



UNIVERSITAT DE BARCELONA

Estudi de la concentració circulant de vitamina D₃ i l'expressió gènica del receptor de vitamina D a teixit adipós en relació a la hipertensió arterial

Núria Garriga Bardalet

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

**ESTUDI DE LA CONCENTRACIÓ
CIRCULANT DE VITAMINA D₃ I
L'EXPRESSIÓ GÈNICA DEL RECEPTOR DE
VITAMINA D A TEIXIT ADIPÓS EN
RELACIÓ A LA HIPERTENSIÓ ARTERIAL**

NÚRIA GARRIGA BARDALET

OCTUBRE – 2015

Institut d'Investigació Biomèdica de Girona Dr. Josep Trueta (IDIBGI)

Programa de doctorat de Nutrició i Metabolisme

Universitat de Barcelona

**ESTUDI DE LA CONCENTRACIÓ CIRCULANT DE VITAMINA D₃ I
L'EXPRESSIÓ GÈNICA DEL RECEPTOR DE VITAMINA D A TEIXIT
ADIPÓS EN RELACIÓ A LA HIPERTENSIÓ
ARTERIAL**

Memòria presentada per Núria Garriga Bardalet per optar al títol de doctora per la Universitat de
Barcelona

Interessada



Núria Garriga Bardalet

Director



Dr. José Manuel Fernández Real
Hospital Universitari Josep Trueta

Tutor



Dr. José Antonio Fernández López
Departament de Nutrició i Bromatologia
Facultat de Biologia

Agraïments

En primer lloc, voldria agrair sincerament al Dr. José Manuel Fernández Real per haver-me recolzat de manera totalment incondicional amb el seu esforç, consells i supervisió de la tesis. Al Dr. José Antonio Fernández López en la revisió de la tesis i orientar-me sobre les directrius establertes per la UB.

La present Tesis Doctoral ha estat un gran repte personal. Com infermera he pogut conèixer i apreciar la gran tasca dels biòlegs en el camp científic amb la seva aportació en els estudis clínics. Voldria mostrar el meu agraïment a la Dra. Marta Serrano per recolzar-me, ajudar-me i guiar-me en l'estudi clínic de les persones incloses en la tesis. El Dr. José Maria Moreno i el Dr. Francisco Ortega per la seva amabilitat, professionalitat i col·laboració. A la meva família pel seu recolzament i paciència en aquest anys de creixement professional i personal.

Moltíssimes gràcies a tots.

Índex general

Llistat d'abreviacions	iv
1. Resum	1
1.1 Resum	1
1.2 Resumen	4
1.3 Summary.....	7
2. Introducció	9
2.1 Vitamina D	10
2.1.1 Definició	10
2.1.2 Regulació de la vitamina D.....	13
2.1.3 Mecanismes d'acció.....	15
2.1.3.1 Via genòmica.....	16
2.1.3.2 Via no genòmica.....	17
2.2 Obesitat	19
2.2.1 Definició	19
2.2.2 Epidemiologia i complicacions associades	24
2.3 Teixit adipós	29
2.3.1 Teixit adipós blanc	29
2.3.2 Teixit adipós i resistència a la insulina	32
2.4 Hipertensió arterial	40
2.4.1 Definició	40
2.4.2 Hipertensió arterial i obesitat	44
2.4.3 Hipertensió arterial i resistència a la insulina	48
2.4.4 Hipertensió arterial i citocines: TNF-alfa i IL-10	49
2.5 Funcions biològiques de la vitamina D	51

2.5.1	Vitamina D i hipertensió arterial.....	51
2.5.1.1	Mecanismes biològics que relacionen el dèficit de vitamina D i la hipertensió arterial.....	53
2.5.1.2	Suplementació de vitamina D i la tensió arterial.....	56
2.5.2	Vitamina D i obesitat	57
2.5.3	Vitamina D i teixit adipós	59
3.	Justificació.....	61
4.	Hipòtesis	64
5.	Objectius	65
6.	Metodologia.....	66
6.1	Disseny de l'estudi, participants i enregistrament de les dades.....	66
6.2	Procediments clínics	70
6.2.2	Mesura de la tensió arterial	70
6.2.3	Paràmetres analítics	72
6.3	Teixit adipós	73
6.3.1	Obtenció i tractament del teixit adipós	73
6.3.2	Estudi d'expressió gènica	74
6.3.2.1	Extracció de l'ARN.....	74
6.3.2.2	Retrotranscripció de l'ARN	78
6.3.2.3	Anàlisi de l'expressió gènica via Real-time PCR	80
6.3.3	Kits, reactius i assajos comercials. Equipament	84
6.4	Anàlisi estadístic.....	86
7.	Resultats	87
7.1	Primer objectiu. Vitamina D circulant i hipertensió arterial	88
7.2	Segon Objectiu. Vitamina D circulant i hipertensió arterial	89
7.3	Tercer objectiu. Estudi de l'expressió gènica del VDR en el teixit adipós.....	99

8. Discussió	108
8.1 Primer i segon objectiu	108
8.1.1 Concentració de vitamina D ₃ circulant i tensió arterial.....	108
8.1.2 Efectes de la suplementació amb vitamina D ₃	112
8.2 Tercer objectiu. Estudi de l'expressió del VDR en el teixit adipós	118
8.2.1 Relació entre expressió gènica del VDR i la tensió arterial.....	118
8.2.2 Expressió gènica del VDR i el teixit adipós subcutani i visceral	120
8.2.3 Relació entre l'expressió gènica del VDR i el metabolisme de la glucosa	121
8.2.4 Relació entre expressió gènica del VDR i citocines	123
8.3 Limitacions	126
9. Conclusions	127
10. Bibliografia	129
11. Annex: Article	159

Llistat d'abreviacions

1,25(OH) ₂ vitamina D ₃	1,25 dihidroxivitamina D ₃ o calcitriol
25(OH)vitamina D ₃	25-hidroxivitamina D ₃ o calcidiol o calcifediol
ADN	Àcid desoxirribonucleic
ADNc	Còpia d'àcid desoxirribonucleic
AGL	Àcids grassos lliures
AMPA	Automesura de la tensió arterial
Ang II	Angiotensina II
ARN	Àcid ribonucleic
ARNm	Àcid ribonucleic missatger
AT1	Receptor d'angiotensina II
CC	Circumferència de cintura
Colesterol-HDL	Lípids d'alta densitat
Colesterol-LDL	Lípids de baixa densitat
Cts	Cicles tèrmics (Threshold cycle)
DBP	Proteïna d'unió a la vitamina D
DM2	Diabetis mellitus tipus 2
ECA	Enzim convertidor d'angiotensina
FGF-23	Factor de creixement fibroblàstic-23
Hb1Ac	Hemoglobina glicosilada

HOMA-IR	Model d'homeòstasi de la resistència a la insulina
HTA	Hipertensió arterial
ICC	Índex de cintura i maluc
IL-1b	Interleuquina-1b
IL-6	Interleuquina-6
IL-10	Interleuquina-10
IMC	Índex de massa corporal
Ln	Logaritme
LPL	Lipoproteïna lipasa
LSH	Lipasa sensible a l'hormona
MAPA	Mesura de la tensió arterial en el Centre d'Atenció Primària
MCP-1	Proteïna quimioattractant de macròfags
M1	Macròfags amb perfil secretor antiinflamatori
M2	Macròfags amb perfil secretor proinflamatori
NO	Òxid nítric
OMS	Organització Mundial de la Salut
PAC	Mesura de la tensió arterial en la Consulta clínica
PPAR γ	Receptors activats per proliferadors de paroximes gamma

PAI-1	Inhibidor de l'activador del plasminògen
PTH	Hormona paratiroidea
RI	Resistencia a la insulina
RT-PCR	Temps real de la reacció en cadena de la polimerasa
RXR	Receptor de l'acid retinoic
SAT	Teixit adipós subcutani
SEEDO	Societat Espanyola per l'Estudi de l'Obesitat
SRA	Sistema renina angiotensina
SRAA	Sistema renina angiotensina aldosterona
SVC	Estroma vascular
TA	Tensió arterial
TAd	Tensió arterial diastòlica
TAs	Tensió arterial sistòlica
TLR	Receptors tipus Toll
TNF- alfa	Factor de necrosis tumoral alfa
TNFR1	Receptor-1 del TNF-alfa
TNFR2	Receptor-2 del TNF-alfa
tPA	Proteases tissulars de plasminògen
VAT	Teixit adipós visceral
VDR	Receptor de vitamina D

VDR-SAT	Receptor de vitamina D ₃ en el teixit subcutani
VDR-VAT	Receptor de vitamina D ₃ en el teixit visceral

1. Resum

1.1 Resum

Diferents estudis epidemiològics evidencien un major risc de desenvolupar hipertensió arterial (HTA) en subjectes amb baixes concentracions circulants de 25 (OH) vitamina D₃. Tant la HTA com la deficiència de la vitamina D₃ estan associades amb l'obesitat. Es ben conegut que la pèrdua de pes comporta una reducció de la tensió arterial (TA), però la seva relació amb la vitamina D₃ ha estat poc estudiada. El teixit adipós podria jugar un paper en la relació entre obesitat, HTA i el metabolisme de la vitamina D₃. En aquest treball es va analitzar 3 objectius: 1) L'associació entre la concentració circulant de vitamina D₃ i la TA a individus obesos i no obesos, 2) si la concentració circulant de vitamina D₃ tenia relació amb la baixada de la TA després de pèrdua de pes en pacients amb obesitat mòrbida intervinguts per cirurgia bariàtrica, i 3) l'associació entre l'expressió gènica del receptor de vitamina D (VDR) i la TA, i elements implicats amb la seva fisiopatologia en el teixit adipós subcutani (SAT) i visceral (VAT).

El primer objectiu s'analitzà a partir d'un estudi transversal retrospectiu de 509 subjectes (cohort formada per subjectes amb un ampli rang d'índex de massa corporal) on es va observar una associació inversa entre la concentració circulant de vitamina D₃ i la xifra de TA sistòlica i diastòlica,

però al realitzar una regressió lineal múltiple, les relacions entre les concentracions circulants de vitamina D₃ i la TA sistòlica i TA diastòlica no van ser independents del grau d'obesitat i l'edat dels subjectes. La concentració plasmàtica de vitamina D₃ va ser inferior en subjectes catalogats com hipertensos (≥ 135 i/o > 85 mmHg o tractament antihipertensiu) respecte als normotensos ($15,5 \pm 9,2$ vers $17,9 \pm 9,6$; $p = 0,011$ ng/ml).

El segon objectiu s'analitzà a partir d'un estudi longitudinal retrospectiu de 169 subjectes, on es va observar una associació inversa entre la concentració circulant de vitamina D₃ prèvia a la cirurgia i la xifra de la TA diastòlica als 12 i 18 mesos després de la cirurgia bariàtrica.

I el tercer objectiu s'analitzà a partir d'un estudi retrospectiu de l'expressió gènica del VDR en mostres de teixit adipós. En el teixit adipós visceral es va objectivar una associació positiva entre l'expressió gènica del VDR i la xifra de la TA sistòlica ($r = 0,282$; $p = 0,020$), així com una associació directa amb l'expressió gènica del factor de necrosis tumoral alfa (TNF-alfa) ($r = 0,264$; $p = 0,045$) ($n = 121$). A SAT també es va observar una associació positiva entre l'expressió gènica del VDR i l'expressió gènica de la interleuquina 10 (IL-10) ($r = 0,616$; $p < 0,001$). Es de destacar que la expressió relativa del VDR es va relacionar de forma inversa amb el grau de

sensibilitat a la insulina tant en SAT ($r = -0,54$; $p = 0,021$) com en VAT ($r = -0,49$; $p = 0,037$) en una cohort independent.

En conclusió, la concentració circulant de vitamina D₃ s'associà amb la xifra de la TA en subjectes amb un ampli rang d'adipositat, però aquesta associació no es va mantenir després d'ajustar-ho per possibles factors de confusió en una regressió lineal múltiple. En subjectes amb obesitat mòrbida, la concentració circulant de vitamina D₃ prèvia a la cirurgia (abans de la pèrdua de pes) s'associà amb les xifres de TA diastòlica als 12 i 18 mesos posteriors al procediment quirúrgic i la pèrdua de pes assolida. Una major expressió gènica del VDR al teixit adipós de pacients obesos es relaciona amb diferents elements de la fisiopatologia de la HTA, com la sensibilitat a la insulina i la inflamació crònica de baix grau (TNF-alfa i IL-10).

1.2 Resumen

Diferentes estudios epidemiológicos evidencian un mayor riesgo de desarrollar hipertensión arterial (HTA) en sujetos con bajas concentraciones circulantes de 25(OH)vitamina D₃. Tanto la HTA como la deficiencia de la vitamina D₃ están asociadas con la obesidad. Es bien conocido que la pérdida peso comporta una reducción de la tensión arterial (TA), pero su relación con la vitamina D₃ ha estado poco estudiada. El tejido adiposo podría jugar un papel en la relación entre obesidad, HTA, y el metabolismo de la vitamina D₃. En esta tesis se analizó 3 objetivos: 1) La asociación entre la concentración circulante de vitamina D₃ y la TA en individuos obesos y no obesos, 2) si la concentración circulante de vitamina D₃ tenía relación con la bajada de la TA después de la pérdida de peso en pacientes con obesidad mórbida intervenidos por cirugía bariátrica, i 3) l'asociación entre la expresión génica del receptor de vitamina D (VDR) y la TA, y elementos implicados con su fisiopatología, en el tejido adiposo subcutáneo (SAT) y visceral (VAT).

El primer objetivo se analizó a partir de un estudio transversal retrospectivo de 509 sujetos (cohorte formada por sujetos con un amplio rango de índice de masa corporal), donde se observó una asociación inversa entre la concentración circulante de vitamina D₃ y la cifra de TA sistólica y

diastólica, pero al realizar una regresión lineal múltiple, las relaciones entre las concentraciones circulantes de vitamina D₃ y la TA sistólica y la TA diastólica no fueron independientes del grado de obesidad y de la edad de los sujetos. La concentración plasmática de vitamina D₃ fue inferior en sujetos catalogados como hipertensos (≥ 135 i/o >85 mmHg o con tratamiento antihipertensivo) respecto a los normotensos ($15,5 \pm 9,2$ frente a $17,9 \pm 9,6$; $p= 0,011$ ng/ml).

El segundo objetivo se analizó a partir de un estudio longitudinal retrospectivo donde se incluyó 169 sujetos, se observó una asociación inversa entre la concentración circulante de vitamina D₃ previa a la cirugía y la cifra de la TA diastólica a los 12 y 18 meses después de la cirugía bariátrica.

Y el tercer objetivo se analizó a partir de un estudio retrospectivo de la expresión génica del VDR en muestras de tejido adiposo, se objetivó una asociación positiva entre la expresión génica del VDR en VAT y la cifra de la TA sistólica ($r= 0,282$; $p= 0,020$), así como una asociación directa con la expresión génica del factor de necrosis tumoral alfa (TNF-alfa) en VAT ($r= 0,264$; $p= 0,045$) ($n= 121$). En el SAT también se observó una asociación positiva entre la expresión génica del VDR y la expresión génica de la interleuquina 10 (IL-10) ($r= 0,616$; $p <0,001$). Es de destacar que la

expresión relativa del VDR se relacionó de forma inversa con el grado de sensibilidad a la insulina tanto en SAT ($r = -0,54$; $p = 0,021$) como en VAT ($r = -0,49$; $p = 0,037$) en una cohorte independiente.

En conclusión, la concentración circulante de vitamina D₃ se asoció con la cifra de la TA en sujetos con un amplio rango de adiposidad, pero la asociación no se mantuvo después de ser ajustado por posibles factores de confusión en una regresión lineal múltiple. En sujetos con obesidad mórbida, la concentración circulante de vitamina D₃ previa a la cirugía (antes de la pérdida de peso) se asoció con las cifras de la TA diastólica a los 12 y 18 meses posteriores al procedimiento quirúrgico y la pérdida de peso lograda. Una mayor expresión génica del VDR en el tejido adiposo de pacientes obesos se relaciona con diferentes elementos de la fisiopatología de la HTA, como la sensibilidad a la insulina y la inflamación crónica de bajo grado (TNF-alfa y IL-10).

1.3 Summary

Several epidemiologic studies have evidenced an increased risk for the development of hypertension in subjects with low serum vitamin D₃ levels.

Both hypertension and vitamin D₃ deficiency are associated with obesity.

It is well known that weight loss results in decreased blood pressure but there are few studies in the literature about the potential relationship between weight loss and serum vitamin D₃ levels. The adipose tissue could have a role in the relationship among obesity, hypertension and vitamin D₃ metabolism. In this Thesis, we aimed : 1) To study the association between serum vitamin D₃ levels and blood pressure in obese and non obese individuals. 2) To evaluate the effects of bariatric surgery-induced weight loss on serum vitamin D₃ levels and their relationship with blood pressure in patients with morbid obesity. 3) To study the potential relationship among vitamin D receptor (VDR) gene expression in subcutaneous (SAT) and visceral adipose tissue (VAT), blood pressure and other elements implicated in the pathophysiology of hypertension.

The first objective was studied in cross-sectional study in 509 subjects (including a wide range of adiposity). We observed an inverse association between serum vitamin D₃ levels and systolic and diastolic blood pressure levels, but multivariate regression analyses s showed that the association

was not independent of the degree of obesity or age. The plasma levels of vitamin D₃ were lower among hypertensive subjects (>135 i/o >85 mmHg or antihypertensive treatment) compared with healthy group of subjects (15.5 ± 9.2 vs. 17.9 ± 9.6 ; $p= 0.011$ ng/ml).

In a retrospective study of 169 subjects with morbid obesity, we observed an inverse association between serum vitamin D levels before bariatric surgery and diastolic blood pressure 12 and 18 months after bariatric surgery.

The third objective was studied also in subjects with morbid obesity. A positive association between VAT VDR gene expression and systolic blood pressure was found ($r= 0,282$; $p= 0,020$); VAT VDR mRNA levels were also linked to VAT Tumour Necrosis factor Alfa (TNF-alpha) gene expression ($r=0,264$; $p= 0,045$) ($n=121$); and SAT VDR mRNA levels were linked to SAT interleukin 10 mRNA (IL-10) ($r= 0,616$; $p <0,001$). Insulin sensitivity was associated with SAT ($r= -0,54$; $p= 0,021$) and VAT mRNA levels ($r=-0,49$; $p=0,037$).

In conclusion, circulating vitamin D₃ concentration was associated with blood pressure in subjects with a wide range of adiposity, but the association did not remain significant after adjusting for potential confounders in a multivariate regression analyses. In subjects with morbid obesity, baseline pre-surgical serum vitamin D concentrations were associated with diastolic

blood pressure 12 and 18 months after bariatric surgery. The increased gene VDR expression in the adipose tissue of obese patients was related to different elements of the hypertension pathophysiology, as insulin sensitivity and chronic low grade inflammation (TNF-alpha and IL-10).

2. Introducció

2.1 Vitamina D

2.1.1 Definició

La vitamina D és un heterolípid insaponificable del grup dels esteroides que es troba implicada en múltiples funcions. Existeixen fonamentalment dues vitamines D, la D₃ o colecalciferol (Adams JS et al, 2010; Dusso AS et al, 2005), que prové de la dieta o es sintetitzada endògenament en l'epidermis per l'acció de la radiació solar (radiació β ultravioleta, entre 290 i 315 nm) sobre un precursor anomenat 7-dehidrocolesterol (provitamina D₃), que a la vegada procedeix del colesterol (DeLuca HF, 2004), i la vitamina D₂ o ergocalciferol, que es forma també a partir d'un compost d'origen vegetal (plantes i fongs), l'ergosterol (provitamina D₂).

En sentit estricte, la vitamina D₃, més que una vitamina és una prohormona, on la seva configuració molecular és similar als esteroides clàssics (cortisol, aldosterona, estradiol), ja que posseeix l'estructura bàsica de l'anell ciclopentanoperhidrofenantreno (Norman AW, 2008).

La principal font de vitamina D₃ prové de l'exposició de la pell a la llum solar, i solament una petita part prové de la ingesta. Existeixen diverses fonts naturals alimentàries riques en vitamina D, com són els peixos amb alt contingut en greix (el salmó o la sardina), o oli de fetge de bacallà, entre

altres. El colecalciferol procedent dels aliments s'absorbeix en el duodè i en el jejú, gràcies a les micel·les grasses que es formen en el intestí. Una vegada a l'enterocit, la vitamina D₃ s'incorpora als quilomicrons, arribant a la circulació sistèmica limfàtica, i finalment al fetge on succeeix una hidroxilació hepàtica que dóna lloc a la 25-hidroxivitamina D₃ (25(OH)vitamina D₃ o calcidiol). Aquesta conversió a calcidiol a nivell hepàtic també succeeix amb el colecalciferol sintetitzat en l'epidermis (60%) i la dermis (40%).

La 25(OH)vitamina D₃ circulant té una vida mitja de 25 dies i és el marcador biològic que millor reflecteix l'estat corporal de vitamina D₃ (Holick M, 1981; Prentice A et al, 2008). La 25(OH)vitamina D₃ serveix com a substrat per a l'enzim renal 1 α -hidroxilasa (CYP27B1), el qual regula la síntesi de la forma activa de la vitamina D₃, anomenada 1,25-dihidroxivitamina D₃ (1,25(OH)₂vitamina D₃ o calcitriol) (Bouillon R et al, 2008). El major regulador d'aquest sistema és la hormona paratiroidea (PTH) que, com a resposta a les concentracions de calci, incrementa la formació de 1,25(OH)₂vitamina D₃ (Christakos S et al, 2010).

En circulació, tant la 25(OH)vitamina D₃ com la 1,25(OH)₂vitamina D₃ es poden unir a diverses proteïnes plasmàtiques, la principal és la proteïna d'unió a la vitamina D (DBP) que s'encarrega de més del 90% del seu

transport (Norman AW, 2006), encara que també es pot trobar unida a l'albumina o a les lipoproteïnes. La forma activa de la vitamina D₃, 1,25(OH)₂vitamina D₃, s'uneix a un receptor nuclear (receptor de vitamina D, VDR) que no només s'ha trobat en el sistema gastrointestinal i hepàtic, sinó també en molts altres teixits (Verhave G et al, 2010).

Al llarg dels anys s'ha establert que la vitamina D₃ és essencial per a l'absorció de calci intestinal i desenvolupa un paper important en el manteniment de la seva homeòstasis, així com en el manteniment de la integritat de l'esquelet. A més, les baixes concentracions de 25(OH)vitamina D₃ s'han trobat associades amb diverses malalties i factors de risc cardiovasculars (Riachy R et al, 2006; Chiu KC et al, 2004). La prevalença de la hipovitaminosis D₃ s'associa amb una exposició baixa al sol, combinada amb una ingesta pobre d'aliments que contenen vitamina D o processos que cursen amb una dolenta absorció de les grasses (<http://www.uptodate.com/contents/overview-of-vitamin-d>).

