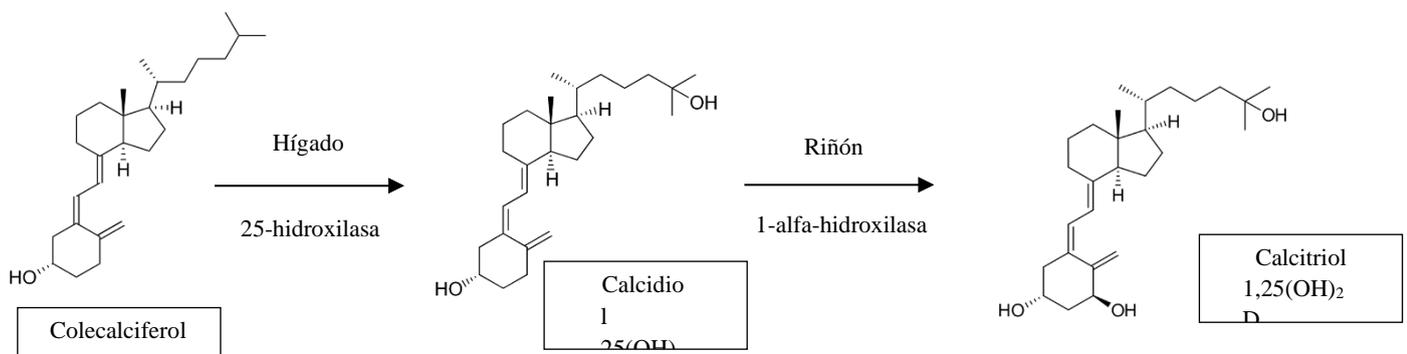


Figura 1.2.3. Transformaciones enzimáticas del colecalciferol hasta llegar a la vitamina D activa, calcitriol

### 1.3.2. SÍNTESIS CUTÁNEA

La síntesis endógena de vitamina D a partir del 7-DHC presente en la piel aporta el 90-95% de los depósitos de vitamina D.

Un adulto caucásico produce 1 ng de colecalciferol/cm<sup>2</sup> de piel cuando se expone a luz solar o lámparas de luz UV.

Se estima que la exposición solar de 5-15 minutos días en cara y brazos durante la primavera, verano y otoño es suficiente para mantener los depósitos de vitamina D en niveles adecuados.

Aproximadamente, el 65% del 7-DHC se encuentra en la epidermis, y el 35% restante en la dermis.

Si la transformación del 7-DHC en precolecalciferol y la de éste a colecalciferol se produce durante un largo tiempo, como consecuencia de una exposición solar prolongada, estos metabolitos se pueden isomerizar a varios fotoproductos con escasa actividad. En concreto, el precolecalciferol se isomeriza a lumisterol y taquisterol, y el colecalciferol a suprasterol I y II, y a 5,6-transvitamina D3. Este proceso hace que nunca se produzca un exceso en la producción endógena de vitamina D que pudiera llevar a una intoxicación<sup>(13)</sup>.

Se conocen diversos factores que influyen en la síntesis cutánea de vitamina D<sup>(6,14)</sup>:

- Cantidad de 7-dehidrocolesterol:

Los depósitos de este metabolito disminuyen con la edad. Un individuo con más de setenta años produce tan sólo un 20-25% de la vitamina D sintetizada por uno de veinte años, considerando que los dos se expongan a la misma radiación solar.

- Cantidad de melanina:

Puesto que la melanina es capaz de absorber los fotones solares, las personas con más cantidad de melanina requieren de tiempos de exposición solar más prolongados para sintetizar la misma cantidad de colecalciferol.

- Uso de cremas solares:

Las cremas con protección solar absorben las radiaciones antes de que penetren en la piel. De hecho, un factor de protección superior a 8 reduce capacidad para la síntesis cutánea de vitamina D en un 95%, y los superiores a 15 lo hacen en más de un 98%<sup>(15)</sup>.

- Intensidad de la luz solar:

La intensidad de la luz solar puede verse afectada por diversos factores, como la hora del día, la estación del año, la latitud o la altitud<sup>(16)</sup>.

El ángulo con que los rayos solares inciden sobre la superficie de la Tierra es más oblicuo en invierno. Esto supone que el recorrido de los rayos UV es mayor y por tanto también lo será la absorción por parte de la capa de ozono. Esta situación también se da durante las primeras horas de la mañana y las últimas de la tarde.

La altitud también influye en las características de los rayos UV que llegan a la superficie, ya que cuanto mayor sea, menor densidad de la capa de ozono, y por tanto menor absorción por parte de ésta.

Por otro lado, la latitud condiciona el número de fotones procedentes de la luz solar que alcanza la superficie terrestre, disminuyendo estos a medida que aumenta la latitud. La correlación que existe entre la latitud, el nivel de radiación UV que alcanza la superficie terrestre y la degradación de melanina de la piel fue claramente establecido en un estudio realizado por Jablonski y Chaplin<sup>(3)</sup>.

La latitud merece una mención especial por su relación con los niveles de vitamina D, pues diversos estudios han analizado su influencia en la síntesis de esta vitamina. En uno de ellos, Holick et al.<sup>(17)</sup> mostraron que en las regiones que se encuentran en una latitud por encima de los 35º la síntesis cutánea de la vitamina D en humanos se ve reducida, pudiendo llegar a ser prácticamente inexistente en los meses de invierno. Webb et al.<sup>(18)</sup> llegaron a conclusiones similares, deduciendo que había una diferencia significativa entre los niveles de vitamina D en sujetos procedentes de Boston, Estados Unidos (42º Norte) y Edmonton, Canadá (52º Norte), a pesar de haber tan sólo 10º de diferencia entre ambas poblaciones. Además, un estudio desarrollado por Leary et al.<sup>(19)</sup> demostró que la latitud era una variable influyente en los niveles séricos de vitamina D, comparando estudiantes de dos poblaciones estadounidenses: Bradenton, Florida (27º Norte) y Erie, Pennsylvania (42º Norte).

### 1.3.3. DIETA

La vitamina D aportada por la dieta puede encontrarse de dos formas:

- Colecalciferol o vitamina D3, de origen animal
- Ergocalciferol o vitamina D2, de origen vegetal

Pocos alimentos contienen vitamina D en cantidad importante. Los ácidos grasos del pescado marino, como el salmón, representan la fuente más rica de colecalciferol.

La vitamina D de los alimentos no se destruye con el calor ni con los procesos tecnológicos. Pero su cantidad sí puede variar en función de la época del año. Esto se debe a que el ergocalciferol se produce como consecuencia de la irradiación UV en las levaduras<sup>(20)</sup>.

Es importante destacar aquí el consumo de los alimentos funcionales. Estos son alimentos cuya composición es modificada por la industria alimentaria para conseguir que presenten mayores cantidades de ciertos micronutrientes, entre los cuales puede encontrarse la vitamina D. Esto es muy frecuente en Estados Unidos o Canadá, pero en España la fortificación de alimentos con ergo o colecalciferol es escasa.

### 1.3.3.1. INGESTA RECOMENDADA DE VITAMINA D

Para valorar de forma adecuada la ingesta de un nutriente hay que tener presentes tres conceptos <sup>(21-23)</sup>:

- Recommended Dietary Allowance (RDA): Nivel de ingesta diaria de un nutriente que resulta suficiente para cubrir las necesidades de casi todos los individuos sanos (97,5%) según edades, sexo y situaciones de embarazo y lactancia.
- Adequate Intake (AI) o “Ingesta recomendada”: Valor de ingesta recomendada resultado de aproximaciones como consecuencia de observaciones o de experimentación en uno o más grupos de personas sanas.
- Estimated Average Requirement (EAR) o “Requerimiento medio estimado de un nutriente”: Se define como la cantidad mínima de dicho nutriente para evitar su deficiencia. Supone el nivel de ingesta diaria de un nutriente que se estima que cubrirá el requerimiento de la mitad (mediana) de los individuos sanos, divididos en grupos como para los RDA. Dicho de otra manera, es la ingesta que cumple con las necesidades del 50% de la población

Las AI se establecen a partir de las RDA para un grupo de individuos. Se suele calcular como el resultado de las 2 desviaciones estándar (DS) sobre la media calculada de la AI, ya que así se engloba al 97,5% de los individuos, y se establece utilizando la información más reciente y fiable que en ese momento esté disponible acerca de la variación interindividual de los requerimientos en ese grupo poblacional para un nutriente.

La deficiencia de un nutriente puede definirse con criterios clínicos, fisiológicos y bioquímicos.

Para un individuo, el requerimiento de cualquier nutriente dependerá de varios factores, como la edad, el sexo, actividad física o estado de salud. También dependerá de los genotipos que posea para desarrollar ciertas proteínas fundamentales en aspectos metabólicos.

Estos requerimientos variarán en función del grupo poblacional estudiado, no dependiendo únicamente de la geografía, raza o estado de salud. En general, los grupos se dividen en: hombres adultos, mujeres adultas, niños, adolescentes, personas de edad avanzada, mujeres embarazadas y con lactancia. En muchas ocasiones, dentro de cada grupo, se hace una división por edades <sup>(24)</sup>.

El Institute of Medicine (IOM) realiza de forma periódica unas publicaciones con las AI de los distintos micronutrientes. El más reciente expone que el AI del colestiferol en adultos sanos de 18-50 años es de 5 µg/día, y de 50-70 años de 10 µg/día, sin olvidar que 1 µg de colestiferol equivale a 40 UI de vitamina D <sup>(25)</sup>.

Aunque ni siquiera hoy contamos con unos requerimientos de vitamina D aceptados a nivel mundial, se han desarrollado diversos trabajos que pretendían lograr esto. Uno de ellos se inició en enero del 2007 con un proyecto europeo que pretendía establecer las recomendaciones de los requerimientos de los micronutrientes en distintos grupos de población. Se denominó EURRECA (European micronutrient recommendation saligned) <sup>(22)</sup>, y englobó a 17 países europeos. Este

trabajo estableció diferencias importantes en los requerimientos de vitamina D en función del país estudiado.

A partir del estudio EURRECA se han desarrollado otros trabajos con resultados interesantes:

- Novaković et al. <sup>(26)</sup> realizaron un estudio en países europeos en el que establecieron que el consumo medio de vitamina D en España era de 2 µg/día para los hombres y 1 µg/día para las mujeres.
- Roman Viñas et al. <sup>(27)</sup> desarrollaron otro estudio que tuvo como objetivo analizar la prevalencia de la ingesta inadecuada de la vitamina D y otros micronutrientes en adultos (19-64 años) y personas de edad avanzada (> 64 años), utilizando los datos más representativos en ese momento en Europa y aplicando la necesidad promedio estimada (EAR). Aunque publicaron datos de distintos países, en el caso de España se basaron en una publicación anterior realizada en Cataluña: ENCAT-02 <sup>(28)</sup>. Se trata de una encuesta alimentaria poblacional desarrollada entre 2002 y 2003 sobre una muestra representativa de 2.754 personas de 6 a 75 años, en la que se combinaron indicadores de consumo de alimentos, antropométricos y bioquímicos. Mediante dos recordatorios de 24 horas (técnica que recolecta datos de ingesta reciente), Roman Viñas et al. obtuvieron los siguientes datos sobre la ingesta de vitamina D en adultos:
  - Hombres (n = 706):
    - Vitamina D media consumida (µg/día) = 1,6 ± 0,8.
    - El 100% de los sujetos tenían un consumo deficiente, según datos del IOM (5 µg/día).
  - Mujeres (n = 875):
    - Vitamina D media consumida (µg/día) = 1,2 ± 0,6.
    - El 100% de los sujetos tenían un consumo deficiente, según datos del IOM (5 µg/día).

#### 1.4. REGULACIÓN DE LOS NIVELES DE VITAMINA D

Los niveles en plasma de calcitriol están condicionados por la actividad de la 1-alfa-hidroxilasa, 24-alfa-hidroxilasa y de la disponibilidad de 25(OH)D o calcidiol <sup>(29)</sup>.

La enzima 1-alfa-hidroxilasa está regulada principalmente por los siguientes factores <sup>(5,7)</sup>:

- Hormona paratiroidea (PTH):

La disminución de las concentraciones plasmáticas de calcio iónico es el principal estimulante de la producción y secreción de esta hormona, junto a unos niveles bajos de fósforo. La PTH estimula la producción de 1-alfa-hidroxilasa, que aumentará los niveles de calcitriol, el cual actuará en diversos sistemas del organismo, elevando en último término las concentraciones plasmáticas de calcio. La 1,25(OH)<sub>2</sub>D suprime la producción de PTH la transcripción del gen de la 1-alfa-hidroxilasa. Se genera así un circuito de feedback negativo para la síntesis y secreción de PTH.

- Concentraciones de calcio y fosfato:

Como se deduce del apartado anterior, tanto la hipocalcemia como la hipofosfatemia son señales de activación de la 1-alfa-hidroxilasa.

- Factor de crecimiento de fibroblastos 23 (FGF23):

Se trata de un factor humoral cuyo papel fundamental es mantener las concentraciones séricas de fosfato dentro de su margen fisiológico óptimo, promoviendo su excreción renal. Este factor se secreta en el hueso, fundamentalmente en los osteocitos, y a nivel renal inhibe la reabsorción tubular de fosfato, a la vez que disminuye la producción renal de calcitriol mediante dos mecanismos: por un lado, reduce la actividad de la 1-alfa-hidroxilasa, y por otro, aumenta la de la 24-alfa-hidroxilasa, incrementando la producción de 24,25-dihidroxi- vitamina D, que es un metabolito inactivo <sup>(30)</sup>.

La actividad de FGF23 es estimulada por el calcitriol, independientemente de los cambios en la fosfaturia, generándose así un mecanismo de feedback negativo entre ambos.

## 1.5. ACCIONES DE LA VITAMINA D

La vitamina D actúa en diversos órganos y sistemas del organismo. Para comprender esto es básico conocer la interacción de la vitamina D con su receptor específico, y las consecuencias de esto.

### 1.5.1. RECEPTOR DE VITAMINA D (VDR) Y MECANISMO DE ACCIÓN

El calcitriol actúa a través de dos mecanismos. El primero es típico de hormonas esteroideas, supone la unión a su receptor intracelular: Receptor de vitamina D (VDR), que pertenece a la familia de receptores de hormonas esteroideas de clase II, por lo que comparte muchas características con los receptores de ácido retinoico y de las hormonas tiroideas. Los VDR se expresan prácticamente en la totalidad de las células nucleadas, lo cual hace que el calcitriol interactúe con gran cantidad de células distintas, y actuando como factor de transcripción <sup>(7)</sup>.

El gen del VDR se localiza en el brazo largo del cromosoma 12. El VDR es una fosfoproteína de 427 aminoácidos y 48 kDa, en la que se reconocen dos dominios fundamentales, uno de unión al ADN (DBD) y otro de unión al ligando (calcitriol) (LBD). Posee además una región de unión para heterodimerización con el receptor del ácido retinoico y otra de unión al ADN correspondiente a áreas del genoma que responden específicamente a la vitamina D, también llamados elementos de respuesta a vitamina D (VDRE) <sup>(31,32)</sup>.

El VDR se encuentra libre en el citoplasma celular, por lo tanto, para que el calcitriol pueda interactuar con él debe penetrar en la célula diana. La unión de este ligando al VDR lo activa, lo que hace que se fosforile y penetre en el núcleo celular. Aquí, la estructura 1,25-dihidroxitamina D – VDR es capaz de formar un complejo heterodímero con el receptor del 9-cis retinoide X (RXR), formando el complejo 1,25-dihidroxitamina D – VDR – RXR. Este complejo reconoce y se une específicamente al ADN en secuencias promotoras de diferentes genes o VDRE, además de reclutar diversos factores de transcripción y otros reguladores <sup>(20,32,33)</sup>. De esta forma se controla la transcripción de ARN mensajeros específicos, que a su vez controlan la síntesis de ciertas proteínas, tales como el colágeno, osteocalcina, calbindinas, etc.

La unión del calcitriol a su VDR supone la regulación de la transcripción de aproximadamente un 3% del genoma humano. Interviene, entre otros procesos, en la regulación del crecimiento y maduración celular, inhibe la producción de renina y aumenta la secreción de insulina y la sensibilidad a la misma. Modula también la función de linfocitos B y T activados y macrófagos. Esto ya da una idea de las importantes implicaciones que el calcitriol tiene en la salud <sup>(20)</sup>.

El otro mecanismo de acción del calcitriol es muy rápido y supone la activación de vías de transducción de señales, siendo un mecanismo de acción similar al de las hormonas peptídicas. Esto incluye la generación de flujos de calcio, inducción de segundos mensajeros y la activación de proteínas quinasas citosólicas, que supone la fosforilación de coactivadores que serán clave en la modulación de la transcripción génica dependiente de VDR, como la fosfatidilinositol-3'-kinasa (PI3K), la fosfolipasa C o la proteinkinasa C (PKC) <sup>(33-35)</sup>.

### 1.5.2. CALCIO Y FÓSFORO

El calcitriol incrementa las concentraciones plasmáticas de calcio a través de sus efectos en el tracto gastrointestinal, hueso y riñón:

- Incremento de la absorción intestinal:

En el caso del calcio, se produce por dos vías distintas, una genómica y otra no genómica.

- a) La vía genómica se produce a través de los mecanismos derivados de la unión del calcitriol al VDR que llevan en último término a la síntesis de proteínas específicas. Entre ellas se encuentra la calbindina-D, que promueve la absorción de calcio, a través de canales de calcio, en el borde en cepillo o superficie luminal. Forma con él un complejo, calbindina-calcio, que se traslada a la membrana basal donde se transfiere el ión ( $\text{Ca}^{2+}$ ) a una bomba Ca-ATPasa que lo devuelve a la circulación <sup>(6,36,37)</sup>.
- b) La vía no genómica modula un transporte rápido de calcio llamado “transcaltaquia”. Supone la apertura de canales de calcio dependientes de voltaje en la membrana celular, así como el transporte vesicular de calcio <sup>(36)</sup>.

En el caso del fósforo, un 65% del ingerido se absorbe en el intestino principalmente por transporte pasivo, pero también hay un transporte activo que es estimulado por el calcitriol <sup>(38)</sup>. Cuando se sufre un déficit de vitamina D, la absorción intestinal del calcio y el fósforo ingeridos con la dieta, puede reducirse hasta en un 10 – 15%, y un 50 – 60%, respectivamente. Esto implica un descenso del calcio ionizado, lo cual es detectado por los sensores de calcio (CaSR) de las glándulas paratiroides, con lo que se estimula la síntesis y secreción de la PTH, cuya función será corregirlo <sup>(6,20)</sup>.

- Resorción ósea:

La mayor parte del calcio del organismo se encuentra en el hueso, en forma de hidroxapatita ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ). El tejido óseo es un reservorio de calcio que está implicado en el mantenimiento de las concentraciones plasmáticas del calcio ionizado. Este proceso depende de la actividad de los osteoblastos y osteoclastos, que a su vez están regulados por diversas hormonas, entre ellas el calcitriol y la PTH <sup>(12)</sup>.

Tanto el calcitriol como la PTH interactúan con su receptor en los osteoblastos maduros, induciendo la expresión del ligando del receptor activador del factor nuclear kb (RANKL), que se une su receptor natural, RANK, en la membrana plasmática de los precursores de los osteoclastos, induciendo así su transformación a osteoclastos maduros, que actúan sobre el hueso liberando calcio y fósforo a la circulación, además de ácido clorhídrico y colagenasas <sup>(6,20)</sup>.

El calcitriol tiene también otro mecanismo para activar los osteoclastos, y es a través de su unión al VDR, pues esto estimula la diferenciación de osteoblastos y la producción de proteínas de unión al calcio óseo, como la osteocalcina y la osteopontina. La acción sobre los osteoblastos también lleva a la producción de citoquinas y factores de crecimiento que estimulan la actividad y formación de osteoclastos<sup>(6)</sup>.

- Reabsorción renal:

Tan sólo el calcio libre o ionizado se filtra en el glomérulo renal. Se estima que el 97-99% del calcio así filtrado se reabsorbe en los siguientes segmentos de la nefrona.

El calcitriol aumenta la reabsorción de calcio a nivel renal por un mecanismo similar al intestinal. Incrementa los niveles del transportador de membrana (EcaC) y también el número de calbindinas, responsables del transporte transcelular<sup>(6,12)</sup>.

En esta reabsorción renal también es importante el papel de la PTH, ya que aumenta la reabsorción del calcio filtrado, pero disminuye la de fósforo. Esto produce una estimulación de la síntesis de calcitriol.

#### 1.5.3. FUERZA MUSCULAR<sup>(39,40)</sup>

Las fibras musculares también poseen VDR. Distintos estudios experimentales han demostrado que los metabolitos de la vitamina D influyen en la maduración y funcionamiento del músculo a través de dichos receptores.

La vitamina D produce la estimulación de la proliferación de células musculares y su diferenciación, mediado por la inducción de proteínas de unión al calcio y a la miosina, que son proteínas musculares específicas. Además, la activación de los VDR presentes en la membrana de las células musculares por parte del calcitriol, lleva a la estimulación de la adenil-ciclasa y las fosfolipasas C, D y A2, lo que desemboca en la activación de vías de señalización intracelulares, como MAPK (Mitogen-activated protein kinase) que en último término produce la división celular. Sobre esto, hay un estudio publicado que muestra que ratones recién nacidos de madres con deficiencia de vitamina D tenían unas células musculares más pequeñas que las de los ratones cuyas madres presentaban unos niveles adecuados de calcitriol.

#### 1.5.4. SISTEMA INMUNITARIO<sup>(31,40-43)</sup>

La interacción de la vitamina D con el sistema inmune se da de forma directa e indirecta.

Para comprender el papel que juega la vitamina D en el sistema inmune es necesario centrar los conceptos de inmunidad innata e inmunidad adquirida, propias de los organismos superiores. La inmunidad adquirida requiere del procesamiento del antígeno y su activación por las células dendríticas, esto consigue la activación de los linfocitos T y la producción de anticuerpos por

parte de los linfocitos B. Por otro lado, la inmunidad innata supone una respuesta inmediata frente a una gran variedad de microorganismos patógenos.

Los VDR están presentes en todas las células del sistema inmune, y algunas de ellas también pueden producir  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  por la expresión de 1-alfa-hidroxilasa <sup>(44)</sup>. Además, la vitamina D regula un gran número de genes relacionados con la inmunidad. La activación de los VDR en las células inmunitarias tiene como consecuencia la modulación de la respuesta inmune adquirida y la estimulación de la innata <sup>(45)</sup>.

- Inmunidad innata:

La vitamina D promueve la diferenciación de precursores mieloides a macrófagos, favoreciendo también algunas de sus funciones (fagocitosis, presentación de antígeno, etc.).

La activación de los VDR por el calcitriol activa a su vez la catelicidina, también llamada LL-37, y la beta-defensina tipo 2. Ambos son péptidos producidos por macrófagos y polimorfonucleares que actúan desestabilizando la membrana microbiana. En concreto, la catelicidina tiene capacidad de unirse y lesionar al lipopolisacárido, presente en bacterias Gram negativas. Además, presenta actividad frente a un amplio espectro bacteriano. Se ha postulado la teoría de que esta acción sobre el lipopolisacárido bacteriano no sólo puede ayudar en la lucha inmunitaria frente a la infección, sino que además podría proteger frente a la sepsis <sup>(46-48)</sup>.

La catelicidina también presenta actividad quimiotáctica para neutrófilos, monocitos y linfocitos T, y estimula la proliferación de células endoteliales con la consiguiente inducción de IL-8. Estos mecanismos potencian la respuesta inmunitaria frente a infecciones <sup>(31,47-49)</sup>.

El papel de la vitamina D en la inmunidad innata tiene relevancia y aplicación en diversas infecciones microbianas.

- Inmunidad adquirida <sup>(50)</sup>:

Esta respuesta está mediada por linfocitos, en cuya diferenciación y proliferación puede influir la vitamina D.

En el caso de los linfocitos B, esta acción se produce de forma indirecta a través de los linfocitos T cooperadores o helper (Th). Estos linfocitos, una vez activados, secretan citoquinas que influyen en la función de casi todas las células del sistema inmunitario. De esta forma, inducen la inhibición de la proliferación y diferenciación de los linfocitos B y los llevan a la apoptosis, por lo que disminuye la producción de inmunoglobulinas.

La acción de la vitamina D en la regulación de los linfocitos T se puede hacer de forma directa o indirecta

Los linfocitos T CD4 o helper se dividen en:

- Th1: secretan como citoquinas IL-2 e IFN- $\gamma$ , y están implicados en la inmunidad celular.
- Th2: secretan como citoquinas IL-3, IL-4, IL-5 e IL-10, y están implicados en la inmunidad humoral.

La vitamina D modula la producción de las citoquinas por parte de los linfocitos T: inhibe las proinflamatorias, que son secretadas por los linfocitos Th1 (IL-2, IFN-gamma, TNF alfa, IL-9, IL- 22), y promueve las antiinflamatorias (IL-3, IL-4, IL-5, IL-10), secretadas por los linfocitos Th2.

El papel de la vitamina D en la inmunidad adquirida tiene relevancia y aplicación en diversas enfermedades de origen autoinmune.

La vitamina D se ha relacionado además con la respuesta inmunitaria frente a distintas infecciones descritas, por ejemplo, infección respiratoria en pediatría por Virus Respiratorio Sincitial <sup>(45,51)</sup>. En concreto, esta relación se debe a los diferentes polimorfismos del VDR.

La implicación de la vitamina D en el sistema inmune tiene por tanto dos consecuencias: respuesta a infecciones y curso de enfermedades autoinmunes.

## 1.6. DÉFICIT DE VITAMINA D

Las posibles causas que llevan a un cuadro de deficiencia de vitamina D son <sup>(5,7,52,53)</sup>:

1. Déficit de la síntesis cutánea de calcitriol:
  - a. Falta de exposición a la luz solar: esto ocurre con mayor frecuencia en personas con movilidad reducida, como pacientes ancianos <sup>(54)</sup>, institucionalizados o lactantes.
  - b. Uso de cremas con factor de protección solar.
  - c. Estación del año.
  - d. Latitud y altitud.
  - e. Pigmentación cutánea.
  - f. Edad.
2. Alteración de la disponibilidad de vitamina D secundaria a una dieta inadecuada.
3. Alteración de la absorción intestinal <sup>(55)</sup>:
  - a. Síndrome de malabsorción intestinal: conjunto de síntomas y signos derivados de déficits nutricionales producidos por alteraciones en los procesos fisiológicos realizados en el intestino delgado para digerir y absorber los nutrientes. Las causas del síndrome de malabsorción son múltiples, y se basan en anomalías anatómicas y funcionales, pero las más habituales en nuestro medio son:
    - Enfermedad celíaca: enteropatía inducida por gluten.
    - Síndrome del intestino corto: consecuencia de resecciones intestinales amplias o de enfermedades inflamatorias como la enfermedad de Crohn.
    - Enfermedad de Whipple: también denominada lipodistrofia intestinal. Es una enfermedad rara e infecciosa causada por una bacteria: *Tropheryma whipplei*. Se caracteriza por artritis, malabsorción y otros síntomas, fundamentalmente intestinales.
  - b. Alteración de la circulación enterohepática: esto también ocurre en la enfermedad de Crohn, en enfermedades hepáticas colestáticas, obstrucción biliar extrahepática y afectación de las porciones distales del intestino delgado.
4. Alteración de la hidroxilación en el hígado, como consecuencia de enfermedades hepáticas.
5. Estimulación del catabolismo de 25(OH)D: debido al uso de fármacos inductores del CYP450 que estimulan la transformación de 25(OH)D en metabolitos inactivos. Entre esos fármacos, los más frecuentes son: antiepilépticos como la fenitoína, tuberculostáticos, ketoconazol y antirretrovirales.
6. Pérdidas de 25(OH)D por vía renal: en el síndrome nefrótico se produce una gran pérdida de VDBP que conlleva también un déficit de vitamina D.
7. Alteración de la hidroxilación en el riñón: puede producirse por un mecanismo patológico, como es la insuficiencia renal, o por uno fisiológico, como el envejecimiento. En el caso de la insuficiencia renal, se producirá una disminución del calcitriol por dos

motivos. Por un lado, el filtrado glomerular disminuye el calcidiol, y por otro, se producirá una deficiencia de la 1-alfa-hidroxilasa<sup>(56)</sup>.

#### 8. Insensibilidad de los órganos diana a los metabolitos de la vitamina D.

Las manifestaciones clínicas de un estado de deficiencia de vitamina D dependerán del grado de dicha deficiencia, así como de su duración<sup>(57)</sup>. Aunque las consecuencias del déficit de vitamina D que históricamente más se han estudiado, y por ello son las mejor caracterizadas, están relacionadas con el metabolismo óseo, hoy se conoce la implicación de la vitamina D en muchos otros sistemas del organismo. Así, el déficit de esta vitamina se ha asociado a diversas patologías, como enfermedad cardiovascular, infecciones, enfermedades autoinmunes, neoplasias, patología inflamatoria o diabetes mellitus.

##### 1.6.1. HIPERPARATIROIDISMO SECUNDARIO Y OSTEOPOROSIS<sup>(57,58)</sup>

La falta de vitamina D disminuye la absorción intestinal de calcio hasta en un 15%, y de fósforo hasta en un 60%.

En el déficit temprano, la hipofosfatemia es más evidente que la hipocalcemia. A medida que esta deficiencia persiste, se desarrollará la hipocalcemia, que deriva en un hiperparatiroidismo secundario.

El objetivo del aumento de la PTH es mantener los niveles de calcemia normales.

La principal consecuencia del hiperparatiroidismo secundario es el desarrollo de una osteoporosis de recambio elevado y osteítis fibrosa quística. Esto se traduce en la pérdida de calcio en el tejido óseo, que conlleva un reemplazamiento de masa ósea por tejido fibroso, lo que ocasiona dolor, deformidades y fracturas.

A pesar de que esta situación se produce por un déficit de calcitriol, sus niveles en sangre permanecerán normales o incluso elevados, puesto que la PTH estimula la producción renal de calcitriol.

Tanto la PTH como el calcitriol interactúan con su receptor en los osteoblastos maduros, induciendo la expresión de RANKL.

##### 1.6.2. OSTEOMALACIA<sup>(30)</sup>

La osteomalacia es una enfermedad del metabolismo óseo caracterizada por un defecto de la mineralización ósea. En la infancia, este trastorno se denomina raquitismo y afecta, además, al cartílago de crecimiento.

La causa más frecuente de esta enfermedad es la alteración del metabolismo de la vitamina D, que puede deberse a cualquiera de las causas ya expuestas.

El efecto de la vitamina D sobre el tejido óseo se produce por un mecanismo directo, ya que actúa sobre las células óseas activando su diferenciación, y por uno indirecto, a través de las concentraciones de calcio y fósforo. Esto ocurre porque el déficit de vitamina D disminuye la absorción intestinal de calcio y fósforo, elementos básicos en el proceso de mineralización, y a su vez, la hipocalcemia activa la secreción de PTH, que promueve la resorción ósea e induce un

aumento de la excreción de fosfatos, por lo que la hipofosfatemia puede verse agravada.

Cabe destacar un tipo de osteomalacia de origen muy diferente a lo explicado, pero también relacionado con la vitamina D: Osteomalacia tumoral. Se asocia tanto a tumores benignos de origen mesenquimatoso, como a carcinomas de mama, próstata o pulmón, entre otros. El tumor produce una sustancia humoral que disminuye la reabsorción tubular de fosfato y la hidroxilación renal de 25(OH)D, lo que finalmente lleva al desarrollo de osteomalacia.

La osteomalacia también puede presentarse por un déficit en las concentraciones de fosfato: osteomalacia hipofosfatémica. Evidentemente, este mecanismo también tiene mucho que ver con el metabolismo de la vitamina D, ya que las concentraciones de fosfato están reguladas principalmente por el calcitriol, la PTH y el FGF-23, y el fallo de cualquiera de estos reguladores puede llevar al déficit de fosfato. Cabe mencionar, que uno de los mecanismos bien conocidos que deriva en esta situación patológica es un trastorno hereditario, el raquitismo hipofosfatémico ligado al cromosoma X, en el que se produce hiperfosfaturia con niveles de PTH, 25(OH)D y 1,25(OH)<sub>2</sub>D normales.

Existe un conjunto de manifestaciones clásicas que caracterizan la osteomalacia, como dolor óseo difuso, especialmente en pelvis, columna vertebral y parrilla costal, debilidad y dolor muscular. En las formas más graves, puede llegar a desarrollarse deformidades en el tórax y esternón. Sin embargo, las manifestaciones actuales suelen ser más sutiles y a veces, de difícil distinción con las propias de la osteoporosis, como son las fracturas vertebrales, costales o de fémur. De hecho, más del 90% de los pacientes con osteomalacia por déficit de vitamina D presentan fracturas esqueléticas, y sobre el 80% de ellos tienen criterios densitométricos de osteoporosis, lo que dificulta el diagnóstico correcto.

Los hallazgos analíticos que caracterizan la osteomalacia difieren en función del origen de la enfermedad. Así, cuando se produce por un déficit de vitamina D, suele aparecer, aunque no es universal, hipocalcemia, hipofosfatemia y aumento de la fosfatasa alcalina (FA). Los valores séricos de 25(OH)D suelen estar por debajo de los 12 ng/mL, y la PTH aumentada, por lo que los niveles de 1,25(OH)<sub>2</sub>D pueden encontrarse normales e incluso elevados.

El diagnóstico de la osteomalacia requiere la biopsia del hueso previamente marcado con tetraciclinas, para así determinar la tasa de mineralización. Cuando la osteomalacia se desarrolla como consecuencia del déficit de vitamina D, antes de llegar a esa situación patológica se pasa por otras fases más relacionadas con la osteoporosis. Ya en 1990 Parfitt et al. <sup>(59)</sup> desarrollaron una clasificación en 3 estadios que refleja esta situación <sup>(60,61)</sup>.

- En el estadio 1 se detecta una reducción de la absorción intestinal de calcio, lo que deriva en una disminución de las concentraciones de calcio en el tejido óseo, y finalmente, a la osteoporosis. La biopsia ósea en esta fase no muestra signos de osteomalacia
- En el estadio 2 se aprecian ya signos de osteomalacia en la biopsia, que se traducen en un aumento de la superficie y grosor del osteoide, viéndose además las marcas de depósito de las tetraciclinas con una distancia pequeña entre ellas. Lo que aún no aparecen son signos de osteomalacia en la analítica. La única manifestación

clínica es la osteoporosis.

- En el estadio 3 la osteomalacia ya se manifiesta a nivel histológico, clínico y analítico. En la biopsia se muestra un aumento importante del grosor del osteoide, pero sin distinguir las bandas de tetraciclinas.

En cuanto a los hallazgos radiológicos, el clásico de la osteomalacia es la aparición de zonas de Looser o pseudofracturas. Se trata de líneas radiolucientes delgadas que cruzan los márgenes del hueso, que pueden evolucionar a fracturas completas, y se caracterizan por ser simétricas y bilaterales. A este cuadro patológico se le denomina síndrome de Milkman.

### 1.6.3. RAQUITISMO <sup>(62)</sup>:

Se desarrolla como consecuencia de la deficiente mineralización del hueso o del tejido osteoide en crecimiento. Supondrá para los pacientes un retraso del crecimiento y de la calcificación normal del cartílago epifisario.

Puesto que la vitamina D es básica para el adecuado desarrollo del metabolismo óseo, cualquier anomalía que lleve a una deficiencia de su concentración puede derivar en un raquitismo carencial. Además, existen también otras causas que pueden llevar al desarrollo de la enfermedad:

El raquitismo hipofosfatémico familiar es un trastorno ligado al cromosoma X que consiste en un defecto del transporte tubular proximal de fosfato y de la 1-alfa-hidroxilasa renal, lo que impide la correcta reabsorción del fosfato. El Síndrome de Fanconi también lleva a un aumento de la excreción renal de fosfato con consecuencias similares.

Además de las distintas circunstancias que pueden llevar a una disminución de la síntesis cutánea de vitamina D, o de defectos en su metabolismo que también pueden derivar en unos niveles de calcitriol insuficientes. Existen dos trastornos hereditarios de pseudodéficit de vitamina D, denominados raquitismos vitamina D dependientes (VDDR) de tipo I y tipo II <sup>(30)</sup>.

- El VDDR tipo I se debe a un déficit de la 1-alfa-hidroxilasa en el riñón de carácter autosómico recesivo, por una mutación localizada en el cromosoma 12q13-14. Como consecuencia se produce una disminución muy marcada de los niveles de calcitriol.
- El VDDR tipo II se produce como consecuencia de una resistencia a la acción del calcitriol por una anomalía en su receptor, VDR. Esto tiene distintos orígenes: disminución del número de receptores, defecto de afinidad del receptor por el calcitriol, defecto de translocación nuclear, o alteración de la capacidad de unión del receptor al ADN. Una característica clínica de este tipo de raquitismo es la presencia de alopecia.

	Déficit de vitamina D	VDDR tipo I	VDDR tipo II	Hipofosfatemia ligada al cromosoma X	Hipofosfatemia tumoral
25(OH)D	↓↓	N	N	N	N
1,25(OH) <sub>2</sub> D	↓ o N	↓↓	↑↑	N o ↓	↓
PTH	↑	↑	↑	N	N
Calcemia	↓ o N	↓	↓	N	N
Fosfatemia	↓ o N	↓	↓	↓	↓
FA	↑	↑	↑	↑	↑

Tabla 1.7.3.1. Características analíticas asociadas al déficit de vitamina D, VDDR tipo I y tipo II, hipofosfatemia ligada al cromosoma X e hipofosfatemia tumoral

#### 1.6.4. ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR E HIPERTENSIÓN ARTERIAL <sup>(63,64)</sup>

La enfermedad cardiovascular es una de las patologías con mayor morbilidad y mortalidad tanto a nivel nacional como mundial. La identificación de ciertos factores de riesgo en estos pacientes es crucial en su evolución y tratamiento.

Diversos estudios epidemiológicos han demostrado la asociación entre niveles bajos de vitamina D y cifras de tensión arterial elevadas. De hecho, poblaciones con menor capacidad de síntesis de vitamina D, bien por la situación geográfica, o bien por su etnia o edad, también se asocian con unas cifras de tensión arterial más altas. El hecho más evidente que relaciona la vitamina D con la enfermedad cardiovascular (ECV) es la presencia de VDR en el músculo liso vascular, el endotelio y los cardiomiocitos.

Aunque no están claramente establecidos los mecanismos que relacionan la deficiencia de vitamina D con la enfermedad cardiovascular, parece que potencia algunos de los factores de riesgo relacionados con esta enfermedad, como la hipertensión, diabetes o procesos inflamatorios <sup>(65)</sup>.

En el estudio NHANES 1988-1994 <sup>(66)</sup> se relacionó la deficiencia de vitamina D (25(OH)D < 20 ng/mL) con una mayor prevalencia en el desarrollo de angina de pecho, infarto agudo de miocardio y fallo cardiaco, al comparar poblaciones con distintas concentraciones de 25(OH)D. En otro estudio similar pero más reciente: NHANES 2001-2004 <sup>(67)</sup> se relacionó de nuevo niveles deficientes de vitamina D (25(OH)D < 20 ng/mL) con enfermedades coronarias, fallo cardiaco y enfermedad vascular periférica.

Distintos estudios han relacionado la deficiencia de vitamina D con el desarrollo de hipertensión arterial. Entre ellos se encuentran el HPFS y Nurses Health Study <sup>(68)</sup>, en los que hombres y mujeres con niveles deficientes de vitamina D (25(OH)D < 15 ng/mL) mostraron un riesgo de 3-6 veces mayor de desarrollar hipertensión arterial durante 4 años de seguimiento, comparados con sujetos con niveles óptimos de vitamina D.

En un metaanálisis desarrollado por Kunutsor et al. <sup>(69)</sup> que englobó a 283.537 individuos, se concluyó que existe una relación inversa significativa entre los niveles basales de vitamina D y el riesgo de padecer hipertensión.

El mecanismo que posee la vitamina D para proteger frente a enfermedades cardiovasculares no ha sido completamente dilucidado, pero sí se conoce la implicación de esta vitamina en ciertos mecanismos relacionados con estas enfermedades. Entre ellos se encuentra: el eje renina-angiotensina-aldosterona, control glucémico, citoquinas inflamatorias, efectos directos sobre el sistema vascular y la regulación de los niveles de PTH y calcio.

El sistema renina-angiotensina-aldosterona es un regulador de la homeostasis del volumen extracelular que participa en la estabilización de la presión arterial. Muchos fármacos antihipertensivos tienen como mecanismo de acción la inhibición de este sistema, pues ha demostrado un favorable impacto sobre el riesgo cardiovascular de estos pacientes. Parece que el calcitriol es capaz de modular este sistema reduciendo la expresión del gen de la renina, y con ello disminuyendo los niveles de presión arterial<sup>(70,71)</sup>.

Las células del sistema inmunitario, como los linfocitos y los macrófagos, participan activamente en el desarrollo de la placa aterosclerótica. El calcitriol inhibe la producción de citoquinas proinflamatorias, como la IL-1, IL-2, IL-6 y TNF-alfa, y además activa la de las antiinflamatorias, como la IL-10, además de a los linfocitos Th-2. Este efecto inmunomodulador contribuye a disminuir el proceso aterosclerótico<sup>(65)</sup>.

#### 1.6.5. DIABETES MELLITUS<sup>(71-73)</sup>

Los niveles bajos de vitamina D también se han asociado con un incremento de la resistencia a la insulina, así como con la disfunción de las células beta pancreáticas, resultando en una disminución de la secreción de insulina<sup>(65)</sup>.

La diabetes mellitus tipo 1 (DM1) es una enfermedad autoinmunitaria crónica, en la que se produce una destrucción de las células beta pancreáticas que son las responsables de la producción de insulina. La disminución en sangre de la insulina, lleva un aumento de la glucemia.

Aunque el principal determinante genético de esta enfermedad se encuentra en la región del sistema mayor de histocompatibilidad, en el cromosoma 6p21, parece que existen otros genes que también se relacionan con una mayor susceptibilidad a desarrollar DM1. Uno de estos genes también se relaciona con los niveles de calcitriol, es el CYP27B1. Algunos polimorfismos de este gen pueden disminuir la expresión local de la 1-alfa-hidroxilasa, reduciendo así la síntesis de calcitriol.

La hipovitaminosis D parece tener relación con la disfunción de las células beta pancreáticas, puesto que estas células expresan VDR, lo que llevaría a una alteración en la secreción de insulina y aumento de la resistencia a la misma. Diversos estudios han relacionado a la vitamina D con el correcto funcionamiento del páncreas endocrino, en particular, con las células beta. Además de que en estas células se encuentran VDR, también están presentes calbindinas, que son proteínas fijadoras de calcio dependientes de vitamina D, que introducen calcio en las células, elemento fundamental para la síntesis y secreción de insulina. Además, la expresión de calbindinas en el páncreas, ha demostrado tener un papel de protección de las células beta frente a la acción de ciertas citoquinas proinflamatorias.

Otro de los mecanismos que relaciona la vitamina D con la diabetes es la capacidad del calcitriol de reducir la producción de varias citoquinas inflamatorias. Entre ellas, IFN- $\gamma$  e IL-12, que son marcadores de la respuesta inmunitaria que participa en la respuesta necesaria para la destrucción de las células beta productoras de insulina.

Por otro lado, el déficit de vitamina D también se relaciona con la diabetes mellitus tipo 2 (DM2). En la DM2, la hiperglucemia no se produce como consecuencia de un déficit de insulina. En esta enfermedad, las células beta pancreáticas pueden funcionar correctamente, pero los receptores de la insulina no, lo que lleva finalmente al aumento de la glucemia. La obesidad es uno de los factores implicados en el desarrollo de la DM2, y también existe una estrecha relación entre obesidad y vitamina D. Esta se basa en que en los adipocitos se acumula la vitamina, lo que lleva a una reducción en su concentración circulante, tanto de 25(OH)D como de calcitriol.