Diversos factors endògens i exògens poden afectar a la producció de calcitriol com són: l'altitud i la latitud, l'estació de l'any, la pigmentació pròpia de l'individu, l'edat, l'obesitat i d'altres múltiples factors, inclús l'embaràs o la lactància (Chent S et al, 2007). S'ha descrit que la conversió epidèrmica de 7-dehidrocolesterol a pre-vitamina D₃ pot ser de 5 a 10

vegades més eficient en una pell amb una fototip de tipus II (pell blanca) que en una pell de fototip V (pell morena) (Chent S et al, 2007; Parra E, 2007).

2.1.2 Regulació de la vitamina D

La regulació de la biosíntesis endògena de l'hormona D_3 es centra fonamentalment pels canvis d'expressió dels enzims hidroxilases a través d'una sèrie de processos de retroalimentació positiva i negativa (Plum LA et al, 2009). Encara que el ronyó és el principal òrgan a on estan ubicats els enzims hidroxilases, altres teixits i cèl·lules, com els macròfags (Bikle DD, 2010; Morris HA et al, 2010) també poden portar a terme la síntesis de calcitriol.

En el ronyó està present l'enzim 24-hidroxilasa, un enzim inactivant, que pot hidroxilar tant la $25(OH)$ vitamina D_3 com la $1,25(OH)_2$ vitamina D_3 , però sent aquesta última el substrat preferit. Específicament, la 24-hidroxilasa limita la quantitat de $1,25(OH)_2$ vitamina D_3 accelerant el catabolisme cap a la $1,24,25$ -trihidroxivitamina D_3 , i llavors a àcid calcitroic (forma inactiva), que s'excreta per l'orina. No obstant, també pot hidroxilar la $25(OH)$ vitamina D_3 per formar la $24,25$ -dihidroxivitamina D , disminuint la

quantitat de 25(OH)vitamina D₃ disponible per 1 α -hidroxilasa (Christakos S et al, 2010; Adams JS et al, 2010).

A diferència de la 25-hidroxilació a fetge, la 1 α -hidroxilació a ronyó és regulada segons els requeriments de 1,25(OH)₂vitamina D₃. El calcitriol suprimeix de forma directe la secreció de la PTH per la glàndula paratiroidea, i regula negativament a la 1 α -hidroxilasa (Dusso AS et al, 2005). Trobem situacions com per exemple, durant l'embaràs, la lactància i el creixement, on la concentració plasmàtica de 1,25(OH)₂vitamina D₃ està incrementada probablement per una síntesi augmentada a ronyó. La 1 α -hidroxilasa s'estimula tant per factors iònics (calci, fòsfor, magnesi i potassi) com hormonals (estrògens, prolactina, hormona del creixement, insulina, calcitonina) però sobretot, per l'hormona paratiroidea (Norman AW, 2008).

Hi ha evidència, que al corregir-se el dèficit de concentració sèrica de calci, es genera una regulació a la baixa de 1,25(OH)₂vitamina D₃-PTH a partir del factor de creixement fibroblàstic-23 (FGF-23), alliberat a partir de l'ós (St-Arnaud R, 2008). El FGF-23 suprimeix l'expressió d'1 α -hidroxilasa desencadenant una inhibició en la síntesis de 1,25(OH)₂vitamina D₃ a més d'induir la 24-hidroxilasa al ronyó, amb la conseqüent reducció de les concentracions de vitamina D₃. La major activitat del FGF-23 s'ha associat

a trastorns de pèrdues de fosfat amb característiques clíniques que inclouen hipofosfatèmia, baixes concentracions plasmàtiques de 1,25(OH)₂vitamina D₃ i raquitisme/osteomalàcia (Christakos S et al, 2010; Renkema KY et al, 2008).

La 1,25(OH)₂vitamina D₃ sintetitzada interactuarà amb el VDR generant diversos efectes.

2.1.3 Mecanismes d'acció

El calcitriol és més hidròfil i té menor afinitat per la DBP que la 25(OH)vitamina D₃ (Houghton LA et al, 2006), el que facilita el seu proveïment als òrgans diana, a on el calcitriol exerceix els seus efectes regulant la transcripció gènica mitjançant dos mecanismes: a través de la unió a receptors nuclears (via genòmica), i a través de la seva unió a un receptor de membrana (via no genòmica) (Norman AW, 2008).

El VDR és un membre de la família de receptors nuclears hormonaals, família que inclou altres receptors com els glucocorticoids, els mineralcorticoids, hormones sexuals o tiroïdals. Conté una regió d'unió al lligand i una altra d'unió a l'ADN. El domini lligand localitzat en la porció COOH terminal del VDR és el responsable de la gran afinitat al calcitriol, formant un complex heterodímer amb el receptor de l'àcid retinoic (RXR).

L'heterodímer VDR-RXR és el que interacciona amb els elements de resposta de la vitamina D (VDRE) localitzats a la regió promotora de diversos gens implicats en múltiples vies metabòliques tot regulant la seva expressió (Holick MF, 2003). El gen que codifica el VDR s'ubica en el cromosoma 12, conté 9 exons i es caracteritza per presentar polimorfismes extensos. Existeix evidència que en les accions clàssiques de la vitamina D₃, la resposta intervinguda pel calcitriol pot variar depenent d'aquests polimorfismes en el VDR (Holick MF et al, 2011; Thomas MK et al, 2000).

2.1.3.1 Via genòmica

La 1,25(OH)₂vitamina D₃ exerceix la seva acció unint-se a receptors nuclears, més concretament, al VDR. Aquest receptor es troba en els teixits implicats en l'homeòstasis de calci, com són el ronyó, la paratiroides, els osteoblasts i l'intestí, però també s'ha trobat en altres teixits com l'epidermis, el múscul, el pàncrees o el teixit adipós (Bouillon R et al, 1995; Verhave G et al, 2010) (**taula1**).

El VDR té la capacitat per unir-se a la 1,25(OH)₂vitamina D₃, però també a la 25(OH)vitamina D₃, encara que amb una afinitat fins a 100 vegades menor (Brumbaugh PF et al, 1974; Mellon WS et al, 1979).

Diversos factors influeixen en l'activitat del complex de la vitamina D₃-VDR com la taxa de captació cel·lular i el catabolisme del calcitriol, les concentracions del VDR, les seves modificacions post-traduccionals o la disponibilitat nuclear d'altres components (Dusso AS et al, 1998) .

Les concentracions intracel·lulars del VDR resulten del balanç entre la seva síntesis i la seva degradació. Existint una regulació pel calcitriol i per altres lligands del VDR, com una regulació heterogènia per factors hormonals i de creixement que no s'uneixen al VDR. Aquests factors influiran en la taxa de transcripció del gen del VDR i /o en l'estabilitat del seu ARNm (Dusso AS et al, 1998).

2.1.3.2 Via no genòmica

El calcitriol a més de regular l'expressió gènica, també, té altres accions no genòmiques (resposta ràpida) que succeeixen en un temps menor al corresponent si es generen canvis en l'expressió genètica mitjançant el VDR en la superfície cel·lular, en comptes de ser intervinguts a través de receptors nuclears (Norman AW, 2006).

El paper de les accions no genòmiques en la majoria de les cèl·lules no és completament conegut. No obstant, s'ha descrit efectes fisiològics de les

múltiples respostes ràpides del calcitriol, com la capacitat d'estimular el pas de calci a través de la membrana plasmàtica (Norman AW, 1990).

SISTEMA	ÒRGANS I TEIXITS		
Sistema endocrí	Paratiroides		Glàndules suprarenals
	Cèl·lules T tiroides		Hipòfisi
	Cèl·lules β pancreàtiques		
Sistema cardiovascular	Cèl·lules del múscul llis arterial		
	Cardiomiòcits		
	Cèl·lules endotelials		
Sistema renal	Cèl·lules tubulars		
	Aparell yuxtaglomerular		
	Pondròcits		
Sistema múscul esquelètic	Osteoblasts		
	Condròcits		
	Múscul estriat esquelètic		
Sistema gastrointestinal i hepàtic	Esòfag	Intestí	Hepatòcits
	Estómac		
Sistema reproductor	Ovaris	úter	Testicles
	Placenta		Epidídim
Sistema immunològic	Medul·la òssia	Timus	
	Limfòcits T i B		
Sistema Respiratori	Cèl·lules alveolars pulmonars		
Pell	Queratinòcits i fol·liculs pilosos		
Sistema nerviós central	Neurones		
Altres	Retina		Pit
	Teixit adipós		

Taula1: Teixits i òrgans amb expressió del receptor de vitamina D (VDR).

2.2 Obesitat

2.2.1 Definició

Un desequilibri entre la ingesta i la despesa energètica porta a diverses alteracions metabòliques i endocrines que resulten en un cúmul anormal de reserves lipídiques. Aquest procés es conegut com l'obesitat. L'obesitat és una de les malalties metabòliques més comunes del nostre temps, convertint-se en una epidèmia tant en països desenvolupats com en països en vies de desenvolupament. El seu progrés depèn de factors tant genètics (O'Rourke RW, 2014) com ambientals (Jiménez-Cruz A et al, 2013), on una gran diversitat de gens relacionats amb el control del pes corporal estan descrits al ser implicats en la regulació de la gana, la despesa energètica, l'adipogènesis, entre altres. En quant als factors ambientals, existeix una enorme variabilitat segons l'edat, el lloc de residència, i el nivell socioeconòmic i sociocultural.

Encara que l'obesitat s'hagi considerat sempre conseqüència d'una exagerada ingesta (Poppitt SD, 1995), altres agents com el sedentarisme (Crawford DA et al, 1999) o l'estrès (Kyrou I et al, 2007) han anat guanyat importància. L'obesitat no solament es dona per una excessiva alimentació

sinó també per uns dolents hàbits alimentaris, o per una ingesta excessiva de productes d'animals, de greixos i de sucres (Miller WC et al, 1994). A més, molècules com l'àcid retinoic i els àcids grassos poden alterar l'activitat de factors de transcripció encarregats de regular l'expressió de gens que controlen la diferenciació, i la proliferació dels adipòcits (Felipe F et al, 2004).

L'índex de massa corporal (IMC) és el paràmetre antropomètric més àmpliament utilitzat per determinar el sobrepès i l'obesitat en adults (Eknoyan G, 2008). L'IMC està estretament relacionat amb el percentatge de grassa corporal, i es determina mitjançant la fórmula $IMC = pes / (altura)^2$, on el pes en quilograms es divideix pel quadrat de l'altura en metres.

Dintre de la mateixa classificació trobaríem el criteri d'infrapès o malnutrició definit amb un IMC inferior a 18,5 kg/m².

L'IMC és un paràmetre antropomètric a tenir en compte en l'estudi de l'individu obès, on un major valor d'IMC pot indicar més mortalitat (Flegal KM et al, 2013), però no tot l'augment de pes equivalent a un IMC major és produït per un increment de teixit adipós, ja que amb la mesura d'IMC no es pot discriminar si l'augment s'ha degut a un increment en teixit adipós, muscular o a causa d'un edema (USDHHS, 1996).

La Societat Espanyola per l'Estudi de l'obesitat (SEEDO) ha realitzat certes modificacions a la classificació proposada per l'OMS (SEEDO, 2000), proposant dues diferències importants (Salas-Salvadó J et al, 2007) (**taula 2**):

1. El sobrepès és dividit en dues categories (sobrepès I: 25-26,9 kg/m²; sobrepès II: 27-29,9 kg/m²).
2. Introducció d' un grau d'obesitat per aquells pacients amb un IMC ≥ 50 kg/m², anomenada obesitat grau IV o obesitat extrema.

Des del punt de vista quirúrgic, l'IMC pot tenir rellevància a l'hora de seleccionar la tècnica quirúrgica més apropiada, la Societat Americana de Cirurgia Bariàtrica inclou una categoria superior, la corresponent a l'IMC ≥ 60 kg/m².

El percentatge de greix corporal pot determinar-se a partir de l'IMC mitjançant l'equació de Deurenberg (Deurenberg P et al, 1991) segons la qual el % de greix corporal = $1,2*(IMC) + 0,23*(edat) - 10,8*(sexe) - 5,4$, on el sexe equival a 1 pels homes i 0 per les dones. Amb un error estàndard del 4%, i malgrat totes les irregularitats descrites (Deurenberg P et al, 2001), aquesta equació és capaç de detectar fins el 80% de variació en el percentatge de grassa corporal d'un mateix subjecte.

Els percentatges de greix corporal superiors al 25% en homes i al 35% en dones s'interpreten també com indicadors d'obesitat, i valors entre el 21 i el 25% en homes i entre el 31 i el 35% en dones limiten rangs que defineixen el sobrepès. Aquests criteris de classificació, així com, la relació existent entre l'IMC i els percentatges de greix corporal poden diferir notablement entre diverses poblacions (Fernández-Real JM et al, 2001; Noahsen P et al, 2013).

La SEEDO recomana l'ús de l'antropometria considerant valors subsidiaris com el pes, la talla, les circumferències corporals (perímetre de cintura i cadera), i els plecs cutanis segons l'edat i el sexe, per diagnosticar i valorar els casos d'obesitat. Existeixen nombrosos sistemes àmpliament utilitzats per professionals de la medicina i de l'esport per determinar la composició corporal, el percentatge de greix, i la seva aplicació en estudis epidemiològics (Moon JR et al, 2007).

Estudis epidemiològics, portats a terme durant els últims anys, conclouen que les complicacions més freqüents en els pacients obesos estan majoritàriament relacionades amb la localització de l'excés de greix, més que de l'excedent de pes en si mateix (Montague CT et al, 2000).

En referència aquest aspecte, la circumferència de la cintura (CC) i l'índex de cintura i maluc (ICC) són àmpliament utilitzats com indicadors de

l'obesitat abdominal en estudis sobre factors de risc vasculars i metabòlics (Berdasco A, 2002; Canoy D et al, 2007). L'ICC s'obté mitjançant la divisió del perímetre de cintura, mesurat a l'alçada de l'última costella flotant, pel perímetre màxim de maluc, a l'alçada dels glutis. Encara que no està clarament definit els valors a partir dels quals s'observa un augment del risc cardiovascular i metabòlic, s'ha proposat com valors delimitadors del risc >1 en homes i >0.85 en dones. Estudis epidemiològics transversals de diverses comunitats autònomes espanyoles situen el valor de risc C/C en >1 pels homes i >0.90 per les dones (Valenzuela A et al, 2004).

	Valors IMC (Kg/m²)
Pes insuficient	$<18,5$
Pes òptim	$\geq 18,5-24,9$
Sobrepès grau I	25-26,9
Sobrepès grau II (pre-obesitat)	27-29,9
Obesitat tipus I	30- 34,9
Obesitat tipus II	35-39,9
Obesitat tipus III (mòrbida)	40-49,9
Obesitat tipus IV (extrema)	≥ 50

Taula 2. Tipus d'obesitat segons l'índex de massa corporal (IMC).

Aquells subjectes amb ICCs superiors presenten obesitat androide (cos en forma de poma) associant-se a més risc de malalties cardiovasculars i metabòliques (Chiprut R et al, 2001), mentre que, valors inferiors defineixen

obesitat ginoide (cos en forma de pera). Respecte a la CC, les recomanacions de les Guies Clínicas per l'Obesitat de l'Institut Nacional de Salut dels EEUU (*NIH*), es consideren com punts de tall de CC, 88 cm per dones i 102 cm per homes, amb punts d'alerta per a una acció terapèutica a 80 cm per dones i 94 cm per homes.

Els marcadors antropomètrics elevats, majoritàriament, indiquen la presència d'un teixit adipós hipertròfic i disfuncional amb una activitat endocrina i inflamatòria afectant als òrgans que envolta i protegeix, a través de l'alliberació al torrent sanguini de totes les molècules que produeix (Bays H et al, 2007).

2.2.2 Epidemiologia i complicacions associades

En l'última dècada, la prevalença de l'obesitat ha augmentat tant en els països desenvolupats com en vies de desenvolupament, i aquesta tendència no s'inclina al descens (OMS, <http://www.who.int/es/>).

Dades obtingudes de l'OMS indiquen que 1.600 milions de persones en el món presenten sobrepès i que com a mínim 400 milions pateixen obesitat. Es calcula que si la tendència no canvia, en aquest any 2015 hi haurà 2.300 milions de persones amb sobrepès, entre les quals més de 700 milions seran obeses (OMS, 2008).

Estudis sobre l'obesitat mostren l'evolució històrica d'un problema de salut de gran impacte mundial, així com l'important cost econòmic. Dos estudis consecutius que tracten sobre l'epidèmia de l'obesitat en els EEUU, *The National Health Examination Surgery (NHES)* i *The National Health and Nutrition Examination Surveys (NHANES)*, posen en relleu l'increment exponencial d'obesitat en la població americana com un indicador de tot el món occidental. Aquests estudis realitzats entre el 1960-1962 (*NHES*), el 1971-1975 (*NHANES I*), el 1976-1980 (*NHANES II*), i el 1999-2000 (*NHANES 1999-2000*) detectaren en adults d'entre 20 i 80 anys un alarmant increment del percentatge d'obesos, que evolucionava de forma exponencial passant del 14,6% al 30,4% amb 40 anys de diferència des de l'any 1960 (Wilborn C et al, 2005).

A Europa, la incidència de l'obesitat oscil·la entre el 15 i el 20%. En el nostre país, estudis de la SEEDO ja descriuen en el 2005 en una mostra aleatòria de la població global espanyola entre 25 i 64 anys, una prevalença del 15,5% (el 13,2% dels homes i el 17,5% de les dones). Considerant un increment considerable a partir dels 45 anys associat a baixos nivells culturals i a àmbits preferiblement urbans (Salas-Salvadó J et al, 2006). En conjunt, s'estima que l'excés ponderal afecta al 54,7% de la població espanyola d'entre 25 i 64 anys (Aranceta-Bartrina J et al, 2005).

A partir del 2003, entre un 5 i un 7% del total de la despesa anual en consultes mèdiques van ser destinades a solucionar problemes derivats del sobrepès i l'obesitat. En la Unió Europea, la despesa sanitària derivada de problemes vinculats a l'excés de pes corporal suposen ja més del 5% de la despesa total en medicina clínica. Aquest problema segueix creixent any darrera any (Scarborough P et al, 2011; Von Lengerke T et al, 2011; McCormick B, 2007; Durden ED et al, 2008; Hojgaard B et al, 2008).

Existeix un risc augmentat en persones obesas de presentar certes malalties en comparació en persones amb un pes saludable. Segons el nivell de risc de manifestar-les es classifiquen en tres categories. Risc molt augmentat (risc relatiu >3): diabetis mellitus tipus 2 (DM2), dislipèmia, resistència a la insulina (RI), dísipnea, apnea del son, i malalties de la vesícula biliar. Risc moderadament augmentat (risc relatiu 2 - 3): malalties cardiovasculars, hipertensió arterial (HTA), osteoartritis dels genolls, hiperuricèmia, i gota. I finalment, risc lleugerament augmentat (risc relatiu 1 a 2): càncer de colon, càncer de mama en dones post-menopàusiques, càncer d'endometri, trastorns hormonals, síndrome d'ovaris poliquístics, trastorns de la fertilitat, lumbàlgia, i risc de complicacions d'anestèsia (OMS, 2000). Una descripció més detallada de les conseqüències per a la salut del sobrepès es presenta en

l'estudi de Picot i col. (Picot J et al, 2009). A la **taula 3** podem veure un resum de les diferents malalties.

Una de les patologies desencadenada per l'obesitat és el síndrome metabòlic. L'OMS ha proposat una sèrie de criteris pel diagnòstic del síndrome metabòlic, com: glicèmies en dejú ≥ 110 mg/dl i/o postacarga ≥ 140 mg/dl, RI determinada per la captació de glucosa per sota del percentil 25 en clamp euglicèmic-hiperinsulinèmic; HTA $\geq 140/90$ mmHg; dislipèmia: triglicèrids >150 mg/dl i/o colesterol-HDL <35 en homes i <39 en dones mg/dl; obesitat central: índex cintura/cadera $>0,9$ en homes i $>0,85$ en dones, i/o IMC >30 kg/m², i microalbuminúria en excreció en la primera orina ≥ 20 mg/l de creatinina. No obstant, *National Cholesterol Education Program-Adult Treatment Panell III (ATP III)* planteja altres criteris basats en el dubte sobre si l'obesitat ha de ser un factor obligatori, o si la RI ha de ser confirmada: 1) No insulinoresistència comprovada, cintura ≥ 102 cm en homes i ≥ 88 cm en dones, 2) dislipèmia amb triglicèrids ≥ 150 mg/dl o HDL <40 mg/dl en homes o <50 mg/dl en dones, 3) HTA $\geq 130/95$ mmHg, i 4) glicèmies en dejú >110 mg/dl (Bustamante C,2012).

El síndrome metabòlic porta el problema de l'obesitat al seu màxim exponent quan es diagnostica DM2, apareixent greus problemes

cardiovasculars o fins i tot mort prematura (Cuspidi C et al, 2008; Cuspidi C et al, 2009).

Alteracions metabòliques	Resistència a la insulina Intolerància a la glucosa i diabetis mellitus tipus 2 Dislipèmia Hiperuricèmia i gota
Alteracions endocrines	Hiperandrogenisme, síndrome d'ovari poliquístic
Alteracions hepato-digestives	Litiasis biliar Esteatosis hepàtica Reflux gastroesofàgic/hèrnia hiat
Alteracions cardiovascular	Cardiopatia isquèmica Alteracions de la conducció Hipertensió arterial Trombosis venosa
Alteracions hematològiques	Hipercoagulació
Alteracions respiratòries	Síndrome d'hipoventilació de l'obesitat Síndrome apnea obstructiva del son
Neoplàsia	Endometri, cèrvix, ovari, mama, pròstata

Taula 3. Malalties associades a l'obesitat

2.3 Teixit adipós

2.3.1 Teixit adipós blanc

El teixit adipós blanc és el principal teixit encarregat d'emmagatzemar energia en forma de lípids (Subramanian V et al, 2004) en situacions d'excés d'energia. A més, és capaç de mobilitzar aquests lípids quan l'organisme els necessita. Aquest teixit està considerat un òrgan homogeni format per dipòsits de cèl·lules adiposes i per altres cèl·lules de suport. S'ha descrit que aproximadament entre el 60% (subcutani) i el 80% de les cèl·lules del teixit adipós blanc dels subjectes obesos no són adipòcits madurs sinó que corresponen a l'estroma vascular (Tchoukalova YD et al, 2004). Les cèl·lules que formen l'estroma vascular es troben els preadipòcits, cèl·lules mares i cèl·lules endotelials, on també s'ha descrit la presència de neutròfils i macròfags. La proporció dels diferents tipus cel·lulars presents en l'estroma vascular poden variar segons la situació fisiològica i la localització del teixit adipós (Esteve Ràfols M, 2014). En humans, el teixit adipós blanc presenta certa heterogeneïtat depenent de la seva localització. Essencialment es pot diferenciar el teixit adipós subcutani i el visceral, però també, el teixit visceral no intern (ínamuscular,

perimuscular, paravertebral) i altres teixits adiposos no viscerals (retro-orbital, facial).

El teixit adipós subcutani és la capa que es troba entre la dermis i l'aponeurosis i la fascia dels músculs, on s'inclou els teixit adipós mamari, el qual constitueix al voltant d'un 80% del greix corporal (Godínez SA et al, 2002; Valenzuela A, 2004). El teixit adipós visceral es troba a nivell intratoràcic (intrapericàrdic i extrapericàrdic), intrabdominal-pèlvic [Intraperitoneal (omental i mesentèric). Extraperitoneal: intrabdominal (preperitoneal i retroperitoneal), i intrapèlvic (parametrial, retropúbic, paravesical, retrouterí, pararrectal, i retrorectal)] (Shen W et al, 2003; Pérez Miguelsanz M.^a J et al, 2010). El teixit adipós visceral pot arribar a representar entre el 5-10% del teixit adipós total tant en dones com en homes (Sethi JK et al, 2007).

En el transcurs de la vida, el teixit adipós blanc va incrementant-se i distribuint-se de forma diferent: mentre que al néixer pot representar un 17% del pes, en homes adults pot arribar a representar entre un 15 i 20% , i en dones entre un 25 i 30%. La distribució del teixit adipós és diferent segons el sexe: En les dones predomina la regió inferior del cos (distribució ginoide), principalment en la zona subcutània, i en els homes s'acumula en la meitat superior del cos, en les regions abdominals profundes (distribució

androide). No obstant, pot donar-se situacions inverses segons factors genètics.

Temps enrere, el teixit adipós blanc era considerat un òrgan poc actiu encarregat d'emmagatzemar energia, on el seu estudi bàsicament es centrava en la lipogènesis, en la lipòlisis, i en la regulació d'ambdós vies metabòliques. El teixit adipós blanc participa en la regulació del metabolisme energètic en funció dels senyals hormonals que rep i que ell mateix emet (Ahima RS et al, 2000). En conseqüència, amb el temps, el teixit adipós ha anat guanyant importància com a òrgan secretor i endocrí, amb la capacitat d'interactuar amb altres òrgans en la regulació del control fisiològic i metabòlic. En els últims anys s'han descrit molts senyals produïts i secretats pel teixit adipós blanc (**taula 4**), encara que no tots ells siguin alliberats pels adipòcits, ja que altres cèl·lules del teixit adipós com els preadipòcits i els macròfags també contribueixen.

En el teixit adipós blanc de subjectes obesos s'ha observat un augment en l'expressió i en la segregació de nombroses adipocines inflamatòries (Arita Y et al, 1999; Hajer GR et al, 2008; Acosta E, 2012). Degut al desequilibri entre l'acció de les citocines inflamatòries i de les antiinflamatòries s'afavoreix una situació d'inflamació crònica, que es veu incrementada amb la infiltració de macròfags en el teixit (Weisberg SP et al,

2003). Aquests macròfags tendeixen a agregar-se i a formar cèl·lules gegants i hiperactives, típiques dels desordres propis de la inflamació. Les cèl·lules inflamatòries infiltrades en el greix perpetuen la tumefacció del teixit adipós que, mitjançant diferents senyals paracrins i endocrins, activen als adipòcits perquè produeixin tant mediadors inflamatoris com adipocines, mantenint-se així un cicle de inflamació-obesitat que contínuament es retroalimenta (Di Gregorio GB et al, 2005).

2.3.2 Teixit adipós i resistència a la insulina

Tant el teixit adipós subcutani com el visceral en estat d'obesitat i de RI presenten major alliberació d'àcids grassos lliures (AGL) al torrent circulatori. Un estudi experimental amb rates diabètiques indicà que l'activació espontània de la lipòlisi en condicions d'estrès oxidatiu podria explicar l'alta concentració d'AGL en el plasma sanguini i, per tant, tenir un paper significatiu en el desenvolupament de la RI (Ivanov VV et al, 2015). Hi ha evidència que indica que en els pacients diabètics s'accentua i s'agreuja l'alliberació d'AGL, degut que la lipasa sensible a l'hormona (LSH) del teixit visceral respon menys a la inhibició per la insulina (Galgani

J et al, 2000), sent aquesta més expressada en el teixit visceral que el subcutani (Van Harmelen V et al, 1997).

Tant la LSH com la lipasa de triglicèrids estan fortament associades amb la RI i la hiperinsulinèmia en subjectes obesos, independentment de la massa de greix (Jocken JW et al, 2007). Els AGL poden activar vies proinflamatòries afavorint el desenvolupament de la RI, ja que contribueixen a la inhibició del senyal de la insulina activant els receptors transmembrana TLR (TLR2 i TLR4) (Senn JJ et al, 2006; Nguyen MT et al, 2007).

Els TLR (receptors tipus Toll) són receptors que tenen un paper central en la detecció de patògens i en la iniciació de la resposta inflamatòria (Xu D et al, 2004).

S'ha descrit que la secreció d'una varietat de molècules actives per part del teixit adipós, com la interleuquina 6 (IL-6), el factor de necrosis tumoral alfa (TNF-alfa), la resistina, la hiperleptinèmia, i les concentracions baixes d'adiponectina, contribueixen a un procés aterogènic i a la RI (Yu Li et al, 2013). Concretament, el TNF-alfa té un rol important en l'establiment de la RI.

El TNF-alfa és una citocina produïda principalment pels monòcits, limfòcits, teixit adipós, i múscul. Estudis in vivo han demostrat que el teixit

adipós en rates obeses amb RI (Hotamisligil GS et al, 1994) i en humans (Hotamisligil GS et al, 1995) produeix significativament major quantitat de TNF-alfa local i sistèmica, i la neutralització d'aquesta en rates amb RI produeix un augment de la captació de glucosa en resposta a la insulina. (Hotamisligil GS et al, 1994).

A la inversa, també s'ha pogut observar que una millora de la sensibilitat a la insulina produeix una disminució de les concentracions circulants de TNF-alfa (Hukshorn CJ et al, 2004). També, el receptor-1 de TNF-alfa s'ha correlacionat de manera positiva amb la RI (Guillemette L et al, 2014; García-Compeán D et al, 2014).

S'ha demostrat que una pèrdua de pes en subjectes obesos presenta una disminució del TNF-alfa (Bluher M et al, 2001). De fet, la fracció soluble circulant del receptor-2 del TNF-alfa ha estat correlacionat positivament amb l'IMC i l'índex cintura-cadera (Fernández-Real JM, 1998). No obstant, sembla ser no haver existit diferències entre les concentracions de TNF-alfa entre els pacients amb i sense RI, quan ha estat corregit per l'IMC (Bluher M et al, 2001). Tanmateix, també s'ha pogut observar com una major tasa de transcripció de TNF-alfa, en subjectes amb un polimorfisme en la posició 308 del seu promotor, s'associa a un increment de la massa grassa i de la RI (Fernández-Real JM et al, 1997).

Adipocina	Funció
Leptina	Control de la ingesta, deposició de la grassa, inflamació
Neuropèptid y (NPY)	Proliferació de preadipòcits
Adiponectina	Sensibilitat a la insulina, inflamació
Resistina	Sensibilitat a la insulina, inflamació
Visfatina	Sensibilitat a la insulina, inflamació
Omentina	Sensibilitat a la insulina
Vaspina	Sensibilitat a la insulina
Apelina	Homeostasis vascular (vasodilatació)
Adipsina	Inflamació
Proteïna transportadora d'èsters de colesterol(CEPT)	Metabolisme lipídic
Lipoproteïna lipasa (LPL)	Metabolisme lipídic
Lipasa sensible a les hormones (HSL)	Metabolisme lipídic
Apoliproteïna E(ApoE)	Metabolisme lipídic
Proteïna ligadora de retinol- 4 (RBP)	Metabolisme lipídic
Angiotensinogen	Homeòstasis vascular
Angiotensina II	Homeòstasis vascular
Enzim convertidora d'angiotensina (ACE)	Homeòstasis vascular
Inhibidor de l'activador del plasminògen (PAI-1)	Homeòstasis vascular
Interleuquines (IL-1β, IL-4, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12, IL-18)	Inflamació; També intervé la IL-1 β en el metabolisme energètic, en la sensibilitat a la insulina i en el control de la ingesta.
Proteïna C reactiva (PCR)	Inflamació
Factor de necrosis tumoral alfa (TNF-alfa)	Inflamació, sensibilitat a la insulina
Proteïna quimioattractant de monòcits-1 (MCP-1)	Incorporació de macròfags al teixit
Molècula d'adhesió intercel·lular-1 (ICAM-1)	Activació de macròfags
Factor de creixement de l'endoteli vascular (VEGF)	Angiogènesis
Factor de creixement transformant beta (TGF β)	Migració i adhesió cel·lular, creixement i diferenciació tissular

Taula 4. Adipocines secretades pel teixit adipós blanc i funció fisiològica adaptada (Esteve Ràfols M, 2014).

Adipocina	Funció
Factor de creixement nerviós (NGF)	Creixement i diferenciació tissular
Factor de creixement de fibroblasts (FGF)	Proliferació i diferenciació, angiogènesis
Prostaglandina E2	Homeòstasis vascular, inflamació
Prostaglandina I2	Homeòstasis vascular, inflamació

Taula 4. Adipocines secretades pel teixit adipós blanc i funció fisiològica adaptada (Esteve Ràfols M, 2014).

Hi ha evidència que les concentracions d'ARNm de sortilina (proteïna implicada en el transport de la GLUT4) estan disminuïdes en el teixit adipós dels pacients diabètics obesos, i el tractament amb TNF-alfa en els adipòcits humans disminueixen l'expressió d'ARNm de sortilina, la qual cosa es tradueix en una menor translocació del GLUT4 cap a la membrana plasmàtica (Kaddai V et al, 2009) provocant una hiperglicèmia circulant.

En l'ésser humà, el gen de la leptina es localitza en el cromosoma 7 i es troba expressada principalment en el teixit adipós, però també és produïda en la placenta, el múscul esquelètic, l'epiteli gàstric i mamari, i el cervell (Zhang Y et al, 1994; Green ED et al, 1995, Firedman JM et al, 1998, Ahima RS et al, 2000). S'ha demostrat que la leptina té efectes reductors del pes i actua com un senyal de sacietat a nivell cerebral (Halaas JLet al, 1995; Pelleymounter MA et al, 1995; Mantzoros CS, 1999). La literatura mostra que la RI està associada amb concentracions elevades de leptina (Llaneza-Suarez D et al, 2014; Nehus E et al, 2014; Mirrakhimov EM et al, 2014), on

aquesta associació és independent del grau d'adipositat i de la distribució de la grassa (Albala C et al, 2000). A més, s'ha observat una correlació positiva entre el receptor-2 del TNF-alfa (TNFR2) i la leptina (Vendrell J et al, 2005), on al identificar 4 al·lels diferents del TNFR2, s'ha indicat que la presència de l'al·lel A2 en el gen del TNFR2 pot predisposar als subjectes a l'obesitat i més altes concentracions de leptina (Fernández-Real JM, 2000). S'ha plantejat la possibilitat que la leptina podria mostrar eficàcia pel tractament de la diabetis mellitus, ja que baixa notablement la glucosa de la sang i provoca uns efectes antidiabètics mitjançant la inhibició del glucagó (Friedman J et al, 2014).

La IL-6 és una citocina secretada per cèl·lules immunitàries, fibroblasts, cèl·lules endotelials, miòcits, i una varietat de cèl·lules endocrines (Fried SK et al, 1998). El teixit adipós contribueix el 10-35% d'IL-6 circulant (Mohamed-Ali V et al, 1997), on s'ha demostrat que el teixit adipós visceral allibera de 2-3 vegades més d'IL-6 que el teixit adipós abdominal subcutani (Weisberg SP et al, 2003; Mohamed-Ali V et al, 1998; Makino T et al, 1998). La producció de la IL-6 és estimulada principalment pel TNF-alfa i les catecolamines, i es inhibida pels glucocorticoides, mentre que la insulina no modifica la seva producció (Marcano Y et al, 2006).

Les seves concentracions plasmàtiques s'han correlacionat amb l'obesitat, la intolerància a la glucosa, i la RI (Vozarova B et al, 2001; Kern PA et al, 2001; Pérez MM, 2007; Pal M et al, 2014), i inclús té capacitat predictiva del desenvolupament de la DM2 (Humphries SE et al, 2001). La IL-6 inhibeix l'adipogènesis i estimula la lipòlisis, augmentant la circulació d'AGL i disminuint l'adiponectina (Kershaw EE et al, 2004). Tant la IL-6 com el TNF-alfa redueix l'expressió de la lipoproteïna lipasa, i podria tenir un paper important en la regulació de la captació dels AGL pel teixit adipós (Recasens M et al, 2004).

Encara que es desconeix el mecanisme exacte, la IL-6 podria estar involucrada en la reducció de l'expressió dels components de senyalització del receptor de la insulina, en l'activació de l'enzim tirosina fosfatasa, o en la reducció de l'activació de la proteïna Quinasa B (PKB) provocant una disminució de la translocació de GLUT 4 a la membrana plasmàtica (Acosta E, 2012).

L'adiponectina és una proteïna de 244 aminoàcids sintetitzada específicament i en gran quantitat pel teixit adipós amb propietats antiinflamatòries (Scherer PE et al, 1995; Maeda N et al, 2002). Aquesta adipoquina està molt expressada en el sèrum humà on representa el 0,01% del total de les proteïnes plasmàtiques. Encara que el seu paper fisiològic

està per definir, sembla ser que podria tenir un paper en la prevenció de la RI, ja que els valors d'adiponectina s'han correlacionat negativament amb la RI (Recasens M et al, 2004; Cankaya Set al, 2014); on unes concentracions baixes d'adiponectina poden predir de forma independent el desenvolupament futur de la RI i de la DM2 (Spranger J et al, 2003; Snehalatha C et al, 2003). De fet, hi ha evidència d'una correlació negativa entre l'adiponectina plasmàtica i la producció endògena de glucosa, la qual cosa recolza un paper d'aquesta hormona en el metabolisme de la glucosa (Stefan N et al, 2002). A més, la seva relació amb la RI o DM2 ha estat confirmada per diferents estudis genètics (Palomer X et al, 2005).

En presència d'obesitat, el teixit adipós es troba infiltrat per un 60% macròfags (weisberg SP et al, 2003), els quals formen part de mecanismes fisiopatològics que participen en l'establiment de la RI i de la DM2 (Tateya S et al, 2013). En relació a la inflamació s'ha descrit que l'expansió del teixit adipós no solament augmenta en el grau d'infiltració dels macròfags, sinó que a més, provoca un canvi de polarització dels macròfags que passarien de tipus M2, amb un perfil secretor antiinflamatori, a tipus M1, amb un perfil secretor proinflamatori (Olefsky JM et al, 2010). Aquests últims serien els responsables de l'expressió de la majoria de les citocines proinflamatòries que es produeixen en el teixit adipós, com el TNF-alfa, la

IL-6, la IL-8 i la IL-1b, on algunes estan relacionades amb l'estat d'inflamació present en l'obesitat (Weisberg SP et al, 2003), i amb la RI (Kang K et al, 2008; Odegaard JI et al, 2008).

2.4 Hipertensió arterial

2.4.1 Definició

La hipertensió arterial (HTA) és una malaltia crònica que consisteix en una elevació persistent de la tensió arterial (TA) per sobre o igual a 140/90 mmHg. Es denomina la plaga silenciosa del segle XXI, i per minimitzar-la s'han dissenyat guies internacionals per al seu control i tractament (Williams B, 2007).

En termes generals, la prevalença de la HTA en els països europeus és d'aproximadament un 30-45% amb un marcat augment a edats més avançades (Kearney PM et al, 2005; Danon-Hersch N et al, 2009). Es preveu que per al 2025 la incidència d'individus hipertensos s'haurà incrementat fins a un 24% en països desenvolupats, i podrà arribar fins a un 80% en països subdesenvolupats (Kearney PM et al, 2005). La mortalitat per Ictus (malaltia cerebrovascular que afecta als vasos sanguinis que

suministren sang al cervell) s'ha proposat com una de les malalties a considerar en el control de la HTA, ja que s'ha descrit una forta relació entre la prevalència de la HTA i la mortalitat per Ictus (Wolf-Maier K et al, 2003).

En adults, es diagnostica la HTA depenent de les xifres umbral de la tensió arterial sistòlica (TAs) i de la tensió arterial diastòlica (TAd) en diferents tipus de mesurament [en la consulta, en el Centre d'Atenció Primària, i en el domicili: PAC (pressió arterial clínica), MAPA (monitoratge en el Centre d'Atenció Primària de la pressió arterial), i AMPA (automesura de la pressió arterial en què el pacient pot determinar la seva TA), respectivament](**taula 5**).

Mentre que en nens es diagnostica la HTA quan les xifres són superiors o iguals a les corresponents al percentil 95 per als nens de la seva edat (Mancia G et al,2013;Villar F et al, 1996).

La Guia Europea d'Hipertensió Arterial 2013 (Mancia G et al, 2013), per ajudar a establir el diagnòstic proposa la utilització de tècniques complementàries com l'AMPA, o la MAPA de 24 hores; ja que aquests mesuraments es correlacionen millor amb la lesió orgànica i són superiors en l'estimació de la morbimortalitat cardiovascular que les pròpies mesures preses en la consulta. Dit això, en l'actualització de la Guia d'Hipertensió

Arterial de *National Institute for Clinical Excellence (NICE)*, els experts consideren que si les xifres de la pressió arterial obtingudes en la PAC són elevades ($\geq 140/90$ mmHg), per confirmar el diagnòstic s'hauria d'utilitzar la MAPA, almenys en el període diürn (Higgins B et al, 2011; Lovibond K et al, 2011). No obstant això, la Guia Europea d'Hipertensió Arterial del 2013 cita que la MAPA és considerada útil pel diagnòstic, però la PAC (**taula 6**) segueix sent el mètode de referència pel cribratge, el diagnòstic, i el maneig general de la HTA (Mancia G et al, 2013), on aquesta, es basa en dos o més determinacions de tensió arterial (TA) obtingudes de manera protocol·litzada en dues visites separades com a mínim (Mancia G et al, 2007).

Les persones obeses tenen major risc de desenvolupar patologies cardiovasculars, per conseqüent, en l'actual Guia Clínica Europea de la Hipertensió Arterial ha tingut en compte com a factors utilitzats per l'estratificació del risc cardiovascular l'obesitat ($IMC \geq 30$ kg/m^2) i l'obesitat abdominal (en caucàsics, perímetre abdominal: homes ≥ 102 cm, dones ≥ 88 cm).

És rellevant el maneig acurat de la HTA en pacients obesos, ja que el risc associat a l'augment de la xifra de TA és directament proporcional a la gravetat, cada augment de 2 mmHg està associat a un 7% més de risc de

mortalitat per cardiopatia isquèmica i a un 10% més de risc de mortalitat per accident cerebrovascular (NICE 2011).

Categoria	TAs		TAd
<i>TA en consulta</i>	≥ 140	i/o	≥ 90
<i>TA Centre d'Atenció Primària</i>			
Diürna (o en vigília)	≥ 135	i/o	≥ 85
Nocturna (o dormint)	≥ 120	i/o	≥ 70
24h	≥ 130	i/o	≥ 80
<i>PA en domicili</i>	≥ 135	i/o	≥ 85

Taula 5. Valors umbrals d'hipertensió arterial en els diferents tipus de mesura de la tensió arterial. TA: tensió arterial, TAs: tensió arterial sistòlica, TAd: tensió arterial diastòlica.

Categoria	TAs (mmHg)		TAd (mmHg)
Òptima	<120	i	<80
Normal	120-129	i/o	80-84
Normal- alta	130-139	i/o	85-89
HTA grau 1	140-159	i/o	90-99
HTA grau 2	160-179	i/o	100-109
HTA grau 3	≥ 180	i/o	≥ 110
HTA sistòlica aïllada	≥ 140	i	< 90

Taula 6. Definició i classificació de les xifres de tensió arterial en la consulta.

Categories d'hipertensió arterial segons la Societat Europea d'Hipertensió-Societat Europea de Cardiologia 2013. Les categories es defineixen per la xifra més alta de pressió arterial, ja sigui sistòlica o diastòlica. La hipertensió sistòlica aïllada s'ha de classificar-se en graus 1, 2, 3 segons les xifres de TAs en els intervals indicats. HTA= hipertensió arterial.

Fins ara, l'objectiu d'inici de tractament terapèutic era una reducció <140/90 mmHg en subjectes hipertensos amb risc moderat o baix, i <130/80 mmHg en pacients amb diabetis, malalties cardiovasculars, insuficiència renal amb

proteïnúria menor a 1g/dl o proteïnúria major a 1g/dl amb valors de TA menors a 125/75 mmHg (Mancia G et al, 2007; De la Sierra A et al, 2008; http://www.finisterra.com/guias2/hipertension_arterial.asp).

En la present Guia de Pràctica Clínica de la hipertensió Arterial 2013, l'objectiu de reducció és simplificat a <140/90 mmHg. No obstant, l'objectiu universal de la TAd <90mmHg exclou els individus diabètics que ha de ser <85 mmHg i inclús 80-85 mmHg si és ben tolerat, a l'estar associada amb una important disminució de les complicacions cardiovasculars (Reboldi G et al, 2011).

A la vellesa, es consideren acceptables les xifres de TAs entre 140 i 150 mmHg, encara que s'hauria de procurar establir una TAs <140 mmHg en pacients amb malaltia cardíaca i cerebrovascular renal prèvia. Pacients amb una proteïnúria $\geq 0.5\text{g}/24$ hores, es podria considerar ideal mantenir una TA <130/80 mmHg. (Mancia G et al, 2013).

2.4.2 Hipertensió arterial i obesitat

La HTA associada a l'obesitat és caracteritzada per un augment en el volum de sang expulsat pel ventricle esquerre del cor en estat de sístole (contracció del batec cardíac), mentre que la resistència perifèrica es manté o s'incrementa lleugerament. L'obesitat té un paper en l'augment de la xifra

de la TA, de fet, l'IMC té una correlació positiva amb la prevalença a tenir HTA (Nguyen NT et al, 2008; Ostchega Y et al, 2012), on s'ha observat que un augment de pes de 10 kg s'associa amb un increment de 3 mmHg en la TAs i de 2,3 mmHg en la TAd (Poirier P et al, 2006).

Les associacions entre l'obesitat i la HTA varien segons l'edat, el sexe, i la raça (Abadia CL et al, 2011). Diversos estudis han informat de les diferències de gènere sobre l'efecte de l'obesitat i el canvi en el pes del cos sobre la TA (Droyvold WB et al, 2005), on la dona obesa és més susceptible als efectes advesos cardiovasculars (Kang IS et al, 2013). L'augment de la TA és major quan l'obesitat té una distribució abdominal (Kang IS et al, 2013).