Aunque en la fisiopatología de la DM2 intervienen diversos factores, como la ya mencionada obesidad, parece que la predisposición genética también puede jugar un papel importante en el desarrollo de esta patología. Aún no se ha dilucidado con claridad la relación entre ciertos polimorfismos del VDR y la DM2, pero diversos investigadores trabajan sobre esta teoría. En concreto, se centran en los polimorfismos Fok I y Bsm I del VDR, que parecen estar relacionados con un incremento del riesgo de padecer esta enfermedad <sup>(74)</sup>.

#### 1.6.6. SÍNDROME METABÓLICO <sup>(75-77)</sup>

El SM es una entidad clínica que se define por un conjunto de alteraciones metabólicas y vasculares, tales como: obesidad, dislipemia, hiperglucemia, resistencia a la insulina, hipertensión y estado protrombótico. La suma de estos factores condiciona un aumento de riesgo de enfermedad cardiovascular y de DM2.

Diversos estudios sugieren una relación entre el déficit de vitamina D y la aparición de síndrome metabólico (SM), fundamentalmente por la relación demostrada entre dicha hipovitaminosis y enfermedades como la DM, aunque aún no se ha establecido un mecanismo claro que defina una relación causal.

#### 1.6.7. NEOPLASIAS <sup>(34,35,40,53)</sup>

Ya en 1941 Apperly <sup>(78)</sup> publicó un artículo que relacionaba por primera vez la exposición solar con la reducción de la mortalidad por cáncer en Estados Unidos. Desde entonces, se han publicado diversos estudios epidemiológicos que asocian el estatus de vitamina D con el riesgo y gravedad de varios tipos de neoplasias, llegando a demostrar incluso una asociación entre niveles séricos bajos de 25(OH)D, y un aumento en el riesgo de padecer cáncer de colon <sup>(79)</sup>, mama <sup>(80)</sup> y próstata <sup>(81)</sup>.

Entre los genes cuya transcripción está regulada por el calcitriol se encuentran los responsables de la proliferación, diferenciación celular, apoptosis y angiogénesis, por lo que está relacionado con los mecanismos celulares involucrados en la transformación tumoral de las células.

Los efectos del calcitriol sobre el crecimiento y diferenciación varían con el tipo de tejido. Así, inhibe la diferenciación de los linfocitos B, mientras que potencia la de los queratinocitos. Se han identificado distintas dianas de las acciones de la vitamina D, tanto genómicas como no genómicas. Entre ellas se incluyen: receptores acoplados a proteínas G, genes involucrados en vías de transducción de señales, reguladores del ciclo celular, componentes de la matriz extracelular y moléculas de adhesión. A través de estas interconexiones, el calcitriol es capaz de regular el crecimiento y diferenciación celular.

Hoy conocemos el nombre de alguna de esas dianas con las que interacciona la vitamina D y su papel en ciertas neoplasias. Por ejemplo:

- Incrementa la expresión del gen p21, que codifica a la proteína CDKN1A, y del gen p27, que codifica a la proteína CDKN1B. Ambas proteínas son inhibidoras de las quinasas dependientes de ciclina (CDKs), en concreto de los complejos ciclina-CDK2 y ciclina-CDK4. Como consecuencia, se detiene el paso del ciclo celular de la fase G0 a G1.
- Inhibe la expresión de factores de crecimiento, como el factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF1) y el factor de crecimiento epidérmico (EGF). Mientras que potencia la expresión de otros como el factor de crecimiento transformante beta (TGF beta), que promueve la expresión de CDKs, favoreciendo la detención del ciclo celular.

Por otro lado, parece que la vitamina D también puede inducir la apoptosis de células cancerosas, suprimiendo la expresión de genes anti-apoptóticos, como BCL-2, e induciendo otros pro-apoptóticos como BAX y BAK.

La vitamina D también parece estar implicada en la disminución de la expresión de la telomerasa transcriptasa inversa (TERT), lo que induce a la apoptosis.

La angiogénesis es un mecanismo básico en el desarrollo del cáncer, pues supone la inducción de vasos sanguíneos nuevos en el tumor, que le permitirán proveerse de nutrientes y crecer. Inhibir la angiogénesis es la base de parte del tratamiento citostático, y es eficaz en ciertos tumores. La vitamina D también se relaciona con la inhibición de este proceso, pues suprime la expresión de algunos factores de crecimiento que lo potencian, como el factor de crecimiento endotelial (VEGF).

Un estudio reciente, liderado por Ferrer-Mayorga et al. <sup>(82)</sup>, y realizado en pacientes con cáncer colorrectal, relaciona la vitamina D con los fibroblastos en esta neoplasia. Los fibroblastos son células del tejido conjuntivo que constituyen, junto con la matriz extracelular y demás células, el estroma del tumor. Se ha evidenciado que la expresión de los genes que codifican los fibroblastos se ve alterada en algunos tumores, favoreciendo el crecimiento y migración de las células cancerosas. Con lo cual, disminuir la expresión de los mismos a nivel tumoral puede favorecer el pronóstico del paciente.

Para valorar otro mecanismo que relaciona la vitamina D con enfermedades oncológicas, hay que conocer el concepto de microRNA (miRNA), que es un RNA monocatenario de entre 18 y 22 nucleótidos, que tiene la capacidad de potenciar o silenciar la expresión de otros genes. Por ello, el miRNA se ha relacionado con el desarrollo, diferenciación y proliferación celular, además de con la apoptosis.

La vitamina D es capaz de modular la expresión de miRNA y su estabilidad, lo cual se ha relacionado con diversos tipos de tumores como ovario, mama, cérvix, próstata, colorrectal, gástrico o melanoma <sup>(83)</sup>.

Otra implicación de la vitamina D en el desarrollo de ciertos tipos de cáncer está en su capacidad de regular la síntesis de receptores androgénicos y estrogénicos, que están implicados en algunas formas de cáncer de próstata y mama.

Aunque parece que el tratamiento con vitamina D en pacientes con cáncer puede favorecer su pronóstico, a día de hoy, a pesar de todos los estudios publicados, no se puede confirmar con total seguridad.

#### 1.6.8. DEBILIDAD MUSCULAR Y CAÍDAS <sup>(39,40)</sup>

Diversos estudios han demostrado que el déficit de vitamina D se asocia a mialgia, debilidad muscular y sarcopenia, todo ello debido principalmente a la atrofia muscular de fibras musculares de tipo II, afectando sobre todo a la musculatura proximal.

La debilidad muscular asociada a la hipovitaminosis D puede llegar a afectar a la capacidad funcional y a la movilidad, lo que es especialmente relevante en personas ancianas, pues aumentará su riesgo de caída y, por tanto, de fracturas.

#### 1.6.9. ENFERMEDADES RESPIRATORIAS <sup>(84)</sup>

La asociación entre vitamina D y enfermedades respiratorias está íntimamente relacionada con la importancia de la vitamina D en el sistema inmune. Y es que, puesto que la vitamina D favorece la activación de los macrófagos, y estos neutralizan microorganismos implicados en infecciones respiratorias, el déficit de esta vitamina aumentaría el riesgo de padecer determinadas infecciones a este nivel. Estas infecciones son especialmente importantes en pacientes que ya padecen una enfermedad respiratoria previa, como el asma o la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC).

Por otro lado, la vitamina D tiene un efecto inmunomodulador, inhibiendo la producción de citoquinas proinflamatorias secretadas por los linfocitos T, tales como la IL-2 o el IFN-gamma. Estas se ven implicadas en la inflamación de las vías aéreas en ciertas patologías respiratorias.

Se han realizado diversos estudios tratando de relacionar el déficit de vitamina D con la función respiratoria en pacientes con EPOC. Aunque muchos de estos trabajos no han sido concluyentes, y/o muestran resultados discordantes, cabe destacar que Janssens et al. <sup>(85)</sup> encontraron que las

concentraciones séricas de 25(OH)D se correlacionaban con el volumen espirado máximo en el primer segundo de la espiración forzada (FEV1) en pacientes con EPOC, de forma significativa, en comparación con fumadores sanos.

## 1.7. OBESIDAD Y VITAMINA D

En las personas obesas se han observado niveles de vitamina D especialmente bajos <sup>(86-88)</sup>. En parte, cabe pensar que esta población realice una vida más sedentaria, y por tanto con menos exposición solar, pero algunos estudios han demostrado que en estas personas se produce una disminución de la biodisponibilidad de la vitamina D. Esto lleva a un estímulo del hipotálamo que tiene como resultado final el aumento de la sensación de hambre y la disminución del gasto energético <sup>(8,88,90)</sup>.

Puesto que se trata de una vitamina liposoluble, se acumulará en los adipocitos. Al verse estos aumentados en población obesa, la vitamina D quedará “retenida” en el tejido adiposo, antes de que pueda ser transportada al hígado para transformarse en 25(OH)D, disminuyendo por tanto su biodisponibilidad <sup>(91,92)</sup>.

En contraste a las observaciones mencionadas, algunos estudios sugieren que la vitamina D estimula la producción de tejido graso interactuando con los adipocitos por distintos mecanismos <sup>(93,94)</sup>:

- La forma activa de la vitamina D produce un aumento intracelular en los adipocitos de la concentración de calcio, esto estimula la lipogénesis mientras que inhibe la lipólisis, con el consecuente aumento de la grasa corporal.
- 1,25(OH)<sub>2</sub>D estimula la expresión de la 11-β hidroxisteroide deshidrogenasa tipo 1 (11β-HSD 1), enzima responsable de la formación de cortisol a partir de cortisona en los adipocitos, aumentando así el tejido adiposo.

Ambos mecanismos están relacionados, pues el aumento intracelular del calcio provocado por la vitamina D, también estimula la expresión de la 11β-HSD 1.

La clave para entender este comportamiento contradictorio de la vitamina D sobre los adipocitos reside en el aumento de las concentraciones de calcio intracelular. Los niveles bajos de 1,25(OH)<sub>2</sub>D estimulan la producción de PTH, y esta hormona produce un importante aumento intracelular del calcio. Por lo tanto, el aumento de la lipogénesis puede deberse a una disminución de los niveles de la vitamina D y no al contrario <sup>(89)</sup>.

Otro factor fundamental en la relación entre la lipogénesis y/o lipólisis y la vitamina D es el receptor de esta vitamina, VDR, ya que en los adipocitos son muy cuantiosos.

Un interesante estudio desarrollado por Blumberg et al. <sup>(95)</sup> demostró que en ausencia de 1,25(OH)<sub>2</sub>D los VDR se asocian a moléculas moduladores correpressoras, en concreto: NCoR y SMRT, y es esta unión la que promueve la lipogénesis. Mientras que la unión con su ligando natural produce el efecto contrario, la inhibición de la lipogénesis.

Existe también un receptor nuclear, PPARγ, muy relacionado con la vitamina D y la lipogénesis. Este receptor está implicado en la maduración de los adipocitos. Además, regula la expresión de proteínas implicadas en el acúmulo de triglicéridos en los adipocitos. De ahí su implicación en el desarrollo de obesidad. El calcitriol reduce la expresión de este receptor, lo que implica una disminución de la lipogénesis <sup>(89,95,96)</sup>.

### 1.7.1. EVALUACIÓN ANTROPOMÉTRICA

La evaluación antropométrica se basa en un conjunto de medidas corporales (peso, talla, pliegues cutáneos, circunferencias), que proporciona información objetiva y detallada de la composición corporal (CC) de un individuo.

Existen diversas medidas antropométricas a partir de las cuales, y aplicando ecuaciones estandarizadas, se puede calcular la composición corporal de un sujeto, como <sup>(97-99)</sup>:

- Talla
- Peso
- Circunferencia braquial (CB): sirve para estimar la masa muscular y para evaluar la reserva grasa y muscular.
- Pliegue tricípital (PT): aplicando este valor a fórmulas validadas permite obtener la composición corporal del sujeto.

Probablemente, el parámetro antropométrico más utilizado en la práctica clínica diaria es el índice de masa corporal (IMC), que se calcula:

$$IMC = \frac{\text{peso (Kg)}}{\text{altura (m)}^2}$$

La Organización Mundial de la Salud (OMS) reconoce el IMC como un índice para clasificar el sobrepeso y la obesidad en adultos <sup>(100)</sup>:

Clasificación del IMC	
Insuficiencia ponderal	< 18,5
Intervalo normal	18,5 – 24,9
Sobrepeso	≥ 25,0
Preobesidad	25,0 – 29,9
Obesidad	≥ 30,0
Obesidad de clase I	30,0 – 34,9
Obesidad de clase II	35,0 – 39,9
Obesidad de clase III	≥ 40,0

Tabla 1.8.1.1. Grados de obesidad en función del IMC

El IMC como parámetro aislado tiene limitaciones <sup>(101,102)</sup>. Diversos estudios las han demostrado en pacientes ancianos <sup>(103)</sup>, población pediátrica <sup>(104)</sup>, en personas musculosas, o incluso en diferentes etnias. Estas se basan fundamentalmente en que varía con las proporciones corporales

En muchas situaciones clínicas, no sólo interesa conocer el IMC, sino también la CC, y para evaluarla existen diversos métodos. Actualmente, el de referencia es la densitometría de rayos X doble fotón dual, y también las técnicas radiológicas. Estas permiten estimar con precisión la masa grasa y la masa magra, e incluso la grasa visceral, valorando así el índice sarcopénico. Pero el coste y accesibilidad de estos métodos, siguen limitando su uso en la práctica habitual <sup>(101)</sup>.

Las técnicas más tradicionales incluyen las medidas de pliegues cutáneos, diámetros, longitudes y pesos a las que se aplican ecuaciones matemáticas para estimar la grasa corporal (GC), u otros parámetros como la masa muscular total (MMT) <sup>(97,98,105,106)</sup>. Otras técnicas más innovadoras, pero también más accesibles que las radiológicas, incluyen la impedancia bioeléctrica (BIA).

El % de GC también permite realizar una clasificación en cuanto a obesidad. Los valores límites de esta estratificación se establecen en función de la edad y del género <sup>(107,108)</sup>:

Sexo	Edad (años)	Bajo (IMC < 18,5 Kg/m <sup>2</sup> )	Óptimo (IMC = 18,5 – 24,9 Kg/m <sup>2</sup> )	Sobrepeso (IMC = 25,5 – 29,9 Kg/m <sup>2</sup> )	Obesidad (IMC ≥ 30,0 Kg/m <sup>2</sup> )
Mujer	20 – 39	< 21,0%	21,0 – 32,9%	33,0 – 38,9%	≥ 39,9%
	40 – 59	< 23,0%	23,0 – 33,9%	34,0 – 39,9%	≥ 40,0%
	60 – 79	< 24,0%	24,0 – 35,9%	36,0 – 41,9%	≥ 42,0%
Hombre	20 – 39	< 8,0%	8,0 – 19,9%	20,0 – 24,9%	≥ 25,0%
	40 – 59	< 11,0%	11,0 – 21,9%	22,0 – 27,9%	≥ 28,0%
	60 – 79	< 13,0%	13,0 – 24,9%	25,0 – 29,9%	≥ 30,0%

Tabla 1.8.1.2. Clasificación del % de GC en función de la edad y el sexo

## 1.8. DETERMINACIÓN ANALÍTICA

### 1.8.1. VALORACIÓN DE LOS NIVELES DE VITAMINA D

En la evaluación de las concentraciones de vitamina D en el suero se recomienda la medición de 25(OH)D. Esto se debe a que el calcidiol es el principal metabolito circulante de la vitamina D. De hecho, las concentraciones de este metabolito en sangre son, aproximadamente, 1.000 veces superiores a las del 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sup>(9,109)</sup>. Un motivo más para no utilizar el 1,25(OH)<sub>2</sub>D como reflejo del estatus de vitamina D en el organismo, es que en situaciones patológicas su concentración sérica puede verse falseada. De hecho, en estados de hipovitaminosis D, se pueden encontrar niveles de 1,25(OH)<sub>2</sub>D dentro de la normalidad, como resultado de un hiperparatiroidismo secundario<sup>(110)</sup>, y es que cuando un individuo es deficiente en vitamina D, se activa un mecanismo compensatorio que lleva al aumento de los niveles de PTH, que estimula a su vez a la 1-alfa-hidroxilasa renal. Como consecuencia, las concentraciones plasmáticas de 1,25(OH)<sub>2</sub>D pueden ser normales, e incluso algo elevadas, en estados de deficiencia de vitamina D.

Otros motivos que llevan a considerar a la 25(OH)D como el mejor biomarcador del estatus de vitamina D es que refleja tanto la producción endógena, consecuencia de la síntesis cutánea, como la ingerida por la dieta. Además, su producción hepática depende sólo del sustrato y no está regulada hormonalmente<sup>(13,22)</sup>, y su vida media es de tres a cuatro semanas, mientras que, por ejemplo, para la 1,25(OH)<sub>2</sub>D o calcitriol es tan sólo de cuatro a seis horas<sup>(9,11)</sup>.

Aunque se hablará con detalle de los distintos métodos para determinar los niveles de vitamina D en el suero, cabe destacar que en su gran mayoría registran el total de 25(OH)D circulante. Esto incluye el metabolito que es transportado junto con las VDBP, el unido a la albúmina y también el libre. Por otro lado, se considera fracción biodisponible de 25(OH)D la que se encuentra unida a la albúmina o libre y, por último, la fracción libre es la que circula sin unión a ninguna proteína.

### 1.8.2. VDBP

La mayor parte de la 25(OH)D circula unida a las VDBP, hasta en un 88%. Por ello, es lógico pensar que cambios en las concentraciones de estas proteínas pueden llevar a que los niveles de 25(OH)D también varíen.

Este hecho empezó a estudiarse como consecuencia de ciertas publicaciones que mostraban una clara diferencia racial entre caucásicos y afroamericanos en los niveles de 25(OH)D, siendo estos superiores en los caucásicos. Sin embargo, estos resultados no coincidían con la realidad clínica y fisiológica de los sujetos del estudio, ya que los afroamericanos tenían, por ejemplo, una mayor densidad ósea. Además, Aloia et al.<sup>(111)</sup> determinaron en un estudio similar las concentraciones de 25(OH)D libre, y en estas no había diferencia racial.

Posteriormente, Powe et al.<sup>(112)</sup> repitieron esas medidas comparando sujetos afroamericanos y caucásicos estadounidenses, pero esta vez determinaron a mayores la concentración de las VDBP, que resultaron ser un 50% más bajas en los afroamericanos. Este resultado junto con el estado de salud de los sujetos les hizo concluir que los individuos de raza negra podrían tener niveles de vitamina D biodisponible similares a los de raza blanca, a pesar de que sus concentraciones de VDBP fueran inferiores.

Este descubrimiento ofrecía una explicación a que las concentraciones de 25(OH)D total fueran inferiores en la raza negra teniendo igual o mejor densidad ósea, niveles de PTH, concentraciones de calcio y fósforo, etc., ya que, aunque tuvieran menor concentración de 25(OH)D unida a VDBP, los niveles de la fracción biodisponible y libre eran iguales o mayores.

Análisis adicionales revelaron que esa gran diferencia en las concentraciones de las VDBP se debía a los distintos polimorfismos genéticos del gen que codifica para estas proteínas, y que se denomina GC <sup>(10,113)</sup>. Está localizado en el cromosoma 4 y se compone por 13 exones. Este gen tiene un elevado polimorfismo. Se trata de polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs, rs4588 y rs7041) que se producen en el exón 11, dando lugar a dos isoformas: Gc1 y Gc2. Gc1 se ha subdividido a su vez en Gc1f y Gc1s. Se obtienen así tres haplotipos o isoformas de VDBP diferentes, con distinta afinidad por su ligando y distribución étnica.

- Gc1f: se encuentra predominantemente en sujetos con origen africano.
- Gc1s: es el más abundante entre los europeos.
- Gc2: aparece con una frecuencia similar entre africanos, asiáticos y europeos.

Isoforma/Haplotipo	Alelos rs7041 y rs4588	Aminoácidos de las posiciones 416/420
GC1F	G/A	Asp/Thr
GC1S	T/A	Glu/Thr
GC2	G/C	Asp/Lys

Tabla 1.9.2.1. Distintas isoformas con la diferencia en sus alelos y los aminoácidos correspondientes

Las proteínas resultantes tendrán diferente afinidad por el sustrato, así en función de las isoformas: Gc1f tiene mayor afinidad que Gc1s, y esta mayor que Gc2 <sup>(111-117)</sup>.

Estos descubrimientos abrieron la puerta a una nueva forma de analizar la vitamina D: medir la fracción biodisponible o la libre de la 25(OH)D, pues podría reflejar mejor que la total la condición real de la vitamina D en el organismo.

Sin embargo, estudios posteriores han demostrado que la asociación entre los distintos haplotipos de Gc y las concentraciones de VDBP varía en función de la técnica analítica utilizada: los diferentes haplotipos explican el 81% de la variación interracial al determinar las concentraciones de VDBP con inmunoensayos. Sin embargo, tan sólo explica un 12% al utilizar la técnica cromatografía líquida-tándem por espectrometría de masas (LC-MS/MS). Esta fue la técnica empleada por Aloia et al. <sup>(111)</sup> y otros investigadores, en cuyos trabajos no se encontraron diferencias significativas en las concentraciones de VDBP <sup>(111-120)</sup>.

Cabe destacar que existen situaciones fisiológicas y/o fisiopatológicas que pueden llevar una variación de las concentraciones de VDBP. Por ejemplo, en enfermedades hepáticas, como la cirrosis, se produce una disminución de la síntesis de estas proteínas <sup>(110)</sup>. Al contrario ocurre con las embarazadas, en especial en el segundo trimestre. En estos casos, la determinación de la 25(OH)D libre puede reflejar mejor el estado real de la vitamina D en estos sujetos <sup>(121)</sup>.

### 1.8.3. NIVELES ÓPTIMOS DE VITAMINA D

La mayor parte de las publicaciones que muestran estudios poblacionales de concentraciones de vitamina D, expresan sus resultados en ng/mL o en nmol/L de 25(OH)D total. Y, aunque estudios de estas características hay muchos, no se dispone de un estándar que defina el nivel óptimo de vitamina D <sup>(16,109)</sup>. Esta problemática se debe, en parte, a la variabilidad asociada a la técnica analítica que se utilice para determinar la 25(OH)D total, así como a los cambios fisiológicos propios de este analito, en función de la estación del año, y de la localización geográfica de los sujetos que se estudien <sup>(122,123)</sup>.

En un gran número de publicaciones se acepta como deficiencia cifras en plasma iguales o inferiores a 20 ng/mL (equivalente a 50 nmol/L), mientras que niveles insuficientes se establecen por debajo de 30 ng/mL (equivalente a 75 nmol/L). Por último, niveles iguales o superiores a 30 ng/mL (75 nmol/L) se consideran suficientes.

Estos rangos se han establecido considerando que los niveles óptimos de vitamina D son aquellos con los que se consiga una absorción intestinal máxima de calcio, y unas concentraciones de PTH fisiológicamente normales <sup>(124)</sup>.

Cabe destacar que, aunque los estados de suficiencia, insuficiencia y deficiencia se establezcan en esos límites de forma generalizada, en 2010 el IOM concluyó que concentraciones de 25(OH)D superiores o iguales a 20 ng/ml ya eran suficientes para conseguir un estado óptimo de salud <sup>(125)</sup>.

En cuanto a los niveles óptimos de 25(OH)D libre no hay información debido a la falta de estudios que lo determinen.

#### 1.8.4. CUANTIFICACIÓN DE LA VITAMINA D

Las recomendaciones para evaluar el estado de vitamina D en el organismo están dirigidas a la determinación de los niveles séricos de 25(OH)D total. Para ello, el primer paso es siempre liberar el metabolito de la proteína de transporte, VDBP. Estos métodos analíticos, que miden la vitamina D total, reflejan tanto la de producción endógena por la piel, como la de aporte exógeno con la dieta. Para ello es importante que sean capaces de determinar tanto la vitamina D2 o como la D3, pues en caso contrario se estará subestimando la concentración total.

Entre los distintos métodos analíticos disponibles para la cuantificación de la 25(OH)D se encuentran los métodos de referencia <sup>(11)</sup>:

- Cromatografía líquida-tándem por espectrometría de masas (LC-MS/MS), considerado gold standard.
- Cromatografía líquida de alta eficacia o High Performance Liquid Chromatography (HPLC).

El método de referencia es la LC-MS/MS, que cuantifica la vitamina D2 y D3 por separado con alta sensibilidad y especificidad. Pero ni siquiera esta técnica garantiza unos resultados totalmente precisos y fiables.

Desventajas comunes a los dos métodos de referencia son: se trata de equipos de alto coste,

que requieren gran volumen de muestra. Además, son relativamente lentos y precisan de personal experto para su realización. Todo ello, independientemente de su alta sensibilidad, que les ha hecho ser considerados como métodos de referencia<sup>(126,127)</sup>.

Por otra parte, el candidato a método de referencia de dilución isotópica-cromatografía líquida-espectrometría de masas (ID-LC-MS/MS), presenta en principio similares limitaciones de practicabilidad que acabamos de mencionar para los métodos de referencia.

Otra forma de realizar la determinación analítica de la 25(OH)D es a través de los inmunoensayos automatizados<sup>(128)</sup>, que son técnicas analíticas inmunoquímicas que permiten procesar un gran número de muestras en un plazo de tiempo razonable, y que tienen en común el uso de complejos inmunes. Se pueden clasificar por el marcador:

1. Radioinmunoanálisis (RIA):

- Ventaja: no necesita purificar la muestra previamente al ensayo, ni la evaporación de solventes
- Desventaja: el marcador es un isótopo radiactivo

2. Enzimoimmunoanálisis (EIA):

- El marcador es un enzima: ELISA, con lo que se evita la radiactividad.

3. Fluoroimmunoanálisis:

- El marcador es una molécula fluorescente, también se obvia la radiactividad.

4. Ensayo inmunoquimioluminiscente:

- El marcador es un enzima capaz de catalizar una reacción quimioluminiscente, que tampoco precisa de elementos radiactivos.

En los últimos años se ha identificado un epímero de 25(OH)D<sub>3</sub>: 3-epi25(OH)D<sub>3</sub>, cuya actividad biológica aún no está completamente aclarada, pero que ha demostrado presentar reactividad cruzada con 25(OH)D<sub>3</sub> en inmunoensayos, llevando a una sobreestimación de los niveles de 25(OH)D<sup>(9)</sup>.

Songlin Yu et al.<sup>(129)</sup> realizaron un estudio donde se comparaban diferentes métodos analíticos automatizados con el método de referencia (LC-MS/MS). Todos demostraron detectar las concentraciones de 25(OH)D<sub>2</sub> pero con diferentes eficacias. La mayoría de estos inmunoensayos mostraron una reactividad cruzada (< 3%) con el 3-epi 25(OH)D<sub>3</sub>. Como conclusión final, excepto una marca comercial (Siemens®), todos los demás inmunoensayos demostraron una eficacia aceptable de sus resultados, en comparación con LC-MS/MS<sup>(130,131)</sup>.

### 1.8.5. DETERMINACIÓN DE 25(OH)D LIBRE

Actualmente existen dos posibilidades de calcular la concentración de 25(OH)D libre: directamente a través de un ELISA, o calculando este dato a partir de otras concentraciones. Ambas técnicas han demostrado una buena correlación, pero las diferencias interindividuales en las DBP, que pueden ser motivadas, por ejemplo, por diferencias raciales o gestación, pueden provocar sesgos en el cálculo de la 25(OH)D libre por ecuaciones matemáticas, lo que supone que una determinación analítica directa sea preferible<sup>(132)</sup>.

#### CÁLCULO DE LA 25(OH)D LIBRE POR MÉTODOS MATEMÁTICOS<sup>(133)</sup>

Es posible calcular la concentración de 25(OH)D a partir de las concentraciones de 25(OH)D total, VDBP y albúmina.

Al determinar las concentraciones de VDBP hay que considerar los distintos fenotipos que pueden presentar esta proteína y la consecuente diferencia de afinidad hacia los metabolitos de la vitamina D. Chun R.F. et al.<sup>(133)</sup> desarrollaron un método analítico para determinar las concentraciones de vitamina D libre a partir de: los coeficientes de afinidad de los diferentes genotipos del gen GC, la concentración de VDBP, la concentración de albúmina y los niveles de 25(OH)D total y de 1,25(OH)<sub>2</sub>D.

La fórmula matemática final será<sup>(134)</sup>:

$$25(\text{OH})\text{D libre} = \frac{25(\text{OH})\text{D Total}}{1 + (6 \times 10^5 \times [\text{Albúmina}]) + (7 \times 10^8 \times [\text{DBP}])}$$

#### DETERMINACIÓN DIRECTA POR UN MÉTODO ANALÍTICO DE 25(OH)D LIBRE

La técnica ELISA (*Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay*: “ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas”) se basa en el uso de antígenos o anticuerpos conjugados con una enzima y adheridos a una superficie, de forma que, si se ponen en contacto con una muestra que contenga el anticuerpo o antígeno apropiado, se producirá una reacción antígeno-anticuerpo. Ésta podrá ser identificada detectando la actividad enzimática con ayuda de sustratos específicos.

El laboratorio DiaSource® ha desarrollado un método que determina directamente con un inmunoensayo, en concreto un ELISA, la concentración de 25(OH)D libre en una muestra de suero<sup>(135)</sup>.

Este método, como cualquier ELISA, se desarrolla en dos pasos:

- En el primero, la 25(OH)D libre (tanto D2 como D3) se une a anticuerpos anti-25(OH)D libre que se encuentran adheridos a la pared de los pocillos.
- En el segundo paso se añade una cantidad fija de 25(OH)D libre marcada con biotina en presencia de peroxidasa de rábano picante (HRP) a cada pocillo. Ésta competirá con la 25(OH)D libre en los sitios de unión específicos del anticuerpo monoclonal.
- Se agrega la solución cromogénica (TMB), lo que genera una reacción que se detendrá al agregar la solución de parada.

- Con un espectrofotómetro se mide la absorbancia emitida por cada muestra a una longitud de onda de 450 nm.
- La cantidad de 25(OH)D libre de las muestras es inversamente proporcional a la absorbancia resultante en el espectrofotómetro.

JUSTIFICACIÓN

## 2. JUSTIFICACIÓN

Aunque la hipovitaminosis D y sus consecuencias es un tema candente en el momento actual, se han publicado muy pocos estudios que muestren los niveles de vitamina D en población sana. Sí se ha estudiado en poblaciones especiales, con más factores de riesgo de padecerla, como pacientes con insuficiencia renal y mujeres embarazadas o en la etapa postmenopáusica. Es difícil determinar la manera en que estos niveles de vitamina D pueden influir en la salud de esas poblaciones, si no tenemos claro los límites para establecer la hipovitaminosis.

Los pocos estudios realizados con población sana muestran unos resultados decepcionantes, con unos porcentajes de insuficiencia y deficiencia de vitamina D muy elevados. Este resultado ha sido así independientemente de los lugares donde se realizara el estudio, que van desde países con pocas horas de luz y climas fríos, como Finlandia o Polonia <sup>(136)</sup>, hasta otros países mucho más cálidos y con más horas de luz solar, España <sup>(137,138)</sup>. También se han obtenido resultados similares en países tan extensos y con gran variabilidad de climatología como Estados Unidos <sup>(139,140)</sup>.

Por otra parte, resulta que en ninguno de estos estudios se había valorado la posibilidad de “personalizar” los límites para establecer la insuficiencia y deficiencia de vitamina D en función de los resultados obtenidos en las distintas poblaciones.

Además, la técnica analítica de referencia en el análisis de vitamina D es la LC-MS/MS, que cuantifica la vitamina con alta sensibilidad y especificidad, pero ni siquiera ésta garantiza unos resultados precisos y fiables al 100%, aunque determina los niveles de 25(OH)D total, considerado hasta ahora el mejor metabolito para determinar el “status” de vitamina D.

Finalmente, un sorprendente estudio demostró que los polimorfismos responsables de las distintas isoformas de las VDBP podían llevar a la determinación de niveles de 25(OH)D total erróneos <sup>(112)</sup>. Estudios posteriores han concluido que es posible obviar este error midiendo la fracción biodisponible de 25(OH)D, o la libre.

Este trabajo se ha diseñado con el fin de establecer los niveles reales de población sana española, así como su variación estacional, comparando dos grupos de individuos de procedencias geográficas y climatológicas lo suficientemente diferentes como para que esto se vea reflejado en dichos niveles. Además, hemos querido indagar en la técnica analítica que determina la 25(OH)D libre, pues podría tener mayor relevancia clínica que la total, de preferencia de todas las determinaciones analíticas hasta ahora.

OBJETIVOS

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. OBJETIVO GENERAL**

Evaluar el estatus de vitamina D en población sana española.

#### **3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- 3.2.1. Determinar los niveles de vitamina D en población sana de dos áreas geográficas diferentes, y en estaciones distintas, para valorar la influencia de la geografía (en cuanto a horas de luz solar y clima), de los hábitos en la exposición solar y de la dieta en dichos niveles.
- 3.2.2. Comparar los resultados de dos técnicas analíticas diferentes que miden analitos distintos: la 25(OH)D libre en suero con un ELISA, y la 25(OH)D total con la prueba Elecsys Vitamin D Total II (Roche®), un ensayo quimioluminiscente.
- 3.2.3. Evaluar la idoneidad de los límites establecidos hasta ahora para definir los estados de insuficiencia y deficiencia de vitamina D.

MATERIAL Y MÉTODOS

## 4. MATERIAL Y MÉTODOS

### 4.1. DISEÑO DEL ESTUDIO Y ÁMBITO DE ACTUACIÓN

Con el objetivo principal de conocer el estatus de vitamina D en población sana española, desarrollamos un diseño de estudio observacional y transversal.

Para valorar las variaciones de los niveles de vitamina D provocadas como consecuencia de los cambios estacionales forman, realizamos la recogida de datos y muestras en dos momentos diferentes del año 2018: marzo-abril, cuando la síntesis de vitamina D estará disminuida tras el periodo invernal; y octubre-noviembre, cuando tras el periodo estival, la síntesis de vitamina D será superior.

También buscamos conocer el grado de influencia en los niveles de vitamina D que podían tener distintas condiciones geográficas y climatológicas. Para ello, lo llevamos a cabo en dos poblaciones diferentes: la provincia de Burgos y la provincia de Valencia.

Ambas localizaciones, Burgos y Valencia, se encuentran a una latitud por encima de los 37º norte: Burgos a 42º 20' 27,1'' y Valencia a 39º 28'00''. Dada la diferencia de localización cabe suponer que la latitud no será un factor crítico en la discrepancia de concentraciones de 25(OH)D entre ambas poblaciones, pero sí una característica que supondrá niveles más bajos de vitamina D que los esperados por edad, estado de salud, etc. en ambas, y en especial en Burgos.

### 4.2. MUESTRA

#### 4.2.1. TAMAÑO MUESTRAL

El tamaño muestral se ha estimado por comparación de las medias con un estudio previo, de características similares, desarrollado también con población española: *“Prevalencia de concentraciones deficientes e insuficientes de vitamina D en una población joven y sana”* <sup>(141)</sup>. Se estimó un riesgo  $\alpha$  del 5% y un poder estadístico del 90%. En cuanto a la precisión, puesto que la sensibilidad funcional del ensayo utilizado para determinar la 25(OH)D total es el Elecsys Vitamin D Total II (Roche®), que tiene una sensibilidad funcional de 4 ng/mL, y sus límites de detección son de 3 – 100 ng/mL, asumimos una precisión en datos cuantitativos de 3 ng/mL. Por tanto, manteniéndolo por debajo incluso, de la sensibilidad del ensayo.

De esta forma, y asumiendo un 10% de posibles pérdidas, calculamos un tamaño de muestra de 103 sujetos para cada población a estudio.

#### 4.2.2. SELECCIÓN DE LA MUESTRA

Los sujetos participantes en el estudio fueron reclutados a través de Donantes de Sangre. Se trata de personas de entre 18 y 60 años en la fecha de recogida de datos, de la capital y provincia de Burgos, y de la capital y provincia de Valencia.

Se excluyeron aquellos sujetos con enfermedades sistémicas crónicas y/o en tratamiento con cualquier fármaco que pudiera influir en la absorción o metabolismo de la vitamina D, como:

suplementos de vitamina D <sup>(142)</sup>, corticoesteroides, orlistat, colestiramina y antiepilépticos (fenobarbital, fenitoína, carbamacepina y rifampicina).

Todos los sujetos participantes en el estudio fueron debidamente informados sobre los propósitos del mismo, lo cual quedó reflejado al firmar un consentimiento informado.

#### 4.3. CALENDARIO Y PLANIFICACIÓN

Este estudio de investigación se inicia en el año 2017. A lo largo de ese año realizamos una investigación inicial sobre el tema a tratar, el desarrollo de las encuestas de hábitos de exposición solar y el cuestionario de frecuencia de consumo de alimentos (CFCA). También llevamos a cabo, en la segunda mitad del año 2017, todos los trámites necesarios para poder desarrollar el proyecto, y en especial, los acuerdos con las entidades responsables de los donantes de sangre en Burgos (Centro de Hemoterapia y Hemodonación de Castilla y León, CHEMCYL), y Valencia (Centro de Transfusiones de la Comunidad Valenciana).

Entre el último trimestre de 2017 y el primero de 2018, realizamos la formación del personal de Donantes de Sangre, en Valencia y en Burgos, sobre los objetivos del estudio, la forma de recoger todos los datos de los participantes, la realización de las encuestas, y la forma de proceder para obtener los datos antropométricos buscados.

Con el fin de valorar la adecuación del proyecto, en el último trimestre del año 2017 realizamos un estudio piloto en el Centro de Donantes de Sangre de Burgos, donde trabajamos con el personal sanitario para poner a prueba las evaluaciones antropométricas y las encuestas a diferentes donantes de sangre. Esto nos permitió mejorar los cuestionarios y establecer una relación con el centro que facilitaría el desarrollo del proyecto en el año posterior.

La recogida de muestras y realización de las encuestas se llevó a cabo de dos momentos diferentes en las dos poblaciones a la vez: marzo – abril de 2018, y octubre – noviembre del mismo año. Una vez finalizado cada periodo, Donantes de Sangre nos hizo llegar las muestras y las encuestas, para a continuación, desarrollar las técnicas analíticas del estudio, determinando la 25(OH)D total y la libre. Ambas determinaciones se realizaron en el Hospital Universitario de Burgos, gracias a la colaboración del Servicio de Análisis Clínicos, y la Unidad de Apoyo a la Investigación del Complejo Asistencial Universitario de Burgos.

Para finalizar el proyecto, a lo largo de los años, 2019 y 2020, desarrollamos todo el estudio estadístico con los resultados obtenidos. La situación provocada por el SARS-CoV 2 ha supuesto un enlentecimiento en este último proceso del trabajo, lo que ha llevado a alargarlo hasta el año 2021.

#### 4.4. ENCUESTAS

Desarrollamos dos encuestas que pudieran reflejar los aspectos más influyentes en los niveles de vitamina D. La mayor parte de la vitamina D del organismo se produce de forma endógena, con la síntesis cutánea, y un pequeño porcentaje, aunque no por ello despreciable, es aportada

con la dieta a través de distintos alimentos.

Puesto que en el momento de iniciar este trabajo no había ninguna encuesta validada en España que nos permitiera obtener los datos que buscábamos, en octubre de 2017 desarrollamos un estudio piloto en Burgos. A partir de las encuestas validadas en población española que mejor se ajustaban a nuestro estudio: hábitos de exposición solar y hábitos de consumo de alimentos ricos en vitamina D, desarrollamos dos cuestionarios que entregamos a 95 sujetos reclutados a través de Donantes de Sangre de Castilla y León.

Este estudio piloto nos permitió validar las encuestas realizadas y mejorarlas para el momento de la recogida de muestras del estudio. De esta forma, desarrollamos dos tipos de cuestionarios:

#### 4.4.1. ENCUESTA SOBRE LOS HÁBITOS DE EXPOSICIÓN SOLAR

La primera encuesta recoge información relativa a los hábitos solares de los sujetos. En concreto, los más influyentes en la síntesis de vitamina D: uso de cremas solares, horas de exposición solar, etc.

No existe ningún cuestionario validado en España que exponga los datos que nos interesa recoger. La mayoría de los trabajos publicados se centran en la prevención del melanoma y otras patologías dermatológicas, y por ello recogen sólo la información relativa a los hábitos de exposición solar en la playa y demás lugares vacacionales.

Para conseguir nuestro fin, combinamos dos cuestionarios. Por un lado, el realizado por Troya-Martín et al. <sup>(143)</sup>, que sí está validado en España y recoge información sobre comportamientos relacionados con la exposición solar en las playas españolas, así como actitudes y conocimientos vinculados a la exposición solar. Por otro, el realizado por Glanz et al. <sup>(144)</sup>, que fue validado en Estados Unidos, poniéndolo en práctica en múltiples estados, y fue desarrollado como herramienta de ayuda en la prevención del cáncer de piel.

Así, conseguimos incluir aspectos como: el número de horas al día de exposición solar en días de diario y en fines de semana como rutina, y no exclusivamente en vacaciones.

#### 4.4.2. CUESTIONARIO DE FRECUENCIA DE CONSUMO DE ALIMENTOS

La cantidad de vitamina D sintetizada de forma endógena en la dermis y epidermis supone más del 90% del total de vitamina D del organismo. Esto significa que la dieta aporta menos de un 10% de esta vitamina. Sin embargo, este porcentaje puede ser relevante cuando la exposición solar está limitada.

La segunda encuesta recoge toda la información referente a los hábitos alimentarios que permiten valorar la ingesta de alimentos ricos en vitamina D.

Tampoco se ha publicado ninguna encuesta validada que permita determinar la cantidad de vitamina D ingerida con la dieta. Por ello, utilizamos el cuestionario realizado por Susa J. Blalock et al. <sup>(145)</sup> para tal fin. Se trata de un CFCA que se realizó con el objetivo de servir de instrumento para la valoración de la ingesta de vitamina D y calcio, y para validarlo se comparó con un diario de alimentos consumidos a lo largo de siete días, que es un método distinto, pero igualmente válido, para evaluar la ingesta de ciertos nutrientes.

En un CFCA, la persona encuestada responde el número de veces que, como promedio, ha ingerido un alimento, o grupo de alimentos, en un periodo concreto de tiempo. En este caso fue el año precedente. Para ello, el cuestionario se basa en tres pilares<sup>(143)</sup>:

- Una lista de alimentos (mencionados a continuación).
- Frecuencias de consumo en unidades de tiempo.
- Porción de alimento especificada.

Puesto que Susan J. Blalock et al.<sup>(145)</sup> desarrollaron el CFCA para población estadounidense, utilizamos la Base de Datos Española de Composición de Alimentos (BEDCA) para completar la lista de alimentos que contempló este equipo de investigación con otros consumidos en nuestro país<sup>(147)</sup>.

Todas las preguntas del CFCA fueron cerradas y, además, en cada alimento se especificaba el tamaño de ración. Con esta información, los participantes debían completar la frecuencia de consumo, que incluía nueve posibilidades predeterminadas, cuyos límites eran: “nunca o menos de 1 vez al mes” y “2 o más veces por día”.

#### ALIMENTOS RECOGIDOS EN EL CFCA:

- PESCADOS
  - Atún al horno
  - Atún a la plancha
  - Salmón ahumado
  - Salmón fresco
  - Congrio
  - Anchoas
  - Boquerones (frescos, en vinagre, ...)
  - Arenque (salado, ahumado, ...)
  - Pescados enlatados
  - Bonito
  - Atún
  - Sardina
  - Caballa
- LÁCTEOS Y DERIVADOS
  - Mantequilla
  - Margarina
  - Leche
  - Queso
  - Yogur
- CEREALES Y BOLLERÍA
  - Chocolate
  - Muesli o cereales
  - Galletas
- HUEVOS

- CARNE
  - Pollo
  - Conejo
  - Pato
  - Salchichas
  - Embutido: Jamón cocido y serrano, salami, etc.
  