La disfunció endotelial és un dels diversos mecanismes que pot estar involucrada en el desenvolupament de la HTA en els pacients obesos. En primer lloc, en pacients obesos la concentració d'òxid nítric (NO) es troba disminuïda, el qual es considera un dels vasodilatadors endògens més potents al presentar diverses funcions com: intervenir en la regulació del to vascular, inhibir l'agregació i l'adhesió plaquetària, i la proliferació de les cèl·lules musculars (Raij L, 2006). En segon lloc, es dona un augment en la concentració de diverses adipocines que contribueixen a una reducció en la relaxació de l'endoteli com: L'angiotensinogen, l'inhibidor de l'activador

del plasminogen (PAI-1), la IL-6, el TNF-alfa, i la leptina (Rodríguez-Rodríguez E et al, 2009).

El teixit adipós disfuncional degut a l'obesitat produeix angiotensinogen i angiotensina II, contribuint un efecte sobre les xifres de la TA (Massiera F et al, 2001). Una pèrdua de pes del 5%, més una disminució en la circumferència de la cintura s'associa amb una disminució de l'activitat de tots els components del sistema renina angiotensina aldosterona (SRAA), i una disminució del promig de la TA de 7mmHg (Engeli S et al, 2005).

L'angiotensinogen és una glucoproteïna de 452 aminoàcids que circula com a pèptid biològicament inactiu produïda sobretot pel fetge, però també, pel cor, pels ronyons, i pel teixit adipós. Mitjançant la renina, l'angiotensinogen és convertit en angiotensina I, la qual constitueix el pèptid precursor del sistema renina angiotensina (SRA). La conseqüent producció d'angiotensina II per l'enzima convertidora d'angiotensina (ECA) provoca un increment en l'hormona aldosterona, la qual presenta efectes hipertensors (Ferrario CM, 2006; Hitomi H et al, 2007).

L'angiotensina II junt amb el TNF-alfa, els AGL, i la glucosa, augmenten la producció de PAI-1 al fetge, que, sumant-se amb la sobreproducció de PAI-1 per part del teixit adipós (Kohler HP et al, 2000) impedeix que es

produeixi la fibrinolisis. Comportant així, un augment en el risc de patir lesions arterioscleròtiques (Aso Y, 2007).

En els subjectes obesos, tant l'angiotensinogen plasmàtic com les concentracions de renina es troben incrementades, així com l'ECA (Engeli S et al, 2005). Els adipòcits disfuncionals dels subjectes obesos produeixen angiotensinogen i angiotensina II, tot contribuint a l'augment dels nivells sistèmics de pressió sanguínia (Massiéra F et al, 2001). L'angiotensina podria impedir l'activitat de la insulina intracel·lular de manera similar a com ho fa el factor TNF-alfa i els AGL, reduint la captura de glucosa i disminuint la diferenciació dels adipòcits (Ran J et al, 2006; Furuhashi M et al, 2003).

En els últims anys s'han descrit evidències dels mecanismes encarregats de controlar la relació entre la HTA i l'obesitat, però encara no existeixen suficients evidències que puguin indicar quin antihipertensiu és millor, la qual cosa implica la necessitat de rigorosos assajos clínics que puguin explicar la raó per la qual la HTA no es desenvolupa en tots els subjectes obesos (Rahmouni K et al, 2005).

2.4.3 Hipertensió arterial i resistència a la insulina

Les accions de l'AngII sobre la sensibilitat a la insulina ha estat descrita en múltiples estudis des de que la RI ha estat considerada com un factor de risc independent pel desenvolupament de malalties cardiovasculars com la HTA i l'aterosclerosi (Marrero MB et al, 2004).

La insulina posseeix efectes vasodilatadors, antitrombòtics, antiinflamatoris, antioxidants i natriurètics, els quals són alterats en presència de la RI.

La RI no compleix tots els criteris de causalitat epidemiològica per considerar-la "causa" de la HTA, però no obstant, trobem estudis que demostren una relació molt estreta ambdós factors (Ferrannini E et al, 1987; Lima M et al, 2010).

S'ha descrit 4 mecanismes conforme els pacients amb síndrome de RI desencadenen HTA (Acevedo M, 2006):

1) Augmenta l'activitat del sistema nerviós simpàtic comportant una estimulació del dèbit cardíac, una vasoconstricció dels vasos sanguinis, i a nivell renal una absorció de sodi i aigua. 2) S'altera el sistema renina-angiotensina: Els adipòcits dels pacients insulinoresistents obesos estan més augmentats i produeixen més angiotensinogen, i expressen més receptors d'angiotensina II anomenats AT1. Quan l'Ang II actua sobre els seus receptors AT1 és un estímul important per la formació de radicals lliures

d'oxigen en els vasos sanguinis, els quals afavoreix la producció d'anió superòxid i de peròxid d'hidrogen, com també la formació de productes avançats de glicosilació, la qual cosa comporta a una glucotoxicitat de la cèl·lula β . així mateix, l'Ang II incrementa la producció de citocines i factors de creixement fibrogenètics que contribueixen a la formació de plaques amiloides dintre de l'islot (Jaikaran ET et al, 2001). També, 3) l'Ang II provoca un desequilibri entre els efectes vasodilatadors i l'efecte retenidor de sal de la insulina i 4) l'obesitat intra abdominal està associada amb inflamació i amb la disminució de l'adiponectina. L'adiponectina redueix l'expressió de molècules d'adhesió en les cèl·lules endotelials i la producció de citocines pels macròfags. Aquestes propietats a promogut el concepte d'una molècula antiaterogènica o protectora cardiovascular (Pajvani UB et al, 2004; Díez JJ et al, 2003).

2.4.4 Hipertensió arterial i citocines: TNF-alfa i IL-10

El TNF-alfa juga un paper en la fisiopatologia de la HTA associada a l'obesitat, on les seves concentracions estan augmentades en pacients obesos amb síndrome metabòlic en comparació amb els pacients obesos sense síndrome metabòlic (Xydakis AM et al, 2004).

El TNF-alfa s'ha associat en patologies com la HTA (Cottam DR et al, 2004) a l'estimular la producció de l'endotelina (Kahaleh MB et al, 1997), molècula que augmenta el to vascular (Kohan DE et al, 2008) i l'angiotensinogen (Brasier AR et al, 1996) *in vitro*. Hi ha evidència que una inhibició de TNF-alfa millora la funció endotelial vascular i disminueix la rigidesa arterial en la dona menopàusica amb deficiència en estrogens (Moreau KL et al, 2013). Un estudi experimental amb rates mostrà que el TNF-alfa en el ronyó augmenta la xifra de la TA induïda per l'angiotensina II limitant l'òxid nítric renal (Zhang J et al, 2014). S'ha descrit també una associació entre la concentració circulant de TNF-alfa i la xifra de la TA en subjectes amb un rang d'adipositat corporal ampli (Zinman B et al, 1999).

En contraposició, s'ha demostrat que la citocina antiinflamatòria interleuquina 10 (IL-10) té un rol en el sistema cardiovascular. Un augment de les seves concentracions sèriques s'han associat amb una major reactivitat vascular endotelial en pacients amb concentracions elevades de proteïna C reactiva, la qual cosa suggereix la importància de l'equilibri pro/antiinflamatori en la funció endotelial (Tziakas DN et al, 2007). També s'ha observat una forta associació entre els valors alts de l'expressió de la IL-10 en lesions arterioscleròtiques i una reducció de l'expressió de l'òxid nítric sintetasa (Mallat Z et al, 1999). Tinsley JH et al, en el seu estudi ha

mostrat que l'administració d'IL-10 normalitza la xifra de la TA i la funció endotelial en rates hipertenses embarassades (Tinsley JH et al, 2010).

2.5 Funcions biològiques de la vitamina D

2.5.1 Vitamina D i hipertensió arterial

Hi ha una variació geogràfica i racial en quant a la HTA. S'observa un increment de la HTA des del sud al nord en l'hemisferi Nord. El dèficit de vitamina D induït per la radiació UVB, com són la latitud i la pell fosca estan associats amb l'increment de la xifra de la TA (Rostand SG, 1997). En aquest sentit, es publicà un estudi en subjectes hipertensos no tractats que varen ser sotmesos a radiació UVB (3 vegades/setmana), on s'observà un descens de 6 mmHg en la TAs i en la TAd en 6 setmanes, objectivant un augment en els valors de concentracions circulants de 25(OH)vitamina D₃ en un 162% (Krause R et al, 1998). Respecte el color de la pell, s'ha vist que la pigmentació (la melanina) podria explicar el 25% de les diferències en la xifra de la TA (Zhao G et al, 2010; Fiscella K et al, 2011).

L'associació entre la xifra de la TA i la concentració circulants de 25(OH)vitamina D₃ han estat documentats per estudis importants com

NHANES III (Third National Health and Nutrition Examination Survey) en EEUU (N=15.088), on s'observà una disminució de la xifra de la TAs i TAd en subjectes amb unes concentracions circulants de 25(OH)vitamina D₃ $\geq 85,7$ nmol/l comparant-los amb unes concentracions ≤ 40 nmol/L. Aquests resultats han estat validats per diferents i nombrosos investigadors (Martins D et al, 2007; Williams DM et al, 2011; Fraser A et al, 2010; Forrest KYC et al, 2011). No obstant, trobem estudis que no han trobat aquesta associació com l'autor Snijder MB et al, en l'any 2007.

Estudis epidemiològics demostren una probabilitat de desenvolupar HTA en subjectes amb baixes concentracions circulants de 25(OH)vitamina D₃, però no hi ha una relació causa i efecte (Forman JP et al, 2007; Forman JP et al, 2008; Scragg R et al, 2007).

La relació entre els factors de risc cardiovascular i les concentracions circulants de vitamina D ha estat avaluada per estudis com *NHANES III (Third National Health and Nutrition Examination Survey)* en EEUU (N=15.088), i pel *Frammingham Offspring Study* (N=1739). En l'estudi *NHANES III*, els valors circulants de vitamina D₃ < 21 ng/ml s'associaren inversament amb la HTA, la diabetis, l'obesitat, i la hipertriceridèmia. En l'estudi *Frammingham Offspring Study* s'objectivà que els subjectes amb un dèficit de concentracions circulants de 25(OH)vitamina D₃ (< 10 ng/ml)

tenien més risc de presentar malaltia cardiovascular respecte als subjectes amb unes concentracions superiors a 15ng/ml (Wang T et al, 2008).

Una de les bases dels esdeveniments cardiovasculars és l'aterosclerosi. Està descrit que la vitamina D₃ redueix la inflamació associada a l'aterosclerosi, controlant l'acció de diverses metal·loproteases involucrades en el procés de calcificació vascular tot millorant la funció endotelial, i disminuint la hipertròfia del teixit cardíac (Souberbielle JC et al, 2010; Li YC, 2011).

2.5.1.1 Mecanismes biològics que relacionen el dèficit de vitamina D i la hipertensió arterial

Els mecanismes biològics no són del tot coneguts, però hi ha coneixement de l'existència de diverses vies fisiopatològiques per les quals la vitamina D₃ podria exercir efectes antihipertensius i vasculoprotectors.

La deficiència de la vitamina D predisposa a una *up-regulation* del SRAA (Li YC et al, 2002) desenvolupant hipertrofia ventricular esquerra, hipertròfia de cèl·lules del múscul vascular, insuficiència cardíaca congestiva, i inflamació vascular crònica (Scragg RK et al, 2010; Zittermann A et al, 2005; Zittermann A et al, 2006; Holick MF, 2007; Zittermann A et al, 2008). En estudis en ratolins, Yuang et al, mostrà com l'activació del receptor de la vitamina D suprimia l'expressió del gen de

renina (Yuan W et al, 2007). Existeixen altres treballs realitzats en rates Knockout pel receptor de la vitamina D i 1- α hidroxilasa, que indicaren un augment de valors de renina, un augment de la xifra de la TA, i un desenvolupament de la hipertrofia del ventricle esquerre (Yuan W et al, 2007; Xiang W et al, 2005; Simpson R.U et al, 2007; Zhou C et al, 2008). En alguns d'estudis mostraren que el bloqueig del SRAA amb inhibidors de l'ECA normalitzava la xifra de la tensió arterial i la hipertròfia del ventricle esquerre (Yuan W et al, 2007; Zhou C et al, 2008).

Així mateix, es mostrà que l'administració de vitamina D i anàlegs redueix la síntesis de renina (Li YC, 2003), produeix una disminució de renina i angiotensina II (Lind L et al, 1989; Freundlich M et al, 2008), i hi ha una regressió de la hipertròfia cardíaca en subjectes amb hemodiàlisis (Kim HW et al, 2006), i una disminució de la xifra de la TA (Judd SE et al, 2008). L'associació inversa entre la concentració circulants de vitamina D₃ i la HTA podria ser explicada, per la participació de la vitamina D₃ biològicament activa en la regulació del sistema renina-angiotensina per la supressió directa de l'expressió del gen de renina (Xiang W et al, 2005). Vaidya A et al, en el seu estudi transversal de 233 subjectes hipertensos caucàsics informà que altes concentracions circulants de vitamina D₃ estaven associades de manera inversa amb l'activitat de renina plasmàtica

(Vaidya A et al, 2011). L'Ang II regula la pressió arterial augmentant de forma directa la resistència vascular perifèria i de forma indirecta l'augment del volum sistòlic (Hunyady L et al, 2006). Forman JP et al, al comparar els subjectes normotensos amb concentracions circulants suficients de 25(OH)vitamina D₃ (≥ 30 ng/ml) respecte subjectes normotensos amb concentracions circulants insuficients de 25(OH)vitamina D₃ (15 a 29 ng/ml) i deficients (< 15 ng/ml) observà que amb concentracions circulants no suficients de 25(OH)vitamina D₃ tenien més elevada l'Ang II (Forman JP et al, 2010).

Un altre possible mecanisme d'unió entre la vitamina D₃ i la HTA podria ser per l'efecte de la vitamina D₃ sobre les cèl·lules de la paret vascular (cèl·lules endotelials, cèl·lules del múscul llis vascular i macròfags), on s'expressa el VDR i la 1 α -hidroxilasa (Dusso AS et al, 2005; Peterlick M et al, 2005; Medici D et al, 2008). Un estudi en humans demostrà que la disfunció endotelial que presentaven els 23 individus amb concentracions circulants de 25(OH)vitamina D₃ < 10 ng/ml varen millorar amb l'administració de tres dosis mensuals de 300.000 UI de colecalciferol (Tarcin O et al, 2008).

I per últim, el dèficit de vitamina D produeix un augment secundari de la PTH, la qual té molts efectes sobre el sistema cardiovascular. Els

mecanismes pels què la PTH pot produir HTA no són ben coneguts, però s'ha vist que augmenta la rigidesa de la paret arterial i promou canvis ateroscleròtics en els vasos, sobretot en pacients amb malaltia renal (Soubassi LP et al, 2006).

En estudis experimentals amb rates s'ha observat també que la vitamina D₃ biològicament activa disminueix la concentració de calci citosòlic en la cèl·lula endotelial (Wong MS et al, 2008). Quan hi ha una elevada concentració de calci en la cèl·lula es produeix una alteració en l'homeostasis de la cèl·lula per una fosforilació de proteïnes, un augment de concentració d'òxid nítric i producció de radicals lliures. El resultat final d'aquesta activitat enzimàtica anormal es una lesió de les estructures vasculars.

2.5.1.2 Suplementació de vitamina D i la tensió arterial

Vilamerswaran et al, en el seu estudi aleatoritzat analitzà les variants genètiques que afecten la concentració circulant de 25(OH)vitamina D₃ o el substrat disponible (CYP2R1 i DHCR7) i observà que un augment de la concentració circulant de vitamina D₃ s'associà a una disminució de la TAS de -0,10mmHg, i un canvi de -0,08 mmHg en la TAd (Vimalleswaran k et al, 2014).

Actualment, no hi ha suficient evidència sòlida per recomanar quines dosis de suplementació de vitamina D són les òptimes per reduir la xifra de la tensió arterial en la pràctica clínica. Sembla ser, que la vitamina D té un major efecte reductor de la TAs de 3 mmHg, però també s'ha demostrat que dosis mínimes de 1000 UI diàries també disminueix la TAd en 1,5 mmHg (Tamez H et al, 2012).

Recentment Carrara D et al, en un estudi de 15 subjectes hipertensos no tractats amb antihipertensius amb una suplementació de 25.000 UI de colecalciferol un cop per setmana durant 2 mesos observà una reducció dels valors de renina plasmàtica i d'aldosterona al finalitzar la suplementació de vitamina D₃ (Carrara D et al, 2014).

2.5.2 Vitamina D i obesitat

Estudis de l'estatus de vitamina D₃ han suggerit que existeix una relació inversa entre la deficiència de vitamina D₃ i l'obesitat amb individus obesos (Wood RJ, 2008; Ding C et al, 2012), on la 25(OH)vitamina D₃ està relacionada amb una menor adipositat visceral i amb una disminució de la grandària de l'adipòcit (Ding C et al, 2012).

La relació entre l'obesitat i la forma biològicament activa de la vitamina D₃ està per clarificar, possiblement per la naturalesa dinàmica de la producció i

la regulació de l'hormona activa. No obstant, la concentració plasmàtica de 1,25(OH)₂vitamina D₃ en adults sans està associada a major IMC i a major massa grassa corporal (Ding C et al, 2012).

El calcitriol, que té un paper en el teixit adipós humà, i la presència del VDR en els adipocits permeten la supressió de la PTH. L'excés de PTH observat en persones grans amb hiperparatiroidisme primari i secundari pot promoure l'augment de pes impeding la lipòlisis induïda per les catecolamines (Xue B et al, 2001; McCarty MF et al, 2003).

Estudis genètics tant en humans com en animals experimentals relacionen la vitamina D₃ i l'obesitat, i confirmen un paper important del VDR en el control del metabolisme de l'adipòcit i en la regulació del metabolisme energètic, suggerint que les alteracions de la funció del VDR poden exercir un paper en pacients amb obesitat (vinh quóc Lu'o'ng K et al, 2013).

Respecte a la suplementació de colecalciferol, no s'ha observat una disminució significativa del pes durant la seva administració (Sneve M et al, 2008; Zittermann A et al, 2009), com tampoc s'ha demostrat un efecte sobre les citocines i els marcadors d'inflamació en els individus obesos (Jorde R et al, 2010).

2.5.3 Vitamina D i teixit adipós

Actualment, el teixit adipós és reconegut com un òrgan endocrí actiu. Hi ha recopilació d'estudis sobre la relació entre la vitamina D i l'adipogènesis. Un estudi *in vitro* en preadipòcits 3T3-L1 de ratolí ha demostrat que la 1,25(OH)₂vitamina D₃ inhibeix l'adipogènesis antagonitzant principalment l'activitat del PPAR γ i retenint el receptor nuclear retinoic X (RXR) (Kong J et al, 2006). S'ha observat que aquest efecte antiadipogènic del calcitriol té una funció oposada en el teixit humà, on la 1,25(OH)₂vitamina D₃ promou la diferenciació dels preadipòcits subcutanis a través d'una expressió augmentada dels marcadors adipogènics FABP4 (*fatty acid-binding protein 4*), LPL (Nimitphong H et al, 2012).

Davant uns adipòcits hipertrofics s'observa una disminució d'adiponectina i una major secreció de citocines proinflamàtores i diverses interleuquines (Maury E et al, 2010; Vlasova M et al, 2010). S'ha mostrat que tant en estudis *in vitro* en cèl·lules 3T3-L1 com en adipòcits en humans, el calcitriol inhibeix la inflamació crònica en el teixit adipós a partir d'una inhibició de quimiocines, de citocines, i de la inhibició de NF- κ B (factor nuclear Kappa B) i de les vies MAPK (proteïnes quinases activades per mitogen), les quals impedeixen la transcripció gènica dels factors proinflamatoris (Mutt SJ et al, 2014).

El VDR està present en el teixit adipós, on recents descobriments amb models de ratolins genèticament modificats indiquen un paper complexa de la 1,25 (OH)₂vitamina D₃ i del VDR en l'homeòstasi energètica (Mutt SJ et al, 2014).

3. Justificació

La insuficiència i deficiència de vitamina D₃ en la població espanyola adulta en ambdós sexes és aproximadament del 50%, similar a l'existent en tot el món (Holick MF et al, 2007; Navarro C et al, 2014). En el nostre medi es practicà un estudi a Sabadell, ciutat de la comarca del Vallés Occidental (Catalunya, Espanya), on es mostrà una prevalença d'hipovitaminosis D₃ del 86% en la població major de 65 anys. Les baixes concentracions circulants de vitamina D₃ en aquest grup de població es correlacionaren de manera inversa amb la prevalença d'HTA (Almirall J et al, 2010). Aquests resultats són similars als estudis transversals realitzats a diferents països del món (Burgaz A et al, 2011; Bhandari SK et al, 2011); però no està clar si aquesta associació persisteix en el temps (Pittas AG et al, 2010; Snijder MB et al, 2007).

Estudis realitzats en Espanya han demostrat una prevalença de sobrepès del 34,2%, sent major en homes (43,9%) que en dones (25,7%), i una prevalença en l'obesitat del 13,6% tant en homes com en dones (Rodríguez-Rodríguez E et al, 2011).

L'obesitat està relacionada amb la hipovitaminosis D₃ (Ding C et al, 2012) i amb el risc d'HTA (Nguyen NT et al, 2008; Ostchega Y et al, 2012). La deficiència de la vitamina D₃ s'associa amb xifres de la TA elevades en pacients amb obesitat mòrbida (Buchwald H et al, 2004), els quals tenen una

prevalença del dèficit de vitamina D₃ (20 ng/ml) del 60%, i quan aquests pacients són induïts a una pèrdua de pes per cirurgia bariàtrica és manté una deficiència del 44% o del 14% depenent la dosis suplementació de vitamina D₃ (Carlin AM et al, 2006; Carlin AM et al, 2009). Hi ha poca evidència sobre les concentracions plasmàtiques de vitamina D₃ i la xifra de la TA en pacients sotmesos a cirurgia bariàtrica. Un estudi longitudinal mostrà que l'estat nutricional de vitamina D impacta la taxa de resolució de la HTA després de la cirurgia bariàtrica (Carlin AM et al, 2008).

Davant l'associació entre la deficiència de vitamina D₃ circulant i les diferents patologies associades es recomana una suplementació de vitamina D₃ per arribar a valors plasmàtics òptims (Ish-shalom S et al, 2008). Les conclusions de diversos estudis casos-control són controvertits davant l'associació entre suplementació de vitamina D₃ i la disminució de la xifra de la TAs a l'utilitzar variades dosis de vitamina D (Tamez H et al, 2013). No obstant, hi han altres estudis en què aquests resultats no s'observen.

La vitamina D biològicament activa s'uneix al VDR, aquest receptor s'ha descrit en diferents teixits i òrgans del cos (Norman AW et al, 2006; Plum LA et al, 2010). Encara que l'expressió i accions del VDR ha estat àmpliament estudiades en cèl·lules d'origen animal, molts pocs estudis han indagat sobre l'expressió del VDR en el teixit adipós humà.

No es coneix del tot si la presència de HTA condueix a una alteració de les concentracions circulants de vitamina D₃ o si aquesta té una relació causal en la regulació de la TA. El propòsit de la tesis és aprofundir l'associació entre la TA i la la concentració circulant de vitamina D₃ en subjectes amb un ampli rang de greix corporal, i en pacients amb obesitat-obesitat mòrbida intervinguts de cirurgia bariàtrica. Finalment, es va estudiar l'expressió gènica VDR en el teixit visceral i subcutani en relació amb la xifra de TA.

4. Hipòtesis

1. La concentració de la vitamina D₃ es relaciona amb la HTA independentment del grau d'obesitat.
2. En pacients amb obesitat, l'expressió gènica de VDR en el teixit adipós s'associa amb la xifra de la tensió arterial i elements implicats amb la seva fisiopatologia (citocines i sensibilitat a la insulina).

5. Objectius

1. Analitzar l'associació entre la concentració circulant de vitamina D₃ i la xifra de la tensió arterial en subjectes amb un ampli rang de greix corporal en un estudi transversal retrospectiu.
2. Analitzar si la concentració plasmàtica de vitamina D₃ té relació amb la xifra de la tensió arterial en pacients amb obesitat després de la cirurgia bariàtrica en un estudi longitudinal retrospectiu.
3. Analitzar l'associació de l'expressió genètica de VDR amb la xifra de la tensió arterial en el teixit adipós subcutani i visceral en pacients amb obesitat, i amb elements implicats amb la seva fisiopatologia (sensibilitat a la insulina, i citocines pro i antiinflamatòries).

6. Metodologia

6.1 Disseny de l'estudi, participants i enregistrament de les dades.

***Cohort 1**

Participants

Des de l'any 2010 fins a l'any 2013 inclòs, es va realitzar un estudi transversal retrospectiu de 509 subjectes sans caucàsics de 21 a 66 anys amb un IMC de 18 a 64 kg/m² de la població assistida en l'hospital Josep Trueta. Els subjectes varen ser estudiats pel Servei d'Endocrinologia de l'hospital Universitari Dr. Josep Trueta (Girona, Espanya).

Els criteris d'exclusió varen ser: 1) alteració hepàtica o renal i/o disfunció de la tiroides, 2) evidència de malaltia crònica o l'ús de medicament crònic i, 3) malaltia aguda apareguda en el mes anterior.

***Cohort 2**

Participants

Des de l'any 2000 fins a l'any 2012 inclòs, es va realitzar un estudi longitudinal retrospectiu de 169 pacients caucàsics de 33 a 65 anys amb un IMC >35 kg/m² intervinguts de cirurgia bariàtrica. El pacients van ser reclutats pel Servei d'Endocrinologia de l'hospital Universitari Dr. Josep

Trueta (Girona, Espanya) seguint els criteris d'inclusió i d'exclusió de la Guia Clínica d'Actuació en el Sobrepès i l'Obesitat en l'adult de la regió sanitària de Girona (GirObSMet).

Criteris d'inclusió varen ser: 1) edat compresa entre 30 i 65 anys, 2) IMC $>40 \text{ kg/m}^2$ o IMC $>35 \text{ kg/m}^2$ amb patologies majors associades, 3) capacitat de comprensió per part dels pacients del procediment quirúrgic, així com dels seus efectes i motivació pel complex seguiment dietètic.

Criteris d'exclusió varen ser: 1) bulímia no controlada, 2) antecedents psiquiàtrics majors no controlats, 3) ingesta de drogues o alcohol superior a 80 gr/dia en homes i 40 gr/dia en dones, 4) risc anestèsic no acceptable, i com objectiu específic de l'estudi: 5) subjectes amb suplementació de vitamina D₃ prèvia a la cirurgia, 6) l'ús de tractament amb anticonvulsionants com el fenorbarbital o fenitoïna o els seus anàlegs, i 7) tots els pacients que no tenien enregistrades en les seves històries clíniques la concentració circulant de vitamina D₃ o la xifra de la TA sistòlica i diastòlica prèvia a la intervenció.

Enregistrament de les dades

Es va utilitzar les històries clíniques dels pacients per estudiar els valors analítics com els antropomètrics en els diferents períodes de temps: prèvia a la cirurgia i en els 12, 18 i 24 mesos després de la intervenció (**taula 1**).

	Prèvia cirurgia	Post cirurgia		
		12è mes	18è mes	24 mesos
Any de la intervenció	*			
Edat del pacient	*	*	*	*
Antecedents patològics	*			
Mesures antropomètriques	*	*	*	
Mesures bioquímiques	*	*	*	
Concentracions circulants de 25(OH)vitamin D ₃	*	*	*	*
Suplementació de vitamina D ₃	*	*	*	*

Taula 1: Períodes de temps de recollida de dades

***Cohort 3**

Participants

Des de l'any 2000 fins al 2012 inclòs, es va realitzar un estudi retrospectiu de l'expressió gènica del VDR en 121 pacients caucàsics. Les mostres de teixit adipós es van obtenir dels dipòsits de teixit adipós visceral (VAT) i subcutanis (SAT) (91 VAT i 87 SAT) a partir d'una cirurgia electiva (by-pass gàstric, colecistectomia, i hèrnies umbilicals i inguinals). Els pacients varen ser reclutats en el Servei d'Endocrinologia de l'hospital Universitari Dr. Josep Trueta (Girona, Espanya).

Criteris d'inclusió varen ser: 1) edat de 30 a 65 anys, 2) IMC >30 kg/m², i 3) la capacitat de comprendre els procediments de l'estudi.

Criteris d'exclusió varen ser: 1) malaltia crònica greu, 2) ingesta d'etanol >20g/dia, i 3) malaltia i/o infecció aguda apareguda en el mes anterior.

Tots els subjectes van donar el seu consentiment informat per escrit.

*** Cohort 4**

Participants

Del 2010 al 2013 es va reclutat 32 pacients del projecte multicèntric FLORINASH.

Els criteris d'inclusió varen ser: 1) pacients caucàsics de 30 a 65 anys, 2) IMC >30 kg/m², 3) capacitat de comprendre els procediments de l'estudi.

Els criteris d'exclusió varen ser: 1) malaltia sistèmica, 2) infecció en el mes anterior, 3) malaltia crònica greu, 4) ingesta d'etanol >20g per dia, o 5) l'ús de medicaments que poden interferir amb l'acció de la insulina.

Es va analitzar un subgrup de 18 pacients que no varen diferir del grup (14 homes i 4 dones).

6.2 Procediments clínics

6.2.1 Càlcul de l'índex de massa corporal (IMC)

L'índex de Massa Corporal es va calcular utilitzant la següent fórmula:

$$\text{IMC} = \text{Pes (kg)} / \text{Alçada (m}^2\text{)}$$

A on el pes es mesura en una bàscula calibrada situada en una superfície plana i llisa, col·locant al pacient en el centre de la balança sense sabates ni jaquetes o abrics. El pes s'expressa en kg i amb un decimal.

L'alçada es mesura amb un tallímetre de braç mòbil situat en una superfície llisa i dura. El pacient és col·locat d'esquena al tallímetre, amb els talons junts, els glutis i els braços a la barra fixa. El braç mòbil del tallímetre és desplaçat fins a la base de la superfície del cap del pacient, formant un angle recte amb el braç mòbil del tallímetre. Els valors s'expressen en centímetres.

6.2.2 Mesura de la tensió arterial

La TA es va mesurar segons el protocol de la *Guia Clínica Española de Hipertensión Arterial 2005 (SEH-LELHA)*. La tècnica emprada pel mesurament de la xifra de la TA és també la vigent al dia d'avui actualment per la *ESH/ESC guidelines for the management of arterial hypertension*

2013. Els pacients han d'estar en posició fowler (assentats) o semifowler (lleugera inclinació) amb esquena i braços recolzats, i cames no creuades. Fixant-se que el braçal estigui a l'altura del cor i cobreixi el 80% del perímetre del braç (12-13 cm d'amplada i 35 cm de llarg). La lectura s'inicia després d'un mínim de 3- 5 minuts en repòs i sense administració prèvia de fàrmacs amb efectes sobre la xifra de la TA. Es deixa un interval d'1-2 minuts entre les mesures. Si les xifres són molt diverses s'agafen medicacions addicionals. Es considera el càlcul de la xifra promig de la TA si es creu necessari. La tensió arterial s'expressa en mil·límetres de mercuri (mmHg). Les mesures de la pressió arterial es varen registrar amb un esfigmomanòmetre automàtic.

Per classificar les categories d'hipertensió es va utilitzar la *ESH/ESC guidelines for the management of arterial hypertension 2013* (<http://www.esh2013.org/wordpress/wp-content/uploads/2013/06/ESCESH-Guidelines-2013.pdf>)

És important esmentar que els graus de la HTA descrits per la *ESH/ESC* coincideixen amb la Guia de Pràctica de l'Institut Català de la Salut.

Tenint present el tipus de pacient de l'estudi es va definir hipertens amb una TAs ≥ 135 mmHg i una TAd > 85 mmHg o amb tractament hipotensor.

6.2.3 Paràmetres analítics

Els procediments analítics realitzats en l'estudi van ser mesurats en dejú, d'un mínim de 8h. Tant el colesterol total, com colesterol-HDL i els triglicèrids es van determinar mitjançant un mètode enzimàtic colorimètric en un analitzador Roche/Hitachi Cobas C. El colesterol-LDL es va obtenir mitjançant l'aplicació de la fórmula Friedwald.

Les concentracions circulants de 25(OH)vitamina D₃ es van determinar per electroquimioluminiscència (Modular Analytics E170; *Roche*). El coeficient de variància del sèrum humà va ser de 4,5% i del control de qualitat de 3,6 %.

La concentració plasmàtica d'hormona paratiroidea (PTH) es va determinar per electroquimioluminiscència (Modular Analytics E170; *Roche*).

Les concentracions de glucosa plasmàtiques basals van ser valorades amb un espectrofotòmetre *Beckman Glucose Analyzer II* (*Beckman Instruments; Brea, Calif*) segons un mètode enzimàtic colorimètric.

L'hemoglobina glicosilada (HbA1c) es va analitzar a partir d'una mostra de sang total amb EDTA potàssic amb una tècnica immunoquímica basada en la inhibició de l'aglutinació de partícules de làtex.

La sensibilitat a la insulina es va mesurar mitjançant el clamp euglicèmic hiperinsulinèmic. Es va administrar per via intravenosa una perfusió

continua d'insulina (Actrapid HM, Novo Nordisk, Copenhagen, Dinamarca) durant 120 minuts a $40 \text{ mUI} / \text{m}^2 \cdot \text{min}$, amb un resultat d'hiperinsulinèmia constant de 80 mUI/ml . La glucosa en sang arterialitzada es va obtenir cada 5 minuts, i la infusió de glucosa al 20 % (1,11M) es va ajustar per mantenir les concentracions de glucosa en plasma a 5 mM . El ritme de la infusió de glucosa serà proporcional a la sensibilitat a la insulina, i per tant, inversament proporcional a la resistència a la insulina. La taxa de la captació de glucosa de tot el cos (valor M) es va calcular en 2 hores del clamp com la taxa mitja de la infusió de glucosa de 80 a 120 minuts.

6.3 Teixit adipós

6.3.1 Obtenció i tractament del teixit adipós

Les mostres de teixit adipós subcutani i visceral van ser obtingudes mitjançant cirurgia oberta o laparoscòpia dels pacients reclutats en el servei d'endocrinologia de l'Hospital Dr. Josep Trueta de Girona (Girona, Espanya). Les mostres de teixit adipós es van obtenir durant els procediments quirúrgics electius per aquest ordre: Bypass gàstric, colecistectomia i operacions abdominals per reparar hèrnies inguinals i umbilicals. Es va constatar l'absència de malaltia sistèmica. Tots els subjectes van donar el seu

consentiment informat per escrit després que el propòsit, la naturalesa i els riscos potencials per a l'estudi els van ser explicats. Les mostres de teixit adipós es van obtenir apartir de teixit adipós subcutani i visceral, es va rentar, fragmentar i immediatament congelat en nitrogen líquid abans de ser emmagatzemat a -80°C .

6.3.2 Estudi d'expressió gènica

6.3.2.1 Extracció de l'ARN

El primer pas de l'extracció de l'ARN de teixit adipós congelat, va incloure la retirada de les alíquotes prèviament identificades, del congelador a -80°C , i s'afegí a cada alíquota 600 μl de *QIAzol*® *Lysis Reagent* (*QIAGEN, EUA*) fred i es va voltejar durant 10 seg. El *QIAzol*® (o *Trizol*® segons la casa comercial) és una barreja comercial fotosensible de guanidina, tiocianats, fenols i alcohols que condiciona la degradació de les cèl·lules, permetent l'extracció del material nucleic íntegre. El *QIAzol*® estabilitza l'ARN, inactivant les ARNases que podrien degradar-los. Mitjançant l'ús d'un homogeneïtzador (*Ultraturrax Werke*®; *Londres, Anglaterra*), es va triturar la mostra a nivell subcel·lular (màxima potència durant 20-40s).

Després d'un període de repòs de 5 min es va afegir a la solució 200 μ L de cloroform i es va agitar durant 15 seg. A continuació, la solució es va centrifugar per un període de 15 minuts a 4° i 1200 g. D'aquesta manera, la barreja va perdre la seva homogeneïtat per mostrar tres fases clarament diferenciades de les quals, la fase superior, completament incolora d'aspecte aquós, és la que contenia l'ARN dissolt i ja separat de la resta de molècules. Va quedar una segona interfase blanca, constituïda, en la seva pràctica totalitat per l'ADN, i una hipofase vermellosa. Aquesta primera fase d'uns ~600 μ L es va transferir a un nou *Eppendorf*® estèril i lliure d'ARNases on es va barrejar amb un volum equivalent d'etanol absolut, fred i estèril. En aquestes condicions, després de voltejar-lo vigorosament és possible que el material genòmic contingut en la solució comenci a ser visible degut a la desnaturalització de les cadenes d'ARN: cal mantenir-lo dissolt abans de passar la solució per la *RNeasy*® *Mini Spin column*, una columneta cromatogràfica col·locada a un tub de centrífuga de 2 mL. Van seguir una sèrie de rentats i centrifugacions a 8000 g durant 60 seg. a temperatura ambient. Els tampons comercials que inclou el kit (*Buffer RPE i RW1*) n'asseguren un rentat complet de restes lipídiques, proteiques i/o fenòliques, per tal d'aconseguir una puresa òptima. Una última centrifugació a màxima velocitat (14000 g) de 2 min garanteix assecament i neteja de la

membrana polar, encara amb l'ARN atrapat. Finalment, es va transferir la columna a un nou tub de col·lecció estèril (correctament etiquetat i amb tap) i es va eluir l'ARN passant 50 µL d'aigua estèril *RNase-free* directament a través del centre de la membrana i centrifugant a 8000 g, 1 min (RT). Es va repetir el procés una segona vegada amb els mateixos 50 µL d'aigua per tal de maximitzar-ne la concentració i assegurar l'eficiència de l'extracció.

La puresa i concentració de l'ARN obtingut s'estima mitjançant mètodes espectrofotomètrics. El *NanoDrop™* (*Thermo Fischer Scientific; Wilmington, EUA*) permet valorar de forma precisa la concentració d'ARN de la solució final i la seva puresa a l'analitzar també altres espectres d'absorció per longituds d'ona diferents a les dels oligonucleòtids (260 nm).

La puresa i concentració d'ARN de la solució final s'estimen de la mateixa manera que l'ADN, per espectrofotometria, mesurant l'absorbància de la mostra a diferents longituds d'ona. Per determinar-ne la integritat, paràmetre extremadament important donada la fragilitat de l'ARN i la sensibilitat de les determinacions que volen dur-se a terme a posteriori, pot fer-se correr una petita mostra tenyida amb bromur d'etidi per un gel d'agarosa 1%. Al gel s'hi ha de poder apreciar dues bandes clares, corresponents a l'ARN ribosòmic, subunitats 18S i 28S

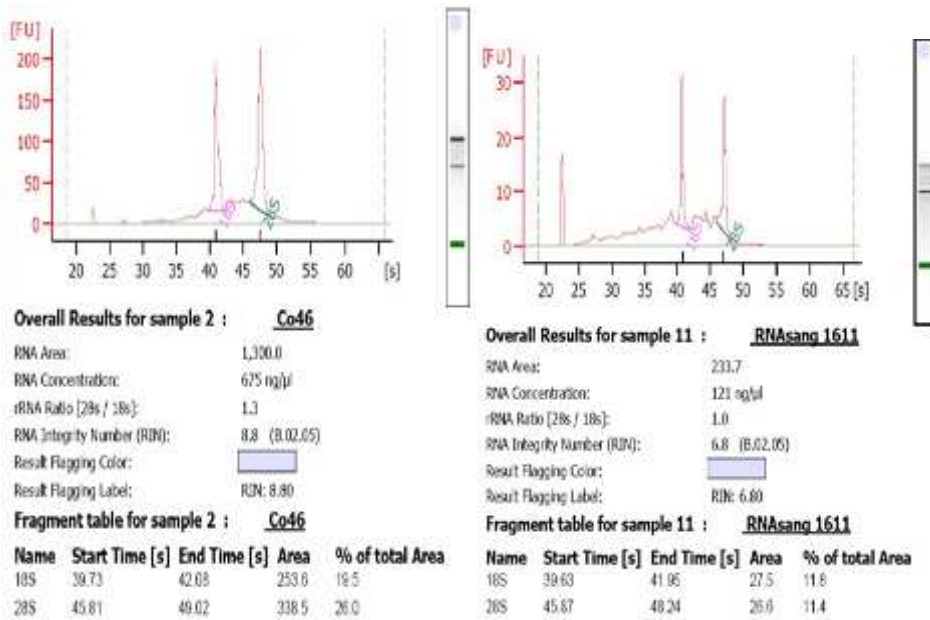


Figura 8. Diagrama de la integritat de l'ARN

Exemple del diagrama que proporciona el Bioanalyzer® representant la integritat de l'ARN d'una solució aquosa. Els pics corresponen a la presència de les subunitats ribosòmiques 18S i 28S i, la base dels mateixos, un marcador de la integritat general de l'ARN. L'ARN Integrity Number (RIN) es calcula a partir dels darrers i es considera òptim per l'anàlisi d'expressió gènica per sobre de 7,5. Al costat de cada gràfica, una representació digital del què seria l'equivalent en bandes d'un gel d'agarosa.

És molt més objectiva, específica, replicativa i sensible l'estimació de la integritat i concentració que s'assoleix a través del *Bioanalyzer*®, un sofisticat sistema de caracterització de solucions d'àcids nucleics. Un *Bioanalitzador (Bioanalyzer™, Agilent Technologies; Santa Clara, EUA)* és una plataforma microfluídica útil per quantificar el grau de la degradació del material genòmic obtingut (RIN number). Es basa en la presència

relativa de les principals subunitats ribosomes, la 18S i la 28S, ambdues molt abundants, per valorar la integritat de la mostra.

6.3.2.2 Retrotranscripció de l'ARN

Tot i l'absència d'ARNases, l'ARN en solució aquosa és extremadament làbil. Els cicles de congelació i descongelació comporten la formació de cristalls que poden fragmentar les seqüències dels ribonucleòtids i reduir a l'hora de l'anàlisi per Rt-PCR, la presència real de les mateixes. Donada l'extremada sensibilitat de la tècnica, aquest fenomen, lligat a més a més, a la naturalesa estructural de cada seqüència, pot derivar en resultats i interpretacions completament errònies. El més indicat per evitar aquest error és rebutjar qualsevol mostra d'ARN després del seu 3r cicle de congelació/descongelació.

L'alternativa més adequada per allargar el temps de vida útil d'aquests tipus de mostres és la retrotranscripció de l'ARN missatger (ARNm) a ADNc, un ADN monocatenari sintetitzat a partir dels ARNm en suspensió però molt més estable, aguantant bé fins a 10 cicles de congelació/descongelació. Amb aquesta finalitat, kits comercials com el *High Capacity® cDNA Archive Kit*(Applied Biosystems; Dinamarca) permeten, mitjançant l'ús d'encebadors

aleatoris, nucleòtids lliures i una retrotranscriptasa termosensible (temperatura òptima 37°C), la total conversió de l'ARNm a ADNc. Aquests *primers* aleatoris asseguren la síntesi d'una única cadena d'ADNc a partir de qualsevol espècie d'ARNm existent a la mostra. Al final del procés, totes i cada una de les seqüències d'ARNm hauran estat (teòricament) transformades a ADNc.

Per exemple, per a retrotranscriure 50 µL de mostra (de 0,1 a 10 µg d'ARN pur a concentracions entre 0,002 i 0,2 µg/µL) es realitza una MIX (50 µL/mostra) dels components del kit, sempre treballant sobre gel i en condicions estèrils. Aquests reactius són un tampó adient per promoure la retrotranscripció (*10 x Reverse Transcription Buffer*, 10 µL), la solució de *desoxiribonucleòtids* lliures (*25x dNTPs*, 4 µL), una solució d'encebadors aleatoris (*10x Random Primers*, 10 µL) i la retrotranscriptasa, normalment de naturalesa vírica i en suspensió alcohòlica (*MultiScribe™ Reverse Transcriptase*, 50 U/µL, 5 µL). Finalment s'enrasarà amb 21 µL d'aigua destil·lada *RNase-free* i es barrejaran les 2 solucions, els 50 µL de mostra amb els 50 µL de MIX, per obtenir 100 µL d'una solució de 0,1-10 µg d'ADNc pur.

La reacció de retrotranscripció consta de 2 etapes, una de *melting* o associació de seqüències complementàries (encebadors amb molècules

d'ARNm) de 10 min a 25°C i una altra d'elongació de seqüències i degradació de molècules d'ARNm dirigida per l'acció de les retrotranscriptases a 37°C durant 120 min.

6.3.2.3 Anàlisi de l'expressió gènica via Real-time PCR

La reacció en cadena de la polimerasa a temps real (Rt-PCR) permet estimar amb certa facilitat les concentracions d'expressió relatius d'un gen determinat. Cada assaig té una única sonda, específica per un gen determinat i situada al mig d'un *amplicó* (la seqüència, específica pel gen estudiat, amplificada entre ambdós encebadors).

La PCR a temps reals realitza en un termociclador amb capacitat de fer incidir sobre cada mostra un feix de llum d'una longitud d'ona determinada i de detectar la fluorescència emesa pel fluorocrom excitat. Aquest termociclador és un aparell amb capacitat per escalfar i refredar ràpidament les mostres, que permet la replicació exponencial d'una seqüència específica d'ADNc, denominada *amplicó*, aprofitant les qualitats fisicoquímiques dels àcids nucleics i les enzimàtiques de l'ADN polimerasa.