- OTROS: Caviar, pasta, etc.

#### 4.5. ESTUDIO ANTROPOMÉTRICO

Diversos estudios han comparado las técnicas antropométricas clásicas, que parten de la medición de pliegues cutáneos, circunferencias, longitudes y peso, con otras más modernas como la impedancia bioeléctrica (BIA) <sup>(148-153)</sup>. En la mayoría de estos estudios se concluye que, cuando se estudia el porcentaje de grasa corporal (%GC), la mejor correlación se obtiene entre el BIA y la ecuación de Siri, que se explicará a continuación.

En este trabajo, también hemos querido utilizar ambos tipos de técnicas, estudiando su concordancia con los niveles de vitamina D de los sujetos. Para ello, la mitad de los sujetos del estudio (103 sujetos), en concreto los procedentes de Burgos, se sometieron a una BIA, mientras que, a la otra mitad, los procedentes de Valencia, se les realizó el estudio de la composición corporal a partir de la medición del pliegue tricipital (PT) y la circunferencia braquial (CB).

##### 4.5.1. MEDIDAS ANTROPOMÉTRICAS CLÁSICAS

###### 4.5.1.1. ESTIMACIÓN DE LA GRASA CORPORAL A PARTIR DEL PLIEGUE TRICIPITAL

La medición de los pliegues cutáneos tiene como objetivo deducir el %GC de un sujeto, utilizando diversas ecuaciones y coeficientes <sup>(153,154)</sup>.

Aplicando la ecuación de Durnin y Womersley <sup>(155)</sup>, con la medida del PT (mm) y los coeficientes *c* y *m*, se obtiene la densidad corporal:

$$\text{Densidad (D)} = c - [m \times \log(\text{PT})]$$

Donde *c* y *m* son constantes, en función del sexo y la edad:

Rango de edad	Coeficiente "c"		Coeficiente "m"	
	Hombres	Mujeres	Hombres	Mujeres
17-19	1,1252	1,1159	0,0625	0,0648
20-29	1,1131	1,1319	0,0530	0,0776
30-39	1,0834	1,1176	0,0361	0,0686
40-49	1,1041	1,1121	0,0609	0,0691
> 50	1,1027	1,1160	0,0662	0,0762

Tabla 4.5.1.1.1. Valores de los coeficientes "c" y "m" en función de la edad y el sexo

A partir de estos datos, aplicando la ecuación de Siri <sup>(156)</sup>, se obtiene el %GC:

$$\%GC \text{ Siri} = \left[ \left( \frac{4,95}{D} \right) - 4,50 \right] \times 100$$

Además de la ecuación de Siri, también hemos utilizado la ecuación de Brozcek <sup>(157)</sup>. Ambas ecuaciones utilizan los mismos parámetros:

$$\%GC \text{ Brozec} = \left[ \left( \frac{4,57}{D} \right) - 4,5142 \right] \times 100$$

#### 4.5.1.2. ESTIMACIÓN DE LA GRASA CORPORAL A PARTIR DE LA CIRCUNFERENCIA BRAQUIAL Y EL PLIEGUE TRICIPAL

El PT y la CB se utilizan de forma conjunta para deducir la masa muscular (MM) total de un sujeto, así como su GC, a partir de la secuencia de fórmulas propuesta por Frisancho <sup>(158)</sup>:

1) Área del brazo (AB):

$$AB (cm^2) = \frac{\pi}{4} \times d^2$$

$$d = \frac{cb}{\pi}$$

2) Área muscular braquial (AMB):

$$AMB (cm^2) = \frac{(cb - \pi \times PT)^2}{4 \times \pi}$$

La fórmula de Frisancho <sup>(155)</sup> para calcular el AMB presenta como limitación un error de entre 10 – 25% en comparación con la tomografía axial computarizada (TAC). Heymsfield et al. <sup>(159)</sup> lograron reducir este error a un 8% utilizando un factor corrector en función del sexo. También consiguieron, a partir de esa medida, estimar la masa muscular total (MMT) del sujeto <sup>(160-162)</sup>:

- Para hombres:

$$AMBc (cm^2) = \frac{(cb - \pi \times PT)^2}{4 \times \pi} - 10$$

- Para mujeres:

$$AMBc (cm) = \frac{(cb - \pi \times PT)^2}{4 \times \pi} - 6,5$$

3) Área grasa del brazo (AGB):

$$AGB (cm^2) = AB - AMB$$

4) Área adiposa del brazo (AAB):

$$AAB (cm^2) = PT \times \frac{CB}{2} - \frac{\pi \times PT^2}{4}$$

Para deducir %GC a partir de las áreas anteriores:

$$\%GC_{Brazo} = \frac{AAB \times 100}{(AAB + AMB)}$$

#### 4.5.2. IMPEDANCIA BIOELÉCTRICA <sup>(163-165)</sup>

La impedancia bioeléctrica (BIA) es un método de valoración de la composición corporal.

Durante años, numerosos estudios han realizado esta tarea mediante la medida de los pliegues cutáneos y el desarrollo de ecuaciones para la estimación de la grasa corporal.

La BIA es un método que ofrece grandes ventajas en comparación con otras formas de valoración de la composición corporal. Entre ellas, que se trata de una técnica no invasiva con un protocolo sencillo de utilización y válido en todo tipo de poblaciones, así como la rapidez con que se puede llevar a cabo <sup>(148,168)</sup>.

Esta técnica se basa en la variación que experimenta una corriente eléctrica alterna al pasar a través de un cuerpo humano. Esta corriente pasa inadvertida al sujeto dada la poca intensidad que se requiere.

Se conoce como impedancia la oposición que ofrece un conductor, que será el cuerpo humano, al paso de la corriente eléctrica.

La base de la BIA radica en el concepto físico de que la impedancia es directamente proporcional a la longitud (L) de un conductor, que en este caso será la estatura del individuo, e inversamente proporcional a la superficie de sección (A) del dicho conductor (Ley de Ohm). Para ello, se asume que el cuerpo humano actúa como un cilindro <sup>(167,168)</sup>.

La impedancia corporal (Z) depende de dos factores: la resistencia (R) y la reactancia (Xc), relacionados mediante la siguiente fórmula <sup>(148,167,168)</sup>:

$$Z^2 = R^2 + Xc^2$$

- R: supone la resistencia que ofrecen los tejidos al paso de una corriente eléctrica.
- Xc: oposición adicional por la capacitancia (mantenimiento de una carga eléctrica, es decir, actuar como un condensador) de los tejidos y las membranas celulares.

La conductividad de la corriente eléctrica en el organismo depende del contenido en agua y electrolitos de los fluidos intra y extracelulares, por lo que la propia de la masa libre de grasa (MLG) será muy superior a la de la masa grasa (MG) <sup>(167)</sup>.

Este método permita por tanto estimar el agua corporal total (ACT), y a partir de ella, estimar la MLG, y por derivación, la MG, mediante la siguiente ecuación:

$$MLG \text{ (kg)} = \text{peso total (kg)} - MG \text{ (kg)}$$

##### 4.5.2.1. APARATOS UTILIZADOS PARA DETERMINAR LA BIA

En Burgos utilizamos el BIA101 (Akern Srl<sup>®</sup>, Pontassieve, Italia), dispositivo que emite una corriente monofrecuencia de muy baja intensidad (50 kHz) a través de cuatro electrodos colocados dos a dos en la mano y pie de la mitad derecha del cuerpo. El objetivo de este modo

de colocar los electrodos es que la corriente se transmita desde dos de ellos y se recoja por los dos restantes.

La frecuencia de 50 kHz es muy habitual en los estudios de composición corporal, ya que supone que el índice de impedancia sea directamente proporcional al ACT, permitiendo así el cálculo de la MLG. En cambio, no permite diferenciar el agua intracelular de la extracelular, pero este no formaba parte de los objetivos de nuestro estudio <sup>(148)</sup>.

Para obtener la MLG (kg) utilizamos la ecuación de Kyle <sup>(169)</sup>, que tiene en cuenta: R, Xc, peso y sexo de los sujetos:

$$MLG = -4,104 + \left(0,518 \times \frac{H^2}{R}\right) + (0,231 \times peso) + (0,130 \times Xc) + (4,229 \times sexo)$$

Sexo: hombre = 1; mujer = 0; H = altura (cm); R = resistencia a 50 Hz en  $\Omega$

Esta ecuación, también conocida como la ecuación BIA Geneva, está validada en sujetos de 22 a 94 años, de ambos sexos y con índices de masa corporal entre 17 y 34 Kg/m<sup>2</sup>.

#### 4.5.2.2. LIMITACIONES DEL BIA

Las condiciones ideales para realizar esta prueba incluyen el ayuno en las cuatro horas previas a su realización. Suponer esto en los donantes de sangre es imposible ya que una de las condiciones para poder donar es haber ingerido alimento y líquidos poco antes de realizar la donación. Cuando dichas condiciones no se cumplen, la precisión de las medidas obtenidas puede verse comprometida.

Diversos estudios publicados han intentado cuantificar la diferencia que la ingesta de bebida y alimentos podía ocasionar en un BIA. Sus resultados son controvertidos ya que, investigadores como Gómez et al. <sup>(170)</sup> estudiaron la influencia de la ingesta de agua, bebidas de rehidratación hipotónicas y bebidas isotónicas en la medida del BIA, realizándola en ayunas, tras 4 minutos de la ingesta de líquida y tras 90 minutos. La resistencia del BIA variaba en función de los electrolitos de la bebida ingerida, y en todos los casos, se produjo una infraestimación del ACT. Por otro lado, Heiss et al. <sup>(171)</sup> realizaron un BIA a 32 sujetos antes y después de la ingesta de 350 ml de una bebida energética o de leche con cereales y no encontraron diferencias en la composición corporal entre ambas mediciones. Sin embargo, estos mismos autores en un estudio posterior, demostraron que la ingesta de un litro de líquido puede aumentar los resultados de adiposidad obtenidos mediante un BIA <sup>(172)</sup>.

## 4.6. ANÁLISIS BIOQUÍMICO

### 4.6.1. TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS

Las muestras de sangre de los participantes del estudio se recogieron en puntos fijos de Donantes de Sangre. Tras realizar su donación, se obtuvo de cada sujeto una muestra adicional en un tubo sin aditivos de 8,5 mL. Estas muestras se mantuvieron refrigeradas a 4°C un máximo de 24 horas.

Las muestras obtenidas en Valencia fueron centrifugadas en el propio Centro de Transfusión de la Comunidad Valenciana. Una vez separado el suero, éste fue recogido en tubos de 2 mL y se preservó a – 80°C.

Las muestras obtenidas en Burgos fueron trasladadas, en condiciones adecuadas de refrigeración, al Centro de Hemoterapia y Hemodonación de Castilla y León (CHEMCYL), situado en Valladolid. Allí procedieron a la centrifugación de las muestras y posterior congelación del suero obtenido a – 80°C, de la misma forma que se realizó en Valencia.

Puesto que las dos técnicas analíticas de este estudio fueron desarrolladas en Burgos, las muestras de suero, congeladas a – 80°C, se trasladaron al Hospital Universitario de Burgos (HUBU), manteniendo estas condiciones de temperatura durante el transporte. Una vez allí, se descongelaron procediendo a los análisis oportunos.

Este proceso de recogida, tratamiento, conservación y transporte de las muestras, se realizó tras las dos recogidas programadas, al final del verano y al final del invierno del año 2018.

### 4.6.2. TÉCNICAS ANALÍTICAS

El análisis de la vitamina D en las muestras de sangre consiste en la determinación de:

- 25(OH)D libre, mediante un ELISA, ensayo que requiere de unos kits específicos disponibles desarrollados por el laboratorio DIASource®.
- 25(OH)D total, mediante un ensayo de electroquimioluminiscencia (ECLIA) en un analizador cobas e 801, con el reactivo Elecsys® Vitamina D total II (Roche®).

#### 4.6.2.1. DETERMINACIÓN DE 25(OH)D LIBRE MEDIANTE UN ELISA

Una técnica ELISA puede llevarse a cabo con distintos tipos de reactivos, lo que supone diferentes anticuerpos, en función del antígeno que se desee determinar.

#### REACTIVOS PROPIOS DE LA TÉCNICA

En concreto, la técnica analítica de ELISA capaz de medir directamente la 25(OH)D libre se realiza con unos kits específicos desarrollados por el laboratorio DiaSource®, compuestos por:

- ◆ Placa recubierta con los anticuerpos anti-vitamina D: se trata de anticuerpos monoclonales anti-25(OH)D<sub>2</sub>/D<sub>3</sub>. Cada placa contiene 96 test.
- ◆ Diluyente de la muestra (12 mL): contiene un surfactante fluorado y proclin.
- ◆ Reactivo Biot-VitD concentrado 100x (250 µL)
- ◆ Reactivo estreptavidina-HRP (12 mL): reactivo de peroxidasa de rábano conjugada con estreptavidina.
- ◆ Calibrador A (1 vial): 25(OH)D liofilizado procedente de suero humano que contiene Proclin y BND.
- ◆ Calibrador B (1 vial): 25(OH)D liofilizado procedente de suero humano que contiene Proclin y BND.
- ◆ Calibrador C (1 vial): 25(OH)D liofilizado procedente de suero humano que contiene Proclin y BND.
- ◆ Calibrador D (1 vial): 25(OH)D liofilizado procedente de suero humano que contiene Proclin y BND.
- ◆ Calibrador E (1 vial): 25(OH)D liofilizado procedente de suero humano que contiene Proclin y BND.
- ◆ Calibrador F (1 vial): 25(OH)D liofilizado procedente de suero humano que contiene Proclin y BND.
- ◆ Control 1 (1 vial): suero humano liofilizado que contiene Proclin y BND.
- ◆ Control 2 (1 vial): suero humano liofilizado que contiene Proclin y BND.
- ◆ Tampón lavador 20x ("wash buffer") (25 mL): agente tampón para realizar los lavados concentrado 20x. Contiene Proclin.
- ◆ Reactivo sustrato (14 mL): Potenciador del sustrato "K-Blue TMB".
- ◆ Reactivo de parada (14 mL): HCl 1M.
- ◆ Dilución tampón Biot-VitD (14.5 mL): solución tampón que contiene Proclin y BND.

#### FASES DEL ENSAYO:

Antes de iniciar el ensayo, es necesario preparar parte del material:

- Se deben reconstituir los calibradores y los controles, para ello se añaden 250 µL de agua destilada, dejándolo actuar durante 15 minutos. Antes de continuar, hay que asegurarse de que todo el material liofilizado del vial se ha reconstituido.
- Diluir el reactivo "tampón lavador 20x" ("20x wash buffer"). Para ello, basta con pipetear

25 mL de esta solución “20x tampón lavador” y llevarlos a 475 mL de agua destilada. De esta forma obtenemos una dilución “100x”.

- Uno de los reactivos es el compuesto de vitamina D unido a biotina (Biot-VitD). Hay que preparar un volumen adecuado de trabajo de este compuesto mezclando el reactivo Biot-VitD concentrado 100x con la dilución tampón de Biot-VitD. Para calcular esta cantidad hay que tener en cuenta el número de pocillos a utilizar. Calculamos que cada tanda de muestras a analizar será, sin contar posibles pérdidas, de 95 muestras, con lo cual, necesitaremos 95 pocillos, es decir, 16 tiras: 160 µL de reactivo Biot-VitD concentrado 100x se añaden a 6 mL de con la dilución tampón de Biot-VitD

El resto del material necesario para realizar el ensayo no requiere una preparación previa, pero sí tener la precaución de mantenerlo a la temperatura ambiente del lugar del análisis durante al menos 30 minutos antes de su uso.

Una vez que están preparados todos los reactivos, los pasos a realizar son:

1. Mezclar 90 µL de diluyente con 10 µL del calibrador, control o muestra.
2. Incubar durante 90 minutos a 37°C agitando a 650 RPM.
3. Lavar 3 veces, cada una de ellas con 350 µL.
4. Añadir 100 µL de la mezcla preparada con anterioridad del reactivo Biot-VitD.
5. Incubar durante 90 minutos a 37°C agitando a 650 RPM.
6. Lavar 3 veces, cada una de ellas con 350 µL.
7. Añadir 100 µL del reactivo sustrato.
8. Mantener durante 15 minutos a temperatura ambiente, inmóvil y a oscuras.
9. Añadir 100 µL del reactivo de parada.

Finalmente, sólo queda leer los resultados con un espectrofotómetro a una longitud de onda de 450 nm y calcular la cantidad de 25(OH)D libre de las muestras, que será inversamente proporcional a la absorbancia determinada por el espectrofotómetro.

**INTERVALO DE MEDICIÓN:**

El rango de medición de esta técnica es: 0 – 40 pg/mL

**LÍMITES DE MEDICIÓN:**

- Límite del Blanco = 0,7 pg/mL
- Límite de Detección = 1,9 pg/mL

#### 4.6.2.2. DETERMINACIÓN DE LA VITAMINA D TOTAL MEDIANTE ENSAYO INMUNOQUIMIOLUMINISCENTE

Para la determinación de las concentraciones de vitamina D en un individuo, existen diversos ensayos analíticos disponibles.

El método de referencia es la LC-MS/MS, pero entre sus características se encuentran: coste elevado, necesidad de personal cualificado y gran volumen de muestra. Esto dificulta su empleo en las determinaciones rutinarias en los laboratorios clínicos. Por ello, se realizan fundamentalmente inmunoensayos automatizados que hayan demostrado su concordancia y validez al compararlos con LC-MS/MS<sup>(116,130,173,174)</sup>.

Distintas casas comerciales han desarrollado métodos de inmunoensayos automatizados. En este estudio utilizamos uno de ellos, la prueba Elecsys Vitamina D total II con el inmunoanalizador cobas e 801 (Roche®), que utiliza un inmunoensayo de unión competitiva a la proteína de fijación, con detección por ECLIA<sup>(175)</sup>. Este ensayo ha demostrado una trazabilidad directa al método de referencia: LC-MS/MS<sup>(176)</sup>.

##### REACTIVOS DEL INMUNOANALIZADOR COBAS E 801:

El inmunoanalizador cobas e 801 requiere de los siguientes reactivos:

- ◆ Reactivo de pretratamiento 1 (4 mL): contiene Ditiotreitól 1 g/L.
- ◆ Reactivo de pretratamiento 2 (4 mL): contiene Hidróxido de sodio 28 g/L.
- ◆ Micropartículas recubiertas de estreptavidina (6,5 mL).
- ◆ Proteína fijadora de vitamina D-BRPu (6,5 mL): proteína fijadora de vitamina D marcada con Rutenio.
- ◆ 25(OH)D-biotina (6,5 mL): 25(OH)D marcada con biotina.

Este tipo de ensayo admite dos clases de muestras: suero o plasma tratado con heparina de litio, EDTA bi y tripotásico, pero ambos deben mantenerse a – 80°C tras su extracción hasta que se realice el ensayo.

Antes de iniciar el ensayo es conveniente atemperar los reactivos refrigerados a 20°C.

##### FASES DEL ENSAYO

Los pasos para llevar a cabo este ensayo son:

1. Incubar 15 µL de muestra con los reactivos de pretratamiento 1 y 2 con el fin de separar la 25(OH)D de la proteína fijadora de vitamina D (DBP).
2. Incubar la muestra anterior pretratada con la proteína fijadora de vitamina D marcada con Rutenio, que formará un complejo con la 25(OH)D.
3. Añadir las micropartículas recubiertas de estreptavidina y 25(OH)D-biotina. Este último reactivo formará un complejo con los sitios de unión que queden libres de la proteína fijadora de vitamina D marcada con Rutenio, y se fijarán a la fase sólida por la

interacción entre la biotina y la estreptavidina.

4. La mezcla de reacción se traslada a la célula de lectura donde, por magnetismo, las micropartículas se fijan a la superficie del electrodo. Se aplica una corriente eléctrica que produce una reacción quimioluminiscente cuya emisión de luz se mide con un fotomultiplicador.

Los resultados se obtienen mediante una curva de calibración que el sistema genera a partir de una calibración y una curva máster.

#### INTERVALO DE MEDICIÓN:

El intervalo de medición de esta técnica está definido por el límite de detección y el máximo de la curva máster, y es: 3 – 100 ng/mL, que equivale a 7,5 – 250 nmol/L.

#### LÍMITES DE MEDICIÓN:

- Límite del Blanco = 2 ng/mL (5 nmol/L)
- Límite de Detección = 3 ng/mL (7,5 nmol/L)
- Límite de Cuantificación = 5 ng/mL (12,5 nmol/L), con un error permitido máximo permisible de  $\leq 20\%$ .

#### 4.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Como medida de tendencia central se presenta la media aritmética junto con la desviación estándar (DS) como medida de dispersión.

Considerando que las variables cumplan las exigencias de normalidad y homogeneidad de varianzas (homocedasticidad), utilizaremos pruebas de estadística paramétrica. En concreto, para el estudio de dos grupos, la prueba “t” de Student. En aquellos casos en los que no se cumpla la homogeneidad de varianzas, realizaremos la prueba “t” de Student corregida para varianzas diferentes. Para el estudio de más de dos grupos, utilizaremos el análisis de la varianza (ANOVA).

El estudio de la posible asociación entre dos variables numéricas se realizará mediante regresión lineal simple o múltiple, en función del número de variables independientes. Si en algún caso al realizar estos análisis se observa el incumplimiento de los supuestos necesarios para poder realizarlos, se llevará a cabo un análisis de residuales y de valores alejados, eliminando, en su caso, aquellos valores que impliquen dicho incumplimiento.

Para estudiar la evolución de variables categóricas, con más de dos categorías cada una, utilizaremos el test de McNemar-Bowker <sup>(177)</sup>.

Para valorar la correlación entre los resultados de los niveles séricos de vitamina D total y vitamina D libre obtendremos el coeficiente de correlación de Pearson <sup>(178)</sup>.

Utilizaremos también el coeficiente de correlación de Pearson para analizar la relación entre el IMC y los %GC obtenidos por diversos métodos, así como para analizar la relación entre estos mismos parámetros y las concentraciones séricas de vitamina D (libre y total).

Para poder estudiar la concordancia entre las ecuaciones utilizadas para obtener el %GC a partir de las medidas del PT y la CB en la población procedente de Valencia, utilizaremos dos métodos: el coeficiente de correlación intraclase (CCI) y el método de Bland y Altman, incluyendo el coeficiente de correlación de concordancia de Lin <sup>(179,180)</sup>. Para interpretar los valores obtenidos con el CCI tendremos en cuenta las categorías propuestas por Fleiss <sup>(181)</sup>, que asocian una buena correlación con un valor de CCI  $\geq 0,75$ . Para interpretar el gráfico obtenido con el método de Bland y Altman asumimos que para un intervalo del 95% el porcentaje de puntos fuera de este límite no debería superar el 2,5% por ambos lados.

Para analizar la influencia de las distintas variables independientes sobre los niveles de vitamina D libre y total realizaremos un estudio de regresión lineal múltiple. Formará parte del mismo el análisis conjunto de todas las variables independientes sobre la dependiente, pero puesto que esto incluirá muchos términos, realizaremos también un estudio de colinealidad con el objetivo de evitar estimaciones inestables, para luego llevar a cabo un análisis de regresión por pasos, y en concreto, de exclusión por pasos (Backward Stepwise selection). Así, analizaremos las variables independientes del estudio que más influyen en los niveles de 25(OH)D total y libre. O, dicho de otra forma, seleccionaremos el subconjunto de variables que mejor expliquen las variaciones de las concentraciones séricas de 25(OH)D total y libre.

En todos los análisis, los resultados se considerarán estadísticamente significativos si  $p < 0,05$ .

Para todas las pruebas estadísticas utilizaremos el programa informático Stata/IC14 (StataStatistical Software: Release 14, CollegeStation, TX, StataCorporation).

#### 4.8. FUENTES DE FINANCIACIÓN:

- Ayudas a La Investigación de la Fundación Burgos por la Investigación de la Salud año 2016.
- Ayudas a La Investigación de la Fundación Burgos por la Investigación de la Salud año 2017.

RESULTADOS

## 5. RESULTADOS

### 5.1. DATOS PERDIDOS Y PARTICIPACIÓN

Como paso previo a la descripción de los resultados, se muestran en las siguientes tablas la participación y los datos perdidos:

	Burgos		Valencia	
	Invierno	Verano	Invierno	Verano
Cuestionarios				
General	60	36	52	53
Hábitos de exposición solar	60	36	52	53
CFCA	60	37	52	53
Datos antropométricos				
Talla	60	36	52	53
Peso	60	36	52	53
BIA	60	32	-	-
PTC	-	-	52	53
CB	-	-	52	53
Análisis clínico				
25(OH)D total	60	41	52	53
25(OH)D libre	59	41	49	53

Tabla 5.1.1. Participación de la muestra según población y periodo de estudio

	Burgos		Valencia	
	Invierno	Verano	Invierno	Verano
Cuestionarios				
General	0	5	0	0
Hábitos de exposición solar	0	5	0	0
CFCA	0	5	0	0
Datos antropométricos				
Talla	0	5	0	0
Peso	0	5	0	0
BIA	0	9	-	-
PTC	-	-	0	0
CB	-	-	0	0
Análisis clínico				
25(OH)D total	0	0	0	0
25(OH)D libre	1	0	1	0

Tabla 5.1.2. Datos perdidos según población y periodo de estudio

## 5.2. DATOS DEMOGRÁFICOS

A continuación, se describe los datos demográficos de los participantes del estudio, extraídos del cuestionario general, discerniendo la población procedente de Burgos con la de Valencia:

	Burgos	Valencia	Total
<b>N</b>			
Verano	41	53	94
Invierno	60	52	112
<b>Sexo</b>			
Mujer	41	43	84
Hombre	60	62	122
<b>Edad (años)</b>			
media ± DS	40,49 ± 10,79	41,41 ± 13,67	40,97 ± 12,35
<b>Tiempo de residencia, n (%)</b>			
Residencia habitual	90 (89,11)	100 (95,24)	190 (92,23)
Residencia temporal (2 – 12 meses)	5 (4,95)	3 (2,86)	8 (3,88)
Turista (0 – 2 meses)	2 (1,98)	2 (1,90)	4 (1,94)
Datos perdidos	4 (3,96)	0 (0,00)	4 (1,94)
<b>Nivel de estudios, n (%)</b>			
Sin estudios	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
Estudios primarios	9 (8,91)	18 (17,14)	27 (13,11)
Estudios secundarios	43 (42,57)	48 (45,71)	91 (44,17)
Estudios superiores	45 (44,55)	39 (37,14)	84 (40,78)

Tabla 5.2.1. Datos demográficos de la muestra

### 5.3. ESTUDIO ANTROPOMÉTRICO

En el estudio antropométrico se midieron la altura (cm) y el peso (Kg) a todos los participantes, para así deducir el IMC (Kg/m<sup>2</sup>). En la población de Burgos, se realizó además un estudio de BIA, a partir del cual se obtuvo el %GC. A continuación, se muestran todos los datos antropométricos mencionados en la muestra procedente de Burgos, diferenciados por sexo:

	Mujer	Hombre
<b>Altura (cm)</b>		
media ± DS	165,68 ± 6,42	175,28 ± 8,37
mínimo; máximo	157,0; 188,0	154,0; 192,0
<b>Peso (Kg)</b>		
media ± DS	67,90 ± 12,18	81,84 ± 13,66
mínimo; máximo	51,0; 110,0	54,0; 110,0
<b>IMC (Kg/m<sup>2</sup>)</b>		
media ± DS	24,37 ± 3,68	26,60 ± 3,85
mínimo; máximo	19,22; 38,51	20,99; 37,95
<b>%GC</b>		
media ± DS	22,08 ± 6,63	18,73 ± 6,96
mínimo; máximo	12,76; 39,95	6,92; 33,35

Tabla 5.3.1. Datos antropométricos de la muestra procedente de Burgos

Además de las medidas antropométricas comunes a toda la muestra del estudio (talla y peso), a los participantes provenientes de Valencia también se les midió el PT y la CB, lo que permitió deducir: %GC<sub>Siri</sub>, %GC<sub>Brozec</sub>, y %GC<sub>Brazo</sub>. En la siguiente tabla se muestran los datos antropométricos procedentes de la muestra de Valencia, diferenciados por sexo:

	Mujer	Hombre
<b>Altura (cm)</b>		
media ± DS	162,95 ± 6,75	176,32 ± 7,16
mínimo; máximo	150,0; 179,2	163,3; 197,2
<b>Peso (Kg)</b>		
media ± DS	67,85 ± 12,83	84,71 ± 16,49
mínimo; máximo	48,5; 106,0	60,5; 140,0
<b>IMC (Kg/m<sup>2</sup>)</b>		
media ± DS	25,55 ± 4,47	27,12 ± 4,11
mínimo; máximo	18,73; 30,06	20,02; 38,58
<b>%GC<sub>Siri</sub></b>		
media ± DS	31,51 ± 4,08	28,30 ± 6,19
mínimo; máximo	22,26; 41,48	11,59; 42,34
<b>%GC<sub>Brozec</sub></b>		
media ± DS	30,44 ± 3,76	27,38 ± 5,71
mínimo; máximo	21,80; 39,55	11,95; 40,35
<b>%GC<sub>Brazo</sub></b>		
media ± DS	38,10 ± 8,13	28,09 ± 9,29
mínimo; máximo	22,90; 60,34	8,77; 51,56

Tabla 5.3.2. Datos antropométricos de la muestra procedente de Valencia

Analizando la correlación entre el IMC y los %GC encontramos que en Burgos el coeficiente de correlación de Pearson entre ambas variables, teniendo en cuenta que el %GC se ha obtenido a partir de un estudio de impedancia bioeléctrica, muestra un resultado positivo, estadísticamente significativo: 0,680,  $p < 0,001$ ; analizando sólo al subgrupo de hombres el coeficiente muestra un resultado de 0,780,  $p < 0,001$ ; y con el de mujeres de 0,840,  $p < 0,001$ .

Los resultados de analizar la correlación entre el IMC y los distintos datos de %GC en la población procedente de Valencia se muestran en la siguiente tabla:

	%GC <sub>Siri</sub>	%GC <sub>Brozec</sub>	%GC <sub>Brazo</sub>
Global			
IMC (Kg/m <sup>2</sup> )	0,458*	0,458*	0,045
Hombres			
IMC (Kg/m <sup>2</sup> )	0,601*	0,601*	0,271
Mujeres			
IMC (Kg/m <sup>2</sup> )	0,444*	0,444*	-0,032

\* $p < 0.005$

Tabla 5.3.3. Coeficientes de correlación de Pearson, globalmente y diferenciado por sexo

Para comparar la concordancia entre las distintas formas de obtener el %GC en Valencia (ecuación de Siri, Brozec, y el área adiposa del brazo), utilizamos el coeficiente de correlación intraclase (CCI), y los resultados se muestran a continuación.

	CCI (IC 95%)
Global	
%GC <sub>Siri</sub> - %GC <sub>Brazo</sub>	0,694 (0,537 – 0,797)
%GC <sub>Brozec</sub> - %GC <sub>Brazo</sub>	0,654 (0,436 – 0,780)
%GC <sub>Brozec</sub> - %GC <sub>Siri</sub>	0,990 (0,310 – 0,998)
Hombres	
%GC <sub>Siri</sub> - %GC <sub>Brazo</sub>	0,729 (0,548 – 0,837)
%GC <sub>Brozec</sub> - %GC <sub>Brazo</sub>	0,712 (0,521 – 0,826)
%GC <sub>Brozec</sub> - %GC <sub>Siri</sub>	0,977 (0,031 – 0,995)
Mujeres	
%GC <sub>Siri</sub> - %GC <sub>Brazo</sub>	0,502 (-0,136 – 0,770)
%GC <sub>Brozec</sub> - %GC <sub>Brazo</sub>	0,435 (-0,199 – 0,735)
%GC <sub>Brozec</sub> - %GC <sub>Siri</sub>	0,993 (0,567 – 0,998)

Tabla 5.3.4. CCI y su intervalo de confianza 95% entre las distintas técnicas de obtener el %GC en Valencia a partir de datos antropométricos, globalmente y diferenciado por sexo

Un segundo método empleado para valorar esta concordancia es el de Bland-Altman <sup>(179,180)</sup>. En la siguiente tabla se muestran los resultados del mismo, reflejando la media de las diferencias, y su intervalo de confianza del 95%, el coeficiente de correlación de Lin, así como los casos que aparecen fuera de los límites de acuerdo.

	Media de las diferencias (IC 95%)	Coefficiente de correlación de Lin	Casos (n, %) por encima del límite de acuerdo	Casos (n, %) por debajo del límite de acuerdo	p <sup>1</sup>
Global					
%GC <sub>Siri</sub> - %GC <sub>Brazo</sub>	- 2,572 (- 17,658 – 12,513)	0,530	0 (0,00%)	6 (5,71%)	≤ 0,001
%GC <sub>Brozec</sub> - %GC <sub>Brazo</sub>	- 3,591 (- 18,807 – 11,624)	0,484	0 (0,00%)	6 (5,71%)	≤ 0,001
%GC <sub>Brozec</sub> - %GC <sub>Siri</sub>	- 1,019 (- 1,866 – (-0,172))	0,978	4 (3,81%)	3 (2,86%)	0,077
Hombres					
%GC <sub>Siri</sub> - %GC <sub>Brazo</sub>	0,214 (- 14,145 – 14,574)	0,569	0 (0,00%)	4 (6,45%)	≤ 0,001
%GC <sub>Brozec</sub> - %GC <sub>Brazo</sub>	- 0,704 (- 15,036 – 13,628)	0,548	0 (0,00%)	4 (6,45%)	≤ 0,001
%GC <sub>Brozec</sub> - %GC <sub>Siri</sub>	- 0,918 (- 1,849 – 0,013)	0,985	3 (4,84%)	3 (3,23%)	0,534
Mujeres					
%GC <sub>Siri</sub> - %GC <sub>Brazo</sub>	- 6,590 (- 19,102 – 5,921)	0,333	0 (0,00%)	1 (2,33%)	0,351
%GC <sub>Brozec</sub> - %GC <sub>Brazo</sub>	- 7,755 (- 20,383 – 4,874)	0,276	0 (0,00%)	1 (2,33%)	0,404
%GC <sub>Brozec</sub> - %GC <sub>Siri</sub>	- 1,165 (- 1,778 – (-0,551))	0,955	1 (2,33%)	2 (4,65%)	0,946

p<sup>1</sup>: test de normalidad Shapiro-Wilk

Tabla 5.3.5. Método de Bland-Altman aplicado a los %GC obtenidos a partir de datos antropométricos en la población proveniente de Valencia

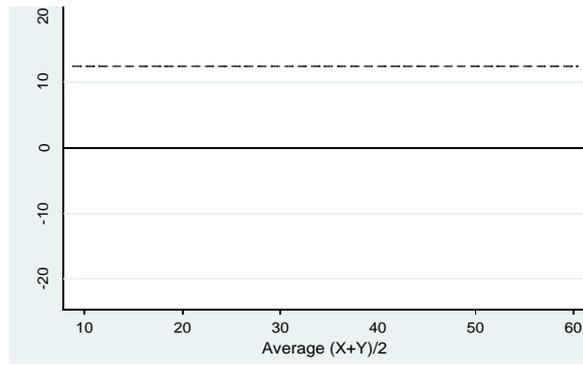


Gráfico 5.3.1. Bland-Altman %GC<sub>Siri</sub> - %GC<sub>Brazo</sub> global

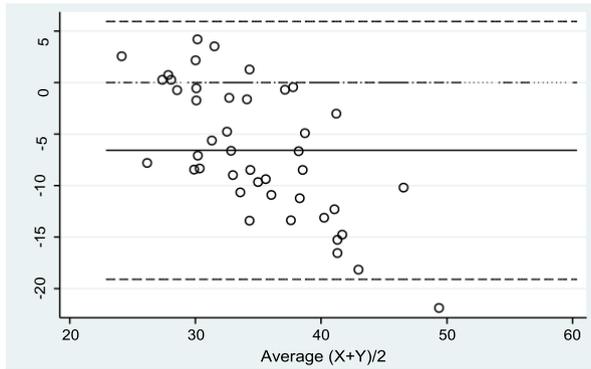


Gráfico 5.3.2. Bland-Altman %GC<sub>Siri</sub> - %GC<sub>Brazo</sub> mujeres

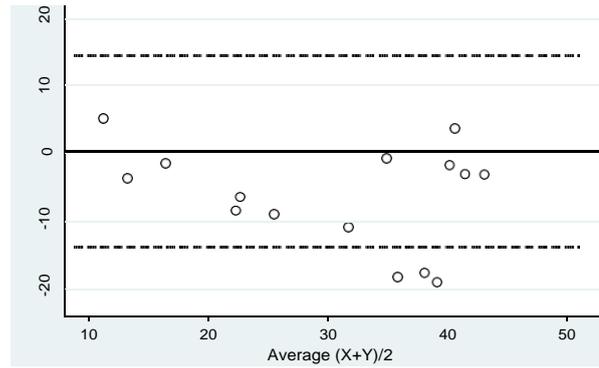


Gráfico 5.3.3. Bland-Altman %GC<sub>Siri</sub> - %GC<sub>Brazo</sub> hombres

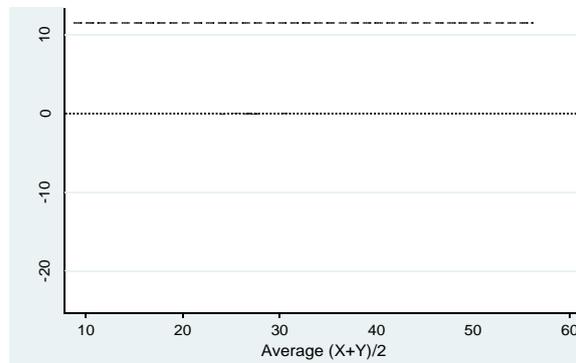


Gráfico 5.3.4. Bland-Altman %GC<sub>Brozec</sub> - %GC<sub>Brazo</sub> global

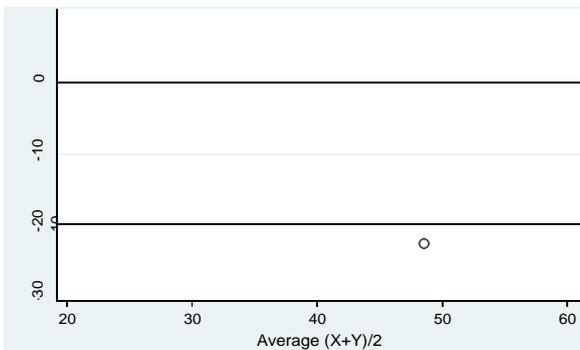


Gráfico 5.3.5. Bland-Altman %GC<sub>Brozec</sub> - %GC<sub>Brazo</sub>

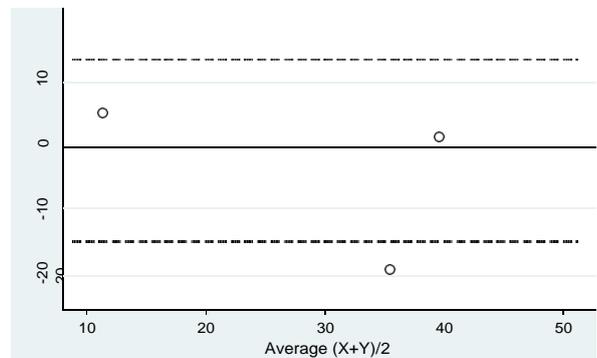


Gráfico 5.3.6. Bland-Altman %GC<sub>Brozec</sub> - %GC<sub>Brazo</sub> hombres

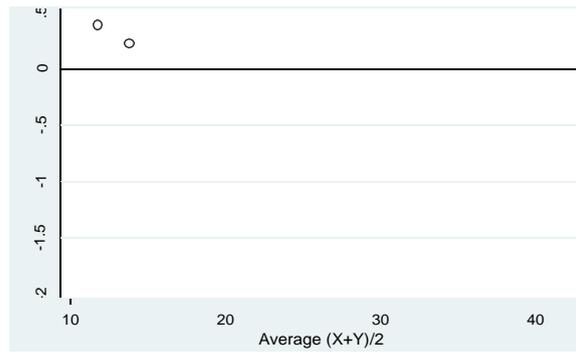


Gráfico 5.3.7. Bland-Altman %GC<sub>Brozec</sub> - %GC<sub>Siri</sub> global

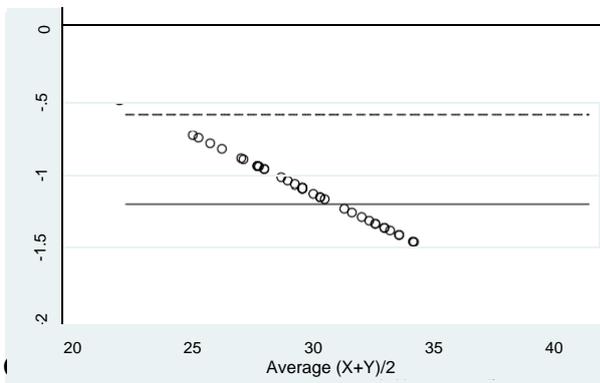


Gráfico 5.3.8. Bland-Altman %GC<sub>Brozec</sub> - %GC<sub>Siri</sub> mujeres

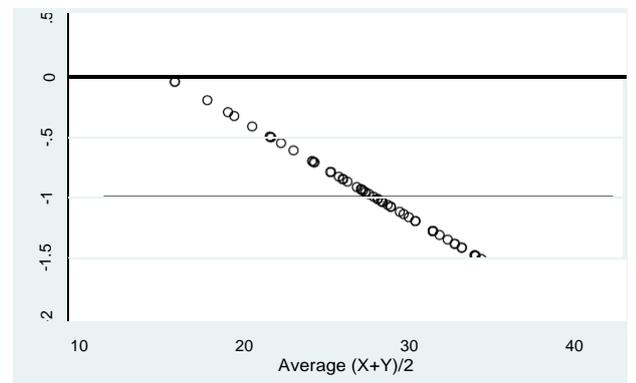


Gráfico 5.3.9. Bland-Altman %GC<sub>Brozec</sub> - %GC<sub>Siri</sub> hombres

#### 5.4. HÁBITOS DE EXPOSICIÓN SOLAR

Para valorar los hábitos de exposición solar en los meses de verano, que pudieran influir en los niveles de vitamina D, se llevó a cabo una encuesta. Los resultados se muestran a continuación, diferenciando la población de origen de las muestras:

	Burgos n (%)	Valencia n (%)
¿Cuánto tiempo pasa al aire libre entre las 10AM y las 4PM?		
30 minutos o menos	7 (7,22)	11 (10,48)
30 minutos – 1 hora	16 (16,49)	15 (14,29)
1 – 2 horas	24 (24,74)	32 (30,48)
2 – 3 horas	27 (27,84)	22 (20,95)
3 – 4 horas	10 (10,31)	8 (7,62)
4 – 5 horas	9 (9,28)	6 (5,71)
Más de 5 horas	4 (4,12)	11 (10,48)
¿Con que frecuencia sale al exterior?		
Menos de 1 vez por semana	2 (2,06)	0 (0,00)
De 1 a 2 veces por semana	6 (6,19)	1 (0,95)
Más de 2 veces por semana	8 (8,25)	3 (2,86)
Todos los días	81 (83,51)	101 (96,19)
Estando fuera de casa, ¿se expone al sol?		
Intento evitarlo	15 (15,46)	56 (53,33)
A veces	68 (70,10)	31 (29,52)
Me gusta hacerlo para ponerme moreno/a	14 (14,43)	18 (17,14)
¿Qué tipo de ropa viste con mayor frecuencia?		
Manga larga y pantalón/falda largo	1 (1,03)	4 (3,81)
Manga corta y pantalón/falda largo	17 (17,53)	10 (9,52)
Manga corta y pantalón/falda corta	65 (67,01)	86 (81,90)
Traje de baño o ropa ligera veraniega	14 (14,43)	5 (4,76)
¿Qué grado de fotoprotector usa con mayor frecuencia?		
Factor ≤ 20	15 (15,96)	6 (5,71)
Factor 21 – 40	32 (34,04)	23 (21,90)
Factor > 40	40 (42,55)	53 (50,48)
No utilizo	7 (7,45)	23 (21,90)

Tabla 5.4.1. Hábitos de exposición solar en los meses de verano

## 5.5. INGESTA DE VITAMINA D

A partir del CFCA y la base de datos BEDCA se pudo estimar la ingesta de vitamina D de los participantes del estudio. Además de los resultados del total de la muestra, estos también se muestran separados por periodo del estudio (verano e invierno), y por procedencia de la muestra (Burgos y Valencia):

Vitamina D ( $\mu\text{g}/\text{día}$ )	Total
media $\pm$ DS	6,45 $\pm$ 3,90
mínimo; máximo	0,23; 25,61

Tabla 5.5.1. Ingesta de vitamina D del total de la muestra

BURGOS	Verano	Invierno	Total
Vitamina D ( $\mu\text{g}/\text{día}$ )			
media $\pm$ DS	5,90 $\pm$ 3,70	6,21 $\pm$ 3,94	6,09 $\pm$ 3,83
mínimo; máximo	2,16; 19,26	0,23; 25,61	0,23; 25,61

Tabla 5.5.2. Ingesta de vitamina D de la muestra procedente de Burgos

VALENCIA	Verano	Invierno	Total
Vitamina D ( $\mu\text{g}/\text{día}$ )			
media $\pm$ DS	7,27 $\pm$ 3,78	6,27 $\pm$ 4,08	6,77 $\pm$ 3,95
mínimo; máximo	0,76; 18,13	1,46; 19,66	0,76; 19,66

Tabla 5.5.3. Ingesta de vitamina D de la muestra procedente de Valencia

Para valorar si la cantidad diaria de colecalciferol es adecuada, consideramos la publicación más reciente del IOM sobre la ingesta diaria recomendada de vitamina D en adultos sanos dicta <sup>(17)</sup>:

- En adultos de 18 – 50 años: 5 µg/día.
- En adultos de 50 – 70 años: 10 µg/día.