Cada mostra d'ADNc, sintetitzada a partir de l'ARN extret es diluirà a una concentració constant per tal de carregar, amb 11,25 µL de solució, entre

10-100 ng d'ADNc. Nosaltres vam utilitzar 10 ng/ml d'ADNc a partir de 20 ng/ml d'ARN. A cada pouet s'aplicaran a continuació 13,75 µL d'una MIX constituïda per 12,5 µL de *TaqMan® PCR Master Mix* (solució prefabricada per AB amb la totalitat de components necessaris per dur a terme l'amplificació gènica, menys els encebadors) i 1,25 µL de l'assaig o combinació de *primers* (i sonda) necessaris segons el gen estudiat.

La integritat de l'ADN, l'eficiència enzimàtica i altres factors poden conduir a una variabilitat que condueixi a un error en la quantificació. Per aquest motiu s'han desenvolupat sistemes d'estandardització, com per exemple la quantificació relativa del gen d'estudi respecte a un altre anomenat 'normalitzador', que se selecciona degut a la seva expressió gairebé constant, ja que solen estar involucrats en funcions bàsiques de la supervivència cel·lular (gen d'expressió constitutiva). D'aquesta manera, efectuant en cada experiment el mesurament dels gens d'interès i dividint-los per l'expressió del gen normalitzador seleccionat, és possible comparar els primers tot i que no coneguem amb termes absoluts els seus nivells d'expressió.

En el nostre cas concret, vam seleccionar la *Ciclofilina A* (*Cyclophilin A*, *PPIA*; *RefSeq. NM_002046.3*). La seva expressió és constitutiva i relativament constant, independent de l'estat metabòlic de les cèl·lules,

especialment útil, doncs, en l'estudi dels patrons d'expressió. El seu ús com a gen normalitzador per a estudis d'expressió gènica relativa en teixit adipós ha estat extensivament validat en estudis anteriors (Ortega FJ et al, 2010; Moreno-Navarrete JM et al, 2011; Ortega FJ et al, 2009).

Així doncs, per a cada determinació (per duplicat) s'analitzarà el control endogen, també per duplicat. Desviacions estàndard per sobre de 0,3 per a qualsevol d'aquestes rèpliques invalidaran la prova en la mostra afectada.

Per resumir doncs el procés de la Rt-PCR, podem dir que consisteix en una sèrie de canvis de temperatura que es repeteixen entre 40 vegades, anomenats cicles. Teòricament en cada cicle s'obté el doble de producte, i cada un d'ells té un mínim de 3 etapes: la primera, al voltant dels 95°, permet la separació dels àcids nucleics de doble cadena, el segon, a una temperatura al voltant dels 50-60°, permet l'alineació dels encebadors al motlle d'ADN; i el tercer, a 68-72°, facilita la polimerització per part de l'ADN polimerasa. Les temperatures i el temps utilitzats en cada cicle depenen de gran varietat de paràmetres com els encebadors i les sondes utilitzades per la síntesi d'ADN, el tamany de l'amplicó etc.

De la corba de fluorescència resultant al llarg de 40 cicles d'amplificació es pot determinar un nivell límit de fluorescència o *threshold*, arbitrari però constant per a cada gen/assaig, definit normalment com el valor de

fluorescència màxim que assoleix la corba sigmoïdal cicles *versus* fluorescència en la fase de creixement exponencial. El *threshold cycle* (valor Ct) es defineix llavors per mostra i gen com els cicles necessaris per assolir aquest punt i depèn de la quantitat inicial del transcrit amplificat de forma que, quan més transcrit hi ha a la solució d'ADNc, menys cicles (\downarrow Cts) caldran per assolir aquest *threshold*. La Δ Ct es calcula llavors com la diferència entre el Ct del gen problema i el Ct obtingut pel control endogen en una mateixa mostra. El valor de Ct pel control endogen serà teòricament idèntic en totes les mostres analitzades de forma que la variació *entre determinacions* en el control endogen permetrà per exemple corregir errors de processament de les mostres (**figura 9**).

Canvis relatius entre mostra (entre individus, teixits o tractaments) respecte al control endogen son determinats més tard a través de la fórmula $2^{-\Delta Ct}$ segons les indicacions del proveïdor (*Livak and Schmittgen, 2001*), de forma que els valors d'expressió son expressats finalment com a *ràtio d'expressió relativa respecte a l'expressió del control endogen*, en aquest cas PPIA.

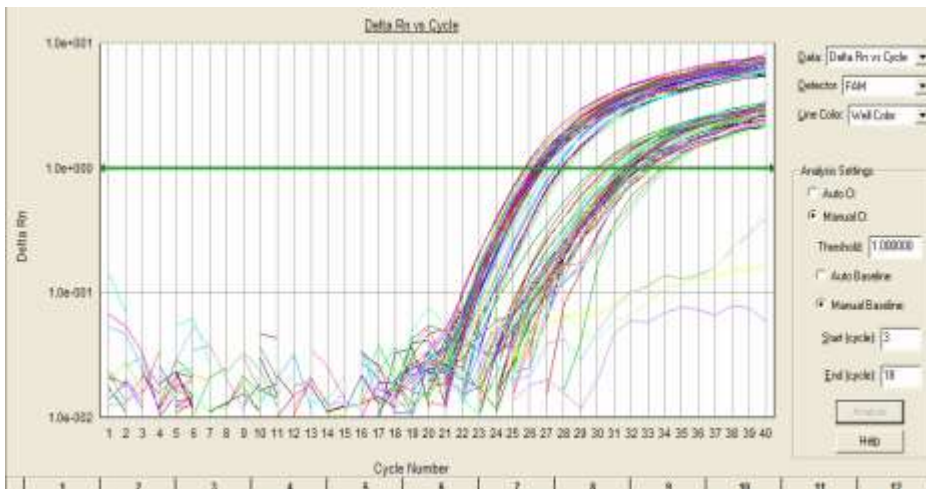


Figura 9. Amplificació dels transcrits d'ADNc.

6.3.3 Kits, reactius i assajos comercials. Equipament

<i>Equip</i>	<i>Marca</i>	<i>Model</i>	<i>País</i>
<i>Dispensador automàtic</i>	LabChip	Agilent2100 Bioanalyzer	Anglaterra
<i>Cambra flux laminar</i>	Telstar	MINI-V/PCR	Espanya
<i>Cambra flux laminar</i>	Captair Captair®	Chem by erlab	Espanya
<i>Centrífuga</i>	Hettich Zentrifugen	Hettich Universal 32R	Alemanya
<i>Congelador -20°C</i>	Bosch	GSE36421	Espanya
<i>Cubetes electroforesi</i>	Invitrogen	XCell Surelock™	Espanya
<i>Bioanalyzer®</i>	Drummord	Pipet-Ais	EUA
<i>Espectrofotòmetre</i>	HITACHI	U-1800	Japó
<i>Espectrofotòmetre</i>	GeneQuant	GeneQuant Pro	Anglaterra

Taula 1

<i>Fàbrica de Gel</i>	BAR-LINE	BF-85-AS	Espanya
<i>Incubador</i>	PS Biotech	Galaxy S	Anglaterra
<i>Joc micropipetes</i>	GILSON	PipetMan	França
<i>Microcentrifuga</i>	Eppendorf Centrifuge	5415R	Anglaterra
<i>Microcentrifuga</i>	Jouan	A14	Espanya
<i>Micropipeta</i>	Nichiryo	Nichipet 7000 40-200µL	Xina
<i>Microscopi</i>	Zeiss	Axiovert 40 CFL	EUA
<i>Nevera</i>	Bosch	Cooler	Espanya
<i>Ordinador portàtil</i>	DELL	Lattitude C810	Xina
<i>Real- Time PCR</i>	Roche Diagnostics	LC480	Alemanya
<i>Termobloc</i>	SELECTA	Tenbloc (x18 Epperndorf®)	Espanya
<i>Termociclador</i>	Bio-Rad MyCycler	Thermal Cycler	Anglaterra
<i>Ultracongelador - 80°C</i>	Sanyo	MDF-U71V	Japó
<i>Ultrafragmentador</i>	IKA	Ultraturrax Werke	Anglaterra
<i>Vortex</i>	Scientific Industrial	Genie-2	EUA

Taula 1. Equipament del laboratori emprat pel desenvolupament d'aquest treball.

Kit/Reactius	Definició	Referència	Casa	País
RNeasy® Lipid Tissue	Kit d'extracció de RNA	74804	QIAgen	EUA
Kit High-Capacity® cDNA Archive	Kit de retrotranscripció RNAcDNA	4322171	Applied Biosystems	Anglaterra
TaqMan® PCR Master Mix	Per l'anàlisi de l'expressió gènica mitjançant primers & sondes TaqMan®	4304437	Applied Biosystems	Anglaterra

Taula 2. Reactius i kits comercials utilitzats per l'elaboració dels bancs de mostres, l'anàlisi i la caracterització molecular.

TaqMan®	Gen	Seq. de referencia
Hs99999904_m1	PPIA	NM_002046.3
Hs00172113_m1	VDR	NM_001017535.1
Hs01113624_g1	TNF-alfa	NM_000594.3
Hs00961622_m1	IL-10	NM_000572.2

Taula 3. Assajos comercials desenvolupats i testats per Applied Biosystems (AB) per realitzar anàlisi d'expressió gènica mitjançant la tecnologia TaqMan® (primers i sondes) o SybrGreen® (primers i Sybr® Green, un fluorocrom específic pel marcatge del sDNA sintetitzat de novo).

6.4 Anàlisi estadístic

Tots els assaigs es varen realitzar almenys per duplicat i els resultats s'expressaren amb la mitjana \pm desviació estàndard (SD) per a les variables contínues i per freqüències per a les variables categòriques. Com a primer pas en l'anàlisi estadístic, es varen provar la distribució de la normal i si les variables no seguien una distribució normal es van transformar logarítmicament. La relació lineal simple entre variables quantitatives

s'analitzà amb models bivariables mitjançant el test de Pearson. Per comparar paràmetres continus entre grups de subjectes es va utilitzar el test d'ANOVA per comparacions múltiples quan l'equiparabilitat de les variàncies poden ser assumides, o el test t de Student i proves no paramètriques per a comparacions entre parelles. Es va utilitzar l'anàlisi de regressió de lineal múltiple per tenir en compte els possibles factors de confusió. Per estudiar la relació entre les variables s'utilitzà el Model Lineal Mixt considerant dades repetides. L'anàlisi estadístic es va realitzar utilitzant el programa SPSS 16.0 (SPSS, Chicago IL, EUA) i el programa SAS SYSTEM 9.2 per Windows.

7. Resultats

7.1 Primer objectiu. Vitamina D circulant i hipertensió arterial

**Cohort 1*

Les característiques clíniques i antropomètriques d'aquests subjectes es mostren a la **taula 1**, formada per 509 subjectes caucàsics, 158 homes i 351 dones, amb un interval d'IMC entre 20 i 52 kg/m², i amb una mitjana d'edat de 44,6 ± 10,0 anys.

A l'analitzar tota la mostra conjunta es va correlacionar de manera inversa la concentració plasmàtica de vitamina D₃ i la xifra de la tensió arterial sistòlica i diastòlica (r= -0,165; p <0,001 / r= -0,117; p= 0,012) (**figura 1 i 2**), però al realitzar una regressió lineal múltiple, les relacions entre la vitamina D₃ circulant i la TAs i TAd no van ser independents del grau d'obesitat i de l'edat dels subjectes (p= 0,404 i p= 0,217, respectivament).

Al classificar els subjectes segons els graus d'hipertensió arterial es va observar que els pacients amb HTA definida (TA ≥135 i/o >85 mmHg o amb tractament hipotensor) (**figura 3**), HTA grau I, i HTA grau II tenien menys concentració circulant de 25(OH)vitamina D₃ respecte als normotensos. (15,3 ± 8,4 vers 17,6 ± 9,5; p= 0,011 / 14,8 ± 7,8 vers 17,54 ± 9,6; p= 0,002 / 14,2 ± 9,5 vers 17,6 ± 9,5;p= 0,009, respectivament).

Es va observar una diferència significativa entre la concentració plasmàtica de vitamina D₃ i les xifres de TAd dicotomitzada. Els pacients amb la xifra de la TAd ≥ 75 mmHg varen tenir menys concentració sèrica de 25(OH)vitamina D₃ respecte als pacients amb la xifra de la TAd < 75 mmHg ($15,1 \pm 8,2$ vers $17,6 \pm 10,1$; $p = 0,006$).

7.2 Segon Objectiu. Vitamina D circulant i hipertensió arterial

****Cohort 2***

La cohort 2 va ser formada per 169 pacients caucàsics, 27 homes i 142 dones, amb una mitjana d'edat de $44,5 \pm 9,9$ (**taula 2**).

Es van observar diferències significatives al comparar la variable de la xifra de la TAs i de la TAd abans i després de la cirurgia bariàtrica [amb els diferents períodes de la post cirurgia (12, 18 i 24 mesos)]. Mentre que ambdós tensions arterials varen disminuir significativament després de l'operació (TAs: $138,0 \pm 18,0$ vers $127,9 \pm 15,3$; $p < 0,001$ / TAd: $78,8 \pm 14,3$ vers $72,3 \pm 10,3$; $p < 0,001$) les concentracions circulants de vitamina D₃ varen augmentar sota la suplementació de vitamina D₃ ($22,7 \pm 14,2$ vers $26,3 \pm 11,6$; $p = 0,003$) (**taula 2**).

	Pes normal N=39	Sobrepès N=23	Obesitat N=89	Obesitat mòrbida N=336	P(t-student)		
					Pes normal-sobrepès	Pes normal-obesitat	Pes normal-obesitat mòrbida
participants (N)	509 (158 homes i 351 dones)						
Edat	44,6±10,0						
IMC (kg/m²)	22,1±1,8	27,1±1,5	36,8±2,7	46,4±4,8	<0,001	<0,001	<0,001
Glucosa(mg/dl)	83,7±8,5	92,5±8,1	95,3±20,7	98,1±20,8	0,407	0,025	<0,001
Hb1Ac (%)	5,4±0,2	5,4±0,2	5,5±0,5	5,8±0,6	0,999	0,047	0,004
C-total (mg/dl)	194,2±43,1	196,4±37,0	188,8±35,8	191,7±33,3	0,996	0,886	0,282
C-LDL (mg/dl)	109,0±37,6	121,4±33,0	116,8±30,0	119,1±29,5	0,497	0,617	0,981
C-HDL (mg/dl)	71,0±17,0	58,3±14,5	49,4±13,7	47,5±11,5	0,002	<0,001	<0,001
TG (mg/dl)	70,4±29,1	83,5±27,1	112,5±53,4	125,5±55,6	0,827	<0,001	<0,001
TAs (mmHg)	117,2±11,7	127,7±17,6	132,5±22,5	142,4±19,2	0,230	<0,001	<0,001
TAd(mmHg)	64,6±6,5	74,8±8,7	76,3±13,3	78,5±13,5	0,030	<0,001	<0,001
PTH(pg/ml)	37,3±14,2	43,9±14,0	52,2±17,6	56,0±20,4	0,639	0,001	<0,001
25(OH)D₃ (ng/ml)	25,4±8,1	21,4±6,5	16,4±9,2	14,3±9,0	0,389	<0,001	<0,001

Taula 1. Valors antropomètrics i bioquímics dels subjectes estudiats de la cohort 1. Anàlisi: el valor de p correspon sempre a la comparació entre dos grups. *IMC= índex de massa corporal, Hb1Ac=hemoglobina glicosilada; C-total= colesterol total; C-LDL= lípids de baixa densitat; C-HDL= lípids d'alta densitat; TG= triglicèrids, TAs= tensió arterial sistòlica; TAd= tensió arterial diastòlica; PTH= hormona paratiroidea; 25(OH)D₃= concentració plasmàtica de vitamina D₃.

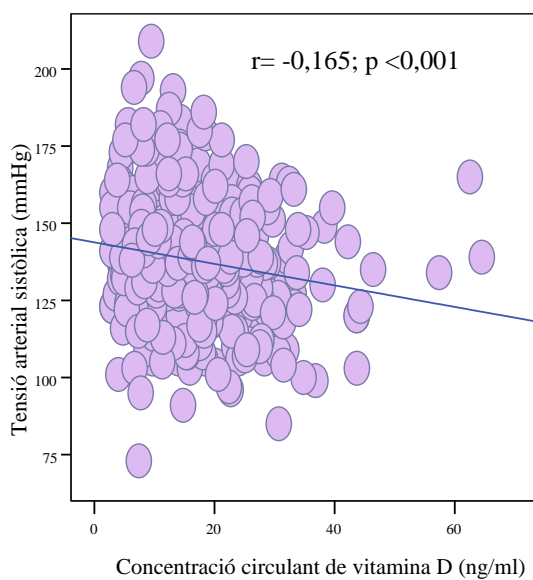


Figura 1. Concentració circulant de vitamina D₃ i la xifra tensió arterial sistòlica.

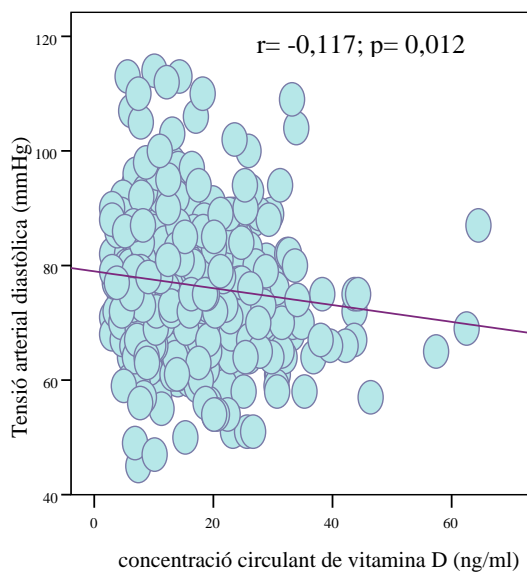


Figura 2. Concentració circulant de vitamina D₃ i la xifra de la tensió arterial diastòlica.

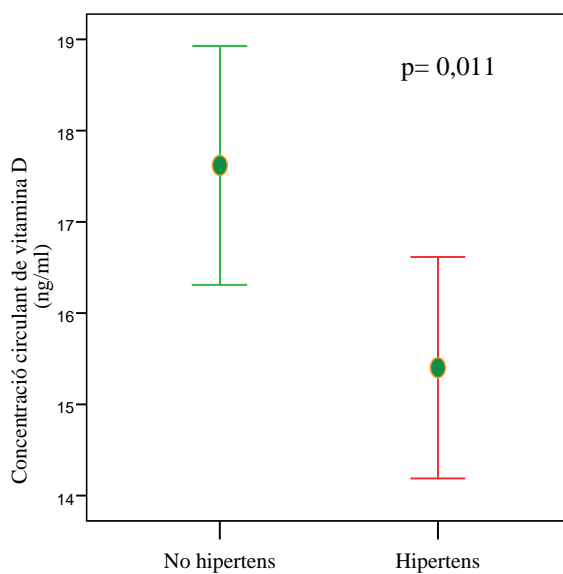


Figura 3. Concentració circulant de vitamina D₃ en pacients hipertensos (≥ 135 -159 i/o > 85 -99 mmHg o amb tractament hipotensor) i pacients no hipertensos (< 135 i/o ≤ 85 mmHg).

Malgrat no es va observar cap associació significativa entre les concentracions plasmàtiques de vitamina D₃ i les xifres de la TA tant sistòlica com diastòlica dintre d'un mateix període de temps, si que es va mostrar diferències significatives al comparar les variables entre els diferents períodes de temps. Per exemple, les concentracions circulants de vitamina D₃ basals o abans de la cirurgia es varen correlacionar de manera inversa amb les xifres de la TAd en el 12è mes ($r = -0,225$; $p = 0,016$) i en el 18è mes ($r = -0,295$; $p = 0,013$) (**figura 4 i 5**, respectivament). Una altra correlació va ser la que es va mostrar entre la concentració plasmàtica de vitamina D₃ dels 24 mesos i la xifra de la TAd precirurgia ($r = -0,274$; $p = 0,003$).

A partir d'un Model Lineal Mixt es va estudiar la relació entre la variable TAs i les variables següents: la concentració plasmàtica de glucosa en dejú, la suplementació de vitamina D₃ i l'edat.

Considerant el model de dades repetides es va mostrar que la xifra de la TAs va dependre de l'edat ($p = 0,003$), de la concentració plasmàtica de glucosa en dejú ($p = 0,029$) i de la suplementació de vitamina D₃ ($p = 0,003$) en els períodes inicial, 12 i 18 mesos (**taula 3**).

Com a molt tangencial, es va observar que els pacients que prengueren suplementació de vitamina D₃ ≥ 1000 UI tingueren una xifra de la TAd més

disminuïda respecte als que prengueren dosis de vitamina D₃ <1000 UI tant als 18 mesos (p= 0,005) com als 24 mesos (p=0,020).

Davant les associacions que s'han descrit entre les concentracions sèriques de vitamina D₃ i ambdós tensions arterials, es va separar la cohort de pacients entre hipertensos (TAs \geq 135 mmHg i/o TAd >85 mmHg i/o tractats amb hipotensors) i normotensos (**taula 4**). Al comparar els dos grups (hipertensos vers normotensos) es va observar en el període previ a la cirurgia una tendència d'associació entre les concentracions circulants de vitamina D₃ (21,2 \pm 12,9 vers 26,1 \pm 15,4; p= 0,055 ng/ml), i una diferència significativa entre les xifres de la TAs (144,6 \pm 12,2 vers 120,0 \pm 9,0; p <0,001). La xifra de la TAs va ser estadísticament significativa en tots els períodes post quirúrgics estudiats: al 12è mes (p= 0,007), al 18è mes (p= 0,008) i als 24 mesos (p= 0,033). Mentre que, la variable TAd només va diferir significativament entre els grups estudiats a la precirurgia (p <0,001) com als 18 mesos (p= 0,006), on va mostrar també una tendència als 12 mesos (p= 0,061).

Període	Precirurgia	12 m	18 m	24 m	p (t-student)		
					inicial-12m	inicial-18m	inicial-24m
N	169 (27 homes i 142 dones)						
Edat	44,5 ± 9,9						
IMC (Kg/m ²)	N=169 45,4±5,9	N=156 30,4±4,4	N=150 29,6±5,1	N=128 29,7±4,1	<0,001	<0,001	<0,001
Glucosa (mg/dl)	N=157 104,0±9,4	N=143 84,2±2,7	N=140 84,0±2,8	-	<0,001	<0,001	-
Colesterol total (mg/dl)	N=152 189,7±37,6	N=144 165,2±35,0	N=140 169,2±32,1	-	<0,001	<0,001	-
C-LDL (mg/dl)	N=137 116,8±31,9	N=118 89,1±26,2	N=120 90,6±26,4	-	<0,001	<0,001	-
C-HDL (mg/dl)	N=143 52,1±12,7	N=124 60,6±19,4	N=125 62,3±1,4	-	<0,001	<0,001	-
Triglicèrids (mg/dl)	N=154 118,1±65,0	N=143 82,3±53,8	N=140 82,0±5,2	-	<0,001	<0,001	-
TAs (mmHg)	N=149 138,0±18,0	N=122 129,4±16,4	N=141 128,1±16,9	N=120 127,9±15,3	<0,001	<0,001	<0,001
TAd (mmHg)	N=149 78,8±14,3	N=122 73,6±9,4	N=141 74,4±10,4	N=120 72,3±10,3	<0,001	0,007	<0,001
Hormona paratiroidea (pg/ml)	N=76 46,2±25,1	N=84 42,9±15,4	N=83 50,1±22,8	N=84 50,1±22,6	0,109	0,943	<0,001
25(OH)D₃ (ng/ml)	N=169 22,7±14,2	N=146 29,6±38,8	n=135 25,8±11,6	N=136 26,3±11,6	0,022	0,003	0,003

taula2. Característiques antropomètriques i bioquímiques dels pacients estudiats de la cohort 2. Anàlisi: el valor de p correspon sempre a la comparació entre dos grups. N= número de participants; *IMC= índex de massa corporal; C-LDL= lípids de baixa densitat; C-HDL= lípids d'alta densitat; TAs= tensió arterial sistòlica; TAd= tensió arterial diastòlica; 25(OH)D₃= concentració plasmàtica de vitamina D₃; m= mesos.

Solution for Fixed Effects					
Effect	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > t
Intercept	111,57	5,7426	153	19,43	<0,0001
Edat	0,3301	0,1118	123	2,95	0,0035
Glucosa	0,06905	0,03145	213	2,20	0,0292
Suplementació de vitamina D ₃	-0,00184	0,000621	213	-2,96	0,0034

Taula 3. Model Lineal Mixt considerant dades repetides.

Variable resposta: TAs

Variable explicativa: Concentració plasmàtica de glucosa basal, suplementació de vitamina D₃ (D₃ total) i edat i la seva interacció (“**”).

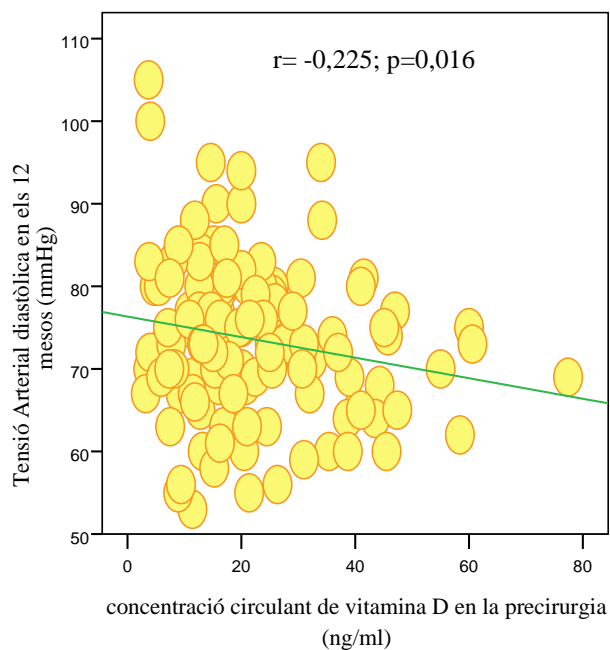


Figura 4. Concentració circulant de vitamina D₃ prèvia cirurgia vers la xifra de la tensió arterial diastòlica als 12 mesos.

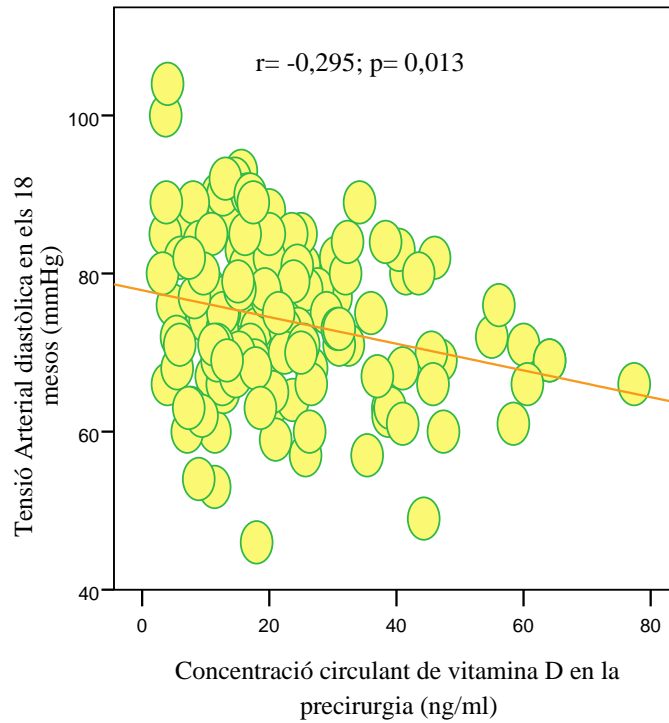


Figura 5. Concentració circulant de vitamina D₃ prèvia cirurgia vers la xifra de la tensió arterial diastòlica als 18 mesos.

	Hipertens				No hipertens/normotens				p (t-student)			
	Inicial	12 m	18 m	24 m	Inicial	12 m	18 m	24 m	Inicial	12m	18m	24m
Edat	45,5±9,8				45,5±9,8							
IMC (Kg/m ²)	N=96 46,1±5,0	N=92 30,9±4,3	N=86 30,3±5,7	N=76 30,2±3,9	N=45 43,0±6,7	N=42 29,0±5,1	N=41 28,7±4,1	N=32 29,0±5,1	0,003	0,129	0,117	0,176
Glucosa (mg/dl)	N=94 104,1±23,6	N=87 83,6±19,0	N=87 84,3±28,2	-	N=44 104,2±39,6	N=36 88,1±27,8	N=35 83,0±9,7	-	0,990	0,307	0,779	-
CT (mg/dl)	N=91 190,2±35,1	N=87 167,7±35,9	N=86 170,5±32,8	-	N=43 187,5±39,6	N=37 160,3±36,1	N=35 168,5±31,4	-	0,691	0,301	0,757	-
C-LDL (mg/dl)	N=79 117,3±26,8	N=70 89,3±28,8	N=72 93,1±27,4	-	N=40 114,9±33,6	N=32 86,3±21,3	N=31 85,5±25,0	-	0,672	0,596	0,189	-
C-HDL (mg/dl)	N=85 53,0±13,3	N=74 61,4±20,0	N=76 62,4±17,4	-	N=41 51,9±10,5	N=34 60,9±20,5	N=32 53,8±16,2	-	0,629	0,905	0,702	-
TG (mg/dl)	N=90 115,9±54,7	N=86 88,0±64,2	N=86 89,2±68,9	-	N=41 105,2±55,1	N=37 72,3±33,8	N=35 75,2±27,7	-	0,301	0,162	0,246	-
TAs (mmHg)	N=93 144,6±12,4	N=73 131,9±16,4	N=85 131,3±16,5	N=73 130,0±13,3	N=45 120,0±9,0	N=33 122,9±13,4	N=35 122,1±17,9	N=33 123,0±18,3	<0,001	0,007	0,008	0,033
TAd (mmHg)	N=93 81,6±13,6	N=73 74,9±8,8	N=85 72,5±10,6	N=73 72,5±10,6	N=45 70,7±12,1	N=33 71,4±8,4	N=35 70,7±8,2	N=33 70,5±8,2	<0,001	0,061	0,006	0,350
PTH (pg/ml)	N=47 49,0±28,4	N=58 43,0±14,9	N=51 48,9±23,6	N=52 49,8±20,7	N=18 36,1±12,9	N=18 52,8±17,7	N=20 52,8±17,7	N=22 47,4±22,9	0,576	0,880	0,508	0,664
25(OH)D3 (ng/mL)	N=96 21,2±12,9	N=86 27,0±18,4	N=79 27,6±16,4	N=78 27,6±23,9	N=45 26,1±15,4	N=37 26,1±12,2	N=36 24,0±13,0	N=39 34,5±27,2	0,055	0,800	0,247	0,169

Taula 4.Característiques antropomètriques i bioquímiques dels pacients hipertensos (TAs ≥135 mmHg i/o TAd >85 mmHg i/o tractats amb hipotensors) i no hipertensos. Anàlisi: el valor de p correspon sempre a la comparació entre dos grups.

*IMC= índex de massa corporal; CT=colesterol total; C-LDL= lípids de baixa densitat; C-HDL= lípids d'alta densitat;TG=Triglicèrids; TAs= tensió arterial sistòlica; TAd= tensió arterial diastòlica; PTH= hormona paratiroidèica; 25(OH)D₃= concentració circulant de vitamina D₃; m= mesos.

7.3 Tercer objectiu. Estudi de l'expressió gènica del VDR en el teixit adipós

**cohort 3*

La cohort 3 va ser formada per 121 pacients, dels quals es va obtenir una mostra de teixit adipós visceral (VAT) i/o de teixit adipós subcutani (SAT). S'obtingueren 91 mostres d'origen visceral i 87 mostres d'origen subcutani. Les variables antropomètriques i metabòliques dels subjectes i les concentracions d'expressions gèniques es varen resumir en la **taula 5**.

En aquesta cohort de pacients amb obesitat no s'observà una significació entre la concentració circulant de vitamina D₃ i la xifra de la TAs i TAd.

Es va observar una tendència negativa entre l'expressió gènica del VDR en el teixit adipós (VAT i SAT conjuntament) i la concentració circulant de vitamina D₃ ($r = -0,32$; $p = 0,07$). L'expressió gènica del VDR, al ser estudiada en VAT com en SAT de pacients amb obesitat, va resultar ser significativament major en VAT que en SAT ($0,0038 \pm 0,0019$ vers $0,0032 \pm 0,0017$; $p = 0,021$).

A l'estudiar les correlacions entre l'expressió gènica del receptor de vitamina D i la xifra de la TAs i la TAd, s'observà que l'expressió gènica

del VDR en VAT es va associar significativament amb la xifra de la TAs ($r= 0,282$; $p= 0,020$) (**taula 6**).

Al classificar els pacients en dos grups: hipertens (TAs ≥ 135 mmHg i/o TAd >85 mmHg) i normotens (**taula 7**) es va observar que el logaritme de l'expressió gènica del VDR en VAT en el grup del hipertens va ser significativament major que en el grup del normotens ($p= 0,027$), però no va ser significativament més alta en SAT ($p= 0,14$). A més, en el grup del hipertens es va mostrar una associació positiva entre el logaritme de l'expressió gènica del VDR en VAT i les xifres de la TAs ($r= 0,339$; $p= 0,013$). En canvi, no es va mostrar en el grup del normotens ($r= -0,295$; $p= 0,285$).

Tot seguit, es va definir el grup d'hipertens com l'ús de fàrmac antihipertensiu i/o una xifra de TA elevada (TAs ≥ 135 mmHg i/o TAd >85 mmHg). Amb aquesta descripció d'HTA es va observar una associació positiva entre el logaritme de l'expressió gènica del VDR en VAT i els valors de la xifra de la TAs ($n= 45$) ($r= 0,372$; $p= 0,013$) (**figura 6**).

En les dues classificacions d'hipertensió descrites, tant el grup del normotens com del hipertens no es va trobar cap significació entre la xifra de la TAd i l'expressió gènica del VDR en VAT i en SAT.

Número de participants	91 VAT / 87 SAT
	121 individus
Edat (anys)	44,7 ± 10,2
IMC (kg/m²)	42,5 ± 8,9
Glucosa (mg/dl)	105,9 ± 34,4
Hb1Ac (%)	5,2 ± 1,15
Colesterol total (mg/dl)	188,8 ± 32,8
Colesterol- LDL (mg/dl)	111,0 ± 31,2
Colesterol- HDL (mg/dl)	59,2 ± 35,0
Triglicèrids (mg/dl)	118,7 ± 69,0
TAs (mmHg)	132,7 ± 24,9
TAd (mmHg)	76,9 ± 16,4
25(OH)Vitamina D₃ (ng/ml)	23,8 ± 14,7
PTH (pg/ml)	42,1 ± 26,8
VDR-VAT (R.U)	0,0038 ± 0,0019
VDR-SAT (R.U)	0,0032 ± 0,0017

Taula 5. Valors antropomètrics i bioquímics del subjectes estudiats de la cohort 3.

*IMC= índex de massa corporal; Hb1Ac=hemoglobina glicosilada; Colesterol-LDL= lípids de baixa densitat; Colesterol-HDL= lípids d'alta densitat; TAs= tensió arterial sistòlica; TAd= tensió arterial diastòlica; 25(OH)vitamina D₃= concentració sèrica de vitamina D₃; PTH= hormona paratiroidea; VDR-VAT= expressió gènica del receptor de vitamina D en teixit adipós visceral; VDR-SAT= expressió gènica del receptor de vitamina D en teixit adipós subcutani.

	Expressió gènica del VDR en SAT (N=87)		Expressió gènica del VDR en VAT (N=91)	
	R	P	R	P
TAs (mmHg)	0,148	0,231	0,282	0,020
TAd (mmHg)	-0,070	0,575	-0,012	0,912
C-HDL (mg/dl)	-0,394	0,005	-0,016	0,915
IMC(kg/m ²)	0,195	0,112	0,92	0,444
25(OH)vitaminaD ₃ (ng/ml)	0,009	0,943	0,0037	0,775

Taula 6. Correlació entre l'expressió gènica del receptor de la vitamina D en el teixit subcutani i visceral en les variables: antropomètriques, bioquímiques i mesurament de la tensió arterial.

*TAs = tensió arterial sistòlica; TAd= tensió arterial diastòlica; C-HDL= lipoproteïna d'alta densitat; IMC= índex de massa corporal; 25(OH)vitamina D₃= concentració plasmàtica de vitamina D₃; SAT= teixit adipós subcutani; VAT= teixit adipós visceral.

Es va observar que en VAT, l'expressió gènica del VDR es va correlacionar de manera positiva amb l'expressió gènica de TNF-alfa ($r= 0,264$; $p= 0,045$). Mentre que en SAT, es va mostrar una associació positiva entre l'expressió gènica del VDR i l'expressió gènica de la IL-10 ($r= 0,616$; $p < 0,001$).

***Cohort 4**

La cohort 4 va ser formada per 32 pacients (32 teixits adiposos d'origen visceral i 32 teixits d'origen subcutani), dels quals 5 varen ser homes i 27 varen ser dones. Les variables antropomètriques i metabòliques dels subjectes i les concentracions d'expressions gèniques es varen resumir en la **taula 7**.

En aquesta cohort de pacients amb obesitat mòrbida no s'observà una significació entre la concentració circulant de vitamina D₃ i la xifra de la TAs i TAd.

A l'igual que es va observar en la tercera cohort, l'expressió gènica del VDR va ser significativament major en el teixit adipós visceral ($0,0052 \pm 0,0025$ vers $0,0038 \pm 0,0019$; $p= 0,017$).

En una subcohort de 18 pacients que no diferien del grup, 14 dones i 5 homes, es va observar una associació negativa entre la sensibilitat a la insulina i l'expressió gènica del VDR en VAT($r= -0,49$; $p= 0,037$) (**figura 8**) i en SAT ($r= -0,54$; $p= 0,021$) (**figura 9**).

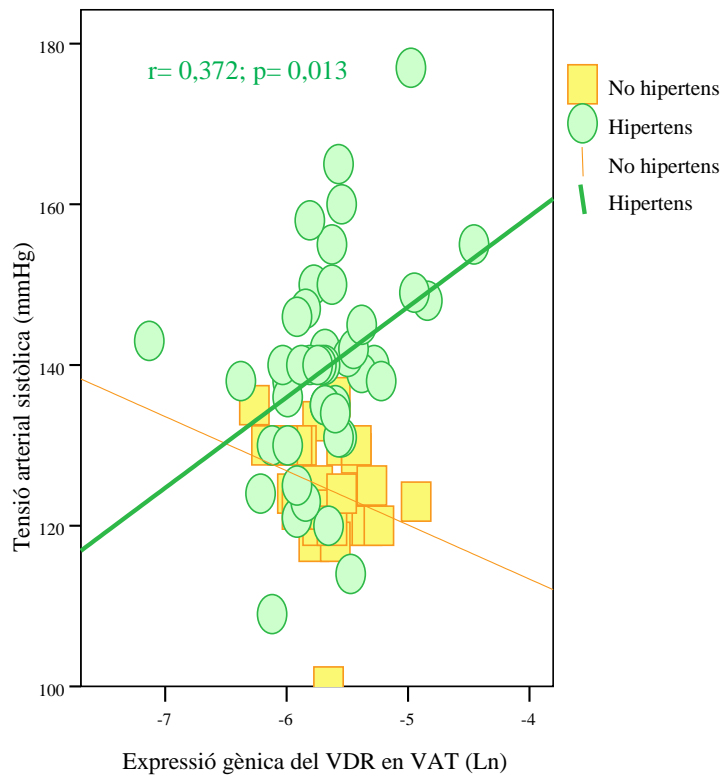


Figura 6. Expressió gènica del receptor de vitamina D (VDR) en el teixit visceral en pacients hipertensos [ús de fàrmacs antihipertensius i/o tensió arterial elevada (TAs \geq 135 mmHg i/o TAd $>$ 85 mmHg)] i normotensos.
*VAT= teixit adipós visceral

	Hipertens	No hipertens	P(t-student)
Edat	44,9± 10,2	44,5± 10,0	
IMC (kg/m ²)	N= 40 46,1 ± 5,1	N= 81 43,1 ± 7,14	0,003
Glucosa (mg/dl)	N=40 103,5 ± 41,2	N=81 105,4 ± 41,2	7,1351
Hb1Ac (%)	N=40 5,6 ± 1,5	N=81 5,4 ± 2,9	0,661
Colesterol total (mg/dl)	N=40 191,1 ± 35,4	N=81 187,7 ± 41,2	0,611
C-LDL (mg/dl)	N=40 118,9 ± 28,0	N=81 114,1 ± 33,0	0,390
C-HDL (mg/dl)	N= 40 52,8 ± 13,3	N= 81 51,6 ± 11,6	0,605
Triglicèrids (mg/dl)	N=40 114,7 ± 54,2	N= 81 108,3 ± 58,1	0,520
Tensió arterial sistòlica (mmHg)	N=40 145,2 ± 13,1	N=81 120,8 ± 9,0	<0,001
Tensió arterial diastòlica (mmHg)	N=40 82,2 ± 13,3	N= 81 71,0 ± 11,32	<0,001
25(OH)vitamin D₃ (ng/ml)	N= 40 21,4 ± 13,1	N= 81 24,7± 15,0	0,170
PTH (pg/ml)	N=40 49,2 ± 27,8	N=81 37,8 ± 14,5	0,73
VDR-VAT (R.U) (Ln)	N=40 -5,9239 ± 0,45927	N=81 -5,6907 ± 0,41437	0,027
VDR-SAT (R.U) (Ln)	N=40 -5,7767 ± 0,41337	N=81 -5,6417 ± 0,41327	0,14

Taula 7.Característiques antropomètriques i bioquímiques del pacients hipertensos. (TAs ≥135 mmHg i/o TAd >85 mmHg) i no hipertensos; IMC= índex de massa corporal; Hb1Ac= hemoglobina glicosilada; C-LDL= lípids de baixa densitat; C-HDL= lípids d'alta densitat; PTH= hormona paratiroidea; 25(OH)vitamina D₃= concentració plasmàtica de vitamina D₃; SAT= teixit adipós subcutani; VAT= teixit adipós visceral; Ln= logaritme

Número de participants	32
Sexe	5 Homes / 27dones
Edat (anys)	47,8 ± 8,6
IMC (kg/m²)	44,2 ± 6,4
Glucosa (mg/dl)	113,8 ± 43,7
Hb1Ac (%)	6,20 ± 1,42
Colesterol total (mg/dl)	180,5 ± 30,4
Colesterol- LDL (mg/dl)	108,0 ± 27,8
Colesterol- HDL (mg/dl)	49,2 ± 13,4
Triglicèrids (mg/dl)	116,0 ± 53,0
TAs (mmHg)	139,3 ± 17,9
TAd (mmHg)	80,3 ± 13,4
25(OH)vitamina D₃ (ng/ml)	11,3 ± 5,7
PTH (pg/ml)	48,2 ± 16,0
VDR-VAT (R.U)	0,0052 ± 0,0025
VDR-SAT (R.U)	0,0038 ± 0,0019

Taula 8. Valors antropomètrics i bioquímics del subjectes estudiats de la cohort 4.

*IMC= índex de massa corporal; Hb1Ac= hemoglobina glicosilada; Colesterol-LDL= lípids de baixa densitat; Colesterol-HDL= lípids d'alta densitat; TAs= tensió arterial sistòlica; TAd= tensió arterial diastòlica; 25(OH)vitaminaD₃= concentració plasmàtica de vitamina D₃; PTH= hormona paratiroidea; VDR-VAT= expressió gènica del receptor de vitamina D en el teixit visceral; VDR-SAT= expressió gènica del receptor de vitamina D en el teixit subcutani.

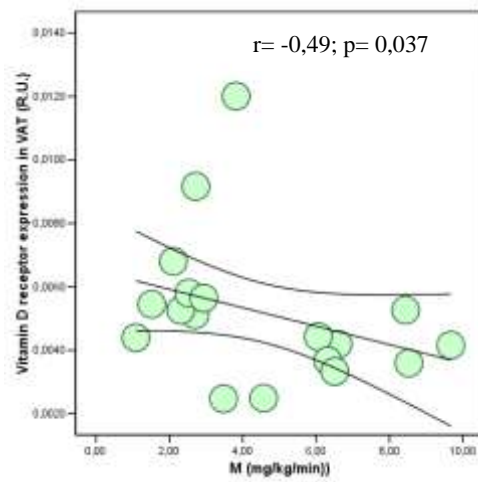


Figura 7. L'Expressió gènica del VDR i la sensibilitat a la insulina en el teixit adipós visceral
 *VAT= teixit adipós viscera M= Clamp, Sensibilitat a la insulina.