A continuación, se muestran los resultados de las tablas 5.5.1., 5.5.2 y 5.5.3. desglosados por dichos grupos de edad:

TOTAL Vitamina D (µg/día)	Edad ≤ 50 años	Edad > 50 años
media ± DS	6,62 ± 4,00	5,92 ± 3,57
mínimo; máximo	0,76; 25,61	0,23; 19,26

Tabla 5.5.4. Ingesta de vitamina D de la muestra total estudiada diferenciado dos grupos de edad

BURGOS Vitamina D (µg/día)	Verano		Invierno		Total	
	Edad ≤ 50 años	Edad > 50 años	Edad ≤ 50 años	Edad > 50 años	Edad ≤ 50 años	Edad > 50 años
media ± DS	5,81 ± 3,09	6,43 ± 6,41	6,58 ± 4,02	4,87 ± 3,44	6,27 ± 3,68	5,36 ± 4,46
mínimo; máximo	2,16; 12,64	2,19; 19,26	1,41; 25,61	0,23; 13,45	1,41; 25,61	0,23; 19,26

Tabla 5.5.5. Ingesta de vitamina D de Burgos diferenciando dos grupos de edad

VALENCIA Vitamina D (µg/día)	Verano		Invierno		Total	
	Edad ≤ 50 años	Edad > 50 años	Edad ≤ 50 años	Edad > 50 años	Edad ≤ 50 años	Edad > 50 años
media ± DS	7,25 ± 4,13	7,31 ± 3,02	6,76 ± 4,52	5,06 ± 2,43	7,00 ± 4,31	6,26 ± 2,95
mínimo; máximo	0,76; 18,13	1,67; 13,47	1,69; 19,66	1,46; 10,14	0,76; 19,66	1,46; 13,47

Tabla 5.5.6. Ingesta de vitamina D de Valencia diferenciando dos grupos de edad

Considerando las pautas en cuanto a la ingesta de colecalciferol marcadas por el IOM, se muestra a continuación los porcentajes de sujetos con ingestas suficientes o no de esta vitamina:

TOTAL	Ingesta de vitamina D suficiente n (%)	Ingesta de vitamina D insuficiente n (%)
Edad ≤ 50 años	90 (59,60)	61 (40,40)
Edad > 50 años	7 (13,73)	44 (86,27)

Tabla 5.5.7. Ingesta suficiente vs insuficiente en función del rango de edad y la estación del año a estudio en Valencia

BURGOS	Ingesta de vitamina D suficiente n (%)			Ingesta de vitamina D insuficiente n (%)		
	Verano	Invierno	Total	Verano	Invierno	Total
Edad ≤ 50 años	16 (51,61)	30 (63,83)	46 (58,97)	15 (48,39)	17 (36,17)	32 (41,03)
Edad > 50 años	1 (16,67)	1 (7,69)	2 (10,53)	5 (83,33)	13 (92,31)	17 (89,47)

Tabla 5.5.8. Ingesta suficiente vs insuficiente en función del rango de edad y la estación del año a estudio en Burgos

VALENCIA	Ingesta de vitamina D suficiente n (%)			Ingesta de vitamina D insuficiente n (%)		
	Verano	Invierno	Total	Verano	Invierno	Total
Edad ≤ 50 años	22 (61,11)	22 (59,46)	44 (60,27)	14 (38,89)	15 (40,54)	29 (39,73)
Edad > 50 años	4 (23,53)	1 (6,67)	5 (15,63)	13 (76,47)	14 (93,33)	27 (84,38)

Tabla 5.5.9. Ingesta suficiente vs insuficiente en función del rango de edad y la estación del año a estudio en Valencia

Al estudiar las diferencias en las ingestas de vitamina D entre ambos grupos de edad, considerando el total de la muestra, encontramos:

	Edad ≤ 50 años (media)	Edad > 50 años (media)	Δ Media	p
Vitamina D (μg/día)	6,62	5,92	0,70	0,14

Test "t" de Student para dos muestras

Tabla 5.5.10. Comparación de la ingesta de vitamina D por grupos de edad

Al estudiar las diferencias en las ingestas de vitamina D entre ambas poblaciones encontramos:

	Burgos (media)	Valencia (media)	Δ Media	p
Vitamina D (μg/día)	6,09	6,77	0,68	0,11

Test "t" de Student para dos muestras

Tabla 5.5.11. Comparación de la ingesta de vitamina D según la población

Para finalizar el estudio de la ingesta de colecalciferol en ambas poblaciones y periodos, mostramos a continuación su distribución por percentiles:

Percentil	INGESTA DE VITAMINA D ( $\mu\text{g}/\text{día}$ )			
	Burgos		Valencia	
	Invierno	Verano	Invierno	Verano
P5	1,92	2,19	1,72	1,67
P10	2,74	2,29	2,08	3,78
P25	3,63	3,11	3,34	4,74
P50	5,34	5,05	5,18	6,22
P75	7,68	8,03	8,63	9,32
P90	10,50	10,71	11,82	12,88
P95	13,11	12,64	14,44	14,03

Tabla 5.5.11. Distribución por percentiles de la ingesta de vitamina D ( $\mu\text{g}/\text{día}$ )

A partir de los datos recogidos con el CFCA hemos podido establecer las principales fuentes dietéticas de vitamina D, así como la frecuencia del consumo de dichas fuentes. Se muestran los resultados del total de la muestra estudiada, indicativo de la población sana española.

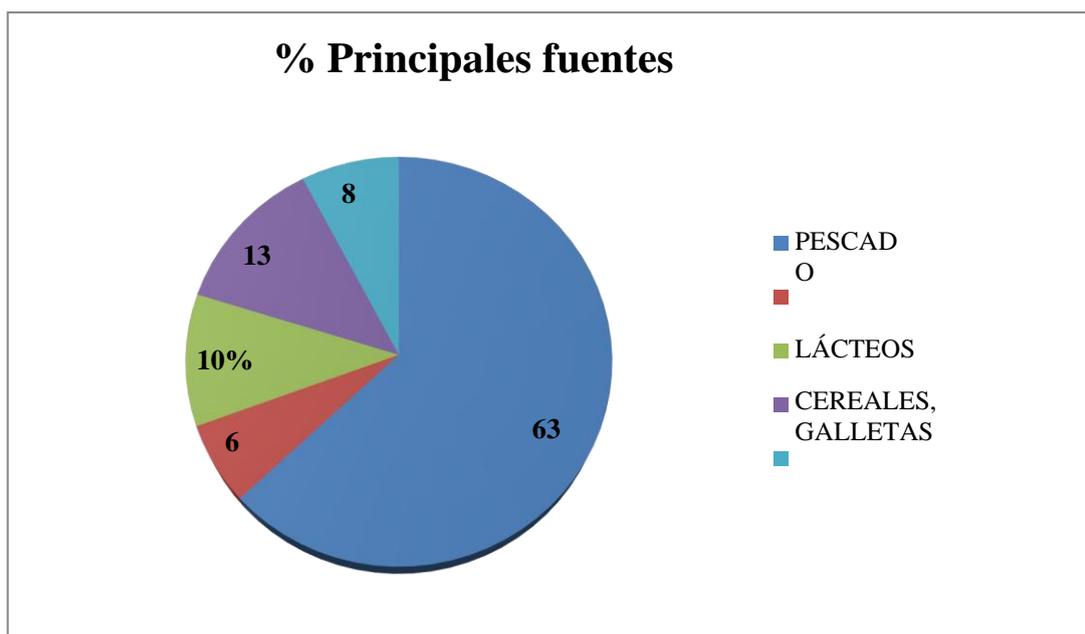


Gráfico 5.5.1. Principales fuentes dietéticas de vitamina D (%)

### % Principales fuentes dietéticas, según población y periodo a estudio

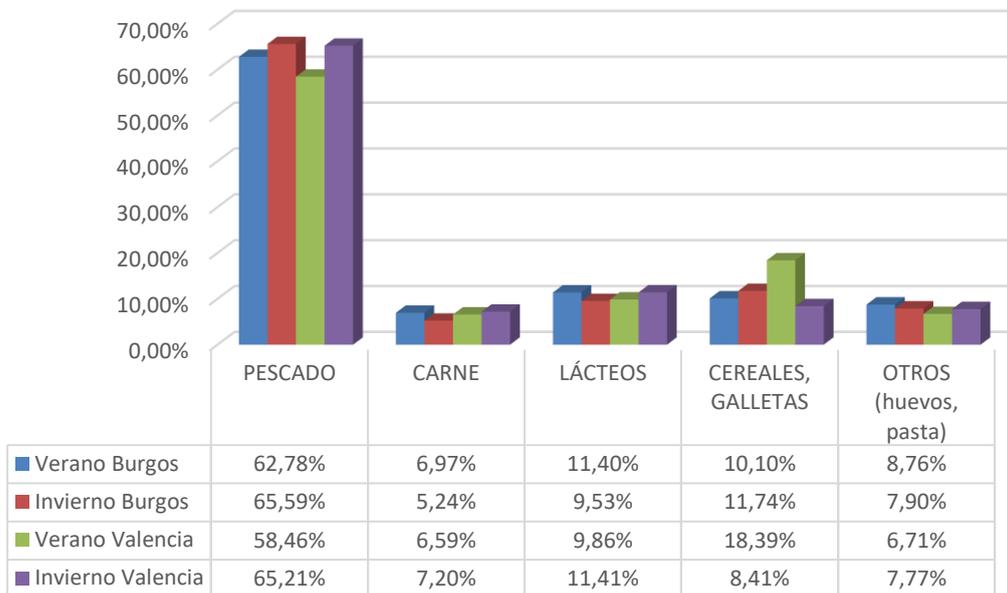


Gráfico 5.5.2. Principales fuentes dietética de Vitamina D (%) por población y periodo a estudio

### Frecuencia de consumo de las principales fuentes de vitamina D (%)

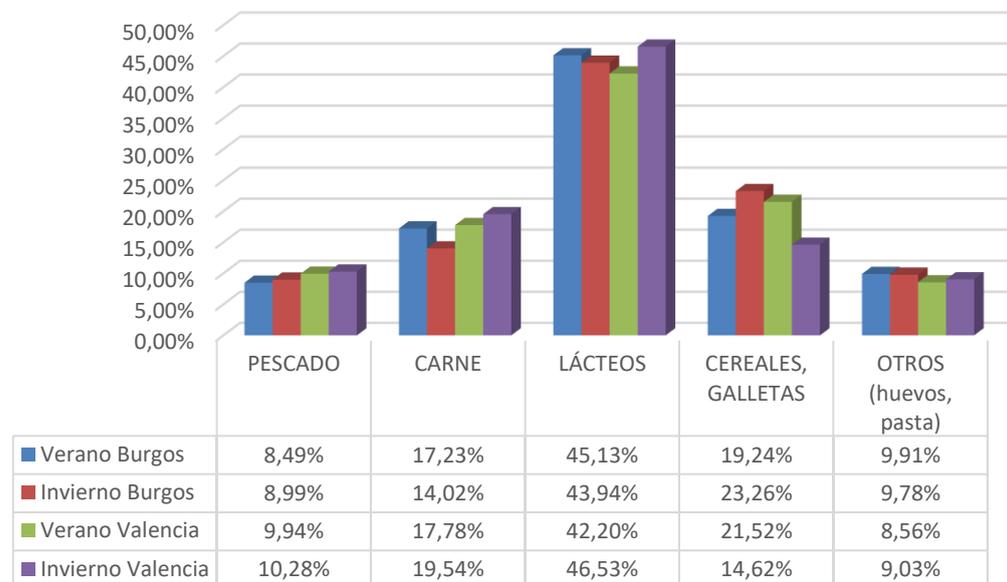


Gráfico 5.5.3. Frecuencia de consumo de grupos de alimentos ricos en vitamina D

## 5.6. ANÁLISIS BIOQUÍMICO

A continuación, se muestran los resultados del análisis paramétrico llevado a cabo con los valores de las concentraciones séricas de 25(OH)D total y libre. Para poder realizarlo de forma adecuada, previamente llevamos a cabo un análisis de los valores atípicos.

Al analizar los valores atípicos del total de la muestra, es decir, de la población procedente de Burgos y Valencia en conjunto, encontramos, para la 25(OH)D total dos valores atípicos, excesivamente altos, únicamente tras el verano. En cuanto a la 25(OH)D libre, hallamos dos valores atípicos, también demasiado elevados y tras el verano.

En Burgos, al realizar dicho análisis con los datos obtenidos de la 25(OH)D total, se han encontrado dos valores atípicos en las muestras recogidas en verano, uno demasiado elevado, y el otro demasiado reducido. En cuanto a los resultados de los niveles séricos de 25(OH)D libre, se han omitido cinco, cuatro de ellos obtenidos en invierno (dos eran demasiado elevados, y los otros dos demasiado bajos), y el último obtenido en verano, por resultar muy elevado.

En Valencia, se han encontrado tres valores atípicos, excesivamente elevados, en los resultados de 25(OH)D total. Perteneían a los registros recogidos en invierno.

La técnica analítica llevada a cabo para la determinación de la vitamina D total fue un inmunoensayo automatizado: el test Elecsys. Los resultados obtenidos se muestran en las siguientes tablas.

Los resultados del análisis de la 25(OH)D total fueron:

MUESTRA TOTAL (Burgos y Valencia)	Total	Verano	Invierno
25(OH)D TOTAL (ng/mL)			
media $\pm$ DS	22,05 $\pm$ 6,31	24,91 $\pm$ 6,26	19,64 $\pm$ 5,28
mínimo; máximo	7,92; 40,95	7,95; 40,95	7,92; 32,89

Tabla 5.6.1. Niveles de 25(OH)D total

BURGOS	Total	Verano	Invierno
25(OH)D TOTAL (ng/mL)			
media $\pm$ DS	20,28 $\pm$ 6,05	24,31 $\pm$ 5,25	17,66 $\pm$ 5,04
mínimo; máximo	7,92; 33,42	15,14; 33,42	7,92; 28,77

Tabla 5.6.2. Niveles de 25(OH)D total en Burgos

VALENCIA	Total	Verano	Invierno
25(OH)D TOTAL (ng/mL)			
media $\pm$ DS	23,85 $\pm$ 6,08	25,99 $\pm$ 6,87	21,38 $\pm$ 3,77
mínimo; máximo	10,84; 42,15	16,18; 42,15	10,84; 26,82

Tabla 5.6.3. Niveles de 25(OH)D total en Valencia

Los resultados del análisis de la 25(OH)D libre fueron:

MUESTRA TOTAL (Burgos y Valencia)	Total	Verano	Invierno
25(OH)D LIBRE (pg/mL)			
media ± DS	6,27 ± 2,69	7,13 ± 2,80	5,56 ± 2,38
mínimo; máximo	1,59; 13,96	2,41; 13,96	1,59; 11,84

Tabla 5.6.4. Niveles de 25(OH)D libre

BURGOS	Total	Verano	Invierno
25(OH)D LIBRE (pg/mL)			
media ± DS	4,47 ± 1,05	5,01 ± 1,25	4,08 ± 0,66
mínimo; máximo	2,41; 7,71	2,41; 7,71	2,63; 5,61

Tabla 5.6.5. Niveles de 25(OH)D libre en Burgos

VALENCIA	Total	Verano	Invierno
25(OH)D LIBRE (pg/mL)			
media ± DS	8,11 ± 2,77	8,97 ± 2,82	7,23 ± 2,44
mínimo; máximo	2,78; 15,68	4,68; 15,68	2,78; 11,84

Tabla 5.6.6. Niveles de 25(OH)D libre en Valencia

En cuanto a los niveles óptimos de 25(OH)D libre no hay información debido a la falta de estudios que lo determinen. Tampoco se dispone de un estándar de niveles óptimos de 25(OH)D total, pero sí existen múltiples publicaciones que aceptan las siguientes cifras límite para poder clasificar el estado de suficiencia ( $\geq 30$  ng/mL), insuficiencia (20 – 30 ng/mL) y deficiencia ( $\leq 20$  ng/ml).

La siguiente tabla muestra como encajan nuestros resultados de 25(OH)D total en dicha clasificación

VERANO	BURGOS	VALENCIA
<i>Concentraciones séricas de vitamina D</i>	<i>Sujetos, n (%)</i>	
Suficiente ( $\geq 30$ ng/mL)	9 (21,95)	13 (24,53)
Insuficiente (20 - 30 ng/mL)	21 (51,22)	26 (49,06)
Deficiente ( $< 20$ ng/mL)	11 (26,83)	14 (26,42)

Tabla 5.6.7. Clasificación de las concentraciones séricas de 25(OH)D Total tras el verano

INVIERNO	BURGOS	VALENCIA
<i>Concentraciones séricas de vitamina D</i>	<i>Sujetos, n (%)</i>	
Suficiente ( $\geq 30$ ng/mL)	0 (0,00)	3 (6,12)
Insuficiente (20 - 30 ng/mL)	21 (35,00)	31 (63,27)
Deficiente ( $< 20$ ng/mL)	39 (65,00)	15 (30,61)

Tabla 5.6.8. Clasificación de las concentraciones séricas de 25(OH)D Total tras el invierno

A continuación, se muestra el análisis con los cambios de las concentraciones séricas de 25(OH)D total, según la clasificación ya mostrada de número de sujetos con niveles suficientes, insuficientes y deficientes.

<b>BURGOS</b> n (%)	<i>Invierno</i>				p <sup>1</sup>
	<i>Verano</i>	≥ 30 ng/mL	20 - 30 ng/mL	< 20 ng/mL	
≥ 30 ng/ml	0 (0,00)	4 (9,75)	5 (12,19)	9 (21,95)	< 0.001
20 - 30 ng/mL	0 (0,00)	6 (14,64)	15 (36,58)	21 (51,22)	
< 20 ng/mL	0 (0,00)	4 (9,75)	7 (17,07)	11 (26,83)	
Total	0 (0,00)	14 (34,15)	27 (65,85)	41 (100,00)	

<sup>1</sup>Test de McNemar-Bowker

Tabla 5.6.9. Cambio en las concentraciones de 25(OH)D total según la clasificación de sus niveles en Burgos

<b>VALENCIA</b> n (%)	<i>Invierno</i>				p <sup>1</sup>
	<i>Verano</i>	≥ 30 ng/mL	20 - 30 ng/mL	< 20 ng/mL	
≥ 30 ng/mL	1 (2,04)	8 (16,33)	3 (6,12)	12 (24,49)	0.076
20 - 30 ng/mL	2 (4,08)	14 (28,57)	7 (14,29)	23 (46,94)	
< 20 ng/mL	0 (0,00)	9 (18,37)	5 (10,20)	14 (28,57)	
Total	3 (6,12)	31 (63,27)	15 (30,61)	49 (100,00)	

<sup>1</sup>Test de McNemar-Bowker

Tabla 5.6.10. Cambio en las concentraciones séricas de 25(OH)D total según la clasificación de sus niveles en Valencia

## CORRELACIÓN ENTRE LAS TÉCNICAS ANALÍTICAS DESARROLLADAS

Ya se han mostrado diversos análisis con los resultados de los niveles séricos de vitamina D libre y total. En las siguientes tablas se muestran los resultados del estudio de correlación entre ambas técnicas analíticas:

TOTAL		
Total	25(OH)D total (ng/mL)	
	Coefficiente correlación Pearson	p <sup>1</sup>
25(OH)D libre (pg/mL)	0,474 (IC 95%: 0,360 a 0,574)	< 0,001
Invierno	25(OH)D total (ng/mL)	
	Coefficiente correlación Pearson	p <sup>1</sup>
25(OH)D libre (pg/mL)	0,461 (IC 95%: 0,298 a 0,600)	< 0,001
Verano	25(OH)D total (ng/mL)	
	Coefficiente correlación Pearson	p <sup>1</sup>
25(OH)D libre (pg/mL)	0,358 (IC 95%: 0,167 a 0,522)	< 0,001

<sup>1</sup> Coeficiente de correlación de Pearson

Tabla 5.6.11. Correlación entre los niveles séricos de 25(OH)total y libre para el total de la muestra

BURGOS		
Total	25(OH)D total (ng/mL)	
	Coefficiente correlación Pearson	p <sup>1</sup>
25(OH)D libre (pg/mL)	0,494 (IC 95%: 0,329 a 0,629)	< 0,001
Invierno	25(OH)D total (ng/mL)	
	Coefficiente correlación Pearson	p <sup>1</sup>
25(OH)D libre (pg/mL)	0,258 (IC 95%: 0,002 a 0,482)	0,049
Verano	25(OH)D total (ng/mL)	
	Coefficiente correlación Pearson	p <sup>1</sup>
25(OH)D libre (pg/mL)	0,443 (IC 95%: 0,157 a 0,661)	0,004

<sup>1</sup> Coeficiente de correlación de Pearson

Tabla 5.6.12. Correlación entre los niveles séricos de 25(OH)total y libre para la población de Burgos

VALENCIA		
Total	25(OH)D total (ng/mL)	
	Coefficiente correlación Pearson	p <sup>1</sup>
25(OH)D libre (pg/mL)	0,403 (IC 95%: 0,227 a 0,554)	< 0,001
Invierno	25(OH)D total (ng/mL)	
	Coefficiente correlación Pearson	p <sup>1</sup>
25(OH)D libre (pg/mL)	0,327 (IC 95%: 0,051 a 0,557)	0,022
Verano	25(OH)D total (ng/mL)	
	Coefficiente correlación Pearson	p <sup>1</sup>
25(OH)D libre (pg/mL)	0,355 (IC 95%: 0,093 a 0,570)	0,009

<sup>1</sup> Coeficiente de correlación de Pearson

Tabla 5.6.13. Correlación entre los niveles séricos de 25(OH)total y libre para la población de Valencia

## 5.7. INFLUENCIA DE LAS DISTINTAS VARIABLES EN LOS NIVELES SÉRICOS DE VITAMINA D

A partir de los resultados expuestos hasta ahora, queremos analizar las posibles relaciones existentes entre los niveles de 25(OH)D (libre y/o total), y los distintos factores que pueden influir en los mismos.

### 5.7.1. INFLUENCIA DE LA ESTACIONALIDAD

En la siguiente tabla se muestran los cambios en los niveles séricos de 25(OH)D total y libre entre el verano y el invierno, diferenciando los lugares de procedencia.

TOTAL				
	Verano/ Media	Invierno/ Media	$\Delta$ Media	p
25(OH)D total (ng/mL)	24,91	19,64	5,27	< 0,001 <sup>1</sup>
25(OH)D libre (pg/mL)	7,13	5,56	1,57	< 0,001 <sup>1</sup>
BURGOS				
	Verano/ Media	Invierno/ Media	$\Delta$ Media	p
25(OH)D total (ng/mL)	24,31	17,66	6,65	< 0,001 <sup>1</sup>
25(OH)D libre (pg/mL)	5,01	4,08	0,93	< 0,001 <sup>2</sup>
VALENCIA				
	Verano/ Media	Invierno/ Media	$\Delta$ Media	p
25(OH)D total (ng/mL)	25,99	21,38	4,62	< 0,001 <sup>2</sup>
25(OH)D libre (pg/mL)	8,97	7,23	1,74	< 0,001 <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Test "t" de Student para dos muestras

<sup>2</sup> Test "t" de Student para dos muestras corregido para varianzas diferentes

Tabla 5.7.1.1. Análisis de los cambios estacionales en las concentraciones de 25(OH)D total y libre

### 5.7.2. INFLUENCIA DEL CLIMA

Para estudiar la implicación de la diferente climatología entre las dos poblaciones analizadas en nuestro trabajo, realizamos la comparación entre las muestras obtenidas en Burgos y Valencia, en ambas estaciones del año.

En el análisis de los valores atípicos en los resultados de la 25(OH)D total en Burgos, sin diferenciar estaciones, encontramos un valor extremadamente alto, que eliminamos del estudio, puesto que llevamos a cabo una prueba paramétrica, t de Student. Este mismo análisis en los resultados de la 25(OH)D total en Valencia llevó a prescindir de cinco sujetos, por presentar valores excesivamente elevados.

En el análisis de los valores atípicos en los resultados de la 25(OH)D libre en Burgos, encontramos tres, dos demasiado altos y uno demasiado bajo, que fueron excluidos. De las muestras procedentes de Valencia no fue necesario excluir ningún resultado.

TOTAL				
	Valencia/ Media	Burgos/ Media	$\Delta$ Media	p
25(OH)D total (ng/mL)	23,26	20,16	3,11	< 0,001 <sup>1</sup>
25(OH)D libre (pg/mL)	8,11	4,46	3,65	< 0,001 <sup>2</sup>
VERANO				
	Valencia/ Media	Burgos/ Media	$\Delta$ Media	p
25(OH)D total (ng/mL)	25,99	24,31	1,68	0,102 <sup>1</sup>
25(OH)D libre (pg/mL)	8,97	5,01	3,96	< 0,001 <sup>2</sup>
INVIERNO				
	Valencia/ Media	Burgos/ Media	$\Delta$ Media	p
25(OH)D total (ng/mL)	21,38	17,66	3,72	< 0,001 <sup>2</sup>
25(OH)D libre (pg/mL)	7,23	4,08	3,15	< 0,001 <sup>2</sup>

<sup>1</sup> Test "t" de Student para dos muestras

<sup>2</sup> Test "t" de Student para dos muestras corregido para varianzas diferentes

Tabla 5.7.2.1. Análisis de los cambios estacionales en las concentraciones de 25(OH)D total y libre

### 5.7.3. INFLUENCIA DE LA LATITUD

Las siguientes tablas muestran la influencia de la latitud (Valencia y Burgos) en las concentraciones séricas de 25(OH)D total y libre:

25(OH)D total (ng/mL)		
VERANO	Burgos	Valencia
Latitud norte	42º 20' 27.1''	39º 28' 00''
Media (DS)	24,31 (5,25)	25,99 (6,87)
Mínimo; máximo	15,14; 33,42	16,18; 42,15
INVIERNO		
VERANO	Burgos	Valencia
Latitud norte	42º 20' 27.1''	39º 28' 00''
Media (DS)	17,66 (5,04)	21,38 (3,77)
Mínimo; máximo	7,92; 28,77	10,84; 26,82
25(OH)D libre (pg/mL)		
VERANO	Burgos	Valencia
Latitud norte	42º 20' 27.1''	39º 28' 00''
Media (DS)	5,01 (1,25)	8,97 (2,82)
Mínimo; máximo	2,41; 7,71	4,68; 15,68
INVIERNO		
VERANO	Burgos	Valencia
Latitud norte	42º 20' 27.1''	39º 28' 00''
Media (DS)	4,08 (0,66)	7,23 (2,44)
Mínimo; máximo	2,63; 5,61	2,78; 11,84

Tabla 5.7.3.1. Concentraciones séricas de 25(OH)D total y libre en función de la latitud y estación del año

A continuación, se muestra la relación entre las concentraciones plasmáticas de 25(OH)D total y libre, y la latitud de cada lugar de origen de las muestras.

25(OH)D total (ng/mL)			
	Pendiente	R <sup>2</sup>	p <sup>1</sup>
VERANO	1,614	0,014	0,025
INVIERNO	4,399	0,174	< 0,001
25(OH)D libre (pg/mL)			
	Pendiente	R <sup>2</sup>	p <sup>1</sup>
VERANO	3,830	0,396	< 0,001
INVIERNO	3,144	0,438	< 0,001

<sup>1</sup> Test de regresión lineal

Tabla 5.7.3.2. Influencia de la latitud en los niveles séricos de 25(OH)D total y libre.

#### 5.7.4. RELACIÓN ENTRE EL IMC Y LOS %GC, Y LOS NIVELES SÉRICOS DE VITAMINA D

Dada la relación ampliamente estudiada entre vitamina D y obesidad, hemos querido analizar la asociación de los niveles séricos de 25(OH)D con el IMC y el %GC de nuestros sujetos.

La siguiente tabla muestra los resultados de IMC y %GC, según la clasificación de los niveles séricos de vitamina D, en cuanto a suficiencia, insuficiencia y deficiencia, en el total de la muestra y diferenciando también los dos periodos del estudio:

<b>TOTAL</b>		
<b>VERANO E INVIERNO</b>		
<i>Concentraciones séricas vitamina D</i>	<i>Sujetos, n (%)</i>	<i>IMC (media, DS)</i>
Suficiente $\geq$ 30 ng/mL	25 (12,32)	24,71 (3,44)
Insuficiente (20 - 30 ng/mL)	98 (48,28)	25,99 (4,14)
Deficiente (< 20 ng/mL)	80 (39,41)	26,61 (4,27)
<b>VERANO</b>		
<i>Concentraciones séricas vitamina D</i>	<i>Sujetos, n (%)</i>	<i>IMC (media, DS)</i>
Suficiente $\geq$ 30 ng/mL	22 (23,40)	24,69 (3,70)
Insuficiente (20 - 30 ng/mL)	47 (50,00)	26,40 (4,25)
Deficiente (< 20 ng/mL)	25 (26,60)	28,18 (4,71)
<b>INVIERNO</b>		
<i>Concentraciones séricas vitamina D</i>	<i>Sujetos, n (%)</i>	<i>IMC (media, DS)</i>
Suficiente $\geq$ 30 ng/ml	3 (2,75)	24,87 (0,33)
Insuficiente (20 - 30 ng/mL)	51 (46,79)	25,63 (4,04)
Deficiente (< 20 ng/mL)	55 (50,46)	25,94 (3,92)

Tabla 5.7.4.1. IMC según clasificación de concentraciones séricas de vitamina D en el total de la muestra estudiada

A continuación, se muestran los mismos resultados que en la tabla anterior, 5.7.4.1., pero exclusivamente con los datos provenientes de Burgos. Se diferencian también los resultados de las dos estaciones estudiadas:

<b>BURGOS</b>			
<b>VERANO E INVIERNO</b>			
<i>Concentraciones séricas vitamina D</i>	<i>Sujetos, n (%)</i>	<i>IMC (media, DS)</i>	<i>%GC<sub>BIA</sub> (media, DS)</i>
Suficiente $\geq 30$ ng/mL	9 (8,91)	23,86 (3,16)	19,86 (2,86)
Insuficiente (20 - 30 ng/mL)	42 (41,58)	25,78 (4,29)	19,64 (8,01)
Deficiente ( $< 20$ ng/mL)	50 (49,50)	25,62 (3,70)	20,46 (6,58)
<b>VERANO</b>			
<i>Concentraciones séricas vitamina D</i>	<i>Sujetos, n (%)</i>	<i>IMC (media, DS)</i>	<i>%GC<sub>BIA</sub> (media, DS)</i>
Suficiente $\geq 30$ ng/mL	9 (21,95)	23,86 (3,16)	19,86 (2,86)
Insuficiente (20 - 30 ng/mL)	21 (51,22)	25,96 (4,05)	19,96 (6,34)
Deficiente ( $< 20$ ng/mL)	11 (26,83)	27,09 (4,36)	22,24 (6,25)
<b>INVIERNO</b>			
<i>Concentraciones séricas vitamina D</i>	<i>Sujetos, n (%)</i>	<i>IMC (media, DS)</i>	<i>%GC<sub>BIA</sub> (media, DS)</i>
Suficiente $\geq 30$ ng/mL	0 (0,00)	X	X
Insuficiente (20 - 30 ng/mL)	21 (35,00)	25,61 (4,60)	19,41 (9,22)
Deficiente ( $< 20$ ng/mL)	39 (65,00)	25,28 (3,51)	20,05 (6,67)

Tabla 5.7.4.2. IMC y %GC según clasificación de concentraciones séricas de vitamina D, diferenciando por estación, en la población de Burgos

La siguiente tabla muestra los mismos resultados que las dos anteriores, 5.7.4.1. y 5.7.4.2., pero referentes a la población de Valencia:

<b>VALENCIA</b>					
<b>VERANO E INVIERNO</b>					
<i>Concentraciones séricas vitamina D</i>	<i>Sujetos, n (%)</i>	<i>IMC (media, DS)</i>	<i>%GC<sub>Siri</sub> (media, DS)</i>	<i>%GC<sub>Brozec</sub> (media, DS)</i>	<i>%GG<sub>Brazo</sub> (media, DS)</i>
Suficiente ( $\geq 30$ ng/mL)	16 (15,69)	25,08 (3,59)	27,75 (5,90)	26,88 (5,45)	31,97 (10,91)
Insuficiente (20 - 30 ng/mL)	57 (55,88)	26,10 (4,09)	29,87 (6,06)	28,83 (5,59)	31,99 (10,53)
Deficiente ( $< 20$ ng/mL)	29 (28,43)	28,24 (4,60)	30,19 (4,55)	29,13 (4,20)	32,22 (9,23)
<b>VERANO</b>					
<i>Concentraciones séricas vitamina D</i>	<i>Sujetos, n (%)</i>	<i>IMC (media, DS)</i>	<i>%GC<sub>Siri</sub> (media, DS)</i>	<i>%GC<sub>Brozec</sub> (media, DS)</i>	<i>%GG<sub>Brazo</sub> (media, DS)</i>
Suficiente ( $\geq 30$ ng/mL)	13 (24,53)	25,13 (4,01)	28,26 (6,45)	27,34 (5,95)	34,04 (10,93)
Insuficiente (20 - 30 ng/mL)	26 (49,06)	26,74 (4,45)	31,86 (6,31)	30,67 (5,82)	34,18 (11,83)
Deficiente ( $< 20$ ng/mL)	14 (26,42)	28,89 (4,94)	30,21 (4,84)	29,15 (4,46)	32,41 (10,60)
<b>INVIERNO</b>					
<i>Concentraciones séricas vitamina D</i>	<i>Sujetos, n (%)</i>	<i>IMC (media, DS)</i>	<i>%GC<sub>Siri</sub> (media, DS)</i>	<i>%GC<sub>Brozec</sub> (media, DS)</i>	<i>%GC<sub>Brazo</sub> (media, DS)</i>
Suficiente ( $\geq 30$ ng/mL)	3 (6,12)	24,87 (0,33)	25,55 (1,69)	24,84 (1,56)	23,00 (5,24)
Insuficiente (20 - 30 ng/mL)	31 (63,27)	25,64 (3,70)	28,51 (5,66)	27,58 (5,23)	30,50 (9,16)
Deficiente ( $< 20$ ng/mL)	15 (30,61)	27,65 (4,52)	29,54 (3,79)	28,52 (3,50)	31,36 (7,98)

Tabla 5.7.4.3. IMC y %GC según clasificación de concentraciones séricas de vitamina D, diferenciando por estación, en la población de Valencia

En la siguiente tabla se muestra la relación entre el IMC y las concentraciones séricas de 25(OH)D total y libre en la población total del estudio:

TOTAL						
TOTAL	25(OH)D total (ng/mL)			25(OH)D libre (pg/mL)		
	pendiente	R <sup>2</sup>	p <sup>1</sup>	pendiente	R <sup>2</sup>	p <sup>1</sup>
IMC (Kg/m <sup>2</sup> )	-0,136	0,011	0,156	0,039	0,004	0,416
VERANO	25(OH)D total (ng/mL)			25(OH)D libre (pg/mL)		
	pendiente	R <sup>2</sup>	p <sup>1</sup>	pendiente	R <sup>2</sup>	p <sup>1</sup>
IMC (Kg/m <sup>2</sup> )	-0,318	0,079	0,011	-0,013	0,000	0,858
INVIERNO	25(OH)D total (ng/mL)			25(OH)D libre (pg/mL)		
	pendiente	R <sup>2</sup>	p <sup>1</sup>	pendiente	R <sup>2</sup>	p <sup>1</sup>
IMC (Kg/m <sup>2</sup> )	-0,060	0,002	0,632	0,051	0,007	0,383

<sup>1</sup> Regresión lineal

Tabla 5.7.4.4. Influencia del IMC en los niveles séricos de 25(OH)D total y libre en el total de la muestra del estudio, y diferenciando por estación

En las siguientes tablas se muestra la relación entre las concentraciones séricas de 25(OH)D total y libre, y el IMC y %GC:

BURGOS						
TOTAL	25(OH)D total (ng/mL)			25(OH)D libre (pg/mL)		
	pendiente	R <sup>2</sup>	p <sup>1</sup>	pendiente	R <sup>2</sup>	p <sup>1</sup>
IMC (Kg/m <sup>2</sup> )	0,055	0,002	0,747	-0,033	0,021	0,271
%GC <sub>BIA</sub>	0,062	0,009	0,478	0,005	0,002	0,739
VERANO	25(OH)D total (ng/mL)			25(OH)D libre (pg/mL)		
	pendiente	R <sup>2</sup>	p <sup>1</sup>	pendiente	R <sup>2</sup>	p <sup>1</sup>
IMC (Kg/m <sup>2</sup> )	-0,294	0,033	0,289	-0,049	0,016	0,462
%GC <sub>BIA</sub>	-0,147	0,015	0,509	-0,027	0,009	0,617
INVIERNO	25(OH)D total (ng/mL)			25(OH)D libre (pg/mL)		
	pendiente	R <sup>2</sup>	p <sup>1</sup>	pendiente	R <sup>2</sup>	p <sup>1</sup>
IMC (Kg/m <sup>2</sup> )	0,055	0,002	0,747	-0,033	0,021	0,271
%GC <sub>BIA</sub>	0,062	0,009	0,478	0,005	0,002	0,739

<sup>1</sup> Regresión lineal

Tabla 5.7.4.5. Influencia del IMC y el %GC<sub>BIA</sub> en los niveles séricos de 25(OH)D total y libre en Burgos en total y diferenciando por estación

VALENCIA						
TOTAL	25(OH)D total (ng/mL)			25(OH)D libre (pg/mL)		
	pendiente	R <sup>2</sup>	p <sup>1</sup>	pendiente	R <sup>2</sup>	p <sup>1</sup>
IMC (Kg/m <sup>2</sup> )	-0,306	0,046	0,032	0,014	0,001	0,828
%GC <sub>Siri</sub>	-0,141	0,017	0,196	0,047	0,009	0,332
%GC <sub>Brozec</sub>	-0,153	0,017	0,196	0,051	0,009	0,332
%GC <sub>Brazo</sub>	-0,018	0,001	0,763	0,011	0,002	0,696
VERANO	25(OH)D total (ng/mL)			25(OH)D libre (pg/mL)		
	pendiente	R <sup>2</sup>	p <sup>1</sup>	pendiente	R <sup>2</sup>	p <sup>1</sup>
IMC (Kg/m <sup>2</sup> )	-0,450	0,091	0,028	-0,088	0,021	0,304
%GC <sub>Siri</sub>	-0,209	0,034	0,186	0,011	0,001	0,867
%GC <sub>Brozec</sub>	-0,226	0,034	0,186	0,012	0,001	0,867
%GC <sub>Brazo</sub>	-0,023	0,001	0,792	0,004	0,000	0,920
INVIERNO	25(OH)D total (ng/mL)			25(OH)D libre (pg/mL)		
	pendiente	R <sup>2</sup>	p <sup>1</sup>	pendiente	R <sup>2</sup>	p <sup>1</sup>
IMC (Kg/m <sup>2</sup> )	-0,194	0,028	0,249	0,103	0,029	0,232
%GC <sub>Siri</sub>	-0,202	0,050	0,124	0,038	0,006	0,586
%GC <sub>Brozec</sub>	-0,218	0,050	0,124	0,041	0,006	0,586
%GC <sub>Brazo</sub>	-0,105	0,040	0,166	-0,012	0,002	0,755

<sup>1</sup> Regresión lineal

Tabla 5.7.4.6. Influencia del IMC, el %GC<sub>Siri</sub>, el %GC<sub>Brozec</sub> y el %GC<sub>Brazo</sub> en los niveles séricos de 25(OH)D total y libre en Valencia en total y diferenciando por estación

Teniendo en cuenta que la edad y el sexo influyen de forma muy significativa sobre el IMC, en las siguientes tablas se refleja de nuevo la relación entre IMC y %GC con los niveles séricos de la 25(OH)D total y libre, teniendo en cuenta el peso de la edad y del sexo por separado, y también en común.

- Influencia del IMC y el %GC, ajustado por la edad:

TOTAL						
TOTAL	25(OH)D total (ng/mL)			25(OH)D libre (pg/mL)		
	pendiente	$\beta$	$p^1$	pendiente	$\beta$	$p^1$
IMC (Kg/m <sup>2</sup> )	-0,137	0,010	0,394	0,046	0,001	0,601
VERANO	25(OH)D total (ng/mL)			25(OH)D libre (pg/mL)		
	pendiente	$\beta$	$p^1$	pendiente	$\beta$	$p^1$
IMC (Kg/m <sup>2</sup> )	-0,295	0,069	0,065	0,009	0,000	0,992
INVIERNO	25(OH)D total (ng/mL)			25(OH)D libre (pg/mL)		
	pendiente	$\beta$	$p^1$	pendiente	$\beta$	$p^1$
IMC (Kg/m <sup>2</sup> )	-0,078	0,006	0,742	0,047	0,009	0,638

<sup>1</sup> Regresión lineal múltiple

Tabla 5.7.4.7. Influencia del IMC, ajustado por la edad, en los niveles séricos de 25(OH)D total y libre en el total de la muestra del estudio, y diferenciando por estación

BURGOS						
TOTAL	25(OH)D total (ng/mL)			25(OH)D libre (pg/mL)		
	pendiente	$\beta$	$p^1$	pendiente	$\beta$	$p^1$
IMC (Kg/m <sup>2</sup> )	0,066	0,010	0,757	-0,036	0,040	0,318
%GC <sub>BIA</sub>	0,057	0,014	0,662	0,007	0,020	0,576
VERANO	25(OH)D total (ng/mL)			25(OH)D libre (pg/mL)		
	pendiente	$\beta$	$p^1$	pendiente	$\beta$	$p^1$
IMC (Kg/m <sup>2</sup> )	-0,047	-0,026	0,883	0,030	0,074	0,661
%GC <sub>BIA</sub>	-0,060	-0,046	0,802	0,002	0,005	0,975
INVIERNO	25(OH)D total (ng/mL)			25(OH)D libre (pg/mL)		
	pendiente	$\beta$	$p^1$	pendiente	$\beta$	$p^1$
IMC (Kg/m <sup>2</sup> )	0,066	0,051	0,704	-0,036	-0,156	0,241
%GC <sub>BIA</sub>	0,057	0,085	0,522	0,007	0,059	0,657

<sup>1</sup> Regresión lineal múltiple

Tabla 5.7.4.8. Influencia del IMC y el %GC<sub>BIA</sub>, ajustado por la edad, en los niveles séricos de 25(OH)D total y libre en Burgos, diferenciando por estación

VALENCIA						
TOTAL	25(OH)D total (ng/mL)			25(OH)D libre (pg/mL)		
	pendiente	$\beta$	$p^1$	pendiente	$\beta$	$p^1$
IMC (Kg/m <sup>2</sup> )	-0,287	0,047	0,094	0,014	0,001	0,977
%GC <sub>Siri</sub>	-0,114	0,022	0,338	0,051	0,010	0,608
%GC <sub>Brozec</sub>	-0,124	0,022	0,338	0,055	0,010	0,608
%GC <sub>Brazo</sub>	-0,052	0,018	0,403	0,014	0,002	0,896
VERANO	25(OH)D total (ng/mL)			25(OH)D libre (pg/mL)		
	pendiente	$\beta$	$p^1$	pendiente	$\beta$	$p^1$
IMC (Kg/m <sup>2</sup> )	-0,381	-0,255	0,085	-0,108	-0,177	0,248
%GC <sub>Siri</sub>	-0,138	-0,122	0,412	0,010	0,021	0,892
%GC <sub>Brozec</sub>	-0,150	-0,122	0,412	0,010	0,021	0,892
%GC <sub>Brazo</sub>	-0,084	-0,135	0,363	0,006	0,023	0,881
INVIERNO	25(OH)D total (ng/mL)			25(OH)D libre (pg/mL)		
	pendiente	$\beta$	$p^1$	pendiente	$\beta$	$p^1$
IMC (Kg/m <sup>2</sup> )	-0,185	-0,160	0,281	0,117	0,192	0,184
%GC <sub>Siri</sub>	-0,195	-0,216	0,153	0,050	0,102	0,486
%GC <sub>Brozec</sub>	-0,211	-0,216	0,153	0,054	0,102	0,486
%GC <sub>Brazo</sub>	-0,127	-0,242	0,109	-0,021	-0,075	0,614

<sup>1</sup>Regresión lineal múltiple

Tabla 5.7.4.9. Influencia del IMC, el%GC<sub>Siri</sub>, el%GC<sub>Brozec</sub> y el %GC<sub>Brazo</sub>, ajustado por la edad, en los niveles séricos de 25(OH)D total y libre en Valencia, diferenciando por estación

- Influencia del IMC y el %GC, ajustado por el sexo:

TOTAL						
TOTAL	25(OH)D total (ng/mL)			25(OH)D libre (pg/mL)		
	pendiente	R <sup>2</sup>	p <sup>1</sup>	pendiente	R <sup>2</sup>	p <sup>1</sup>
IMC (Kg/m <sup>2</sup> )	-0,143	0,011	0,355	0,032	0,003	0,760
VERANO	25(OH)D total (ng/mL)			25(OH)D libre (pg/mL)		
	pendiente	R <sup>2</sup>	p <sup>1</sup>	pendiente	R <sup>2</sup>	p <sup>1</sup>
IMC (Kg/m <sup>2</sup> )	-0,338	0,081	0,038	-0,048	0,009	0,720
INVIERNO	25(OH)D total (ng/mL)			25(OH)D libre (pg/mL)		
	pendiente	R <sup>2</sup>	p <sup>1</sup>	pendiente	R <sup>2</sup>	p <sup>1</sup>
IMC (Kg/m <sup>2</sup> )	-0,074	0,005	0,776	0,054	0,008	0,665

<sup>1</sup> Regresión lineal múltiple

Tabla 5.7.4.10. Influencia del IMC, ajustado por sexo, en los niveles séricos de 25(OH)D total y libre en el total de la muestra del estudio, y diferenciando por estación

Hay tal déficit en invierno

BURGOS						
TOTAL	25(OH)D total (ng/mL)			25(OH)D libre (pg/mL)		
	pendiente	β	p <sup>1</sup>	pendiente	β	p <sup>1</sup>
IMC (Kg/m <sup>2</sup> )	0,045	0,003	0,918	-0,032	0,022	0,540
%GC <sub>BIA</sub>	0,079	0,015	0,658	0,004	0,004	0,907
VERANO	25(OH)D total (ng/mL)			25(OH)D libre (pg/mL)		
	pendiente	β	p <sup>1</sup>	pendiente	β	p <sup>1</sup>
IMC (Kg/m <sup>2</sup> )	-0,348	-0,212	0,275	-0,097	-0,249	0,193
%GC <sub>BIA</sub>	-0,147	-0,121	0,526	-0,035	-0,121	0,525
INVIERNO	25(OH)D total (ng/mL)			25(OH)D libre (pg/mL)		
	pendiente	β	p <sup>1</sup>	pendiente	β	p <sup>1</sup>
IMC (Kg/m <sup>2</sup> )	0,045	0,035	0,799	-0,032	-0,141	0,300
%GC <sub>BIA</sub>	0,079	0,119	0,395	0,004	0,031	0,826

<sup>1</sup> Regresión lineal múltiple

Tabla 5.7.4.11. Influencia del IMC y el %GC<sub>BIA</sub>, ajustado por el sexo, en los niveles séricos de 25(OH)D total y libre en Burgos, diferenciando por estación

VALENCIA						
TOTAL	25(OH)D total (ng/mL)			25(OH)D libre (pg/mL)		
	pendiente	$\beta$	$p^1$	pendiente	$\beta$	$p^1$
IMC (Kg/m <sup>2</sup> )	-0,330	0,053	0,068	0,007	0,004	0,834
%GC <sub>Siri</sub>	-0,138	0,017	0,434	0,060	0,017	0,416
%GC <sub>Brozec</sub>	-0,150	0,017	0,434	0,065	0,017	0,416
%GC <sub>Brazo</sub>	-0,006	0,002	0,897	0,024	0,009	0,618
VALENCIA						
VERANO	25(OH)D total (ng/mL)			25(OH)D libre (pg/mL)		
	pendiente	$\beta$	$p^1$	pendiente	$\beta$	$p^1$
IMC (Kg/m <sup>2</sup> )	-0,440	-0,295	0,035	-0,081	-0,133	0,351
%GC <sub>Siri</sub>	-0,249	-0,220	0,129	0,001	0,001	0,994
%GC <sub>Brozec</sub>	-0,270	-0,220	0,129	0,001	0,001	0,994
%GC <sub>Brazo</sub>	-0,065	-0,105	0,518	-0,010	-0,040	0,806
INVIERNO	25(OH)D total (ng/mL)			25(OH)D libre (pg/mL)		
	pendiente	$\beta$	$p^1$	pendiente	$\beta$	$p^1$
IMC (Kg/m <sup>2</sup> )	-0,247	-0,214	0,146	0,088	0,144	0,316
%GC <sub>Siri</sub>	-0,161	-0,179	0,259	0,078	0,160	0,293
%GC <sub>Brozec</sub>	-0,175	-0,179	0,259	0,084	0,160	0,293
%GC <sub>Brazo</sub>	-0,076	-0,145	0,406	0,018	0,063	0,710

<sup>1</sup> Regresión lineal múltiple

Tabla 5.7.4.12. Influencia del IMC, el %GC<sub>Siri</sub>, el %GC<sub>Brozec</sub> y el %GC<sub>Brazo</sub>, ajustado por el sexo, en los niveles séricos de 25(OH)D total y libre en Valencia, diferenciando por estación

- Influencia del IMC y el %GC, ajustado por el sexo y la edad:

TOTAL						
TOTAL	25(OH)D total (ng/mL)			25(OH)D libre (pg/mL)		
	pendiente	$\beta$	$p^1$	pendiente	$\beta$	$p^1$
IMC (Kg/m <sup>2</sup> )	-0,140	0,011	0,593	0,040	0,005	0,832
VERANO	25(OH)D total (ng/mL)			25(OH)D libre (pg/mL)		
	pendiente	$\beta$	$p^1$	pendiente	$\beta$	$p^1$
IMC (Kg/m <sup>2</sup> )	-0,309	0,071	0,138	-0,019	0,003	0,973
INVIERNO	25(OH)D total (ng/mL)			25(OH)D libre (pg/mL)		
	pendiente	$\beta$	$p^1$	pendiente	$\beta$	$p^1$
IMC (Kg/m <sup>2</sup> )	-0,087	0,008	0,857	0,049	0,010	0,799

<sup>1</sup> Regresión lineal múltiple

Tabla 5.7.4.13. Influencia del IMC, ajustado por la edad y por el sexo, en los niveles séricos de 25(OH)D total y libre en el total de la muestra del estudio, y diferenciando por estación

BURGOS						
TOTAL	25(OH)D total (ng/mL)			25(OH)D libre (pg/mL)		
	pendiente	$\beta$	$p^1$	pendiente	$\beta$	$p^1$
IMC (Kg/m <sup>2</sup> )	0,051	0,012	0,874	-0,037	0,042	0,496
%GC <sub>BIA</sub>	0,076	0,022	0,734	0,005	0,023	0,732
VERANO	25(OH)D total (ng/mL)			25(OH)D libre (pg/mL)		
	pendiente	$\beta$	$p^1$	pendiente	$\beta$	$p^1$
IMC (Kg/m <sup>2</sup> )	0,075	-0,041	0,835	-0,013	-0,032	0,865
%GC <sub>BIA</sub>	-0,037	-0,028	0,883	-0,000	-0,001	0,996
INVIERNO	25(OH)D total (ng/mL)			25(OH)D libre (pg/mL)		
	pendiente	$\beta$	$p^1$	pendiente	$\beta$	$p^1$
IMC (Kg/m <sup>2</sup> )	0,051	0,040	0,772	-0,034	-0,147	0,281
%GC <sub>BIA</sub>	0,076	0,114	0,418	0,005	0,040	0,776

<sup>1</sup> Regresión lineal múltiple

Tabla 5.7.4.14. Influencia del IMC y el %GC<sub>BIA</sub>, ajustado por la edad y por el sexo, en los niveles séricos de 25(OH)D total y libre en Burgos, diferenciando por estación

VALENCIA						
TOTAL	25(OH)D total (ng/mL)			25(OH)D libre (pg/mL)		
	pendiente	$\beta$	$p^1$	pendiente	$\beta$	$p^1$
IMC (Kg/m <sup>2</sup> )	-0,298	0,057	0,122	0,011	0,004	0,941
%GC <sub>Siri</sub>	-0,085	0,024	0,493	0,082	0,023	0,493
%GC <sub>Brozec</sub>	-0,092	0,493	0,024	0,089	0,023	0,493
%GC <sub>Brazo</sub>	-0,034	0,022	0,533	0,025	0,009	0,811
VERANO	25(OH)D total (ng/mL)			25(OH)D libre (pg/mL)		
	pendiente	$\beta$	$p^1$	pendiente	$\beta$	$p^1$
IMC (Kg/m <sup>2</sup> )	-0,381	-0,255	0,089	-0,109	-0,179	0,246
%GC <sub>Siri</sub>	-0,173	-0,153	0,372	-0,021	-0,046	0,794
%GC <sub>Brozec</sub>	-0,188	-0,153	0,372	-0,023	-0,046	0,794
%GC <sub>Brazo</sub>	-0,097	-0,156	0,340	-0,007	-0,027	0,870
INVIERNO	25(OH)D total (ng/mL)			25(OH)D libre (pg/mL)		
	pendiente	$\beta$	$p^1$	pendiente	$\beta$	$p^1$
IMC (Kg/m <sup>2</sup> )	-0,237	-0,205	0,169	0,102	0,167	0,254
%GC <sub>Siri</sub>	-0,146	-0,161	0,338	0,099	0,203	0,199
%GC <sub>Brozec</sub>	-0,158	-0,161	0,338	0,107	0,203	0,199
%GC <sub>Brazo</sub>	-0,101	-0,193	0,289	0,009	0,031	0,863

<sup>1</sup> Regresión lineal múltiple

Tabla 5.7.4.15. Influencia del IMC, el %GC<sub>Siri</sub>, el %GC<sub>Brozec</sub> y el %GC<sub>Brazo</sub>, ajustado por la edad y por el sexo, en los niveles séricos de 25(OH)D total y libre en Valencia durante el invierno

Para completar este estudio, el siguiente análisis muestra la comparativa de los niveles séricos de 25(OH)D total y libre de los sujetos obesos frente los no obesos. Esta clasificación se ha hecho en función de los rangos de IMC establecidos por la OMS, así como de los %GC<sup>(100,107,108)</sup>.

- Comparación de los niveles de 25(OH)D total y libre en el grupo de sujetos con sobrepeso y obesidad ( $IMC \geq 25,0 \text{ Kg/m}^2$ ) frente al grupo sin sobrepeso ( $IMC < 25,0 \text{ Kg/m}^2$ ):

Para poder utilizar una prueba paramétrica, estudiamos los valores extremos, eliminando un total de dos resultados de 25(OH)D total en sujetos obesos, y cinco en los no obesos. En cuanto a la 25(OH)D libre, excluimos un valor atípico en el grupo de sujetos obesos, y tres en el grupo con intervalo de IMC normal. Este mismo análisis realizado en cada población por separado mostró llevó a: en Burgos, sólo fue necesario eliminar un valor extremo de los resultados de 25(OH)D total, y tres de 25(OH)D libre. Mientras que, en la muestra procedente de Valencia, prescindimos de nueve datos de 25(OH)D total, y sólo uno de 25(OH)D libre.

También comprobamos el supuesto de homogeneidad de varianzas con la prueba de Levene, el de normalidad no fue necesario teniendo en cuenta que el tamaño de la muestra ya lo asegura.

TOTAL				
	INTERVALO NORMAL ( $IMC < 25,0 \text{ Kg/m}^2$ ) media $\pm$ DS	SOBREPESO Y OBESIDAD ( $IMC \geq 25,0 \text{ Kg/m}^2$ ) media $\pm$ DS	$\Delta$ media	p
25(OH)D total (ng/mL)	22,23 $\pm$ 5,85	21,35 $\pm$ 5,67	0,88	0,143 <sup>1</sup>
25(OH)D libre (pg/mL)	6,05 $\pm$ 2,58	6,33 $\pm$ 2,60	- 0,29	0,782 <sup>1</sup>
BURGOS				
	INTERVALO NORMAL ( $IMC < 25,0 \text{ Kg/m}^2$ ) media $\pm$ DS	SOBREPESO Y OBESIDAD ( $IMC \geq 25,0 \text{ Kg/m}^2$ ) media $\pm$ DS	$\Delta$ media	p
25(OH)D total (ng/mL)	20,57 $\pm$ 6,41	19,69 $\pm$ 5,87	0,89	0,237 <sup>1</sup>
25(OH)D libre (pg/mL)	4,50 $\pm$ 1,04	4,42 $\pm$ 1,10	0,08	0,349 <sup>1</sup>
VALENCIA				
	INTERVALO NORMAL ( $IMC < 25,0 \text{ Kg/m}^2$ ) media $\pm$ DS	SOBREPESO Y OBESIDAD ( $IMC \geq 25,0 \text{ Kg/m}^2$ ) media $\pm$ DS	$\Delta$ media	p
25(OH)D total (ng/mL)	23,69 $\pm$ 3,49	22,69 $\pm$ 5,18	0,99	0,136 <sup>2</sup>
25(OH)D libre (pg/mL)	8,24 $\pm$ 2,99	7,89 $\pm$ 2,43	0,35	0,258 <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Test "t" de Student para dos muestras

<sup>2</sup> Test "t" de Student para dos muestras corregido para varianzas diferentes

Tabla 5.7.4.16. Comparación de los niveles de 25(OH)D total y libre según IMC (obesidad vs. Intervalo normal), en el total de la muestra, y por poblaciones

- Comparación de los niveles de 25(OH)D total y libre en el grupo de sujetos con sobrepeso y obesidad frente al grupo de sujetos sin sobrepeso con datos del %GC. En el caso de Valencia, se ha tenido en cuenta el %GC<sub>Siri</sub>. Estos datos tienen en cuenta la edad y el sexo de los sujetos para su clasificación <sup>(104,105)</sup>.

Como en el análisis anterior, para poder realizar la prueba de t de Student, analizamos primero los valores atípicos, lo que derivó en la eliminación de tres resultados de 25(OH)D total y otros once de 25(OH)D libre, en el estudio de la muestra total. En el caso de Valencia, prescindimos de tres resultados atípicos de 25(OH)D total y dos de 25(OH)D libre. En Burgos, eliminamos un resultado atípico de 25(OH)D total y tres de 25(OH)D libre.

TOTAL				
	INTERVALO NORMAL media ± DS	SOBREPESO Y OBESIDAD media ± DS	Δ media	p
25(OH)D total (ng/mL)	20,69 ± 5,84	22,90 ± 6,37	-2,21	0,996 <sup>1</sup>
25(OH)D libre (pg/mL)	4,88 ± 1,63	7,43 ± 2,92	-2,54	<0,001 <sup>2</sup>
BURGOS				
	INTERVALO NORMAL media ± DS	SOBREPESO Y OBESIDAD media ± DS	Δ media	p
25(OH)D total (ng/mL)	19,76 ± 5,96	19,52 ± 6,61	0,24	0,437 <sup>1</sup>
25(OH)D libre (pg/mL)	4,38 ± 1,08	4,36 ± 0,96	0,02	0,478 <sup>1</sup>
VALENCIA				
	INTERVALO NORMAL media ± DS	SOBREPESO Y OBESIDAD media ± DS	Δ media	p
25(OH)D total (ng/mL)	22,11 ± 4,92	23,83 ± 5,04	-1,72	0,058 <sup>1</sup>
25(OH)D libre (pg/mL)	7,73 ± 2,96	8,30 ± 2,67	-0,57	0,160 <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Test "t" de Student para dos muestras

<sup>2</sup> Test "t" de Student para dos muestras corregido para varianzas diferentes

Tabla 5.7.4.18. Comparación de los niveles de 25(OH)D total y libre según %GC (obesidad vs. intervalo normal), por poblaciones

- Comparación de los niveles de 25(OH)D total y libre entre los grupos de sujetos con intervalo normal (IMC < 25,0 Kg/m<sup>2</sup>), sobrepeso (IMC = 25,0 – 29,9 Kg/m<sup>2</sup>) y obesidad (IMC ≥ 30,0 Kg/m<sup>2</sup>), con datos de IMC:

Antes de desarrollar este análisis, realizamos una exploración de los datos, con el objetivo de detectar y prescindir de valores anómalos. Obtuvimos así, en el total de la muestra, un valor atípico de 25(OH)D total del grupo de obesidad, dos del grupo de sobrepeso y cinco del normopeso. En cuanto a la 25(OH)D libre en el total de la muestra, encontramos dos valores atípicos del grupo de obesidad y tres del normopeso. En Burgos, eliminamos dos valores atípicos de 25(OH)D total del grupo de obesidad y dos del grupo de sobrepeso, y cuatro valores extremos de 25(OH)D libre del grupo de sobrepeso, y tres del grupo de normopeso. En Valencia, prescindimos de un valor anómalo de 25(OH)D total del grupo de obesidad, y ocho del normopeso, y también de dos valores atípicos de 25(OH)D libre.

TOTAL					
	INTERVALO NORMAL (IMC < 25,0 Kg/m <sup>2</sup> ), media	SOBREPESO (IMC = 25,0 – 29,9 Kg/m <sup>2</sup> ), Media	OBESIDAD (IMC ≥ 30,0 Kg/m <sup>2</sup> ), media	p <sup>1</sup> lineal	p <sup>1</sup> cuadrática
25(OH)D total (ng/mL)	22,23 ± 5,85	21,22 ± 5,97	21,55 ± 5,22	0,414	0,460
25(OH)D libre (pg/mL)	6,05 ± 2,58	6,14 ± 2,64	6,47 ± 2,31	0,406	0,765
BURGOS					
	INTERVALO NORMAL (IMC < 25,0 Kg/m <sup>2</sup> ), media	SOBREPESO (IMC = 25,0 – 29,9 Kg/m <sup>2</sup> ), media	OBESIDAD (IMC ≥ 30,0 Kg/m <sup>2</sup> ), media	p <sup>1</sup> lineal	p <sup>1</sup> cuadrática
25(OH)D total (ng/mL)	20,57 ± 6,41	18,24 ± 5,03	21,19 ± 4,60	0,794	0,056
25(OH)D libre (pg/mL)	4,50 ± 1,04	4,12 ± 0,75	4,62 ± 1,09	0,947	0,063
VALENCIA					
	INTERVALO NORMAL (IMC < 25,0 Kg/m <sup>2</sup> ), media	SOBREPESO (IMC = 25,0 – 29,9 Kg/m <sup>2</sup> ), media	OBESIDAD (IMC ≥ 30,0 Kg/m <sup>2</sup> ), media	p <sup>1</sup> lineal	p <sup>1</sup> cuadrática
25(OH)D total (ng/mL)	24,58 ± 3,72	23,21 ± 5,52	21,85 ± 4,56	0,033	0,997
25(OH)D libre (pg/mL)	8,24 ± 2,99	7,64 ± 2,58	8,06 ± 1,84	0,642	0,362

<sup>1</sup> Análisis de la varianza (ANOVA) con prueba de tendencia

Tabla 5.7.4.18. Comparación de los niveles de 25(OH)D total y libre según IMC (intervalo normal vs. sobrepeso vs. obesidad), en el total de la muestra, y por poblaciones

- Comparación de los niveles de 25(OH)D total y libre entre los grupos de sujetos con intervalo normal, sobrepeso y obesidad, con datos del %GC: Al igual que en la tabla 5.7.4.17., en el caso de Valencia, se ha tenido en cuenta el %GC<sub>Siri</sub>, y todos los datos de %GC tienen en cuenta la edad y el sexo de los sujetos para su clasificación<sup>(107,108)</sup>:

Una vez más, realizamos un análisis de los valores anómalos previo. Eliminamos tres valores atípicos de 25(OH)D total del grupo de sobrepeso, y otros tres del normopeso. En cuanto a la 25(OH)D libre, prescindimos de once resultados del grupo de normopeso. En Burgos, eliminamos un valor anómalo de 25(OH)D total del grupo de obesidad y otro del grupo de normopeso, y tres resultados de 25(OH)D libre del grupo de normopeso. En Valencia, eliminamos dos valores extremos de 25(OH)D total del grupo de normopeso.

TOTAL					
	INTERVALO NORMAL, media	SOBREPESO, media	OBESIDAD, Media	p <sup>1</sup> lineal	p <sup>1</sup> cuadrática
25(OH)D total (ng/mL)	20,49 ± 5,74	23,10 ± 6,41	22,55 ± 5,03	0,020	0,128
25(OH)D libre (pg/mL)	5,05 ± 1,70	7,39 ± 3,11	7,46 ± 2,72	<0,001	0,006
BURGOS					
	INTERVALO NORMAL, media	SOBREPESO, media	OBESIDAD, Media	p <sup>1</sup> lineal	p <sup>1</sup> cuadrática
25(OH)D total (ng/mL)	19,76 ± 5,96	18,90 ± 7,43	21,68 ± 4,22	0,585	0,398
25(OH)D libre (pg/mL)	4,37 ± 1,08	4,33 ± 1,12	4,40 ± 0,77	0,997	0,885
VALENCIA					
	INTERVALO NORMAL, media	SOBREPESO, media	OBESIDAD, Media	p <sup>1</sup> lineal	p <sup>1</sup> cuadrática
25(OH)D total (ng/mL)	22,11 ± 4,92	26,14 ± 7,02	23,13 ± 4,73	0,508	0,004
25(OH)D libre (pg/mL)	7,73 ± 2,96	8,38 ± 2,89	8,23 ± 2,48	0,458	0,486

<sup>1</sup> Análisis de la varianza (ANOVA) con prueba de tendencia

Tabla 5.7.4.19. Comparación de los niveles de 25(OH)D total y libre según %GC (intervalo normal vs. sobrepeso vs. obesidad), en el total de la muestra, y por poblaciones

### 5.7.5. INFLUENCIA DE LOS HÁBITOS DE EXPOSICIÓN SOLAR

Con los datos recogidos en la encuesta sobre los hábitos de exposición solar, analizamos la influencia de tres variables relacionadas con ellos sobre las concentraciones de vitamina D:

- Tiempo al aire libre en las horas de máximo calor (10 AM – 4 PM) durante el verano
- Actitud ante la exposición solar
- Uso de cremas fotoprotectoras

La siguiente tabla muestra la relación entre la cantidad de horas al día al aire libre durante las 10 AM y las 4 PM, rango horario con el máximo calor, en el verano, y las concentraciones de 25(OH)D total y libre, según población de origen:

BURGOS					
Horas/día al aire libre en verano (10 AM- 16 PM)	< 1 hora	1 – 3 horas	> 3 horas	p <sup>1</sup> lineal	p <sup>1</sup> cuadrática
25(OH)D total (ng/mL) (media ± DS)	22,31 ± 4,01	24,46 ± 5,47	28,96 ± 2,11	0,023	0,499
25(OH)D libre (pg/mL) (media ± DS)	4,27 ± 1,29	5,19 ± 1,30	5,69 ± 0,76	0,024	0,633

<sup>1</sup> Análisis de la varianza (ANOVA) con prueba de tendencia

Tabla 5.7.5.1. Relación entre las horas al día de exposición solar durante el verano y las concentraciones séricas de 25(OH)D total y libre en Burgos

VALENCIA					
Horas/día al aire libre en verano (10 AM- 16 PM)	< 1 hora	1 – 3 horas	> 3 horas	p <sup>1</sup> lineal	p <sup>1</sup> cuadrática
25(OH)D total (ng/mL) (media ± DS)	24,76 ± 4,96	26,51 ± 7,30	23,87 ± 5,33	0,835	0,249
25(OH)D libre (pg/mL) (media ± DS)	8,18 ± 2,97	9,21 ± 2,84	9,06 ± 2,71	0,466	0,463

<sup>1</sup> Análisis de la varianza (ANOVA) con prueba de tendencia

Tabla 5.7.5.2. Relación entre las horas al día de exposición solar durante el verano y las concentraciones séricas de 25(OH)D total y libre en Valencia

Las siguientes tablas muestran los resultados de analizar la relación entre la actitud ante la exposición solar durante el verano, y las concentraciones séricas de 25(OH)D total y libre, en Burgos y Valencia:

BURGOS				
Actitud ante la exposición solar	Lo evitan	A veces	Lo buscan	p <sup>1</sup>
25(OH)D total (ng/mL) (media ± DS)	24,02 ± 0,08	25,25 ± 4,77	20,80 ± 6,18	0,152
25(OH)D libre (pg/mL) (media ± DS)	4,02 ± 1,20	5,20 ± 1,32	4,52 ± 1,08	0,278

<sup>1</sup> Análisis de la varianza (ANOVA)

Tabla 5.7.5.3. Relación entre la actitud ante la exposición solar durante el verano y las concentraciones séricas de 25(OH)D total y libre en Burgos

VALENCIA				
Actitud ante la exposición solar	Lo evitan	A veces	Lo buscan	p <sup>1</sup>
25(OH)D total (ng/mL) (media ± DS)	26,78 ± 6,57	22,82 ± 4,67	25,19 ± 7,17	0,121
25(OH)D libre (pg/mL) (media ± DS)	8,81 ± 2,55	8,84 ± 3,33	10,47 ± 2,45	0,615

<sup>1</sup> Análisis de la varianza (ANOVA)

Tabla 5.7.5.4. Relación entre la actitud ante la exposición solar durante el verano y las concentraciones séricas de 25(OH)D total y libre en Valencia

La última variable sobre los hábitos de exposición solar a valorar es el uso de cremas de fotoprotección solar. Las siguientes dos tablas muestra la relación entre esta variable y las concentraciones séricas de 25(OH)D total y libre, en Burgos y Valencia:

BURGOS					
Factor de protección solar	Factor ≤ 20	Factor 21-40	Factor ≥ 40	p <sup>1</sup> lineal	p <sup>1</sup> cuadrática
25(OH)D total (ng/mL) (media ± DS)	19,8 ± 4,81	26,33 ± 6,72	24,46 ± 6,68	0,310	0,085
25(OH)D libre (pg/mL) (media ± DS)	4,55 ± 1,27	5,40 ± 1,22	5,25 ± 1,90	0,493	0,392

<sup>1</sup> Análisis de la varianza (ANOVA) con prueba de tendencia

Tabla 5.7.5.5. Relación entre el factor de protección solar utilizado durante el verano y las concentraciones séricas de 25(OH)D total y libre en Burgos

VALENCIA					
Factor de protección solar	Factor ≤ 20	Factor 21-40	Factor ≥ 40	p <sup>1</sup> lineal	p <sup>1</sup> cuadrática
25(OH)D total (ng/mL) (media ± DS)	29,53 ± 15,41	27,54 ± 7,22	24,47 ± 6,17	0,156	0,875
25(OH)D libre (pg/mL) (media ± DS)	9,69 ± 1,60	8,69 ± 3,63	8,96 ± 2,73	0,941	0,662

<sup>1</sup> Análisis de la varianza (ANOVA) con prueba de tendencia

Tabla 5.7.5.6. Relación entre factor de protección solar utilizado durante el verano y las concentraciones séricas de 25(OH)D total y libre en Valencia

Puesto que un factor de protección solar por encima de 8 puede reducir ya la síntesis cutánea de vitamina D en un porcentaje importante, a continuación, mostramos la relación entre las concentraciones de 25(OH)D total y el uso de factores de protección solar. Tan sólo se muestran los resultados obtenidos en Valencia, ya que en Burgos la práctica totalidad de la muestra afirmó utilizar factores de protección solar, pero en Valencia no.

	Factor de protección solar (media)	NO factor de protección solar (media)	Δ Media	p <sup>1</sup>
25(OH)D total (ng/mL)	25,44	27,54	2,11	0,165
25(OH)D libre (pg/mL)	8,94	9,08	0,15	0,434

Test "t" de Student para dos muestras

Tabla 5.7.5.7. Relación entre el uso de factores de protección solar y las concentraciones séricas de vitamina D en Valencia

### 5.7.6. INFLUENCIA DE LA INGESTA DE VITAMINA D EN SUS NIVELES SÉRICOS

Aunque en menor medida que la síntesis cutánea, el aporte dietético de vitamina D es también una fuente de esta vitamina.

La siguiente tabla muestra la influencia de la ingesta de vitamina D en los niveles séricos de 25(OH)D total y libre:

INGESTA DE VITAMINA D EN BURGOS			
25(OH)D total (ng/mL)			
	pendiente	R <sup>2</sup>	p <sup>1</sup>
VERANO	0,073	0,002	0,808
INVIERNO	0,142	0,012	0,399
25(OH)D libre (pg/mL)			
	pendiente	R <sup>2</sup>	p <sup>1</sup>
VERANO	-0,040	0,009	0,573
INVIERNO	-0,004	0,001	0,886

<sup>1</sup> Test de regresión lineal

Tabla 5.7.6.1. Influencia de la ingesta de vitamina D en los niveles séricos de 25(OH)D total y libre, en Burgos

INGESTA DE VITAMINA D EN VALENCIA			
25(OH)D total (ng/mL)			
	pendiente	R <sup>2</sup>	p <sup>1</sup>
VERANO	0,118	0,004	0,643
INVIERNO	0,039	0,001	0,826
25(OH)D libre (pg/mL)			
	pendiente	R <sup>2</sup>	p <sup>1</sup>
VERANO	-0,046	0,004	0,662
INVIERNO	-0,058	0,009	0,497

<sup>1</sup> Test de regresión lineal

Tabla 5.7.6.2. Influencia de la ingesta de vitamina D en los niveles séricos de 25(OH)D total y libre, en Valencia

5.7.7. INFLUENCIA DE LAS DISTINTAS VARIABLES EN LOS NIVELES SÉRICOS DE 25(OH)D TOTAL Y LIBRE

La siguiente tabla muestra la influencia de las diferentes variables, ya analizadas por separado, en los niveles séricos de 25(OH)D total:

	25(OH)D total (ng/mL)		
	Coefficiente	Error estándar	p <sup>1</sup>
EDAD	- 0,05	0,04	0,190
ESTACIONALIDAD (Verano vs. Invierno)	5,15	0,89	< 0,001
CLIMA (Valencia vs. Burgos)	3,44	1,21	0,005
IMC (Kg/m <sup>2</sup> )	- 0,21	0,13	0,110
%GC	0,01	0,08	0,971
HÁBITOS DE EXPOSICIÓN SOLAR			
Horas/día al aire libre en verano (10 AM- 16 PM)			
1 -3 horas	0,20	1,08	0,854
> 3 horas	- 0,72	1,24	0,560
Actitud ante la exposición solar			
A veces	0,82	1,08	0,451
Lo buscan	-0,12	1,40	0,930
Factor de protección solar (escala)			
≤ 20	- 2,69	1,85	0,147
20 - 40	- 1,51	1,39	0,281
≥ 40	- 2,14	1,31	0,103
INGESTA DE VITAMINA D (µg/día)	0,08	0,16	0,617
INGESTA DIARIA DE VITAMINA D (suficiente/insuficiente)	0,02	1,20	0,988

<sup>1</sup> Regresión lineal múltiple

Tabla 5.7.7.1. Influencia de las distintas variables en los niveles séricos de 25(OH)D total

La siguiente tabla muestra la influencia de las diferentes variables, ya analizadas por separado, en los niveles séricos de 25(OH)D libre:

	25(OH)D libre (pg/mL)		
	Coefficiente	Error estándar	p <sup>1</sup>
EDAD	- 0,00	0,01	0,954
ESTACIONALIDAD (Verano vs. Invierno)	1,46	0,32	< 0,001
CLIMA (Valencia vs. Burgos)	3,29	0,44	< 0,001
IMC (Kg/m <sup>2</sup> )	- 0,03	0,05	0,508
%GC	0,03	0,03	0,318
HÁBITOS DE EXPOSICIÓN SOLAR			
Horas/día al aire libre en verano (10 AM- 16 PM)			
1 -3 horas	0,15	0,39	0,711
> 3 horas	-0,08	0,46	0,864
Actitud ante la exposición solar			
A veces	0,37	0,39	0,350
Lo buscan	0,17	0,50	0,735
Factor de protección solar (escala)			
≤ 20	- 0,25	0,66	0,711
20 - 40	- 0,07	0,51	0,895
≥ 40	0,11	0,48	0,816
INGESTA DE VITAMINA D (µg/día)	- 0,09	0,06	0,117
INGESTA DIARIA DE VITAMINA D (suficiente/insuficiente)	0,67	0,44	0,126

<sup>1</sup>Regresión lineal múltiple

Tabla 5.7.7.1. Influencia de las distintas variables en los niveles séricos de 25(OH)D libre

Las variables independientes incluidas en el análisis de regresión lineal múltiple cuyos resultados se muestran en las tablas 5.7.7.1. y 5.7.7.2., son numerosas, lo que puede llevar a estimaciones inestables si se confirma colinealidad entre las mismas. Por ello, a continuación se muestran los resultados del análisis de colinealidad, mediante el estudio de la tolerancia (1/VIF) y del factor de incremento de tolerancia (VIF-Variance inflation), tanto para los niveles de 25(OH)D total, como para los de 25(OH)D libre:

	25(OH)D total (ng/mL)	
	VIF	1/VIF
EDAD	1,35	0,743
ESTACIONALIDAD (Verano vs. Invierno)	1,10	0,909
CLIMA (Valencia vs. Burgos)	2,20	0,455
IMC (Kg/m <sup>2</sup> )	1,99	0,503
%GC	3,28	0,305
HÁBITOS DE EXPOSICIÓN SOLAR		
Horas/día al aire libre en verano (10 AM- 16 PM)		
1 -3 horas	1,62	0,618
> 3 horas	1,57	0,637
Actitud ante la exposición solar		
A veces	1,63	0,614
Lo buscan	1,52	0,658
Factor de protección solar (escala)		
No	1,64	0,611
≤ 20	2,19	0,46
20 - 40	2,35	0,426
≥ 40	1,11	0,898
INGESTA DE VITAMINA D (µg/día)	1,97	0,509
INGESTA DIARIA DE VITAMINA D (suficiente/insuficiente)	2,00	0,500

Tabla 5.7.7.3. Análisis de colinealidad de las variables independientes sobre los niveles de 25(OH)D total

	25(OH)D libre (pg/mL)	
	VIF	1/VIF
EDAD	1,34	0,746
ESTACIONALIDAD (Verano vs. Invierno)	1,08	0,924
CLIMA (Valencia vs. Burgos)	2,18	0,458
IMC (Kg/m <sup>2</sup> )	1,97	0,507
%GC	3,23	0,310
HÁBITOS DE EXPOSICIÓN SOLAR		
Horas/día al aire libre en verano (10 AM- 16 PM)		
1 -3 horas	1,61	0,621
> 3 horas	1,56	0,640
Actitud ante la exposición solar		
A veces	1,63	0,613
Lo buscan	1,51	0,661
Factor de protección solar (escala)		
No	1,65	0,607
≤ 20	2,18	0,459
20 - 40	2,36	0,423
≥ 40	1,11	0,899
INGESTA DE VITAMINA D (µg/día)	1,94	0,516
INGESTA DIARIA DE VITAMINA D (suficiente/insuficiente)	1,98	0,505

Tabla 5.7.7.4. Análisis de colinealidad de las variables independientes sobre los niveles de 25(OH)D libre

Una vez eliminadas aquellas variables con mayor evidencia de colinealidad (%GC y los diferentes factores de protección solar), se muestran a continuación los resultados del proceso de regresión por pasos, y en concreto, de exclusión por pasos (Backward stepwise selection):

	25(OH)D total (ng/mL)		
	Coefficiente	Error estándar	p <sup>1</sup>
ESTACIONALIDAD (Verano vs. Invierno)	5,40	0,84	< 0,001
CLIMA (Valencia vs. Burgos)	3,10	0,85	< 0,001
IMC (Kg/m <sup>2</sup> )	- 0,23	0,10	0,024
Factor de protección solar (Sí/No)	- 2,05	1,10	0,063

Tabla 5.7.7.5. Método de Backward stepwise para los niveles de 25(OH)D total

	25(OH)D libre (pg/mL)		
	Coefficiente	Error estándar	p <sup>1</sup>
ESTACIONALIDAD (Verano vs. Invierno)	1,49	0,30	< 0,001
CLIMA (Valencia vs. Burgos)	3,38	0,30	< 0,001

Tabla 5.7.7.7. Método de Backward stepwise para los niveles de 25(OH)D libre

Con la selección del mejor modelo predictivo para las concentraciones séricas de 25(OH)D total y libre, se muestran los resultados del análisis de la influencia de estas variables sobre dichos niveles:

	25(OH)D total (ng/mL)		
	Coefficiente	Error estándar	p <sup>1</sup>
ESTACIONALIDAD (Verano vs. Invierno)	5,37	0,82	< 0,001
CLIMA (Valencia vs. Burgos)	3,14	0,83	< 0,001
IMC (Kg/m <sup>2</sup> )	-0,24	0,10	0,017
Factor de protección solar (Sí/No)	-2,06	1,09	0,060

<sup>1</sup>Regresión lineal múltiple

Tabla 5.7.7.7. Influencia de los predictores sobre los niveles séricos de 25(OH)D total

	25(OH)D libre (pg/mL)		
	Coefficiente	Error estándar	p <sup>1</sup>
ESTACIONALIDAD (Verano vs. Invierno)	1,41	0,29	< 0,001
CLIMA (Valencia vs. Burgos)	3,46	0,29	< 0,001

<sup>1</sup>Regresión lineal múltiple

Tabla 5.7.7.8. Influencia de los predictores sobre los niveles séricos de 25(OH)D libre

DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

## 6. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

### MUESTRA

Para valorar la influencia de la estacionalidad en los niveles séricos de vitamina D en población sana española, y cumplir así uno de los objetivos de este trabajo, seleccionamos dos provincias: Burgos y Valencia, y dos momentos anuales diferentes: tras el periodo estival (octubre – noviembre) y tras el periodo invernal (marzo – abril). La forma más adecuada y fiable de determinar el grado de dicha influencia es realizar medidas intrasujeto en ambas estaciones. Para ello, sería fundamental que los mismos sujetos que participaran en los meses invernales lo hicieran también en los meses estivales, dentro de la programación del proyecto. Conseguir esto en ambas ciudades es muy difícil, puesto que se trata de donantes de sangre que no necesitan programar su visita a estos centros para poder realizar la donación. La consecuencia de que esto no ocurriera sería la pérdida de demasiada información. Por ello, decidimos que sujetos diferentes pudieran participar en ambas recogidas de datos. Para que esto no supusiera un sesgo importante, controlamos las variables que pudieran interferir en los resultados, a través de los cuestionarios que todos los participantes completaron. Estas variables son: Edad, sexo, residencia habitual, obesidad (IMC), dieta y hábitos de exposición solar. Además, para asegurar que este sesgo quedaba reducido lo máximo posible, durante los dos periodos en los que desarrollamos las recogidas de muestras, se permitió participar a todos los sujetos que cumplieran las condiciones de inclusión. Así, obtuvimos en Valencia un total de 190 sujetos, mientras que en Burgos reclutamos a 101 personas. Puesto que el tamaño muestral estimado era de 206 sujetos, cálculo que asumía un 10% de posibles pérdidas, no realizamos ninguna operación con los participantes de Burgos. Sin embargo, ya que en Valencia obtuvimos casi 190 sujetos más de los necesarios, realizamos una aleatorización con el programa estadístico Stata/IC14. De esta forma, y al menos en esta población, disminuimos aún más ese posible sesgo.

Cabe destacar con respecto al cálculo del tamaño muestral, que asumimos una potencia del 90%. El mínimo aceptado, y a su vez el más utilizado, en investigación biomédica es una potencia del 80% <sup>(182)</sup>. Por lo tanto, nuestra muestra tiene una elevada probabilidad de detectar una diferencia cuando realmente exista. Es decir, tiene una elevada potencia.

Finalmente, la muestra real del estudio estuvo constituida por un total de 206 sujetos, de los cuales 112 participaron en el periodo invernal, 60 de ellos procedentes de Burgos y 52 de Valencia, y 94 participaron en el periodo estival, 41 de ellos procedentes de Burgos y 53 de Valencia.

La tabla 5.1.2. muestra los datos perdidos para cada variable considerada en el estudio, y en todas ellas el porcentaje de datos perdidos y/o desconocidos es muy inferior al 10%, por lo que se puede considerar que el número de sujetos participantes es suficiente para resolver los objetivos buscados en este estudio.

Puesto que el objetivo del análisis de las muestras de los participantes era reflejar los valores de vitamina D durante el verano y el invierno, la elección de los momentos de su recogida se ha basado en las fechas de fin del verano, 22 de septiembre, y de fin del invierno, 20 de marzo. Teniendo en cuenta además la semivida del metabolito 25(OH)D, que es de tres semanas.

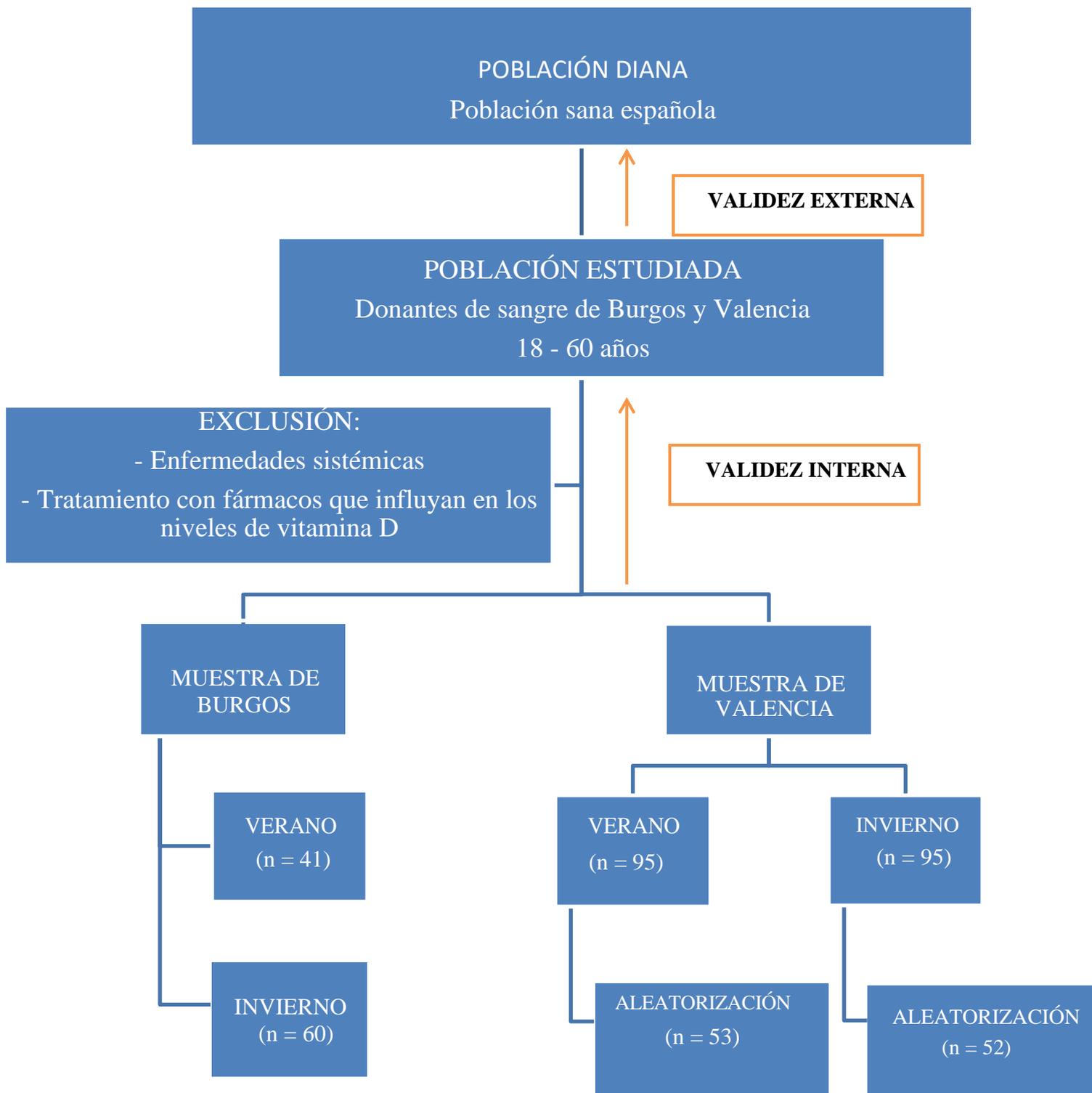


Figura 6.1. Diagrama de flujo con la población a estudio y tamaño de muestra, validez externa e interna del estudio

## DATOS DEMOGRÁFICOS

Los participantes del estudio procedían de dos poblaciones diferentes: Burgos y Valencia, siendo, en cada caso, la residencia habitual del 92,23% de todos ellos. En Burgos, 90 de los participantes (89,11%) confirman que esta provincia es su residencia habitual, para 5 (4,95%) su residencia temporal, y 2 (1,98%) fueron turistas. Mientras que, en Valencia 100 sujetos (95,24%) afirman que esta provincia es su residencia habitual, 3 (2,86%) habitan en ella como residencia temporal, y 2 (1,90%) fueron turistas. Esto demuestra que los resultados obtenidos en este estudio son un reflejo de las características propias de ambas poblaciones.

La edad media de los sujetos fue de  $40,97 \pm 12,35$  años. Muy similar entre ambas poblaciones, en Valencia fue de  $41,41 \pm 13,67$  años, y en Burgos de  $40,49 \pm 10,79$  años. Esta media de edad refleja que el estudio se ha desarrollado en sujetos jóvenes, además de sanos, por lo que cabría esperar unos niveles adecuados de vitamina D. Estudios desarrollados en población más anciana, como el elaborado por Vaquerio et al. <sup>(183)</sup> en mayores de 64 años muestran unos porcentajes de sujetos con hipovitaminosis muy elevados, explicándolo, al menos en parte, por hábitos de exposición solar poco frecuentes, así como por ingestas de vitamina D inferiores a lo indicado en este grupo de edad ( $> 10 \mu\text{g}/\text{día}$ ). Nuestros sujetos, en cambio, sólo por su edad es esperable que presenten unos hábitos de exposición solar más favorables, como se ha mostrado en los resultados y se discutirá a continuación, y requerirán ingestas sólo superiores a  $5 \mu\text{g}/\text{día}$  en un alto porcentaje, pues prácticamente un 75% de la muestra presentan una edad inferior a 50 años. Otra característica importante de las poblaciones de edad avanzada, que no se debe olvidar cuando se estudia el estatus de vitamina D, es que la cantidad de 7-dehidrocolesterol en la piel disminuye a medida que se cumplen años. De hecho, como ya se ha mencionado en este trabajo, los depósitos de este precursor de la vitamina D en un individuo de 70 años son aproximadamente un 20 – 25% de los que se encuentran en un sujeto de 20 años. Esta situación supondría también que la muestra de este estudio reflejara unos niveles adecuados de 25(OH)D, o al menos mucho más elevados que los que muestran estudios como los mencionados.

También fue muy similar en ambas poblaciones el porcentaje de participación por sexo. En total participaron 122 hombres (59,22%) y 84 mujeres (40,78%). En Valencia participaron 62 hombres (59,05%) y 43 mujeres (40,95%), y en Burgos 60 hombres (59,41%) y 41 mujeres (40,59%). Estos resultados reflejan la realidad de los Donantes de Sangre, pues el porcentaje de hombres es superior al de mujeres. En Burgos, durante todo el 2018, se realizaron un total de 12.139 donaciones, de las cuales 7.278 fueron de hombres (59,96%) y 4.861 de mujeres (40,04%) <sup>(184)</sup>. En Valencia, se realizaron en el mismo año 168.364 donaciones, de las cuales 104.386 (62,01%) fueron de hombres, y 63.978 de mujeres (37,99%) <sup>(185)</sup>.

Los datos demográficos de los sujetos en ambas poblaciones son, por tanto, similares. Es por ello, que no se espera que la edad o el sexo puedan generar sesgos en los resultados.

## DATOS ANTROPOMÉTRICOS

Como puede observarse en las tablas 5.3.1. y 5.3.2, los datos antropométricos básicos (altura, peso e IMC) de ambas poblaciones son muy similares.

Los métodos de obtención del %GC en ambas poblaciones son diferentes, en Burgos se obtiene a partir de un estudio de BIA, mientras que en Valencia se ha realizado mediante el registro de pliegues cutáneos. Aunque en el inicio del proyecto, el estudio antropométrico no se planteó de esta manera, la falta de disponibilidad de aparatos BIA, lo suficientemente similares en ambos lugares como para asegurar la ausencia de sesgos, llevó a un cambio de planes. Teniendo en cuenta que ambas poblaciones son muy parecidas en cuanto a datos demográficos, se decidió que esta problemática podía transformarse en una oportunidad. Estudiar cada población por separado, con estudios antropométricos distintos, seguía ofreciendo unos tamaños de muestra aceptables para obtener resultados fiables, de más de 100 sujetos por población a estudio. Diversos estudios han comparado las múltiples maneras que existen de obtener el %GC, así como el grado de concordancia entre dicho %GC y el IMC, y esta comparación se convirtió en una variable más de nuestro estudio.

Al analizar la correlación entre el IMC y los %GC encontramos que, en Burgos, donde el %GC se había obtenido con un estudio de impedancia bioeléctrica, el coeficiente de correlación de Pearson muestra una correlación positiva, de 0,680, estadísticamente significativa. Diferenciando por sexo, los coeficientes encontrados son muy similares y también estadísticamente significativos, de 0,840 para las mujeres y de 0,780 para los hombres.

La impedancia bioeléctrica es una técnica ampliamente estudiada y validada para conocer de forma certera la composición corporal. En nuestro estudio, aunque la correlación entre el %GC<sub>BIA</sub> y el IMC resulte positiva y estadísticamente significativa, no muestra una relación intensa entre ambas variables. Esto se puede explicar, por un lado, por las limitaciones ya explicadas del IMC, pero por otro, porque no debemos obviar el hecho de que la impedancia bioeléctrica deba hacerse en unas condiciones que en nuestro estudio han sido imposibles de cumplir, como es el ayuno en las 4 horas previas a la realización del estudio. Como ya se ha explicado previamente, esta condición en donantes de sangre ni puede, ni debe cumplirse, ya que es necesario que antes y durante la donación, los sujetos se encuentren correctamente nutridos y, sobre todo, bien hidratados. Por ello, esto puede resultar una limitación en nuestros resultados. Aun así, es importante resaltar que dicha limitación produce un error sistemático, que se distribuye igual en todos los sujetos.

En Valencia el coeficiente de correlación de Pearson entre el IMC y el %GC, mostrados en la tabla 5.3.3., en el estudio de la totalidad de los sujetos, también resultó positivo. Dicho porcentaje se había calculado a partir del pliegue tricípital, con la ecuación de Siri y de Brozec, aunque reflejó una correlación menos intensa (0,458 para ambas ecuaciones) que los resultados de Burgos. Que el coeficiente de correlación coincida con ambas ecuaciones es lo más razonable, ya que utilizan los mismos parámetros y tan sólo difieren en una constante. Al estudiar a hombres y mujeres por separado, este coeficiente, para ambas ecuaciones, es más intenso en hombres, 0,601 y 0,444 respectivamente, siendo ambos resultados estadísticamente significativos.

La tabla 5.3.3. también muestra el análisis del coeficiente de correlación de Pearson entre el IMC y el %GC<sub>Brazo</sub>, calculado a partir del pliegue tricípital y la circunferencia braquial. Éste es

prácticamente nulo, tanto en el global de sujetos, 0,045, como diferenciando por sexo, 0,271 en hombres y – 0,032 en mujeres, y no resulta estadísticamente significativo en ningún caso.

En el estudio de Vicente Martín Moreno et al. <sup>(161)</sup>, donde se estudiaba la correlación entre estos mismos métodos de obtención del %GC (ecuación de Siri: %GC<sub>Siri</sub>; ecuación de Brozec: %GC<sub>Brozec</sub>; y área adiposa del brazo: %GC<sub>Brazo</sub>), y el IMC, todos los resultados fueron estadísticamente significativos, pero la relación menos intensa fue entre el IMC y el %GC<sub>Brazo</sub>. Con los datos de nuestro estudio no es posible saber la razón por la que la introducción del dato antropométrico de la circunferencia braquial disminuye la correlación entre las variables, ya que es posible que se deba incluso a la propia fórmula utilizada para obtener el resultado del área adiposa del brazo.

Tras el análisis de estos resultados, podemos afirmar que la correlación entre el %GC y el IMC resulta más intensa cuando el %GC se ha obtenido a partir de un estudio de impedancia bioeléctrica, que a partir de las ecuaciones obtenidas con los datos antropométricos del pliegue tricipital y la circunferencia braquial.

La tabla 5.3.4. muestra el CCI, utilizado para valorar la concordancia entre las técnicas empleadas para obtener el %GC en la población procedente de Valencia (ecuación de Siri y Brozec, a partir del dato de pliegue tricipital, y el área adiposa del brazo, a partir del mismo pliegue junto con la circunferencia braquial). Este coeficiente muestra una correlación positiva, pero sólo alcanza un valor superior a 0,75 al estudiar la concordancia entre la ecuación de Siri y la de Brozec, por lo que es la única concordancia que puede ser clasificada como buena. Estos resultados concuerdan con los obtenidos con el coeficiente de correlación de Pearson. Los resultados de diversos estudios avalan los encontrados aquí entre la ecuación de Siri y la ecuación de Brozec, como, por ejemplo, el desarrollado por Martín Moreno et al. <sup>(161,162)</sup>.

Al estudiar el CCI distinguiendo por sexo, hay una clara diferencia entre los resultados obtenidos en los hombres y en las mujeres. Este coeficiente resulta muy superior en el subgrupo de hombres, pero al igual que los resultados de analizar a todos los sujetos juntos, sólo puede clasificarse como “buena correlación intraclase” la comparación entre la ecuación de Siri frente a Brozec. En algunos estudios, como el de Portao et al. <sup>(186)</sup> el CCI entre estas técnicas es superior en la subpoblación de mujeres que en la de hombres. Sin embargo, en muchas de las publicaciones con metodología similar a la de nuestro estudio, el CCI refleja mucha más concordancia en los subgrupos de hombres que en los de mujeres, como en el de Marrodán Serrano et al. <sup>(187)</sup> y el de Martín Moreno et al. <sup>(161)</sup>. Nuestro estudio apoya por tanto los resultados obtenidos por estos últimos dos estudios pues, aunque bien es cierto que en los hombres el CCI no llega al 0,75, al comparar las ecuaciones de Siri y de Brozec con la del área adiposa del brazo, se queda muy cerca.

Además del CCI hemos realizado el estudio de Bland-Altman <sup>(179,180)</sup>, como segundo método para valorar la concordancia entre las técnicas de obtención del %GC en Valencia. Los resultados, que se muestran en la tabla 5.3.5., concuerdan con los obtenidos con el CCI, y es que los coeficientes de correlación de concordancia de Lin son muy similares a los CCI, es decir, apoyan las conclusiones extraídas de los resultados del estudio de los CCI.

Al realizar el método de Bland-Altman <sup>(179,180)</sup> es importante tener en cuenta que implica que se cumpla el supuesto de normalidad. Cuando esto no ocurre, los límites de acuerdo pueden verse

afectados.

Al utilizar Bland-Altman <sup>(179,180)</sup> para estudiar la concordancia entre la ecuación de Siri y la derivada del área adiposa de brazo, se concluye que no se cumple el supuesto de normalidad, ni en el estudio que incluye a la totalidad de sujetos, ni tampoco en el que incluye exclusivamente a los varones. Ocurre la misma situación al comparar la ecuación de Brozec con también, la derivada del área adiposa del brazo. En estos cuatro ejemplos, el coeficiente de correlación de Lin aporta un resultado similar a los CCI pero algo más bajo. En cualquier caso, el grado de correlación que muestra es bastante bajo.

Cabe destacar que, en casi todos los casos, a excepción de uno, donde se comparan las ecuaciones de Siri y Brozec con la del área adiposa del brazo, esta última sobreestima los valores obtenidos con las dos primeras.

Los únicos resultados de la aplicación de este método que muestran de manera fiable una buena concordancia entre dos ecuaciones en la obtención del %GC, derivan de la ecuación de Siri y de Brozec, al compararlas con la ecuación del área adiposa del brazo, pero sólo en el subgrupo de hombres. Esto apoya, de nuevo, todas las conclusiones extraídas de los resultados del CCI.

## HÁBITOS DE EXPOSICIÓN SOLAR

Los hábitos de exposición solar de cada población reflejan ciertas diferencias entre los lugares de origen, como se muestra en la tabla 5.4.1.

En el periodo estival, la mayoría, el 83,51%, de la población procedente de Burgos afirmó salir al exterior a diario, un 8,25% salía más de dos veces por semana, el 6,19% de una a dos veces por semana, y un 2,06% menos de una vez por semana. Además, en los días en los que estos sujetos disfrutaban del exterior, la mitad, un 52,58%, afirmaba pasar al aire libre, en las horas de máxima incidencia solar, entre una y tres horas; el 23,71% lo hacía menos de una hora, y el 23,71% más de tres horas. En dichas horas de exposición solar, un 15,46% de estos sujetos evitaban la exposición directa del sol, mientras que un 14,43% se exponía con la intención de ponerse morenos, y la gran mayoría, un 70,10%, lo hacía sólo a veces.

En cuanto a la población procedente de Valencia, prácticamente en su totalidad, el 96,19%, afirmaban salir al exterior todos los días, un 2,86% más de dos veces por semana, y tan sólo, el 0,95% de una a dos veces por semana. Ninguno de los participantes en el estudio salía menos de una vez por semana. En esos días, un 51,43% afirmaba permanecer entre una y tres horas en el exterior, en las horas de máxima incidencia solar; el 24,77% lo hacía menos de una hora, y un 23,81% más de tres horas. En estas horas de exposición solar, la mayoría, un 53,33% procuraba evitar la exposición directa al sol, mientras que un 17,14% lo practicaba a menudo con la intención de ponerse morenos, y un 29,52% lo realizaba sólo a veces.

Ante las preguntas sobre la vestimenta habitual en los meses de verano, ambas poblaciones contestaron de forma similar: en Burgos el 67,01% vestía con mayor frecuencia ropa de manga corta y pantalones también cortos, mientras que en Valencia este porcentaje aumentó al 81,90%. La manga corta y el pantalón largo fue el segundo tipo de vestimenta más utilizado en ambas poblaciones, en Burgos un 17,53% de los participantes lo describieron como su vestimenta más habitual, y en Valencia un 9,52%. El traje de baño y la ropa ligera veraniega supuso el tercer tipo de vestimenta más frecuente también en las dos poblaciones, pero con porcentajes diferentes: un 14,43% en Burgos, mientras que en Valencia un 4,76%. Por último, los pantalones largos y la manga larga, fue el tipo de vestimenta usado con menor frecuencia por ambas poblaciones: en Burgos un 1,03% y en Valencia un 3,81%.

Estos resultados reflejan que, a grandes rasgos, la población procedente de Valencia se expone más al sol en los meses estivales, tanto en cuanto a la frecuencia en días de la semana, como en cuanto a número de horas al día. Además, en Valencia, los sujetos afirmaban vestir prendas que favorecían la exposición solar de diversas partes del cuerpo, en mayor porcentaje que en Burgos.

El último aspecto consultado en esta encuesta fue el uso de fotoprotectores solares, factor influyente en la síntesis cutánea de 25(OH)D. Aquí se presentaron diferencias llamativas entre ambas poblaciones. Aunque sí coinciden en que la mitad de los encuestados en cada provincia, en Burgos el 42,55%, y en Valencia el 50,48%, afirmaron utilizar factores de protección solar altos, SPF > 40. En Burgos, un 34,04% de la población utilizaba factores de entre 21 – 40; un 15,96% factores ≤ 20; y tan sólo un 7,45% decían no utilizar ninguno. En cambio, en Valencia un 21,90% utilizaban factores entre 21 – 40, y un 5,71% ≤ 20. En comparación con Burgos, en Valencia hay un alto porcentaje de personas que afirman no utilizar ningún factor de protección

solar, un 21,90%.

## INGESTA DE VITAMINA D

En estos resultados se muestran y describen los datos recogidos en invierno y en verano sobre la ingesta de vitamina D, pero sería un error limitarlos a dichas épocas del año, ya que, en el cuestionario se pedía a los participantes que describieran “*la frecuencia con la que consumió cada alimento en el último año*”.

La decisión de realizar el CFCA considerando un año completo de consumo se basó, fundamentalmente, en el hecho de que las bases de datos de composición de alimentos no contemplan las variaciones estacionales que afectan a las cantidades presentes en los alimentos de múltiples sustancias, entre ellas, la vitamina D. Estas bases de datos reflejan el contenido medio anual de nutrientes en los distintos alimentos. Esto significa que los resultados recogidos en el CFCA son representativos de cada población a estudio, pero no de la estación del año.

Estos resultados se muestran en las tablas 5.5.1., 5.5.2. y 5.5.3. La ingesta media de vitamina D fue de  $6,45 \pm 3,90$   $\mu\text{g}/\text{día}$ . En ambas poblaciones, estos resultados fueron similares. En la muestra procedente de Burgos, la ingesta dietética media de vitamina D fue de  $6,09 \pm 3,83$   $\mu\text{g}/\text{día}$ , mientras que en la procedente de Valencia resultó en un  $6,77 \pm 3,95$   $\mu\text{g}/\text{día}$ .

La publicación más reciente del IOM sobre las recomendaciones de ingesta mínima diaria de vitamina D en adultos sanos, la fija en 5  $\mu\text{g}/\text{día}$  para personas entre 18 – 50 años, y en 10  $\mu\text{g}/\text{día}$  para mayores de 50 años <sup>(25)</sup>. Según esto, la tabla 5.5.7. muestra que del total de individuos de hasta 50 años, un 59,60% mantiene las cantidades recomendadas de ingesta de vitamina D. Sin embargo, esto se desploma en los mayores de 50 años, donde sólo un 13,73% muestra unas cantidades de ingesta adecuadas. Como era de esperar teniendo en cuenta los resultados de la ingesta media de colecalciferol en Burgos y Valencia (tablas 5.5.2. y 5.5.3.), al estudiar esta variable en ambos grupos de edad, los resultados en ambas poblaciones son muy similares (tablas 5.5.8. y 5.5.9.). En Burgos un 58,97% de los menores de 50 años ingieren una cantidad suficiente de vitamina D, y en los mayores de 50 años en cambio, tan sólo un 10,53% cumple con las ingestas diarias recomendadas. En Valencia los datos son similares, el 60,27% de los menores de 50 años cumplen con la ingesta diaria recomendada de colecalciferol, mientras que, de los mayores de 50 años, sólo el 15,63% cumplen con las recomendaciones.

Es evidente que la ingesta recomendada se cumple en mucha menor medida en los mayores de 50 años. Aun así, al analizar estos resultados es importante considerar el número de sujetos mayores de esa edad, pues es muy bajo en comparación con los menores de 50 años. Tenemos un total de 151 sujetos con edad igual o inferior a 50 años, mientras que los mayores de 50 años son 51. A pesar de que este grupo de edad representa sólo el 25% de la muestra, cumple los criterios de normalidad y homogeneidad de varianzas, por lo que no hay porqué presuponer un sesgo debido sólo al tamaño de muestra.

Al analizar las cantidades medias ingeridas de vitamina D por grupo de edad (tabla 5.5.4.) se observa que en los menores de 50 años el resultado es de  $6,62 \pm 4,00$   $\mu\text{g}/\text{día}$ , y en los mayores de 50 años de  $5,92 \pm 3,57$   $\mu\text{g}/\text{día}$ . Al comparar estos resultados (tabla 5.5.10.) entre sí no se observan diferencias estadísticamente significativas. Esto significa que el motivo por el que los mayores de 50 años cumplen con las ingestas recomendadas de vitamina D en un porcentaje tan bajo es que en ellas se duplica la cantidad mínima recomendada de ingesta de esta vitamina,

en comparación con los menores de 50 años, pero la población perteneciente a dicho grupo de edad no aumenta la ingesta de colecalciferol como debería, sino que la mantiene como venía haciendo antes de los 50 años. Por lo tanto, sería recomendable insistir en la importancia de una ingesta adecuada de vitamina D en este grupo de edad, más susceptible de incumplirla.

Cuando analizamos las cantidades medias ingeridas de colecalciferol en ambas poblaciones y grupos de edad, lo que se muestra en las tablas 5.5.5. y 5.5.6. obtenemos resultados similares. Los menores de 50 años en Burgos ingieren una cantidad media de  $6,27 \pm 3,68 \mu\text{g}/\text{día}$  en Burgos, y de  $7,00 \pm 4,31 \mu\text{g}/\text{día}$  en Valencia. En el subgrupo de los mayores de 50 años de edad, se observa una cantidad media de  $5,36 \pm 4,46 \mu\text{g}/\text{día}$  en Burgos, y de  $6,26 \pm 2,95 \mu\text{g}/\text{día}$  en Valencia. Resalta, una vez más, la similitud de las cantidades, tanto entre los grupos de edad como entre las poblaciones.

En la tabla 5.5.10. se describen los resultados del análisis de la comparación entre los resultados de la ingesta media de vitamina D en Burgos y en Valencia. Este análisis no es estadísticamente significativo, y la diferencia entre ambas poblaciones ( $0,70 \mu\text{g}/\text{día}$ ) tampoco resulta relevante. Este resultado concuerda con lo analizado anteriormente, puesto que, si las medias de la ingesta de vitamina D en ambas poblaciones son tan similares, no tendría sentido que el análisis de su comparación sí lo fuera.

Los gráficos 5.5.1. y 5.5.2. muestran las principales fuentes dietéticas de vitamina D en el total de la muestra y en cada estación y población, respectivamente. Se puede observar que las diferencias entre las poblaciones son mínimas. Destaca el pescado como fuente principal de esta vitamina, aportando en torno al 60% de la ingesta total de vitamina D.

El gráfico 5.5.3. muestra la frecuencia de consumo de los principales grupos de alimentos ricos en vitamina D recogidos en el CFCA. Aquí destacan los lácteos como el grupo de alimento más frecuentemente consumido, cubriendo cerca del 50% del consumo total de todos los grupos. Teniendo en cuenta el consumo tan elevado de estos alimentos, en comparación con los demás (pescado, carne, cereales y galletas, y otros como huevos o pasta), cabría esperar que este grupo fuera también la fuente dietética principal de vitamina D. La negativa a esta premisa se explica básicamente con dos hechos. Por un lado, que los lácteos que se incluían en el CFCA no tenían en cuenta aquellos alimentos enriquecidos con vitamina D. Hoy en día, muchas marcas de lácteos ofrecen entre sus productos distintos tipos de leche enriquecidas con calcio y vitamina D, y en estos alimentos la cantidad de colecalciferol se llega a decuplicar, en comparación con aquellas leches no enriquecidas, por lo que la ingesta de vitamina D, teniendo en cuenta la frecuencia de consumo de estos alimentos, puede cambiar, y mucho <sup>(147,154)</sup>. Por otro lado, la base de datos BEDCA <sup>(147)</sup>, utilizada para estudiar el contenido de vitamina D de los alimentos recogidos en el CFCA, muestra unas diferencias abismales en el contenido de colecalciferol por 100 g de producto entre distintos tipos de pescado, como el atún a la plancha con  $25 \mu\text{g}$ , el bonito en lata en aceite con  $23,8 \mu\text{g}$ , o el salmón ahumado con  $19 \mu\text{g}$ , y lácteos como la leche de vaca entera, con  $0,03 \mu\text{g}$ . Por lo tanto, aunque algunos de los pescados mencionados se consuman con mucha menos frecuencia que un vaso de leche, la cantidad aportada de vitamina D por este tipo de alimentos hace que se posicionen como la principal fuente dietética de colecalciferol. Otros estudios desarrollados con población española adulta también han llegado a esta misma conclusión <sup>(188-191)</sup>.

Aunque la ingesta de vitamina D demuestra una influencia mucho menor que la exposición solar sobre los niveles séricos de 25(OH)D, cabe destacar que, los resultados en cuanto a la ingesta diaria de esta vitamina son mucho mayores que en estudios similares. A través de la Universidad de Navarra, Zazpe et al. <sup>(192,193)</sup> desarrollaron un estudio que, entre diciembre de 1999 y febrero de 2008 había incluido a 19.057 sujetos sanos de diversas provincias españolas (en esa fecha aún estaba abierto), y evaluaba la ingesta de distintos nutrientes, entre ellos la vitamina D. Los resultados de este estudio muestran unas ingestas diarias de colecalciferol mucho más bajas que las que reflejan los participantes de presente estudio. Este es un dato más que consolida la gran importancia de la síntesis cutánea de vitamina D mediante los rayos UV, como forma predominante de síntesis de esta vitamina.

Cabe destacar que las encuestas desarrolladas para valorar los hábitos de exposición solar y la ingesta de vitamina D supusieron un desafío en este proyecto. En España, en el momento de la elaboración de este trabajo, no existía ninguna encuesta validada que recogiera los hábitos de exposición solar de población sana. Por otro lado, sí existen diversas herramientas validadas para valorar la ingesta de un determinado nutriente, o grupos de alimentos, pero el problema es que completarlas lleva tiempo, teniendo incluso que ocuparse el sujeto de desarrollarla durante varios días <sup>(194)</sup>. Estas opciones no eran factibles, teniendo en cuenta la naturaleza de este proyecto. Por ello, partiendo de otros trabajos, se realizaron dos encuestas: una para valorar los hábitos de exposición solar, y la otra para poder calcular la ingesta diaria de vitamina D. Para validarla, en septiembre de 2017 se reclutó a 95 sujetos de Donantes de Sangre en Burgos y se les pasaron estas encuestas. Con los resultados obtenidos, las dificultades observadas para completarlas, así como con las críticas recogidas, se pudieron elaborar las encuestas que finalmente fueron utilizadas en este trabajo.

## ANÁLISIS PARAMÉTRICO Y ESTÁNDAR DE NIVELES ÓPTIMOS DE 25(OH) VITAMINA D TOTAL

El análisis de las concentraciones de 25(OH)D total de la muestra completa de nuestro estudio (tabla 5.6.1.), excluyendo los valores atípicos, que recoge un total de 201 sujetos sanos españoles, muestra una concentración media de  $21,86 \pm 6,06$  ng/mL. Este resultado global, que no distingue de estaciones, ni poblaciones, ya permite vislumbrar un resultado importante del estudio, pues estamos trabajando con población sana española y su concentración media de colecalciferol es de poco más de 20 ng/mL. Es decir, se clasificaría como concentración insuficiente de vitamina D. Es más, cuando analizamos la concentración de 25(OH)D total en verano en ambas poblaciones, lo que incluye a 92 sujetos españoles sanos, obtenemos un resultado de  $24,56 \pm 5,86$  ng/mL. Por tanto, ni siquiera en las muestras recogidas tras el periodo estival (octubre – noviembre), momento en el que la síntesis de vitamina D será máxima, se llega a una concentración media de colecalciferol que pueda clasificarse como suficiente. Al analizar los resultados de las muestras recogidas en invierno, que incluyen a 109 sujetos españoles sanos, la concentración media de 25(OH)D total es aún más baja,  $19,64 \pm 5,28$  ng/mL. Se clasificaría como nivel deficiente. Aunque sí es de esperar que los niveles en invierno sean inferiores al verano, cosa que también ocurre con los resultados de la 25(OH)D libre (tabla 5.6.4.), destacan unos resultados tan bajos dentro de la clasificación de suficiencia más aceptada para esta vitamina, teniendo en cuenta que trabajamos con población sana española.

El análisis paramétrico de los niveles séricos de 25(OH)D total muestran una diferencia clara entre estaciones, en especial, en la población de Burgos.

Los niveles medios de 25(OH)D total en verano se encuentran, en las dos poblaciones, en torno a los 25 ng/mL, mientras que, en Valencia en invierno, el nivel medio de este metabolito es de 21,38 ng/mL, y en Burgos tan sólo de 17,66 ng/mL.

Teniendo como referencia el estándar de niveles óptimos ya mencionado, y extrapolando nuestros resultados a dicha clasificación, se puede comprobar también la influencia de la época del año en los niveles de vitamina D. Una vez más, esta diferencia es más evidente en la población de Burgos que en Valencia.

Estas diferencias entre las poblaciones son razonables considerando la climatología característica de cada localización. En un apartado posterior, se analizará esta variante.

Los mejores resultados, en cuanto a niveles suficientes de vitamina D, los refleja la población de Valencia en el verano, como era de esperar. Aquí, además de que la media de 25(OH)D total es la más alta del estudio, el porcentaje de sujetos con concentraciones séricas suficientes ( $\geq 30$  ng/mL) es también el más alto, 24,53%. Es destacable, que aún en este caso de máxima concentración de 25(OH)D total, el porcentaje de sujetos con niveles suficientes resulta bajo, tan sólo un 25% del total.

Al comparar el porcentaje de sujetos en la clasificación de niveles suficientes, insuficientes y deficientes de 25(OH)D total, se comprueba que en Burgos hay una diferencia estacional importante en cada nivel, mientras que en Valencia esto es más equitativo. También se comprueba que la diferencia entre poblaciones disminuye cuando se estudia el periodo estival, mientras que en el invernal se dispara.

El grupo más grande es en ambas estaciones y poblaciones es el correspondiente a los niveles insuficientes (20 - 30 ng/mL), reuniendo, aproximadamente, a la mitad de la población.

En todos los casos, el porcentaje de sujetos con niveles deficientes de 25(OH)D total, (< 20 ng/mL), es también llamativo. En el periodo estival incluye, aproximadamente, al 25% de la población. En el periodo invernal, en Valencia el porcentaje aumenta al 30,61%, pero en Burgos se dispara al 65%.

Teniendo en cuenta este estándar de niveles óptimos, las tablas 5.6.7. y 5.6.8. muestran los cambios en dicha clasificación entre el verano y el invierno. En Burgos, tabla 5.6.7., estos cambios resultan estadísticamente significativos, mientras que, en Valencia, tabla 5.6.8., esta evolución no llega a ser estadísticamente significativa. Es cierto que las diferencias estacionales están mucho más marcadas en la población procedente de Burgos, lo cual, teniendo en cuenta la diferente climatología, era una conclusión esperable.

Estos resultados se amplían en el punto 5.7.1., donde se describe la influencia de la estacionalidad en los niveles séricos de 25(OH)D.

Estos resultados son similares a los obtenidos en estudios parecidos. En el trabajo desarrollado por M. Rodríguez García et al. <sup>(195)</sup>, que estudia una muestra aleatoria de sujetos españoles de entre 54 y 89 años de edad, el porcentaje de sujetos con concentraciones de 25(OH)D total  $\leq$  18 ng/mL es mayor al 70% en invierno. Las concentraciones medias obtenidas fueron de 19,4 ng/mL en verano/otoño, y de 13,7 ng/mL en invierno/primavera.

En Barcelona, González Solanella et al. <sup>(196)</sup> realizaron un estudio en un centro de salud urbano con 94 mujeres de entre 15 y 50 años de edad. Los resultados una concentración media de 25(OH)D total de 14,0 ng/mL, presentando valores deficientes el 47,9% de la población, e insuficientes el 37,2%.

En Córdoba, Mata-Granados et al. <sup>(197)</sup> reclutaron entre abril y mayo a 215 sujetos provenientes de donantes de sangre. El valor medio de 25(OH)D total se mantuvo en 11,62 ng/mL.

En Estados Unidos se desarrolló entre 2001 – 2004 el estudio NHANES (National Health and Nutrition Examination Survey), que evaluaba las asociaciones de los niveles séricos de vitamina D y la enfermedad arterial periférica, analizando los datos de 4.839 pacientes. En este estudio, un 29,86% de los participantes mostraron unos niveles de 25(OH)D total < 17,8 ng/mL, y el 80,39% tenían niveles < 29,1 ng/mL <sup>(67)</sup>.

Resultados como los descritos han llevado a plantear que se esté sobreestimando la prevalencia del estado de insuficiencia y/o deficiencia de vitamina D <sup>(198)</sup>.

En cuanto a los cambios estacionales, en todos los estudios mencionados que desarrollan este análisis, la evolución estacional de la 25(OH)D total resulta estadísticamente significativa: M. Rodríguez García et al. <sup>(195)</sup>, González Solanella et al. <sup>(196)</sup>, González-Molero et al. <sup>(199)</sup>, Lips et al. <sup>(200)</sup>, Pérez-Llamas et al. <sup>(201)</sup>, Mendoza et al. <sup>(202)</sup>. Esto refleja una evidencia de la vitamina D, que la síntesis cutánea es la principal fuente de obtención de esta vitamina.

Los resultados de 25(OH)D libre son más complejos de analizar ya que hay muy pocos estudios que hayan trabajado con este analito. Por ello, actualmente no existe una clasificación de niveles suficientes e insuficientes. Aun así, nuestros resultados reflejan con claridad una diferencia estacional y poblacional.

## CORRELACIÓN ENTRE LAS TÉCNICAS ANALÍTICAS

El análisis de la correlación entre los niveles de 25(OH)D total y 25(OH)D libre muestra una relación estadísticamente significativa en todos los niveles estudiados, tanto en el total de la muestra, como en ambas poblaciones y estaciones. Sin embargo, el coeficiente de correlación resulta bajo.

De manera global, al estudiar todos los resultados obtenidos en cuanto a la correlación entre ambas técnicas (tablas 5.6.11., 5.6.12. y 5.6.13), los mejores resultados los encontramos en el análisis conjunto de ambas poblaciones (tabla 5.6.11.). Esto podría ser debido a que este análisis implica una muestra mayor que cualquiera de los análisis de cada población por separado, lo que puede llevar a una muestra menos sesgada, pues cualquier diferencia entre los individuos del estudio se verá más diluida.

Cuando estudiamos por separado los resultados de esta posible correlación en las dos poblaciones del estudio, parece que el coeficiente adquiere más potencia cuanto mayores son los niveles de 25(OH)D total. Una teoría para explicarlo es que la 25(OH)D libre refleje mejor el estado real de suficiencia o insuficiencia de vitamina D en el organismo que la 25(OH)D total. Por ello, cuanto más se desploma este último metabolito, más estable se mantiene la 25(OH)D libre, y, por tanto, menor es la correlación entre ambos analitos.

Esta teoría, concuerda con la extrapolada del estudio desarrollado por Aloia et al. <sup>(111)</sup>, que analiza los niveles séricos de 25(OH)D total y 25(OH)D libre en muestras de individuos de diferente raza, y concluye que en la raza negra los niveles de 25(OH)D total son más bajos que en los caucásicos, mientras que los niveles de 25(OH)D libre se mantienen prácticamente iguales en ambas poblaciones. Considerando, además, que otros biomarcadores relacionados con el estado de vitamina D (calcio, PTH, ...) son similares en ambas razas, e incluso superiores en la raza negra, parece que los niveles de 25(OH)D libre podrían mostrar mejor el estado fisiológico real de la vitamina D que los niveles de 25(OH)D total.

En cualquier caso, es importante tener presente las limitaciones de estos análisis. Actualmente, las técnicas analíticas de obtención de niveles séricos de 25(OH)D total, incluyendo la desarrollada en este trabajo, se hallan ampliamente estudiadas y automatizadas, por lo que sus resultados son fiables. Sin embargo, la técnica analítica de obtención de niveles séricos de 25(OH)D libre es un ELISA que debe realizarse manualmente, lo cual, siempre conlleva una mayor susceptibilidad a errores.

La falta de estudios con esta técnica ha hecho que no podamos comparar nuestros resultados con un patrón o, simplemente, con resultados obtenidos a partir de muestras provenientes de una población similar a la nuestra. Si partimos de los resultados obtenidos por Aloia et al. <sup>(111)</sup>, que desarrollaron un estudio en mujeres sanas postmenopáusicas en Estados Unidos, los niveles de 25(OH)D libre obtenidos en nuestro trabajo, en concreto en la población procedente de Burgos, resultan muy similares; mientras que, en la población procedente de Valencia, estos niveles son más elevados en nuestro estudio. Estos resultados parecen coherentes, ya que las similitudes entre ambos estudios se desprenden, de forma equitativa, tanto de los niveles de 25(OH)D libre como de los de 25(OH)D total:

	VALENCIA		BURGOS		Aloia et al. <sup>(111)</sup>
	Verano	Invierno	Verano	Invierno	
25-(OH)D LIBRE (pg/mL) media ± DS	8,97 ± 2,82	7,23 ± 2,44	5,01 ± 1,25	4,08 ± 0,66	5,25 ± 1,25
25-(OH)D TOTAL (ng/mL) media ± DS	25,99 ± 6,87	21,38 ± 3,77	24,31 ± 5,25	17,66 ± 5,04	23,26 ± 6,71

Tabla 6.1. Concentraciones de 25(OH)D total y libre en las poblaciones de nuestro estudio y en las del trabajo de Aloia et al.<sup>(111)</sup>

Como resumen sobre el resultado de la correlación entre los niveles de 25(OH)D total y libre se puede afirmar que sí, ambas técnicas demuestran una correlación positiva entre ellas.

## INFLUENCIA DE LAS DISTINTAS VARIABLES EN LOS NIVELES SÉRICOS DE VITAMINA D:

### INFLUENCIA DE LA ESTACIONALIDAD Y DEL CLIMA

La diferencia de climatología entre el periodo estival y el invernal incluye diferencias en las horas de luz, así como en la temperatura exterior, lo que implica a su vez, el uso de prendas de vestir apropiadas para cada estación, condicionando diferencias en las partes del cuerpo expuestas a la luz solar en ambas estaciones.

Esta diferencia estacional se produce en toda la Península Ibérica, por lo que debería reflejarse en los resultados de los niveles de vitamina D, tanto en la población procedente de Burgos como en la procedente de Valencia, aunque en Burgos la diferencia sea más marcada.

La Agencia Estatal de Meteorología (AEMET) dispone de un archivo con distintos datos climatológicos registrados en cada provincia española entre 1981 y 2010. Denominan a estos datos: “Valores climatológicos normales” <sup>(203)</sup>, y para Burgos y Valencia muestran:

	Burgos	Valencia
Temperatura media anual (°C)	10,7	18,3
Temperatura media periodo estival (°C)		
Temperatura media julio	19,5	25,6
Temperatura media Agosto	19,5	26,1
Temperatura media septiembre	16,1	23,5
Temperatura media octubre	11,5	19,7
Temperatura media periodo invernal (°C)		
Temperatura media enero	3,1	11,8
Temperatura media febrero	4,1	12,5
Temperatura media marzo	7,0	14,4
Temperatura media abril	8,6	16,2

Tabla 6.2. Temperaturas medias en Burgos en los meses estivales e invernales, así como en los periodos de recogida de muestras (septiembre, octubre, marzo y abril)

La AEMET también dispone de las temperaturas máximas y mínimas registradas diariamente, así como de las horas de luz detectadas con un heliógrafo:

	Burgos		Valencia	
	Temperatura MÁXIMA media (°C)	Temperatura MÍNIMA media (°C)	Temperatura MÁXIMA media (°C)	Temperatura MÍNIMA media (°C)
Periodo estival				
Julio 2018	27,4	12,8	30,5	22,3
Agosto 2018	28,7	12,2	31,0	23,7
Septiembre 2018	26,6	10,6	28,3	21,0
Octubre 2018	17,3	5,6	23,6	15,4
Periodo invernal				
Enero 2018	7,5	0,2	18,3	9,1
Febrero 2018	6,2	-2,0	15,2	6,6
Marzo 2018	9,6	1,6	19,9	10,7
Abril 2018	15,4	4,5	21,7	12,8

Tabla 6.3. Temperaturas máximas y mínimas medias mensuales registradas en Burgos y Valencia en los periodos del estudio

	Burgos	Valencia
Media de las horas de sol registradas		
Enero 2018	2,80	6,11
Febrero 2018	3,39	5,52
Marzo 2018	3,55	6,52
Abril 2018	5,69	7,07
Julio 2018	10,46	9,84
Agosto 2018	11,56	8,31
Septiembre 2018	10,15	7,34
Octubre 2018	5,63	6,86

Tabla 6.4. Horas de luz registradas en Burgos y Valencia en los periodos de estudio

Los datos recogidos en las tablas anteriores (6.2., 6.3. y 6.4.) muestran una diferencia importante entre las temperaturas habituales medias de Burgos y Valencia, así como entre las máximas y las mínimas registradas durante el periodo de estudio. Esto supone que el clima en Valencia permite el uso de ropa más ligera, y por tanto la exposición solar de distintas partes del cuerpo. Y esto se puede producir no sólo en verano, sino durante prácticamente todo el año. Por otro lado, en Burgos las diferencias de horas de luz entre el periodo estival y el invernal están mucho más marcadas que en Valencia, donde se mantienen bastante constantes durante todo el año. Ambas conclusiones ayudan a entender la diferencia en los resultados de los niveles séricos de vitamina D en ambas poblaciones.

Teniendo en cuenta, las horas de luz mensuales a lo largo de todo el 2018 en Valencia, así como las temperaturas registradas en este periodo, es razonable que las diferencias estacionales en los niveles séricos de vitamina D no sean importantes. Por el contrario, Burgos muestra unas diferencias climatológicas mucho más marcadas entre el periodo estival y el invernal, tanto en las temperaturas como en las horas de luz registradas. Por ello, también es razonable que las muestras procedentes de esta población sí reflejen unas diferencias mucho más claras en los niveles séricos de vitamina D.

Estas conclusiones también se reflejan en los resultados de la clasificación del estado de suficiencia, insuficiencia y deficiencia de 25(OH)D de las muestras procedentes de Burgos y Valencia en los periodos de estudio, lo que se observa en las tablas 5.6.7. y 5.6.8. Así, esta clasificación muestra unos resultados muy similares entre ambas poblaciones cuando las muestras se obtuvieron tras el verano. Sin embargo, de las muestras obtenidas tras el invierno, en Burgos ninguna llega al estado de suficiencia, mientras que en Valencia un 6,12% lo consigue. En cambio, un 65% de las muestras de Burgos presentan niveles deficientes, mientras que en Valencia tan sólo lo hace un 30,61%.

Esto refuerza la teoría que dicta que para sintetizar una cantidad adecuada de vitamina D, unos pocos minutos de exposición de luz solar en cara y brazos son suficientes.

La tabla 5.7.1.1. muestra los resultados del análisis de la influencia de la estacionalidad en los niveles séricos de vitamina D.

Las concentraciones séricas de 25(OH)D mostraron diferencias estadísticamente significativas entre el verano y el invierno, tanto en el total de la muestra, como en Burgos y en Valencia por separado. Esto se reflejó además en ambos analitos, 25(OH)D total y 25(OH)D libre.

Puesto que la principal fuente de vitamina D es la síntesis cutánea a partir de la luz solar, y que ésta muestra grandes diferencias entre el verano y el invierno, era de esperar que estos resultados fueran significativos y concluyentes.

Diversos estudios desarrollados en población española muestran diferencias similares a las de nuestro proyecto, cuando se valora la influencia de la estacionalidad en las concentraciones séricas de vitamina D, como los mencionados en el apartado anterior: *ANÁLISIS PARAMÉTRICO Y ESTÁNDAR DE NIVELES ÓPTIMOS DE 25(OH) VITAMINA D TOTAL*, así como el desarrollado por Fernández Moreno et al. <sup>(204)</sup> en pacientes adultos atendidos desde Atención Primaria. Esto también se ve reflejado en otros estudios internacionales, muchos desarrollados en países soleados tan distintos como Argentina, Brasil, Italia o Irán <sup>(205-209)</sup>. Por lo tanto, nuestro estudio también refleja la importancia de la luz solar en la síntesis de la vitamina D.

La tabla 5.7.2.1. muestra la influencia de la climatología en los niveles séricos de vitamina D, comparando las concentraciones de 25(OH)D total y libre entre el invierno y el verano en el total de la muestra del estudio, así como en ambas poblaciones, Burgos y Valencia, por separado. Todas estas comparaciones resultan estadísticamente significativas, con una excepción: la comparación entre las concentraciones de 25(OH)D total durante el periodo estival.

La información suministrada por la AEMET refleja diferencias estacionales muy importantes cuando comparamos las regiones de Burgos y Valencia. Durante el invierno, estas diferencias están muy marcadas. De hecho, durante el primer trimestre del año 2018, año del desarrollo de este estudio, la media de las horas de luz registradas en Valencia prácticamente duplica las registradas en Burgos. En cuanto a las temperaturas, las máximas registradas en Valencia también duplican las obtenidas en Burgos en el mismo periodo, primer trimestre del 2018, y las mínimas las decuplica. Unas diferencias tan llamativas como las descritas, deben reflejarse en los niveles de vitamina D, y así lo han hecho en nuestro estudio. La diferencia entre ambas poblaciones en las concentraciones séricas de 25(OH)D total es estadísticamente significativa, y de aproximadamente 4 ng/mL, lo que resulta clínicamente relevante. En cuanto a esta diferencia con las concentraciones de 25(OH)D libre, también resulta estadísticamente significativa, con una mediana en los niveles de Valencia de casi el doble que los de Burgos, lo cual también resulta clínicamente relevante.

Cuando estudiamos el periodo estival, las diferencias climatológicas entre ambas poblaciones, aunque evidentes, son más sutiles. Las horas de luz en estos meses son muy similares en ambos lugares, siendo incluso algo superiores en Burgos. Las temperaturas máximas, aunque son mayores en Valencia, también resultan muy parecidas en ambas regiones. La mayor diferencia se observa en las mínimas, pues las registradas en Burgos son prácticamente la mitad que las registradas en Valencia. Aunque, cabe pensar, que esta observación no tiene mayor relevancia en los niveles de vitamina D, pues las temperaturas mínimas se darán durante la noche. Teniendo esto en cuenta, en el estudio de las diferencias entre las concentraciones séricas de vitamina D en Burgos y Valencia durante el verano, hay una discrepancia entre los resultados obtenidos a partir de la 25(OH)D total y la libre. Con la 25(OH)D total no se aprecian diferencias estadísticamente significativas entre ambas poblaciones, con tan sólo una diferencia en sus medias de 1,68 ng/mL. Esto podría sustentarse si consideramos que, durante el verano, las diferencias climatológicas entre Burgos y Valencia no son relevantes. Sin embargo, al realizar

este mismo análisis con las concentraciones de 25(OH)D libre, sí que aparece una diferencia estadísticamente significativa entre ambas poblaciones, con una diferencia de, aproximadamente, 3 pg/mL en sus medianas, lo que sí es clínicamente relevante. Para explicar este resultado se debe considerar que las diferencias climatológicas entre Burgos y Valencia sí son importantes.

Son necesarios estudios donde comparen los niveles de vitamina D en poblaciones con climas similares a Burgos y Valencia, para poder discernir la mejor teoría de las expuestas. Esto, supondría una evidencia en el uso de la 25(OH)D total o libre como analito preferente para reflejar el estado de suficiencia de vitamina D.

## INFLUENCIA DE LA LATITUD

Uno de los factores que puede afectar a la intensidad de la luz solar es la latitud geográfica y, en consecuencia, la síntesis cutánea de vitamina D también podría verse afectada por este factor.

La tabla 5.7.3.1. muestra las concentraciones séricas de 25(OH)D total y libre en función de la latitud. Y la tabla 5.7.3.2. muestra la influencia de la latitud en dichos niveles. En el análisis de ambos analitos, en las dos estaciones estudiadas, se encuentra una relación estadísticamente significativa.

La influencia más importante se observa en los niveles séricos de vitamina D obtenidos en invierno. Al comparar los dos analitos, se aprecia que la influencia de la latitud adquiere mucho más protagonismo con la 25(OH)D libre que con la total, pues la recta de regresión explica, en el caso de la 25(OH)D total tan sólo un 17,4% de la variación producida entre ambas poblaciones, mientras que en el caso de la 25(OH)D libre llega a ser del 43,8%.

Al estudiar las muestras obtenidas en periodo estival, la influencia de la latitud sobre los niveles de vitamina D pierde importancia. Para la 25(OH)D total es prácticamente irrelevante clínicamente, aunque resulta estadísticamente significativa; mientras que con la 25(OH)D libre permite explicar hasta un 39,6% de la variación entre poblaciones.

La diferencia observada entre el verano y el invierno concuerda con los resultados obtenidos en el estudio de la influencia del clima sobre los niveles de vitamina D. De hecho, es posible que ambos factores, clima y latitud, se superpongan, adquiriendo entre ambos mayor influencia en los niveles séricos de vitamina D.

Resulta llamativa la gran diferencia en estos resultados entre ambos analitos. Los resultados de los dos reflejan una influencia clara de la latitud en las concentraciones de vitamina D, pero en la 25(OH)D libre, ésta es mucho más intensa. Serán necesarios estudios similares, en regiones geográficas parecidas, para poder contrastar estos resultados.

## RELACIÓN ENTRE IMC Y %GC, Y ESTATUS DE VITAMINA D TOTAL

Al estudiar el IMC y el %GC según la clasificación de concentraciones séricas de vitamina D, encontramos que, tanto en el total de la muestra, como en Burgos y Valencia, y tanto en verano como en invierno, estos parámetros son más altos en los grupos con concentraciones de vitamina D más bajas, como reflejan las tablas 5.7.4.1., 5.7.4.2 y 5.7.4.3.

En la tabla 5.7.4.1., que muestra estos resultados en la población de Burgos y Valencia de forma conjunta, tan sólo se estudian los valores de IMC, puesto que este parámetro antropométrico se obtuvo de igual manera en ambas poblaciones, cosa que no ocurre con el %GC. Por ello, supondría un sesgo incluir en los mismos grupos sujetos con %GC obtenidos con técnicas diferentes (a partir del estudio de los pliegues en Valencia, y mediante BIA en Burgos). Esto ocurre en todos los análisis realizados en ambas poblaciones de forma conjunta. Estos resultados muestran una tendencia creciente de los valores del IMC a medida que pasamos del grupo de sujetos con concentraciones de 25(OH)D suficientes ( $\geq 30$  ng/mL) a insuficientes (20 – 30 ng/mL), y de éstos a las deficientes ( $< 20$  ng/mL). Esto se observa en todos los niveles del análisis, es decir, tanto en el total de la muestra del estudio, como en los sujetos correspondientes a cada estación por separado.

En Burgos, al analizar ambas estaciones, y en Valencia, al analizar los resultados correspondientes al invierno, aparecen diferencias especialmente llamativas, ya que, según la clasificación del IMC de la OMS, en el grupo con niveles de 25(OH)D total suficientes, el IMC medio se sitúa dentro del intervalo normal y, sin embargo, en el grupo con niveles de 25(OH)D total deficientes, el IMC medio se sitúa en el siguiente escalón, el sobrepeso, y en concreto, la preobesidad.

Estos resultados se solapan con los de diversas publicaciones que analizan la relación entre ambos parámetros, demostrando que en sujetos con sobrepeso u obesos, las concentraciones séricas de vitamina D son más bajas <sup>(86)</sup>.

Los estudios publicados que relacionan el IMC o los %GC con los niveles de 25(OH)D libre muestran resultados controvertidos. Algunos han demostrado una correlación positiva entre las concentraciones de VDBP y el IMC <sup>(210,211)</sup>, lo que puede conllevar una correlación negativa con los niveles de 25(OH)D libre. Por otro lado, y como ya se ha mencionado, diversos trabajos han demostrado una correlación positiva entre las concentraciones séricas de vitamina D total y parámetros relacionados con la obesidad (IMC, %GC). Esta teoría supone que, en estos en sujetos obesos, los niveles de vitamina D libre y, por tanto, la fracción biodisponible de esta vitamina, es más bajo que en sujetos con normopeso. Sin embargo, también se han publicado estudios como el de Szabó, B et al. <sup>(212)</sup>, en los que no se encuentra relación entre los niveles de 25(OH)D libre y el IMC, lo que contrasta con los anteriores.

Las tablas 5.7.4.4., 5.7.4.5. y 5.7.4.6 muestran la influencia del IMC y del %GC, con las distintas formas de obtención del mismo, en las concentraciones séricas de 25(OH)D total y 25(OH)D libre, en las poblaciones y periodos a estudio.

Las únicas relaciones estadísticamente significativas entre el IMC y las concentraciones séricas de vitamina D, se observan en el periodo estival al estudiar la 25(OH)D total en el total de la muestra y en la población de Valencia, y también en ambos periodos conjuntos en la muestra

de Valencia. Pero, en ningún caso, ni siquiera en los mencionados, la influencia de estos parámetros adquiere valores relevantes.

Estos datos antropométricos están muy influenciados por la edad y el sexo. Aunque es cierto que ambas variables se tienen en cuenta en las distintas ecuaciones de obtención del %GC, así como en los estudios de impedancia bioeléctrica, esto no ocurre con el IMC. Es por ello, que las tablas 5.7.4.7., 5.7.4.8. y 5.7.4.9. reflejan la influencia del IMC y el %GC, ajustando por la edad, en las concentraciones séricas de 25(OH)D total y libre, en ambos periodos y poblaciones a estudio; las tablas 5.7.4.10., 5.7.4.11. y 5.7.4.12. lo hacen ajustando por el sexo; y las tablas 5.7.4.13., 5.7.4.14. y 5.7.4.15. ajustando por ambas variables, sexo y edad. Los resultados no aportan información relevante, pues parece que considerar variables como la edad y el sexo, en la influencia del IMC y el %GC sobre los niveles de vitamina D no es relevante.

La última parte del análisis de los niveles de vitamina D en función del IMC y/o el %GC, estudia los valores de las concentraciones séricas de dicha vitamina en los sujetos con obesidad versus aquellos con unos parámetros antropométricos dentro del intervalo normal, según las clasificaciones aceptadas por la OMS. Las tablas 5.7.4.16. y 5.7.4.17. muestran este análisis considerando sólo dos tipos de sujetos: obesos frente a no obesos. Sin embargo, las tablas 5.7.4.18. y 5.7.4.19. dividen a los sujetos en tres grupos diferentes: no obesos, sujetos con sobrepeso y obesos. Aunque en la mayoría no se obtienen resultados estadísticamente significativos, al analizarlos todos en conjunto se obtiene una conclusión, que es que los sujetos clasificados dentro del sobrepeso y/o obesidad presentan niveles de 25(OH)D total y libre más bajos.

De dichas tablas, los resultados expuestos en la 5.7.4.17., y en concreto los que hacen referencia al total de la muestra, sin diferenciar población de origen, son los más llamativos y también los más sorprendentes. Al analizar las diferencias entre los niveles de 25(OH)D total, los sujetos con sobrepeso muestran un nivel algo superior que aquellos con normopeso. Aunque esto no concuerda con la teoría que dicta que el sobrepeso influye en la deficiencia de vitamina D, la diferencia en ambos grupos es tan pequeña y no alcanza significación estadística, por lo que no se puede extraer ninguna conclusión. Lo mismo ocurre en los resultados obtenidos de la población procedente de Valencia. Sin embargo, al analizar las concentraciones de 25(OH)D libre en el total de la muestra, sí que se obtiene una clara diferencia entre los sujetos con y sin sobrepeso, siendo muy superior en los primeros (7,43 pg/mL vs. 4,88 pg/mL). Este resultado es totalmente anómalo y no es acorde a los resultados de cada población, mostrados en esta misma tabla. Esto nos llevó a analizar diferencias en cuanto a la clasificación de obesidad según el %GC en cada población, y obtuvimos que el número de sujetos clasificados como “con sobrepeso u obesidad” era muy superior en Valencia que en Burgos:

	NORMOPESO	SOBREPESO	TOTAL
BURGOS	72	20	92
VALENCIA	35	70	105
TOTAL	107	90	197

Tabla 6.5. Número total de sujetos clasificados como “normopeso” y “sobrepeso” según la clasificación derivada del %GC en cada población a estudio

Como muestra la tabla 6.5., el número de sujetos con sobrepeso en Valencia es muy superior al de Burgos, y viceversa con respecto a los sujetos con normopeso. En Valencia el nivel de 25(OH)D libre es muy superior al de Burgos (tabla 5.7.2.1.). Esto hace que los resultados de la tabla 5.7.4.17. tengan un sesgo muy grande y no deben ser tenidos en cuenta. Además, este mismo sesgo lo encontramos en la primera parte de la tabla 5.7.4.19., por lo que los resultados aquí expuestos deben interpretarse con cautela.

Una vez analizados estos resultados, nos pareció interesante repasar de nuevo los expuestos en la tabla 5.7.4.16., pues expone lo mismo que la 5.7.4.17., pero diferencia por obesidad en función del IMC y no del %GC. Aquí los resultados no son tan incongruentes. Analizamos, como en el caso anterior, el número de sujetos de cada población clasificados en con y sin sobrepeso:

	NORMOPESO	SOBREPESO	TOTAL
BURGOS	53	48	101
VALENCIA	45	60	105
TOTAL	98	108	206

Tabla 6.6. Número total de sujetos clasificados como “normopeso” y “sobrepeso” según la clasificación derivada del IMC en cada población a estudio

En este caso, el número de sujetos en cada clasificación es mucho más equitativo. La explicación a esta diferencia es que la clasificación de obesidad, teniendo en cuenta el %GC diferencia por sexo, dando a cada uno unos límites muy diferentes, mientras que el IMC no.

Cabe destacar también que, en las últimas tablas mencionadas, el dato de %GC con el que se trabaja en la muestra procedente de Valencia es el obtenido por la ecuación de Siri. De todos los posibles resultados del %GC (ecuación de Siri, ecuación de Brozec, y el proveniente del cálculo del área adiposa del brazo), primero se descartó el uso del %GC obtenido a partir del área adiposa del brazo por tener peores resultados de correlación, tanto con el IMC como con los demás métodos de obtención del %GC. Finalmente, se decidió utilizar la ecuación de Siri pues de los tres, es el método más utilizado <sup>(153)</sup>.

Aunque, tal y como se ha expuesto, los resultados no son llamativos, sí que reflejan el resultado esperado. Dicho resultado supone que los sujetos más obesos presentan niveles de vitamina D más bajos. Esto es acorde a la teoría, pues ya que la vitamina D es una vitamina liposoluble, puede acumularse en los adipocitos, quedando de esta manera “secuestrada” en el tejido adiposo, antes de que sufra la hidroxilación en el hígado que la transforme en 25(OH)D <sup>(91,92)</sup>.

Cabe mencionar que la metodología de este estudio no se ha realizado para asegurar una homogeneidad en el número de sujetos asociado a cada eslabón de la clasificación de obesidad. Es por ello, que no todos los grupos tienen un número equitativo de sujetos, lo que puede llevar a un sesgo en el análisis de estos resultados.

## INFLUENCIA DE LOS HÁBITOS DE EXPOSICIÓN SOLAR

La encuesta realizada sobre los hábitos de exposición solar durante el verano recogía distintos ítems que permitirían relacionar dichos hábitos con los niveles séricos de vitamina D. De todos ellos, los más relevantes han sido:

- Tiempo al aire libre en las horas de máximo calor (10 AM – 4 PM) durante el verano.
- Actitud ante la exposición solar.
- Uso de cremas fotoprotectoras.

Todos los resultados referentes a los hábitos de exposición solar se han obtenido exclusivamente con las determinaciones séricas obtenidas en verano, tanto en Valencia como en Burgos. Esto se debe a que la encuesta hacía referencia a los hábitos desarrollados durante los meses de verano, pues será aquí donde adquieran mayor importancia, y donde pueda haber mayor variabilidad interindividual. Además, la semivida de la 25(OH)D conlleva que dichos hábitos sólo puedan tener influencia en las determinaciones bioquímicas realizadas a partir de las muestras recogidas en verano.

Las tablas 5.7.5.1. y 5.7.5.2. muestran la relación entre las tres variables mencionadas y las concentraciones séricas de 25(OH)D total y libre, en Burgos y Valencia respectivamente.

El análisis de la primera variable de los hábitos de exposición solar se ha realizado con una prueba de tendencia, con el fin de determinar si a medida que aumentan las horas al día al aire libre en los momentos de máxima incidencia solar, aumenta también las concentraciones séricas de vitamina D. Los resultados muestran una relación lineal estadísticamente significativa con los datos provenientes de Burgos, tanto para el análisis de 25(OH)D total como para el de 25(OH)D libre, pero no una relación cuadrática. Esto significa que en esta población hay una tendencia creciente en las concentraciones de vitamina D en función de las horas de exposición a la luz solar en verano, pero este aumento no se produce de forma proporcional.

En las muestras procedentes de Valencia no se observa esta tendencia creciente. Al comparar las concentraciones medias de 25(OH)D total y libre en aquellos sujetos expuestos al aire libre de 1 a 3 horas, con los expuestos menos de 1 hora, sí hay una clara diferencia, siendo los niveles más bajos en este segundo grupo. Sin embargo, al introducir un tercer escalón en las horas de exposición solar (más de 3 horas), se pierde la relación creciente entre los niveles de vitamina D y las horas al aire libre. La diferencia entre el grupo que afirma una exposición de entre 1 a 3 horas, con los que aseguran estar más de 3 horas es muy pequeña, y de hecho los resultados son muy similares, algo más bajos en este último grupo, pero sin resultar clínicamente relevante.

Con estos resultados se puede afirmar, por un lado, que los resultados obtenidos en Burgos reflejan la gran importancia de la exposición solar en la síntesis cutánea de vitamina D, pues un cambio en el número de horas diarias de exposición, se traduce en una modificación de los depósitos de esta vitamina. Sin embargo, por otro lado, los resultados obtenidos en Valencia también sustentan una parte importante de la teoría de síntesis cutánea de vitamina D. Se trata de la estimación que fija en 5 – 15 minutos diarios de exposición solar en rostro y brazos durante la época estival, como tiempo necesario y suficiente para mantener los depósitos de vitamina D en niveles adecuados <sup>(6, 50)</sup>.

La siguiente variable a estudio sobre los hábitos de exposición solar es la actitud adoptada ante la misma. En la encuesta se ofrecían tres posibles respuestas a este ítem: *Prefiero evitarla; A veces me gusta exponerme; Me gusta hacerlo para ponerme moreno/a*. Al analizar estas opciones y relacionarlas con las determinaciones analíticas de 25(OH) vitamina D total y libre, no se obtiene ninguna relación estadísticamente significativa, ni en Burgos, ni en Valencia. Tampoco se observa una tendencia creciente en las concentraciones séricas al avanzar en los tres grupos estudiados. Cabe destacar además que las desviaciones estándar asociadas a los valores medios obtenidos son grandes. De todo esto, sólo se puede concluir que la actitud que los sujetos afirman mostrar frente a la exposición solar no es un dato influyente en los niveles séricos de vitamina D.

La última variable estudiada en referencia a los hábitos de exposición solar fue el uso de cremas, y demás preparados tópicos, fotoprotectores. Diferenciamos tres grupos dentro de los sujetos que afirmaban usar este tipo de ungüentos: Factor  $\leq 20$ ; factor = 20 – 40; factor  $> 40$ .

No se advierte ninguna relación estadísticamente significativa, ni en Burgos, ni en Valencia. Y tampoco hay diferencias clínicamente relevantes al estudiar las concentraciones medias obtenidas en cada grupo.

La teoría afirma que las cremas con factor de protección solar absorben las radiaciones antes de su penetración en la epidermis, llegando incluso a reducir la síntesis cutánea de vitamina D en un 95% a partir de un SPF de 8 <sup>(6, 15)</sup>. Sin embargo, en la práctica hay más factores a tener en cuenta, por ejemplo, la técnica en la aplicación de estos preparados tópicos, o la frecuencia con la que se apliquen, y también el hecho probable de que los sujetos que utilicen este tipo de cremas sean también los que más se expongan a la radiación solar. Estos supuestos hacen que, actualmente, no se haya podido relacionar el uso de cremas fotoprotección con la disminución de la síntesis cutánea de vitamina D <sup>(15,50)</sup>.

La tabla 5.7.5.7. muestra los resultados de la relación entre el uso de factores de protección solar y los niveles séricos de vitamina D en Valencia, sin considerar el número de SPF. Tan sólo se ha estudiado esta relación en las muestras procedentes de Valencia ya que aquí, un número importante de sujetos afirmaba no utilizar este tipo de cremas, en cambio, en Burgos, la práctica totalidad de los sujetos sí que utilizaba cremas con factor de protección solar, por lo que no se podrían extrapolar resultados fidedignos.

En el estudio de esta variable no se observan relaciones estadísticamente significativas con las 25(OH)D total ni con la libre. Sin embargo, cabe mencionar que, en ambos análisis, las concentraciones medias son mayores en el grupo que afirma no utilizar cremas con protección durante la exposición solar, siendo esta diferencia superior a 2 ng/ml para la 25(OH)D total, y de 0,15 pg/ml para la 25(OH)D libre.

Todos los resultados obtenidos a partir de los datos del uso de factores de protección solar apoyan la teoría de que estas cremas, con SPF de 20 o superior, pueden reducir la síntesis cutánea de vitamina D, sin encontrar grandes diferencias al aumentar el número de factor protector. Pero, en cualquier caso, no es una variable definitoria de la concentración de vitamina D.

## INFLUENCIA DE LA INGESTA DE VITAMINA D

El mayor porcentaje de vitamina D (aproximadamente un 95%) es sintetizado por la piel a partir de la radiación solar. El porcentaje restante se obtiene con la dieta, a partir de alimentos ricos en vitamina D. Aunque evidentemente, la fuente dietética, en cuanto a aporte de vitamina D, es muy inferior a la síntesis cutánea, es importante tenerla en cuenta, y en especial en la época invernal, donde la exposición solar pierde protagonismo.

La elaboración de un CFCA adecuado y válido para poder determinar la cantidad diaria de vitamina D ingerida por cada sujeto del estudio fue, al igual que con el cuestionario de hábitos de exposición solar, un reto. Diversas publicaciones han estudiado las diferentes maneras de reflejar el consumo diario de un determinado nutriente con fiabilidad, incluyendo CFCA, registro diario de la ingesta de alimentos durante un determinado periodo, 3 o más llamadas telefónicas diarias del investigador al sujeto para conocer su ingesta, etc. <sup>(26,146,213-216)</sup>. En cuanto al registro diario de los alimentos ingeridos por los sujetos durante un determinado periodo, es un método válido para determinar la ingesta diaria de la vitamina D, pero supone un seguimiento de los sujetos del estudio de varios días, así como la voluntad de los mismo de realizar un “diario dietético” durante el periodo establecido. Trasladar estos requisitos a nuestro estudio no era viable. Por otro lado, la mayor parte de los CFCA validados para micronutrientes, como la vitamina D, son largos y suponen una dedicación importante por parte de los sujetos. Esto, tampoco era viable en nuestra realidad, pero se podía adaptar a la misma de una forma más sencilla. Además, estudios como el desarrollado por Weir et al. <sup>(217)</sup> y Kiely et al. <sup>(218)</sup> demostraron que los CFCA eran una herramienta fiable para el estudio del consumo diario de nutrientes como la vitamina D. La realidad de nuestros sujetos obligaba a realizar un cuestionario breve, pero a la vez fiable, premisa que también se contempla en la publicación de Trinidad Rodríguez et al. <sup>(219)</sup>. El estudio de las publicaciones estudiadas junto con otras cuyo objetivo era la validación de CFCA adaptados a características concretas <sup>(215,220)</sup>, así como el uso de una fuente de datos oficial en cuanto a composición de alimentos (BEDCA) <sup>(147)</sup> nos permitió realizar un CFCA adecuado para extrapolar el consumo diario de vitamina D con fiabilidad, y a la vez, pudiera ser realizado con facilidad por los sujetos de nuestro estudio.

Las tablas 5.7.6.1. y 5.7.6.2. muestran la influencia de la ingesta de vitamina D en sus niveles séricos, en Burgos y Valencia respectivamente. Esta ingesta se extrapola a partir del CFCA, del que se ha podido extraer la cantidad diaria de vitamina D ingerida por cada sujeto del estudio, a partir del consumo de alimentos ricos en esta vitamina.

Aunque la vitamina D está presente en múltiples alimentos, tanto de origen animal como de origen vegetal, la cantidad total por gramo es pequeña. Por ello, el CFCA se ha establecido con los alimentos que mayor cantidad de vitamina D tienen, pues serán los que permitan estimar la ingesta total diaria de la vitamina con menor sesgo y mayor fiabilidad.

El CFCA engloba los alimentos consumidos a lo largo de un año completo, pero las tablas muestran los resultados diferenciando el periodo estival y el invernal, debido a que en verano cabe esperar niveles séricos de 25(OH)D más altos, por al aumento de la exposición solar, y sin embargo en invierno, es posible que la ingesta dietética adquiera más importancia en el mantenimiento de las reservas de 25(OH)D en niveles adecuados. Por ello, estudiar esta relación, considerando el total de concentraciones séricas de 25(OH)D total y libre por población, tendría

un gran sesgo.

El análisis no muestra ninguna relación estadísticamente significativa, ni en las distintas poblaciones, ni en las diferentes estaciones.

Los coeficientes de regresión en todos los casos son muy cercanos a cero. Por ello, la conclusión extraída de este análisis es que la ingesta de vitamina D tiene poca importancia en los niveles séricos de dicha vitamina. Sin poder diferenciar entre estaciones ni entre poblaciones. Por tanto, parece que ni siquiera en invierno, la ingesta dietética de vitamina D resta importancia a la síntesis cutánea de esta vitamina a partir de la exposición solar, como fuente prioritaria de vitamina D.

Considerando que los resultados de la ingesta media de vitamina D en ambas poblaciones eran muy similares (tablas 5.5.2. y 5.5.3.), es razonable que en el análisis de la influencia en los niveles séricos de 25(OH)D en cada población no haya diferencias relevantes.

## INFLUENCIA DE LAS DISTINTAS VARIABLES EN LOS NIVELES SÉRICOS DE 25(OH)D TOTAL Y LIBRE

El estudio de colinealidad que se muestra en las tablas 5.7.7.3. y 5.7.7.4. detecta aquellas variables con alta correlación, lo que supone la posibilidad de establecer estimaciones inestables en el análisis estadístico de regresión lineal múltiple que trata de establecer la influencia de las diversas variables descritas y analizadas en este trabajo sobre los niveles séricos de 25(OH)D total y libre.

Tanto en el caso de la 25(OH)D total, como en el de la 25(OH)D libre, las variables que mostraron mayor grado de tolerancia (medida habitual de colinealidad), y que por tanto se eliminaron al realizar el método de exclusión secuencial, Backward Setpwise, fueron el %GC y los distintos factores de protección solar, dejando en cambio la variable categórica que indicaba si se usa o no factor de protección solar.

El procedimiento de exclusión secuencial concluye que las variables predictoras que deben tenerse en cuenta en el análisis de las variaciones de las concentraciones séricas de 25(OH)D total son la estacionalidad, el clima, el IMC y el uso de factor de protección solar, al margen del valor de dicho factor. En cambio, al realizar este procedimiento para las concentraciones de 25(OH)D libre las únicas variables que se detectan como buenos predictores de la misma son el clima y la estacionalidad.

El papel protagonista del IMC como variable predictora de las concentraciones de 25(OH)D total es especialmente llamativo si consideramos que en el análisis de su posible influencia sobre los dos analitos de vitamina D estudiados los resultados no fueron estadísticamente significativos, aunque sí mostraban una tendencia clara de descenso de los mismos al aumentar el IMC. Aquí, sin embargo, esta variable sí consigue significación estadística. Esto significa que al tener en cuenta el total de variables, el IMC muestra claramente una relación inversa con los niveles de 25(OH)D total, a pesar de ser menos influyente que la estacionalidad, el clima e, incluso, el factor de protección solar. Tanto es así que, mientras que la diferencia entre el verano y el invierno supone un incremento/descenso de 5,4 ng/mL de 25(OH)D total, el clima (Valencia/Burgos) lo supone de 3,1 ng/mL, y el uso de cremas con factor de protección solar disminuye estas concentraciones en aproximadamente 2 ng/mL, por cada Kg/m<sup>2</sup> que se incrementa el IMC los niveles de 25(OH)D total descienden en algo más de 0,2 ng/mL.

Las tablas 5.7.7.7. y 5.7.7.8., que muestran el análisis de las variables preseleccionadas como predictoras sobre los niveles de 25(OH)D total y libre refuerzan los extraídos del análisis del total de variables (tablas 5.7.7.1. y 5.7.7.2.), pero ofrecen resultados más precisos y contundentes. Esto es un ejemplo de la importancia de realizar un proceso de selección de variables predictoras. A pesar de que en el caso de la 25(OH)D total se tienen en cuenta las cuatro variables mencionadas, los resultados reflejan, sin lugar a dudas, que la estacionalidad (verano vs. invierno) y el clima (Valencia vs. Burgos) son los factores que más influyen en los niveles séricos de los analitos. Esta teoría se refuerza con los resultados obtenidos con la 25(OH)D libre donde, de inicio, ya sólo se estudian como variables la estacionalidad y el clima.

Una diferencia a destacar es que en el caso de 25(OH)D total es la estacionalidad, como era de esperar, la variable con más peso; sin embargo, para la 25(OH)D libre es el clima el que parece

tener más protagonismo. Para poder explicarlo, serían necesarios estudios que analizaran diferencias poblacionales más específicas, y no solo el lugar de procedencia. A pesar de no contar aún con dichos estudios, esta es una evidencia más de que la 25(OH)D libre podría reflejar ciertos aspectos poblacionales que la total no, y al revés. En cualquier caso, no cabe ninguna duda de que son los grandes condicionantes de los niveles de esta vitamina.

Estos resultados deben iniciar una reflexión. Hemos comprobado que un porcentaje importante de personas sanas españolas presentan niveles insuficientes e incluso deficientes de vitamina D. Además, también se ha comprobado en este trabajo que dichos niveles están totalmente condicionados por la estación del año y por el lugar geográfico, habiendo una diferencia climatológica importante e influyente para la vitamina D entre Burgos y Valencia. Por tanto, en sujetos sanos residentes en lugares como Burgos en meses invernales, es muy probable que se encuentren niveles de vitamina D bajos, pero esto no significa que presenten una patología derivada de esta "insuficiencia", pues por resultados como los derivados de este estudio, no debería considerarse ya "insuficiencia".

En cuanto a los hábitos de exposición solar, no muestran resultados nada concluyentes. Al analizar esta variable es importante tener en cuenta que hace referencia únicamente a los meses estivales, pero en este análisis estamos estudiando la totalidad de la muestra, lo que incluye aquellas recogidas en los meses de invierno. Por ello, es lógico que no tenga relevancia en este análisis.

Destaca la poca influencia que parece tener la ingesta diaria de vitamina D en los niveles de la propia vitamina. No cabe duda de que es la otra fuente básica de colecalciferol, pero parece que, al estudiar las variables en conjunto, queda relegada a un claro segundo plano, por detrás de la síntesis cutánea, consecuencia de los rayos UV.



## CONCLUSIONES

## CONCLUSIONES:

1. Los resultados obtenidos de 25(OH)D total, tanto en la global como diferenciado por estación y/o población, sugieren una insuficiencia e incluso deficiencia de esta vitamina. El hecho de que se trate de sujetos españoles sanos y jóvenes no casa con los resultados de esta clasificación. Cabe pensar que quizá esta clasificación no sea acorde con la realidad de los niveles de vitamina D en población sana, y por tanto los límites que la rigen no sean idóneos.
2. La fuente mayoritaria de vitamina D es la luz solar y, puesto que la intensidad de los rayos UV no es constante a lo largo del año, es de esperar que los niveles séricos de colecalciferol también varíen, lo que no supone una patología. Por ello, al estudiar los niveles de vitamina D en sujetos que, aparentemente no presenten patologías en ciertos momentos del año en los que sus concentraciones sean más susceptibles de estar disminuidas, debe siempre tenerse en cuenta esta condición estacional, y actuar en consecuencia.
3. Ambos analitos de vitamina D, 25(OH)D total y libre, presentan una clara correlación. Parece que la 25(OH)D libre podría reflejar mejor que la total el estatus real de vitamina D en el organismo. En este estudio no se ha obtenido ningún resultado que desmienta esta posibilidad, pero tampoco ninguno lo suficientemente potente como para afirmarla. Pero sí está claro que esto es una puerta abierta al análisis de la vitamina D.
4. Existen muy pocos estudios que trabajen con la 25(OH)D libre. Profundizar en las aplicaciones clínicas de la determinación de este analito, incluyendo métodos automatizados, aumentaría nuestro conocimiento sobre la vitamina D. Este estudio forma parte del inicio de este proceso.
5. A nuestro conocimiento, este es el primer trabajo en España que identifica los valores de vitamina D libre respecto de la vitamina D total, y estudia y selecciona aquellas variables que más influyen en dichos valores.

BIBLIOGRAFÍA

## BIBLIOGRAFÍA

1. Holick MF, Chen TC. Vitamin D deficiency: a worldwide problem with health consequences. *The American journal of clinical nutrition*. 2008; 87(4): 1080S-1086S.
2. Göring H, Koshuchowa S. Vitamin D deficiency in Europeans today and in Viking settlers of Greenland. *Biochemistry (Moscow)*. 2016; 81(12): 1492-1497.
3. Jablonski NG, Chaplin G. The evolution of human skin coloration. *Journal of human evolution*. 2000; 39(1): 57-106.
4. Gamarra AI, Suárez JFR, Gutiérrez CET: Historia de la vitamina D. Universidad Simón Bolívar, Barranquilla: Antonio Iglesias Gamarra, 2008. 513 p.
5. Sassan Pazirandeh MD, David L Burns MD. Overview of vitamin D. [Monografía en Internet]: UptoDate; [citado el 23 de enero de 2022]. Disponible en <http://www.uptodate.com/>.
6. Zanuy MV, Carranza FH. Metabolismo, fuentes endógenas y exógenas de vitamina D. *Revista Española de Enfermedades Metabólicas Óseas*. 2007; 16(4): 63-70.
7. Fernandez, EG, Luca B. Patología de la vitamina D. *Medicine-Programa de Formación Médica Continuada Acreditado*. 2012; 11(16): 961-970.
8. de Oliveira V, Muller Lara G, Dutra Lourenço E, Daniele Boff B, Zirbes Stauder G. Influencia de la vitamina D en la salud humana. *Acta bioquímica clínica latinoamericana*. 2014; 48(3): 329-337.
9. Müller MJ, Volmer DA. Mass spectrometric profiling of vitamin D metabolites beyond 25-hydroxyvitamin D. *Clinical chemistry*. 2015; 61(8): 1033-1048.
10. Chun RF, Peercy BE, Orwoll ES, Nielson CM, Adams JS, Hewison M. Vitamin D and DBP: The free hormone hypothesis revisited. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 2014; 144: 132-137.
11. Su Z, Narla SN, & Zhu Y. 25-Hydroxyvitamin D: analysis and clinical application. *Clinica chimica acta*. 2014; 433: 200-205.
12. Jonathan Hogan, MD, Stanley. Regulation of calcium and phosphate balance. [Monografía en Internet]: UptoDate; [citado el 23 de enero de 2022]. Disponible en <http://www.uptodate.com/>.
13. Aguado Acín MP. Vitamina D y osteoporosis. ¿Es suficiente con tomar el sol?. *Revista Española de Reumatología*. 2001; 28(3): 101-105.
14. Molina AL, Londoño Á. Vitamina D y piel. *Revista de la Asociación Colombiana de Dermatología y Cirugía Dermatológica*. 2012; 239.
15. Norval M, Wulf HC. Does chronic sunscreen use reduce vitamin D production to insufficient levels?. *British Journal of Dermatology*. 2009; 161(4): 732-736.
16. Van Schoor N, Lips P. Worldwide vitamin D status. In *Vitamin D*. Academic Press. 2018; (pp. 15-40)
17. Holick MF. Vitamin D and health: evolution, biologic functions, and recommended dietary

- intakes for vitamin D. *Clinical Reviews in Bone and Mineral Metabolism*. 2009; 7(1): 2-19.
18. Webb AR, Kline L, Holick MF. Influence of season and latitude on the cutaneous synthesis of vitamin D<sub>3</sub>: exposure to winter sunlight in Boston and Edmonton will not promote vitamin D<sub>3</sub> synthesis in human skin. *The journal of clinical endocrinology & metabolism*. 1988; 67(2): 373-378.
  19. Leary PF, Zamfirova I, Au J, McCracken WH. Effect of latitude on vitamin D levels. *J Am Osteopath Assoc*. 2017; 117(7): 433-439.
  20. Quesada Gómez JM, Sosa Henríquez M. Nutrición y osteoporosis. Calcio y vitamina D. *Revista de Osteoporosis y Metabolismo Mineral*. 2011; 3(4).
  21. García Gabarra A. Ingesta de nutrientes: Conceptos y Recomendaciones Internacionales (2ª parte). *Nutrición Hospitalaria*. 2006; 21(4): 437-447.
  22. Ashwell M, Lambert JP, Alles MS, Branca F, Bucchini L, Brzozowska A. et al. How we will produce the evidence-based EURRECA toolkit to support nutrition and food policy. *European Journal of Nutrition*. 2008; 47(1): 2-16.
  23. Manson JE, Brannon PM, Rosen CJ, Taylor CL. Vitamin D Deficiency – Is There Really a Pandemic? *The New England Journal of Medicine*. 2016; 375(1):1817-1820.
  24. Doets EL, de Wit LS, Dhonukshe-Rutten RA, Cavelaars AE, Raats MM, Timotijevic L. et al. Current micronutrient recommendations in Europe: towards understanding their differences and similarities. *European Journal of Nutrition*. 2008; 47(1): 17-40.
  25. Institute of Medicine (US) Subcommittee on Interpretation and Uses of Dietary Reference Intakes; Institute of Medicine (US) Standing Committee on the Scientific Evaluation of Dietary Reference Intakes. *DRI Dietary Reference Intakes: Applications in Dietary Assessment*. Washington (DC): National Academies Press (US); 2000. PMID: 25057725.
  26. Novaković R, Cavelaars AE, Bekkering GE, Roman-Vinas B, Ngo J, Gurinović M et al. Micronutrient intake and status in Central and Eastern Europe compared with other European countries, results from the EURRECA network. *Public health nutrition*. 2013; 16(5): 824-840.
  27. Viñas BR, Barba LR, Ngo J, Gurinovic M, Novakovic R, Cavelaars A et al. Projected prevalence of inadequate nutrient intakes in Europe. *Annals of Nutrition and Metabolism*. 2011; 59(2-4): 84-95.
  28. Serra Majem L, Ribas Barba L, Salvador Castell G, Román Viñas B, Castell Abat C, Cabezas Peña C et al. Tendencias del estado nutricional de la población española: resultados del sistema de monitorización nutricional de Cataluña (1992-2003). *Revista Española de Salud Pública*. 2007; 81(5); 559-570.
  29. Lutsey PL, Parrinello CM, Misialek JR, Hoofnagle AN, Henderson CM, Laha TJ et al. Short-term Variability of Vitamin D–Related Biomarkers. *Clinical chemistry*. 2016; 62(12): 1647-1653.
  30. Peris P. Diagnóstico y tratamiento de la osteomalacia por el reumatólogo. *Reumatología Clínica*. 2011; 7: 22-27.
  31. Fernández RCG, Pérez AD, Saidler LM, Gómez JMQ. La vitamina D como elemento

- inmunitario en las infecciones. *Medicina clínica*. 2009; 133(9): 344-348.
32. Álvarez-Hernández D, Díaz MN, Alonso CG, Andía JC. Los polimorfismos del gen del receptor de la vitamina D (VDR) modulan la respuesta a la vitamina D de forma tejido específica. *Revista Española de Enfermedades Metabólicas Óseas*. 2007; 16(1): 20-27.
  33. Hii CS, Ferrante A. The non-genomic actions of Vitamin D. *Nutrients*. 2016; 8, 135.
  34. González Pardo V, Boland R, Russo de Boland A. Vitamina D y cáncer: acción antineoplásica de la 1 $\alpha$ , 25 (OH) 2-vitamina D3. *Medicina (Buenos Aires)*. 2012; 72(2): 143-149.
  35. Zeljic K, Supic G, Magic Z. New insights into vitamin D anticancer properties: focus on miRNA modulation. *Molecular Genetics and Genomics*. 2017; 1-14.
  36. Sánchez A, Puche R, Zeni S, Oliveri B, Galich AM, Maffei L et al. Papel del calcio y de la vitamina D en la salud ósea (Parte I). *Revista Española de enfermedades metabólicas óseas*. 2002; 11(6): 201-217.
  37. Moreno Martínez A. López Gómez V. Vitamina D. Acciones. Nuevas aplicaciones en prevención de salud. *Educación continuada en el laboratorio clínico*; 14: 114-126.
  38. Carral San Laureano F, Oliveira Fuster G, Aguilar Diosdado M. Homeostasis del calcio, fosforo y magnesio. *Medicina Integral*. 2000; 36: 261-6.
  39. Gómez de Tejada Romero MJ, Sosa Henríquez M, del Pino Montes J, Jódar Gimeno E, Quesada Gómez JM, Cancelo Hidalgo MJ, et al. Documento de posición sobre las necesidades y niveles óptimos de vitamina D. *Revista de Osteoporosis y Metabolismo Mineral*. 2011; 3(1).
  40. Gómez de Tejada Romero MJ. Acciones extraóseas de la vitamina D. *Revista de Osteoporosis y Metabolismo Mineral*. 2014; 6: 11-18.
  41. Quirós AB, Sanz EA, Adrados JG. Luz solar, vitamina D y tuberculosis. *Bol Pediatr*. 2009; 49: 220-226.
  42. Fernández RCG, Pérez AD, Saidler LM, Gómez JMQ. La vitamina D como elemento inmunitario en las infecciones. *Medicina clínica*. 2009; 133(9): 344-348.
  43. Prietl B, Treiber G, Pieber TR, Amrein K. Vitamin D and immune function. *Nutrients*. 2013; 5(7): 2502-2521.
  44. Khoo A, Joosten I, Michels M, Woestenenk R, Preijers F, He X, et al. 1,31,25-Dihydroxyvitamin D3 inhibits proliferation but not the suppressive function of regulatory T cells in the absence of antigen-presenting cells. *Inmunology*. 2011; 134: 459-468.
  45. Cannell JJ, Vieth R, Umhau JC, Holick MF, Grant WB, Madronich S, et al. Epidemic influenza and vitamin D. *Epidemiology and infection*. 2006; 134(06): 1129-1140.
  46. Gombart AF, Borregaard N, Koeffler HP. Human cathelicidin antimicrobial peptide (CAMP) gene is a direct target of the vitamin D receptor and is strongly up-regulated in myeloid cells by 1, 25-dihydroxyvitamin D3. *The FASEB journal*. 2005; 19(9): 1067- 1077.
  47. Yim S, Dhawan P, Ragunath C, Christakos S, Diamond G. Induction of cathelicidin in normal and CF bronchial epithelial cells by 1, 25-dihydroxyvitamin D 3. *Journal of Cystic Fibrosis*. 2007; 6(6): 403-410.

48. Tjabringa GS, Aarbiou J, Ninaber DK, Drijfhout JW, Sørensen OE, Borregaard N, et al. The antimicrobial peptide LL-37 activates innate immunity at the airway epithelial surface by transactivation of the epidermal growth factor receptor. *The Journal of Immunology*. 2003; 171(12): 6690-6696.
49. Rivera LEC, Ramos AP, Desgarenes CP. Péptidos antimicrobianos: antibióticos naturales de la piel. *Dermatología Revista Mexicana*. 2007; 51(2): 57-67.
50. Gilaberte Y, Aguilera J, Carrascosa JM, Figueroa FL, de Gabriel JR, Nagore E. La vitamina D: evidencias y controversias. *Actas dermo-sifiliográficas*. 2011; 102(8): 572-588.
51. Roth DE, Jones AB, Prosser C, Robinson JL, Vohra S; Vitamin D Receptor Polymorphisms and the Risk of Acute Lower Respiratory Tract Infection in Early Childhood. *J Infect Dis*. 2008; 197 (5): 676-680.
52. Zalman S Agus, MD; Marc K Drezner, MD. Causes of vitamin D deficiency and resistance. [Monografía en Internet]: UptoDate; [citado el 23 de enero de 2022]. Disponible en <http://www.uptodate.com/>.
53. Moral JR, de Lamadrid CVD. Patología de la vitamina D. *Medicine- Programa de Formación Médica Continuada Acreditado*. 2008; 10(16): 1051-1056.
54. Chatfield SM, Brand C, Ebeling PR, Russell DM. Vitamin D deficiency in general medical inpatients in summer and winter. *Internal Medicine Journal*. 2007; 37(6): 377- 382.
55. Ballester AH, Rubio AB, de Pablo PH, Catalá JC, Sastre AR, Vicente SG et al. Manifestaciones sistémicas de la malabsorción intestinal. *Rev Soc Valencia Patol Dig*. 2002; 21(1): 1-16.
56. Bover J, Egido J, Fernández-Giráldez E, Praga M, Solozábal-Campos C, Torregrosa JV et al. Vitamina D, receptor de la vitamina D e importancia de su activación en el paciente con enfermedad renal crónica. *Nefrología (Madrid)*. 2015; 35(1): 28-41.
57. Bess Dawson-Hughes, MD. Vitamin D deficiency in adults: Definition, clinical manifestations, and treatment. [Monografía en Internet]: UptoDate; Apr 12, 2016. [citado 10 de enero de 2020] Disponible en <http://www.uptodate.com/>.
58. Gómez-Alonso C, Naves-Díaz ML, Fernández-Martín JL, Díaz-López JB, Fernández-Coto MT, Cannata-Andía JB. Vitamin D status and secondary hyperparathyroidism: The importance of 25-hydroxyvitamin D cut-off levels. *Kidney International*. 2003; 63: S44-S48.
59. Parfitt AM, Avioli LV, Krane SM. *Metabolic bone disease and clinically related disorders*. Academic Press; 1990. 811 p.
60. Soria LM, Pérez SH. Osteomalacia y déficit de vitamina D en el anciano. *FMC-Formación Médica Continuada en Atención Primaria*. 2005; 12(7): 445-452.
61. Marazuela M. Déficit de vitamina D en el adulto: clínica, diagnóstico y tratamiento. *Endocrinología y Nutrición*. 2005; 52(5): 215-223.
62. Halty M, Caggiani M. Raquitismo vitamina D dependiente tipo I. *Archivos de Pediatría del Uruguay*. 2006; 77(2): 160-167.
63. Almirall J. Papel del déficit de vitamina D en la hipertensión arterial y la enfermedad cardiovascular. *Hipertensión y riesgo vascular*. 2010; 27(3): 89-92.

64. Judd S, Tangpricha V. Vitamin D deficiency and risk of cardiovascular disease. *Circulation*. 2008; 117(4): 503-511.
65. Chin K, Appel LJ, Michos ED. Vitamin D, calcium, and cardiovascular disease: a “D” advantageous or “D” detrimental? An era of uncertainty. *Current atherosclerosis reports*. 2017; 19(1), 5.
66. Ballew C, Khan LK, Kaufmann R, Mokdad A, Miller DT, Gunter EW. Blood lead concentration and children’s anthropometric dimensions in the Third National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III), 1988-1994. *The Journal of pediatrics*. 1999; 134(5): 623-630.
67. Melamed ML, Muntner P, Michos ED, Uribarri J, Weber C, Sharma J et al. Serum 25-hydroxyvitamin D levels and the prevalence of peripheral arterial disease: results from NHANES 2001 to 2004. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2008; 28(6): 1179-1185.
68. Vaidya A, Williams JS, Forman JP. The independent association between 25-hydroxyvitamin D and adiponectin and its relation with BMI in two large cohorts: the NHS and the HPFS. *Obesity*. 2012; 20(1): 186-191.
69. Kunutsor SK, Apekey TA, Steur M. Vitamin D and risk of future hypertension: meta-analysis of 283,537 participants. *European journal of epidemiology*. 2013; 28(3): 205-221.
70. Vimalaswaran KS, Cavadino A, Berry DJ, Jorde R, Dieffenbach AK, Lu C et al. Association of vitamin D status with arterial blood pressure and hypertension risk: a mendelian randomisation study. *The Lancet Diabetes & Endocrinology*. 2014; 2(9): 719-729.
71. Jódar-Gimeno E, Muñoz-Torres M. Sistema hormonal D y diabetes mellitus: lecciones de los activadores selectivos del receptor de vitamina D. *Endocrinología y Nutrición*. 2013; 60(2): 87-95.
72. González-Parra E, Egido J. Vitamina D, síndrome metabólico y diabetes mellitus. *Medicina Clínica*. 2014; 142(11): 493-496.
73. Mathieu C, Gysemans C, Giulietti A, Bouillon R. Vitamin D and diabetes. *Diabetologia*. 2005; 48(7): 1247-1257.
74. Yu F, Cui L, Li X, Wang C, Ba Y, Wang L et al. The genetic polymorphisms in vitamin D receptor and the risk of type 2 diabetes mellitus: an updated meta-analysis. *Asia Pacific Journal of clinical nutrition*. 2016; 25(3): 614.
75. González-Molero I, Rojo G, Morcillo S, Pérez-Valero V, Rubio-Martín E, Gutiérrez-Repiso C et al. Relationship between vitamin D deficiency and metabolic syndrome. *Med Clin (Barc)*. 2014; 142:473---7.
76. Gradillas-García A, Álvarez J, Rubio JA, de Abajo FJ. Relación entre el déficit de vitamina D y el síndrome metabólico en población adulta de la Comunidad de Madrid. *Endocrinología y Nutrición*. 2015; 62(4): 180-187.
77. Querales MI, Cruces ME, Rojas S, Sánchez L. Deficiencia de vitamina D: ¿Factor de riesgo de síndrome metabólico?. *Revista médica de Chile*. 2010; 138(10): 1312- 1318.
78. Apperly FL. The relation of solar radiation to cancer mortality in North America. *Cancer*

Research. 1941; 1(3): 191-195.

79. Garland C, Garland F, Shaw E, Comstock G, Helsing K, Gorham E. Serum 25-hydroxyvitamin D and colon cancer: eight-year prospective study. *The Lancet*. 1989; 334(8673): 1176-1178.
80. Bertone-Johnson ER, Chen WY, Holick MF, Hollis BW, Colditz GA, Willett WC et al. Plasma 25-hydroxyvitamin D and 1, 25-dihydroxyvitamin D and risk of breast cancer. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*. 2005; 14(8): 1991-1997.
81. Ahonen MH, Tenkanen L, Teppo L, Hakama M, Tuohimaa P. Prostate cancer risk and prediagnostic serum 25-hydroxyvitamin D levels (Finland). *Cancer Causes & Control*. 2000; 11(9): 847-852.
82. Ferrer-Mayorga G, Gómez-López G, Barbáchano A, Fernández-Barral A, Peña C, Pisano D et al. Vitamin D receptor expression and associated gene signature in tumor stromal fibroblasts predict clinical outcome in colorectal cancer. *Gut*. 2017; 66(8), 1449-1462
83. O'Shea SJ, Davies JR, Newton-Bishop JA. Vitamin D, vitamin A, the primary melanoma transcriptome and survival. *British Journal of Dermatology*. 2016; 175 (Suppl. S2): pp30–34.
84. de Tena JG, Debek AEH, Gutiérrez CH, Alonso JLI. Papel de la vitamina D en enfermedad pulmonar obstructiva crónica, asma y otras enfermedades respiratorias. *Archivos de bronconeumología*. 2014; 50(5): 179-184.
85. Janssens W, Mathieu C, Boonen S, Decramer M. Vitamin D deficiency and chronic obstructive pulmonary disease: a vicious circle. *Vitamins & Hormones*. 2011; 86: 379-399.
86. Hyppönen E, Boucher BJ. Vitamin D, Obesity, and the Metabolic Syndrome. In *Vitamin D*. Academic Press. 2018 (pp. 425-444).
87. Herranz Antolín S, García Martínez MC, Álvarez de Frutos S. Concentraciones deficientes de vitamina D en pacientes con obesidad mórbida. Estudio de caso-control. *Endocrinología y nutrición*. 2010; 57(6): 256-261.
88. Gutiérrez-Medina S, Gavela-Pérez T, Domínguez-Garrido MN, Blanco-Rodríguez M, Garcés C, Rovira A et al. Elevada prevalencia de déficit de vitamina D entre los niños y adolescentes obesos españoles. *Anales de pediatría*. 2014; 80 (4): 229-235.
89. Schuch NJ, Garcia VC, Martini LA. Vitamina D e doenças endocrinometabólicas. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2009; 53(5): 625-33.
90. Alves M, Bastos M, Leitão F, Marques G, Ribeiro G, Carrilho F. Vitamina D—importância da avaliação laboratorial. *Revista Portuguesa de Endocrinologia, Diabetes e Metabolismo*. 2013; 8(1): 32-39.
91. Wortsman J, Matsuoka LY, Chen TC, Lu Z, Holick MF. Decreased bioavailability of vitamin D in obesity. *The American journal of clinical nutrition*. 2000; 72(3): 690-693.
92. Eslamifar A, Khalaj A, Gheini MH, Abachi M, Salati M, Eslamifar M et al. Quantitative comparison between amount of 25-hydroxy vitamin D in serum of 20–35 years old population of in Iran; In winter and in summer. *International Journal of Medical Research & Health Sciences*. 2018; 5(10): 61-64.

93. Morris KL, Zemel MB. 1, 25-dihydroxyvitamin D3 modulation of adipocyte glucocorticoid function. *Obesity research*. 2005; 13(4): 670-677.
94. Sun X, Zemel MB.  $1\alpha$ , 25-Dihydroxyvitamin D and corticosteroid regulate adipocyte nuclear vitamin D receptor. *International Journal of Obesity*. 2008; 32(8):1305.
95. Blumberg JM, Tzamei I, Astapova I, Lam FS, Flier JS, Hollenberg AN. Complex role of the vitamin D receptor and its ligand in adipogenesis in 3T3-L1 cells. *Journal of Biological Chemistry*. 2006; 281(16), 11205-11213.
96. Uauy R, Martínez JI, Rojas CV. Nutrición molecular, papel del sistema PPAR en el metabolismo lipídico y su importancia en obesidad y diabetes mellitus: regulation of lipid metabolism by peroxisome proliferator activated receptors (PPAR). Their relationship to obesity and diabetes mellitus. *Revista médica de Chile*. 2000; 128(4): 437- 446.
97. Cruces Delgado MAA. Valoración de la composición corporal del adulto mayor. Tesis doctoral. Chile. Universidad Finis Terrae. 2017.
98. Agüero SD, Fuentes JF, Leiva AV. Dinamometría, masa muscular y masa grasa braquial en adultos mayores autovalentes. *Revista Española de Nutrición Comunitaria*. 2017; 23(4).
99. Ramón J, Cruz A, Dolores M, Porta J. Protocolo de valoración de la composición corporal para el reconocimiento médico-deportivo. Documento de consenso del grupo español de cineantropometría de la federación española de medicina del deporte. Versión 2010. *Arch. Med. Deporte*. 2010; 26: 166-179.
100. 10 datos sobre obesidad, Organización Mundial de la Salud [en línea]. Ginebra. OMS; 2021 [citado 11 de septiembre de 2021]. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>
101. Almeida JMG, García CG, Castañeda VB, Guerrero DB. Nuevo enfoque de la nutrición. Valoración del estado nutricional del paciente: función y composición corporal. *Nutrición Hospitalaria*. 2018; 35(3).
102. Bagust A, Walley T. An alternative to body mass index for standardizing body weight for stature. *Qjm*. 2000; 93(9): 589-596.
103. López R, del Mar M, Gómez-Martín M, Iglesias Rosado C. Evaluación del índice de masa corporal con factores clínicos-nutricionales en ancianos institucionalizados sin deterioro cognitivo. *Revista Española de Nutrición Humana y Dietética*. 2016; 20(4): 298-306.
104. Bellido D, Bellido V. Composición corporal en niños y adolescentes: en búsqueda de la técnica ideal. *Nutrición Hospitalaria*. 2016; 33(5): 1013-1014.
105. Aristizábal JC, Estrada-Restrepo A, Giraldo García A. Development and validation of anthropometric equations to estimate body composition in adult women. *Colombia Médica*. 2018; 49(2): 154-159.
106. Fernández Cabrera J, Aranda Medina E, Ramos C, de Guía M, Hernández León A, Rodríguez Bernabé JA et al. Evaluación del estado nutricional de estudiantes adolescentes de Extremadura basado en medidas antropométricas. *Nutrición hospitalaria*. 2014; 29(3): 665-673.
107. Gallagher D, Heymsfield SB, Heo M, Jebb SA, Murgatroyd PR, Sakamoto Y. Healthy

percentage body fat ranges: an approach for developing guidelines based on body mass index. *The American journal of clinical nutrition*. 2000; 72(3): 694-701.

108. Cardozo LA, Cuervo Y, Murcia J. Porcentaje de grasa corporal y prevalencia de sobrepeso-obesidad en estudiantes universitarios de rendimiento deportivo de Bogotá, Colombia. *Nutrición clínica y dietética hospitalaria*. 2016; 36(3):68-75.
109. Díaz NS, Mahecha EG, González A, Paredes LP, Lesmes DCQ, Bayona SB. Cuantificación de vitamina D: de la investigación a la práctica clínica. *Biosalud*. 2017; 16(1): 67-79.
110. Pittas AG, Laskowski U, Kos L, Saltzman E. Role of Vitamin D in adults requiring nutrition support. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*. 2010; 34(1): 70- 78.
111. Aloia J, Mikhail M, Dhaliwal R, Shieh A, Usera G, Stolberg A et al. Free 25 (OH) D and the vitamin D paradox in African Americans. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2015; 100(9): 3356-3363.
112. Powe CE, Evans MK, Wenger J, Zonderman AB, Berg AH, Nalls M et al. Vitamin D-binding protein and vitamin D status of black Americans and white Americans. *New England Journal of Medicine*. 2013; 369(21): 1991-2000.
113. Nielson CM, Jones KS, Chun RF, Jacobs J, Wang Y, Hewison M et al. Free 25-Hydroxyvitamin D: Impact of Vitamin D Binding Protein Assays on Racial-Genotypic Associations. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2016; 101(5): 2226 – 2234.
114. Chishimba L, Thickett DR, Stockley RA, Wood AM. The vitamin D axis in the lung: a key role for vitamin D-binding protein. *Thorax*. 2010; 65(5):456-462.
115. Henderson CM, Lutsey PL, Misialek JR, Laha TJ, Selvin E, Eckfeldt JH, et al. Measurement by a novel LC-MS/MS methodology reveals similar serum concentrations of vitamin D-binding protein in blacks and whites. *Clinical chemistry*. 2016; 62(1): 179-187.
116. Bouillon R. Free or total 25OHD as marker for vitamin D status?. *Journal of Bone and Mineral Research*. 2016; 31(6): 1124-1127.
117. Scott MG, Gronowski AM, Reid IR, Holick MF, Thadhani R, Phunney, K. Vitamin D: the more we know, the less we know. *Clinical chemistry*. 2015; 61 (3): 462-465.
118. Heijboer AC, Blankenstein MA, Kema IP, Buijs MM. Accuracy of 6 routine 25-hydroxyvitamin D assays: influence of vitamin D binding protein concentration. *Clinicalchemistry*. 2012; 58(3): 543-548.
119. Nielson CM, Jones KS, Chun RF, Jacobs J, Wang Y, Hewison M et al. Role of assay type in determining free 25-hydroxyvitamin D levels in diverse populations. *New England Journal of Medicine*. 2016; 374(17): 1695-1696.
120. Fu L, Yun F, Oczak M, Wong BY, Vieth R, Cole DE. Common genetic variants of the vitamin D binding protein (DBP) predict differences in response of serum 25-hydroxyvitamin D [25 (OH) D] to vitamin D supplementation. *Clinical biochemistry*. 2009; 42(10): 1174-1177.
121. Schwartz JB, Lai J, Lizaola B, Kane L, Weyland P, Terrault NA et al. Variability in free 25 (OH) vitamin D levels in clinical populations. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 2014; 144: 156-158.

122. Binkley N, Dawson-Hughes B, Durazo-Arvizu R, Thamm M, Tian L, Merkel JM et al. Vitamin D measurement standardization: the way out of the chaos. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 2017; 173: 117-121.
123. Binkley N, Sempos CT. Vitamin D Standardization Program (VDSP). Standardizing vitamin D assays: the way forward. *Journal of Bone and Mineral Research*. 2014; 29(8): 1709-1714.
124. Holick MF. Vitamin D deficiency. *New England Journal of Medicine*. 2007; 357(3): 266-281.
125. Varsavsky M, Alonso G, Garcia-Martin A. Vitamina D: presente y futuro. *Revista Clínica Española*. 2014; 214(7): 396-402.
126. Black LJ, Anderson D, Clarke MW, Ponsonby AL, Lucas RM. Analytical bias in the measurement of serum 25-hydroxyvitamin D concentrations impairs assessment of vitamin D status in clinical and research settings. *PLoS One*. 2015; 10(8), e0135478.
127. Grebe SK, Singh RJ. LC-MS/MS in the clinical laboratory—where to from here?. *The Clinical Biochemist Reviews*. 2011; 32(1): 5.
128. Miranda, D., Leiva, L., León, J.P., & Pía de la Maza, M. (2009). Diagnóstico y tratamiento de la deficiencia de vitamin D. *Revista Chilena de Nutrición*, 36 (3), 269-277.
129. Yu S, Cheng X, Fang H, Zhang R, Han J, Qin X et al. 25OHD analogues and vacuum blood collection tubes dramatically affect the accuracy of automated immunoassays. *Scientific reports*. 2015; 5.
130. Cavalier E, Lukas P, Crine Y, Peeters S, Carlisi A, Le Goff C et al. Evaluation of automated immunoassays for 25 (OH)-vitamin D determination in different critical populations before and after standardization of the assays. *Clinica Chimica Acta*. 2014; 431, 60-65.
131. Holmes EW, Garbincius J, McKenna KM. Analytical variability among methods for the measurement of 25-hydroxyvitamin D: still adding to the noise. *American journal of clinical pathology*. 2013; 140(4), 550-560.
132. Schwartz JB, Lai J, Lizaola B, Kane L, Markova S, Weyland P et al. A Comparison of Measured and Calculated Free 25(OH) Vitamin D Levels in Clinical Populations. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2014; 99(5): 1631-1637.
133. Chun RF, Peercy BE, Adams JS, Hewison M. Vitamin D binding protein and monocyte response to 25-hydroxyvitamin D and 1, 25-dihydroxyvitamin D: analysis by mathematical modeling. *PLoSone*. 2012; 7(1): e30773.
134. Oleröd G, Hultén LM, Hammarsten O, Klingberg E. The variation in free 25-hydroxy vitamin D and vitamin D-binding protein with season and vitamin D status. *Endocrine connections*. 2017; 6(2): 111-120.
135. Heures N, Lindhout E, Swinkels L. A direct assay for measuring free 25-hydroxyvitamin D. *Journal of AOAC International*. 2017; 100(5): 1318-1322.
136. Cashman KD, Dowling KG, Škrabáková Z, Kiely M, Lamberg-Allardt C, Durazo-Arvizu RA, et al. Standardizing serum 25-hydroxyvitamin D data from four Nordic population samples using the Vitamin D Standardization Program protocols: Shedding new light on vitamin D status in Nordic individuals. *Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation*. 2015; 75(7): 549-561.

137. González-Padilla E, López AS, González-Rodríguez E, García-Santana S, Mirallave-Pescador A, Marco MDVG et al. Elevada prevalencia de hipovitaminosis D en los estudiantes de medicina de Gran Canaria, Islas Canarias (España). *Endocrinología y Nutrición*. 2011; 58(6): 267-273.
138. Navarro Valverde C, Quesada Gómez JM. Deficiencia de vitamina D en España. ¿Realidad o mito? *Revista de Osteoporosis y Metabolismo Mineral*. 2014; 6,5-10.
139. Schleicher RL, Sternberg MR, Looker AC, Yetley EA, Lacher DA, Sempos CT et al. National estimates of serum total 25- hydroxyvitamin D and metabolite concentrations measured by liquid chromatography– tandem mass spectrometry in the US population during 2007– 2010. *The Journal of nutrition*. 2016; 146(5): 1051-1061.
140. Binkley N, Novotny R, Krueger D, Kawahara T, Daida YG, Lensmeyer G et al. Low vitamin D status despite abundant sun exposure. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2007; 92(6): 2130 – 2135.
141. Calatayud M, Jódar E, Sánchez R, Guadalix S, Hawkins F. Prevalencia de concentraciones deficientes e insuficientes de vitamina D en una población joven y sana. *Endocrinología y Nutrición*. 2009; 56(4): 164-169.
142. Boullata JI. Vitamin D supplementation: a pharmacologic perspective. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care*. 2010; 13(6): 677-684.
143. De Troya-Martín M, Blázquez-Sánchez N, Rivas-Ruiz F, Fernández-Canedo I, Rupérez-Sandoval A, Pons-Palliser J et al. Validación de un cuestionario en español sobre comportamientos, actitudes y conocimientos relacionados con la exposición solar: «Cuestionario a pie de playa». *Actas Dermo-Sifiliográficas*. 2009; 100(7): 586-595.
144. Glanz K, Yaroch AL, Dancel M, Saraiya M, Crane LA, Buller DB et al. Measures of sun exposure and sun protection practices for behavioral and epidemiologic research. *Archives of dermatology*. 2008; 144(2): 217-222.
145. Blalock SJ, Norton LL, Patel RA, Cabral K, Thomas CL. Development and assessment of a short instrument for assessing dietary intakes of calcium and vitamin D. *Journal of the American Pharmacists Association*. 2003; 43(6): 685-693.
146. Martín-Moreno JM, Gorgojo L. Valoración de la ingesta dietética a nivel poblacional mediante cuestionarios individuales: sombras y luces metodológicas. *Revista española de salud pública*. 2007; 81(5): 507-518.
147. Base de Datos Española de Composición de Alimentos (BEDCA) [en línea]. España [citado 2 de febrero de 2020]. Disponible en: [www.bedca.net/](http://www.bedca.net/)
148. Alvero-Cruz JR, Correas Gómez L, Ronconi M, Fernández Vázquez R, Porta i Manzanido, J. La impedancia bioeléctrica como método de estimación de la composición corporal: normas prácticas de utilización. *Revista Andaluza de medicina del deporte*. 2011; 4(4).
149. Pérez S, Parra MD, de Morentin BEM, Rodríguez MC, Martínez JA. Evaluación de la variabilidad intraindividual de la medida de composición corporal mediante bioimpedancia en voluntarias sanas y su relación con el índice de masa corporal y el pliegue tricípital. *Enfermería clínica*. 2005; 15(6): 343-347.

150. Martín Moreno V, Gómez Gandoy JB, Antoranz González MJ. Medición de la grasa corporal mediante impedancia bioeléctrica, pliegues cutáneos y ecuaciones a partir de medidas antropométricas. Análisis comparativo. Revista española de salud pública. 2001; 75: 221-236.
151. Rodríguez Camacho PM. Valores de referencia de composición corporal para población española adulta, obtenidos mediante antropometría, impedancia eléctrica (BIA) tetrapolar e interactancia de infrarrojos. Tesis doctoral. Madrid. Universidad Complutense de Madrid. 2017.
152. Zanella PB. Comparación de los métodos de antropometría clásica e impedancia bioeléctrica a través de la determinación de la composición corporal en jóvenes universitarias. Nutrición clínica y dietética hospitalaria. 2019; 39 (2): 10-10.
153. Hernández Ruiz de Eguiluz M, Martínez de Morentín B, Pérez-Díez S, Navas- Carretero S. Martínez JA. Estudio comparativo de medidas de composición corporal por absorciometría dual de rayos X, bioimpedancia y pliegues cutáneos en mujeres. An Real Acad Farm. 2010;76(2):209-222.
154. Deurenberg P, Wetstrate JA, Seidell JC. Body mass index as a measure of body fatness: age- and sex- specific prediction formulas. British Journal of Nutrition. 1991, vol. 65, no 2, p. 105-114.
155. Durnin JV, & Womersley JVGA. Body fat assessed from total body density and its estimation from skinfold thickness: measurements on 481 men and women aged from 16 to 72 years. British Journal of Nutrition. 1974;32(1): 77-97.
156. Siri WE. Body composition from fluid spaces and density: analysis of methods. En: Brozek J, Henschel A (eds.): Techniques for measuring body composition. Washington DC.
157. Brožek J, Grande F, Anderson JT, Keys A. Densitometric analysis of body composition: revision of some quantitative assumptions. Annals of the New York Academy of Sciences. 1963;110(1):113-140.
158. Frisancho AR. New norms of upper limb fat and muscle areas for assesment of nutritional status. The American Journal of Clinical Nutrition. 1981;34(11):2540-2545.
159. Heymsfield SB, McManus C, Smith J, Stevens V, Nixon DW. Anthropometric measurement of muscle mass: revised equation for calculating bone free arm muscle area. The American Journal of Clinical Nutrition. 1982;36(4):680-690.
160. Corvos Hidalgo CA. Evaluación antropométrica del estado nutricional empleando la circunferencia del brazo en estudiantes universitarios. Nutrición clínica y dietética hospitalaria. 2011;31(3):22-27.
161. Martín Moreno V, Gómez Gandoy JB, Antoranz González MJ, Gómez de la Cámara A. Concordancia entre los porcentajes de grasa corporal estimados mediante el área adiposa del brazo, el pliegue del tríceps y por impedanciometría brazo- brazo. Revista Española de Salud Pública. 2003;77:347-361.
162. Martín Moreno V, Benito Gómez Gandoy J, Otero, O, Gómez de la Cámara A, Antoranz González M. Grado de acuerdo entre los índices adiposo- musculares obtenidos a partir de medidas antropométricas del brazo, pliegues cutáneos e impedancia bioeléctrica.

Nutrición Hospitalaria. 2003;18(2):77-86.

163. Kyle UG, Bosaeus I, De Lorenzo AD, Deurenberg P, Elia M, Gómez JM, et al. Bioelectrical impedance analysis — part I: review of principles and methods. *Clinical nutrition*. 2004;23(5):1226-1243.
164. Kyle UG, Bosaeus I, De Lorenzo AD, Deurenberg P, Elia M, Gómez JM et al. Bioelectrical impedance analysis — part II: utilization in clinical practice. *Clinical nutrition*. 2004;23(6):1430-1453.
165. Ochoa ER, Oyarzábal AV, Beti MIS, San Martín L, Gracia JR. Análisis de la composición corporal en una muestra de población urbana en riesgo de malnutrición. *Zainak. Cuadernos de Antropología-Etnografía*. 2011;(34):553-565.
166. Portao J, Bescós R, Iruetia A, Cacciatori E, Vallejo L. Valoración de la grasa corporal en jóvenes físicamente activos: antropometría vs bioimpedancia. *Nutrición hospitalaria*. 2009;24(5):529-534.
167. Gil Hernández Á. Tratado de nutrición: Nutrición humana en el estado de salud. *Acción Médica*. Ed. Médica Panamericana; 2017.
168. Arias M. La bioimpedancia como valoración del peso seco y del estado de hidratación. *Diálisis y Trasplante*. 2010;31(4):137-139.
169. Kyle UG, Genton L, Karsegard L, Slosman DO, Pichard C. Single prediction equation for bioelectrical impedance analysis in adults aged 20–94 years. *Nutrition*. 2001;17(3):248-253.
170. Gómez T, Mole PA, Collins A. Dilution of body fluid electrolytes affects bioelectrical impedance measurements. *Research in Sports Medicine: An International Journal*. 1993;4(4):291-298.
171. Heiss CJ, Naylor J, Bronco KM, Myers BJ. A small food or fluid load has no effect on body composition measured by 3 different methods. *Topics in Clinical Nutrition*. 2008;23(3):229-233.
172. Heiss CJ, Gara N, Novotny D, Heberle H, Morgan L, Stufflebeam J et al. Effect of a 1 liter fluid load on body composition measured by air displacement plethysmography and bioelectrical impedance. *Journal of Exercise Physiology Online*. 2009;12(2).
173. Freeman J, Wilson K, Spears R, Shalhoub V, Sibley P. Performance evaluation of four 25-hydroxyvitamin D assays to measure 25-hydroxyvitamin D<sub>2</sub>. *Clinical biochemistry*. 2015;48(16-17):1097-1104.
174. Farrell CJL, Martin S, McWhinney B, Straub I, Williams P, Herrmann M. State-of-the-art vitamin D assays: a comparison of automated immunoassays with liquid chromatography–tandem mass spectrometry methods. *Clinical chemistry*. 2012; 58(3):531-542.
175. Álvarez EMI, Ybern MLG, Botías MD, de Osaba JBM, Sáez IH, Ferrer MCP. Comparación de las concentraciones de vitamina D por 3 métodos comerciales. *Revista del Laboratorio Clínico*. 2013;6(1):2-9.
176. Roche Diagnostics, Method Sheet Elecsys® Vitamin D total II, 2018.
177. Bowker AH. A test for symmetry in contingency tables. *Journal of the American Statistical Association*.

association. 1948;43(244):572-574.

178. Kendall MG, Gibbons JD. Rank Correlation Methods. 5<sup>th</sup> ed. New York: Oxford University Press. 1990. 260 p.
179. Bland JM, Altman DG. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet*, 1986;(1):307-310.
180. Bland JM, Altman DG. Comparing two methods of clinical measurement: a personal history. *International Journal of epidemiology*. 1995;24 (Supplement\_1), S7-S14.
181. Fleiss JL. Design and analysis of clinical experiments (Vol.73). John Wiley & Sons. 2011. 448 p.
182. García-García JA, Reding-Bernal A, López-Alvarenga JC. Cálculo del tamaño de la muestra en investigación en educación médica. *Investigación en educación médica*. 2013;2(8): 217-224.
183. Vaqueiro M, Baré M, Anton E, Andre E, Moya A, Sampere R et al. Hipovitaminosis D asociada a exposición solar insuficiente en la población mayor de 64 años. *Medicina Clínica*. 2007;129(8):287-291.
184. Memoria de Actividad 2018. Memorias de actividad – Portal de Transparencia del Centro de Hemoterapia de Castilla y León. Valladolid. Fundación de Hemoterapia y hemodonación de Castilla y León. 2019. [citado 2 de febrero de 2020] Disponible en: <https://transparencia.centrodehemoterapiacyl.es/quienes-somos/memoria-de-actividades/>
185. Resumen de Actividad 2018. Centre de Transfusió Comunitat Valenciana. Valencia. 2018. [citado 2 de febrero de 2020]. Disponible en: <http://www.centro-transfusion.san.gva.es/resumen-de-actividad>
186. Portao J, Bescós R, Iruetia A, Cacciatori E, Vallejo L. Valoración de la grasa corporal en jóvenes físicamente activos: antropometría vs bioimpedancia. *Nutrición hospitalaria*. 2009;24(5):529-534.
187. Serrano MM, Beneit MS, Santurino MM, Armesilla MC, de Espinosa MGM, del Cerro JP. Técnicas analíticas en el estudio de la composición corporal. Antropometría frente a sistemas de bioimpedancia bipolar y tetrapolar. *Nutrición Clínica y Dietética Hospitalaria*. 2007;27(3):11-19.
188. Rodríguez Huertas JF, Rodríguez Lara A, González Acevedo O, Mesa García MD. Leche y productos lácteos como vehículos de calcio y vitamina D: papel de las leches enriquecidas. *Nutrición hospitalaria*. 2019;36(4):962-973
189. González-Rodríguez LG, Rodríguez-Rodríguez E. Situación en vitamina D y estrategias para alcanzar las ingestas recomendadas. *Nutrición Hospitalaria*. 2014;30.
190. Rodríguez Sangrador M. Influencia de la exposición solar y la dieta en el estatus nutricional de vitamina D en mujeres adolescentes y de edad avanzada estudio OPTIFORD-Unión Europea. Tesis doctoral. Madrid. Universidad Complutense de Madrid. 2007.
191. Ortega Anta RM, González Rodríguez LG, Navia Lombán B, Perea Sánchez JM, Aparicio Vizquete A, López Sobaler AM. Ingesta de calcio y vitamina D en una muestra

representativa de mujeres españolas: problemática específica en menopausia. *Nutrición Hospitalaria*. 2013;28(2):306-313.

192. Serra-Majem L, Bes-Rastrollo M, Román-Vinas B, Pfrimer K, Sánchez- Villegas A, Martínez-González MA. Dietary patterns and nutritional adequacy in a Mediterranean country. *British Journal of Nutrition*. 2009;101(S2):S21-S28.
193. Zazpe I, Sánchez-Taínta A, Santiago S, de la Fuente-Arrillaga C, Bes- Rastrollo M, Martínez JA et al. Association between dietary carbohydrate intake quality and micronutrient intake adequacy in a Mediterranean cohort: the SUN (Seguimiento Universidad de Navarra) Project. *British journal of nutrition*. 2014;111(11):2000-2009.
194. Fallaize R, Forster H, Macready AL, Walsh MC, Mathers JC, Brennan L, et al. Online dietary intake estimation: Reproducibility and validity of the food4me food frequency questionnaire against a 4-day weighed food record. *Journal of medical internet research*. 2014;16(8): e 190.
195. García MR, Martín JF, Cannata J, Alonso CG, Díaz MN. Revisión del concepto de «suficiencia e insuficiencia» de vitamina D. *Nefrología*. 2003;23:73- 77.
196. González Solanellas M, Romagosa Perez-Portabella A, Zabaleta del Olmo E, Gudina Escudero N, Pozo Díaz C, Moreno Feliu R et al. Deficiencia de vitamina D en mujeres en edad fértil. *Atención primaria*. 2008;40(8):393-399.
197. Mata-Granados JM, de Castro ML, Gomez JQ. Inappropriate serum levels of retinol,  $\alpha$ -tocopherol, 25 hydroxyvitamin D3 and 24, 25 dihydroxyvitamin D3 levels in healthy Spanish adults: Simultaneous assessment by HPLC. *Clinical biochemistry*. 2008;41(9):676-680.
198. Rosen CJ, Taylor CL. Common misconceptions about vitamin D— implications for clinicians. *Nature Reviews Endocrinology*. 2013;9(7):434.
199. González-Molero I, Morcillo S, Valdés S, Pérez-Valero V, Botas P, Delgado E, et al. Vitamin D deficiency in Spain: a population-based cohort study. *European journal of clinical nutrition*. 2011;65(3):321.
200. Lips P, Duong TU, Oleksik A, Black D, Cummings S, Cox D, et al. A global study of vitamin D status and parathyroid function in postmenopausal women with osteoporosis: baseline data from the multiple outcomes of raloxifene evaluation clinical trial. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2001;86(3):1212-1221.
201. Pérez-Llamas F, López-Contreras MJ, Blanco MJ, López-Azorín F, Zamora S, Moreiras O. Seemingly paradoxical seasonal influences on vitamin D status in nursing-home elderly people from a Mediterranean area. *Nutrition*. 2008;24(5):414-420.
202. Mendoza B, Ronco ÁL. Estacionalidad de la vitamina D plasmática: su importancia en la clínica y en la salud. *Revista Médica del Uruguay*. 2016;32(2): 80-86.
203. AEMET. (2008). Valores Climatológicos Normales. Guía resumida del clima en España 1971-2000. Madrid. Agencia Estatal de Meteorología. [citado en noviembre de 2019] Disponible en: <http://www.aemet.es/es/serviciosclimaticos/datosclimatologicos/valoresclimatologicos>

204. Moreno AF, Candil SD, Lagos MB. Cambios estacionales de las concentraciones séricas de vitamina D en pacientes atendidos en un Centro de Salud. *Revista de Osteoporosis y Metabolismo Mineral*. 2012;4(2):63-68.
205. Fassi J, Russo Picasso MF, Furci A, Sorroche P, Jauregui R, Plantalech L. Variaciones estacionales de 25-hidroxivitamina D en jóvenes y ancianos de la ciudad de Buenos Aires. *Medicina (Buenos Aires)*. 2003;63(3):215-220.
206. Carnevale V, Modoni S, Pileri M, Di Giorgio A, Chiodini I, Minisola S, et al. Longitudinal evaluation of vitamin D status in healthy subjects from southern Italy: seasonal and gender differences. *Osteoporosis International*. 2001;12(12):1026-1030.
207. Wolman R, Wyon MA, Koutedakis Y, Nevill AM, Eastell R, Allen N. Vitamin D status in professional ballet dancers: winter vs. summer. *Journal of Science and Medicine in Sport*. 2013;16(5):388-391.
208. Eslamifar A, Khalaj A, Gheini MH, Abachi M, Salati M, Eslamifar M, et al. Quantitative comparison between amount of 25-hydroxy vitamin D in serum of 20–35 years old population of in Iran; In winter and in summer. *International Journal of Medical Research & Health Sciences*. 2018;5(10):61-64.
209. Unger MD, Cuppari L, Titan SM, Magalhães MCT, Sasaki AL, dos Reis LM, et al. Vitamin D status in a sunny country: where has the sun gone?. *Clinical nutrition*. 2010;29(6):784-788.
210. Taes YE, Goemaere S, Huang G, Van Pottelbergh I, De Bacquer D, Verhasselt B, et al. Vitamin D binding protein, bone status and body composition in community-dwelling elderly men. *Bone*. 2006;38(5):701-707.
211. Karlsson T, Osmancevic A, Jansson N, Hulthén L, Holmäng A, Larsson I. Increased vitamin D-binding protein and decreased free 25 (OH) D in obese women of reproductive age. *European journal of nutrition*. 2014;53(1): 259-267.
212. Szabó B, Tabák ÁG, Toldy E, Szekeres L, Szili B, Bakos B, et al. The role of serum total and free 25-hydroxyvitamin D and PTH values in defining vitamin D status at the end of winter: a representative survey. *Journal of bone and mineral metabolism*. 2017;35(1):83-90.
213. Ribas-Barba L, Serra-Majem L, Román-Vinas B, Ngo J, García-Álvarez A. Effects of dietary assessment methods on assessing risk of nutrient intake adequacy at the population level: from theory to practice. *British Journal of Nutrition*. 2009;101(S2): S64-S72.
214. Rivas A, Romero A, Mariscal M, Monteagudo C, Hernández J, Olea- Serrano F. Validación de cuestionarios para el estudio de hábitos alimentarios y masa ósea. *Nutrición Hospitalaria*. 2009;24(5):521-528.
215. Pritchard JM, Seechurn T, Atkinson, SA. A food frequency questionnaire for the assessment of calcium, vitamin D and vitamin K: a pilot validation study. *Nutrients*. 2010;2(8):805-819.
216. Henríquez-Sánchez P, Sánchez-Villegas A, Doreste-Alonso J, Ortiz- Andrellucchi A, Pfrimer, K, Serra-Majem, L. Dietary assessment methods for micronutrient intake: a systematic review on vitamins. *British journal of nutrition*. 2009;102(S1):S10-S37.
217. Weir RR, Carson EL, Mulhern MS, Laird E, Healy M, Pourshahidi LK. Validation of a food frequency questionnaire to determine vitamin D intakes using the method of triads.

Journal of Human Nutrition and Dietetics. 2016;29(2):255-261.

218. Kiely M, Collins A, Lucey AJ, Andersen R, Cashman KD, Hennessy Á. Development, validation and implementation of a quantitative food frequency questionnaire to assess habitual vitamin D intake. *Journal of Human Nutrition and Dietetics*. 2016;29(4):495-504.
219. Trinidad Rodríguez I, Fernández Ballart J, Cucó Pastor G, Biarnés Jordà E, Arija Val V. Validación de un cuestionario de frecuencia de consumo alimentario corto: reproducibilidad y validez. *Nutrición Hospitalaria*. 2008;23(3):242-252.
220. Aguirre-Jaime A, Cabrera de León A, Domínguez Coello S, Borges Álamo C, Carrillo Fernández L, Gavilán Batista JC, et al. Validación de un cuestionario de frecuencia de consumo de alimentos adaptado para el estudio y seguimiento de la población adulta de las Islas Canarias. *Revista Española de Salud Pública*. 2008;82(5):509-518.