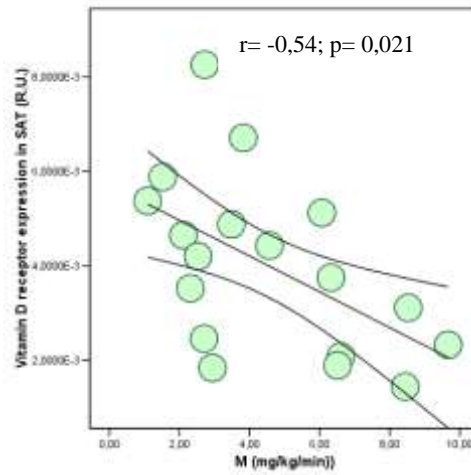


Figura 8. L'Expressió gènica del VDR i la sensibilitat a la insulina en el teixit adipós subcutani.
 *SAT= teixit adipós subcutani, M= Clamp, Sensibilitat a la insulina

8. Discussió

8.1 Primer i segon objectiu

8.1.1 Concentració de vitamina D₃ circulant i tensió arterial

Els resultats de la tesis mostraren una associació inversa entre la concentració circulant de 25(OH)vitamina D₃ i la xifra de la TA sistòlica (TAs) i diastòlica (TAd) en una mostra de 509 subjectes amb un ampli rang de greix corporal, però a l'ajustar amb l'edat i l'IMC no es va trobar una relació independent entre la concentració circulant de vitamina D₃ i la tensió arterial sistòlica o diastòlica; la concentració circulant de vitamina D₃ prèvia a la cirurgia es va associar a la xifra de la TAd als 12 i dels 18 mesos després de cirurgia bariàtrica en una mostra de 169 pacients amb obesitat.

L'associació inversa entre la concentració circulant de vitamina D₃ i la xifra de la TA sistòlica i diastòlica en la tesis confirma els resultats de dos metaanàlisis:

- Burgaz A et al, en el seu metaanàlisis publicat al 2011 inclogué 18 estudis, dels quals quatre eren prospectius i catorze eren transversals. Amb un total de 78.028 participants es mostrà un 27% menys de risc de

desenvolupar HTA amb unes altes concentracions circulants de 25(OH)vitamina D₃ respecte a unes baixes concentracions [OR 0,73 (95% CI 0,63-0,84)]. La recerca de l'associació entre la dosis-resposta relacionada entre la concentració circulant de vitamina D₃ i la HTA es realitzà a partir de 17 estudis. L'OR per la HTA en aquest anàlisis indicà una disminució del 16% per cada increment de concentració circulant de vitamina D₃ de 16 ng/ml, corresponent a 2 SDs en la majoria dels estudis [OR 0,84 (95% CI 0,78-0,90)].

- Pittas AG et al, en el seu metaanàlisis publicat al 2010 mostrà una associació entre la concentració circulant de vitamina D₃ i els risc d'incident d'HTA a partir de 4 cohorts de tres estudis observacionals longitudinals. Els estudis inclogueren 32.181 participants (98% raça caucàsica) amb un seguiment de 7 a 8 anys. Quan es comparà les categories més baixes de la concentració circulant de vitamina D₃ (<15 a 20,4 ng/ml) amb les categories més altes (>75 a 32.4 ng/ml) es trobà una associació estadísticament significativa entre la concentració circulant de vitamina D₃ i l'incident d'HTA de 7 a 8 anys després [RR 1,76(CI 1,27 a 2,44)].

En un recull d'estudis transversals i prospectius, on estan inclosos els articles seleccionats dels dos metaanàlisis, s'observa una associació

significativa entre la concentració circulant de vitamina D₃ i la xifra de la TA en 11 dels 18 estudis transversals i en 4 dels 7 estudis prospectius (**taula 1**). Almirall J et al, en el seu estudi mostrà que la correlació negativa entre la TAs i TAd i la concentració circulant de vitamina D₃ es mantenia després de controlar-ho per possibles factors de confusió com l'obesitat i l'edat en un anàlisi multivariant amb una mitjana de concentració circulant de vitamina D₃ de 16 ng/ml (Almirall J et al, 2010). I, Chan R et al, indicà en un anàlisi de regressió lineal ajustat per l'edat i l'IMC ,entre altres, que la concentració circulant de vitamina D₃ no s'associà a la HTA amb una mitjana de concentració circulant de vitamina D₃ de 31 ng/ml (Chan R et al 2012).

En aquesta tesis, els pacients intervinguts de cirurgia bariàtrica mostraren una associació inversa entre la concentració circulant de vitamina D₃ prèvia a la cirurgia i la xifra de la TAd del 12è i 18è mes després de la mateixa. Carlin AM et al, en el seu estudi amb pacients obesos mòrbids intervinguts de bypass gàstric, mostrà mitjançant un anàlisi de regressió multivariant que l'únic predictor independent de resolució de la HTA després d'un any de la cirurgia fou l'edat més jove i les adequades concentracions de 25(OH)vitamina D₃ (20 ng/ml) (Carlin AM et al, 2008). El resultat d'aquest article és consolidat seguidament per un seu

estudi randomitzat i prospectiu amb 60 dones amb obesitat mòrbida intervingudes de cirurgia bariàtrica. En l'estudi mostrà que les pacients que s'administrà 800 UI de vitamina D diàries juntament amb 50.000 UI de vitamina D setmanalment després del bypass gàstric tingueren una major resolució de la HTA respecte els que no prengueren les 50.000 UI (75% vers 32%, $p=0,029$) (Carlin AM et al, 2009). Tanmateix, Flores L et al, en la seva revisió de 526 pacients intervinguts de cirurgia bariàtrica analitzats en un període de 12 mesos, no observà que l'estat de la vitamina D influeixi en la remissió de la HTA. En el seu anàlisi de regressió multivariant indicà que els determinants predictors de la HTA previs a la intervenció foren: l'edat, el gènere masculí, i la CC ≥ 130 cm; i als 12 mesos foren: el temps transcorregut des del diagnòstic d'HTA ≥ 10 anys i el nombre de fàrmacs antihipertensius administrats (Flores L et al, 2014).

La relació entre la vitamina D₃ circulant i la xifra de la TAd que es mostrà en aquesta cohort de pacients de la tesis també s'observà en la cohort dels subjectes amb un ampli rang d'IMC a l'agrupar les xifres de la TAd en dos grups (TAd <75 mmHg vers TAd ≥ 75 mmHg), on s'observà que els individus amb TAd ≥ 75 mmHg tenien una mitjana de concentració circulant de vitamina D₃ significativament més disminuïda

respecte el grup de subjectes amb TAd <75 mmHg ($p= 0,006$). Curiosament, al classificar la xifra de la TAs en dos grups (TAs ≥ 140 mmHg vers TAs <140 mmHg) no es trobà cap associació significativa entre la xifra de la TAs i la concentració circulant de vitamina D₃ ($p= 0,33$).

8.1.2 Efectes de la suplementació amb vitamina D₃

L'edat del subjecte, la concentració de glucosa en dejú i la suplementació amb vitamina D₃ es van associar de forma independent amb la resolució de la HTA després dels 18 mesos de la cirurgia bariàtrica.

Els beneficis de la suplementació de la vitamina D₃ front la HTA està sent activament investigat. Pittas AG et al, va revisar 10 assajos aleatoritzats amb un total de 37.162 participants que reportaren una suplementació de vitamina D o combinada amb calci a dosis equivalents a 400 a 8.571 UI/dia amb un seguiment de 5 a 52 setmanes en la majoria dels estudis i 7 anys en l'estudi de *Women's Health Initiative*. En el seu anàlisi no es mostrà un efecte de la suplementació de vitamina D significativa tant en la xifra de la TAs [-1,9 mmHg (CI -4,2 a 0,4 mmHg)] com en la TAd [-0,1 mmHg (CI -0,7 a 0,5); $I^2= 23\%$] comparat amb el grup placebo. Tampoc s'observà cap diferència entre la xifra de la

TA sistòlica i diastòlica entre el grup de l'ús de la suplementació de vitamina D respecte als que combinaren la suplementació de vitamina D amb el calci. Però cal senyalar, que en una mostra de la tesis molt reduïda es trobaren unes troballes molt tangencials, que indicaren que els pacients que prengueren suplementació de vitamina D₃ ≥1000 UI tingueren una xifra de la TAd més disminuïda respecte als que prengueren dosis de vitamina D₃ <1000 UI. Aquesta dada confirma un resultat d'aquest metaanàlisi, on mostrà que els subjectes que utilitzaren un mínim de 1000 UI/dia de suplementació de vitamina D mostraren una disminució significativa en la xifra de la TAd (-1,5 mmHg) respecte als que utilitzaren dosis inferiors (0,1 mmHg; p= 0,039). En canvi, no s'indicà una diferència en la TAs entre els estudis amb més altes dosis suplementacions de vitamina D₃ (≥1000 UI/dia) respecte a més baixes dosis (<1000 UI/dia). (Pittas AG et al, 2010).

Witham M et al, en el seu metaanàlisi publicat en l'any 2009 inclogué 11 estudis aleatoris amb una suplementació de vitamina D₃ biològicament activa, vitamina D₂ i D₃ biològicament inactiva i radiació ultra violeta B (UVB). Dels 11 estudis aleatoris, es seleccionà 8 estudis pel metaanàlisi on es mostrà una reducció no significativa en la xifra de la TAs comparant el grup que s'administrà una suplementació de vitamina D

respecte el grup placebo [-3,6 mmHg,(95% CI -8,0 a 0,7), p= 0,1]. Al comparar l'efecte de l'ús de la vitamina D inactiva (vitamina D₂, D₃ i radiació UVB) vers la vitamina D activa (calcitriol/1-alfa calcidiol) sobre el canvi en la xifra de la TA, en un subgrup del metaanàlisi, mostrà que la vitamina D inactiva produeix més disminució de la xifra de la TAs que la vitamina D activa [-6,2 mmHg (95% CI-12,32 a -0,04), vers +0,7 mmHg (95% CI-4,8 a 6,2).

Actualment hi ha diversitat de resultats sobre l'efecte de la suplementació de la vitamina D₃ a l'haver pocs estudis en humans que hagin analitzat la mateixa duració del tractament, dosis i anàlegs de suplementació de vitamina D₃ com es mostra en els assajos clínics aleatoris en la taula 2.

Basant-nos amb les dades recollides de l'estudi i els resultats dels estudis dels metaanàlisis, es podria suggerir que la falta d'associació entre la suplementació de vitamina D₃ i la xifra de la TAd, possiblement fos per unes dosis de suplementació de vitamina D₃ insuficients, ja que els pacients durant el transcurs del 18 mesos des de la cirurgia no tingueren una concentració circulat de vitamina D₃ ≥ 30 ng/ml.

Autor	N	Edat (anys) i sexe	Vit D ₃ circulant (ng/ml)	Relació entre concentració circulant de vitamina D ₃ i HTA/TA
Estudi transversal				
Ford ES et al (2005)	8.421	≥20 H i D	19< [25(OH)D ₃]<39	Associació estadísticament no significativa OR[1,07 IC95%(0,77-1,50)]
Snijder MB et al (2007)	1205	>65 H i D	22	Associació no significativa entre la [25(OH)D ₃] i la TAs (p=0,11) i TAd (p=0,98)
Reis JP et al (2007)	240H 676D	44-96 H i D	≥48	Associació estadísticament no significativa H OR[1,28 IC95%(0,58-2,81), D (0,53-1,93)]
Martins D et al (2007)	15.088	>20 H i D	Q1: <21 Q3: >37	Associació estadísticament significativa de risc entre baixes [25(OH)D ₃] i la HTA OR[1,30IC95%(1,13-1,49)]
Hintzpeter B et al (2008)	1763 H 2.267 D	18-79 H i D	18	Associació estadísticament significativa de protecció entre baixes [25(OH)D ₃] i la HTA. H OR[0,97 IC95%(0,94-0,96)], D OR[0,96 IC95%(0,93-0,99)]
Hyppönen E et al (2008)	6.293	45-47 H i D	27 – 92,4	Associació estadísticament significativa de protecció OR[0,72 IC95%(0,61-0,86)]
Rueda S et al (2008)	298	42,9±10,6 H i D	19,1±8,8	Associació estadísticament no significativa OR[0,47 IC95%(0,98-1,13)]
Wu PW et al (2009)	181 D	43,2±10,6 H i D	27,1±11,9	Associació estadísticament no significativa OR[0,80 IC95%(0,54-1,2)]
Burgaz A et al (2010)	2322	71 H	15	Associació estadísticament no significativa de risc entre la HTA i [25(OH)D ₃] <15ng/ml respecte [25(OH)D ₃] ≥15ng/ml OR[3,3 IC95%(1,0-11,0)]
Almirall J et al (2010)	237	64-72 H i D	17,21±7,57	[25(OH)D ₃] es correlacionen negativament amb la TAs (r=-0,15; p=0,018) TAd (r=-0,15; p=0,019)
Fraser A et al (2010)	3958	NR H i D	24	[25(OH)D ₃] és inversament associada amb la TAs (p=0,04), però no és significativa amb la TAd (p=0,97)
Zhao G et al (2010)	7228	>20 anys H i D	15>[25(OH)D ₃] >30	Associació estadísticament significativa de protecció entre la HTA i pre-hipertensió, i la [25(OH)D ₃] ≥30ng/ml OR[0,82 IC95%(0,73-0,91); 0,80 IC95%(0,69-0,92) respectivament]. En una regressió lineal s'observa una associació inversa entre la [25(OH)D ₃] com a variable continua i la TAd (0,043)
Bhandari SK et al (2011)	2722	≥18 H i D	10<[25(OH)D ₃] < 39	Associació estadísticament significativa de risc entre la HTA i [25(OH)D ₃] <15ng/ml OR [2,7 IC95%(1,4-5,2) ;[25(OH)D ₃] de15a 29 ng/ml OR[2,0 IC95%(1,5-2,6); i [25(OH)D] de 30-39 ng/ml OR [1,3 IC 95% (1,2-1,6)]

Taula 1. Estudis que analitzen concentracions circulants de vitamina D₃ i la xifra de la tensió arterial. *[25(OH)D₃]= concentració circulant de vitamina D₃; HTA= hipertensió arterial; H= home; D= dona; TA= tensió arterial; N= número de participants; NR= no reportat.

Autor	N	Edat (anys) i sexe	S	Vit D ₃ circulant (ng/ml)	Relació entre concentració circulant de vitamina D ₃ i TA
Zagura M et al (2011)	152	51 - 70 anys H i D		10 < [25(OH)D ₃] < 25	[25(OH)D ₃] es correlaciona negativament amb la TAs (r= -0,3; p= 0,01) TAD (r= -0,29; p= 0,01)
Williams DM et al (2011)	5.609	NR H i D		20	[25(OH)D ₃] és inversament associada amb la TAs (p=0,009), però no a la TAD (p=0,13)
Forrest KY et al (2011)	4495	>40 anys H i D		20	[25(OH)D ₃] ≤20ng/ml és associada amb la HTA (p <0,001)
He JL et al (2012)	7.561	≥20 H i D		NR	Diferència entre les altes i baixes [25(OH)D ₃] i la TAs (p<0,01)
Chan R et al (2012)	939	>65 anys H i D		25,5 > [25(OH)D ₃] > 36,4	No associació entre [25(OH)D ₃] i la TAs (p= 0,187) i la TAD (p= 0,120)
Estudi prospectiu observacional					
Forman JP et al (2007)	1811	43 – 82 H i D	4 anys	Q1: <15 Q3: >30	[25(OH)D ₃] < 15ng/ml vers [25(OH)D ₃] >30 ng/ml H: RR [6,13 IC95%(1,0-37,5)] D: RR[2,67 IC95% (0,53-1,93)]
Forman JP et al (2008)	1824 D	32 – 52 H i D	7 anys	6,2 > [25(OH)D ₃] < 89,5	Associació estadísticament significativa de risc entre [25(OH)D] del quartil més baix al més alt i la HTA. OR[1,11 IC 95%(1,11-2,48), p= 0,01]. D: [25(OH)D ₃] <30ng/ml respecte ≥30ng/ml OR[1,47 IC 95%(1,10-1,97)]
Anderson JL et al (2010)	41.504	55 ± 21 H i D	9 anys	Q1: >30 Q2: 16 a 30 Q3: ≤15	Associació estadísticament significativa de risc. Comparant Q1-Q3. OR[1,73 IC95%(1,48-2,02)]
Jorde R et al (2010)	4125	50 – 79 H i D	14 anys	23	Associació inversa entre la [25(OH)D ₃] i la TAs (p= 0,052)
Al Mheid I et al (2011)	91	47 ± 13	6 mesos	30 > [25(OH)D ₃] ≥30	[25(OH)D ₃] ≥30ng/ml vers [25(OH)D ₃] <30 ng/ml tenen xifres de TA més disminuïdes (p= 0,02)
Griffin FC et al (2011)	559	37,7 ± 4,8 D	14 anys	23,5 ± 10	Associació estadísticament no significativa de risc OR[1,9,IC95%(0,76-4,9)]
Margolis KL et al (2012)	2153	50 – 79 D	7 anys	Q1: mitjana 10,2 Q2: mitjana 16,4 Q3: mitjana 22,2 Q4: mitjana 31,1	Associació. no significativa entre la [25(OH)D ₃] en el Q1, Q2 i Q4 i la HTA Associació estadísticament significativa de protecció en el Q4: OR[0,66 IC 95%(0,60-0,96)]

Taula 1. Estudis que analitzen concentracions circulants de vitamina D₃ i la xifra de la tensió arterial*[25(OH)D₃] = concentració circulant de vitamina D₃; HTA= hipertensió arterial; H= home; D= dona; TA= tensió arterial; S= seguiment; N= número de participants; NR= no reportat.

Autor	N	TA (mmHg)	[25(OH)D ₃] circulant basal	suplementació de vitamina D	S	TAs (mmHg)	TAd (mmHg)
Myrup B et al (1992)	74	TAM 102	NR	0,5 µg 1,25(OH) ₂ D ₃	1 any	TAM +1	NR
Pan WH et al (1993)	58	135/76	25 ng/ml	200 UI D ₃ /dia	2 anys	-0,2	+1,3
Scragg R et al (1995)	199	148/82	13 ng/ml	2900 UI D ₃ /dia	5 set	No canvi	No canvi
Krause R et al (1998)	18	148/92	19 ng/ml	Radiació UVB	6 set	-6	-8
Pfeifer M et al (2001)	148	142/84	10 ng/ml	800 UI D ₃ /dia	8 set	-6,5	-0,3
Scheleithoff SS et al, (2006)	93	123/75	15 ng/ml	2000 UI D ₃ /dia + calci	9 m	+1	-1
Major MG et al (2007)	63	<160/95	NR	400 UI D ₃ /dia + calci	15 set	-4,1	No canvi
Sugden JA et al (2008)	34	141/81	15 ng/ml	1800 UI D ₂ /dia	8 set	-13,9	-5,5
Margolis KL et al (2008)	36.282	126/75	NR (quartils)	400 UI D ₃ /dia + calci	7 anys	No canvi	No canvi
Naggal J et al (2009)	71	TAs 124 ± 11 TAd 78 ± 8	36,5±14,6	120.000 UI /setmana	6 set	No canvi	No canvi
Zittermann A et al (2009)	30	TAs 128 ± 15 TAd 86 ± 8	12 ng/ml	83 µg 1,25(OH) ₂ D ₃ /dia	12 m	No canvi	No canvi
Judd SE et al (2010)	9	TAs 130 a 150	10 a 30 ng/ml	200.000 UI D ₃ /setmana; 0,5 µg 1,25(OH) ₂ D ₃ /dia	4 set	Reducció del 9% de la TAs dels subjectes amb calcitriol respecte placebo	NR
Jorde R et al (2010)	438	TAs 124±15 TAd 75,4±9,5	23 ng/ml	40.000 UI/setmana D ₃ ; 20.000 UI/setmana D ₃	1 any	No canvi	No canvi
de Zeeuw D et al (2010)	281	142/73	17 ng/ml	1 µg o 2 µg paricalcitol / dia	24 set	-3 a -9	NR
Thandhani RI et al (2012)	227	TAs 135 TAd 76	NR	0,5 µg 1,25(OH) ₂ D ₃ , 2 vegades/ setmana	48 set	No canvi	No canvi
Liu LJ et al (2012)	25	TA 118/74±16/11 Grup control 117/77±13/10 Grup tmentt	NR	2 µg paricalcitol / dia	48 set	No canvi	No canvi
Bernini G et al (2013)	38	TAs 147,2±3,0/ TAd 93,0±0,9 TAs145,0±6,1/ TAd 90,0± 0,0	14,9±1,4 12,6±1,6	300.000 UI D ₃ 0.25 µg 1,25(OH) ₂ D ₃	Set 7 dies	132,0±1,3 133,0±5,3	79,0±1,4 81,6±4,5

Taula 2. Estudis que analitzen l'efecte de la vitamina D sobre la xifra de la TAs i TAd. *25(OH)D₃= concentració circulant de vitamina D₃; 1,25(OH)₂D₃= concentració circulant de calcitriol; TA= tensió arterial; TAs= tensió arterial sistòlica; TAd= tensió arterial diastòlica; tment= tractament; set= setmanes; m= mesos; N= número de participants; S= seguiment; NR= No reportat

8.2 Tercer objectiu. Estudi de l'expressió del VDR en el teixit adipós

Els resultats d'aquesta part mostraren:

1. Una associació positiva entre l'expressió gènica del VDR en el teixit adipós visceral i la xifra de la TAs.
2. Els subjectes obesos mòrbids presentaren una major expressió gènica del VDR en el teixit adipós visceral vers el subcutani.
3. Una correlació negativa entre l'expressió gènica del VDR i la sensibilitat a la insulina tant en el teixit adipós visceral com en el subcutani.
4. Una correlació positiva entre l'expressió gènica del TNF-alfa i l'expressió gènica del VDR en el teixit adipós visceral, i entre l'expressió gènica del VDR i l'expressió gènica de la IL-10 en el teixit adipós subcutani.

8.2.1 Relació entre expressió gènica del VDR i la tensió arterial

En aquesta tesi s'observà una associació lineal positiva entre l'expressió gènica del VDR en el teixit adipós visceral i la xifra de la TAs ($r= 0,339$; $p= 0,013$). Que es tingui coneixement, cap altre estudi ha avaluat

l'associació entre l'expressió gènica del VDR en el teixit adipós i la xifra de la TA, excepte el nostre recent (Clemente-Postigo M et al, 2015).

Blum M et al, en el seu estudi transversal en 17 homes i dones amb obesitat mòrbida sotmesos a cirurgia bariàtrica observà una correlació positiva entre la concentració de vitamina D₃ en el teixit subcutani i la concentració de vitamina D₃ plasmàtica ($r= 0,69$; $p= 0,003$) mostrant que el teixit adipós és un lloc d'emmagatzematge de vitamina D₃ (Blum M et al, 2008).

S'hipotetitza que els pacients obesos amb baixes concentracions circulants de vitamina D₃ associades amb altes xifres de TA podrien tenir augmentada l'expressió gènica del VDR en el teixit adipós visceral, per contribuir en l'acció de la vitamina D₃ metabolitzada localment (Wamberg L et al, 2013) i depositada en aquest teixit (Blum M et al, 2008). De fet, Yuan W et al, mostrà en el seu estudi amb ratolins que la vitamina D₃ biològicament activa suprimeix l'expressió gènica de renina (Yuan W et al, 2007), i Li YC com una injecció d'aquesta vitamina en ratolins salvatges conduïa a la supressió de renina a través d'un mecanisme que intervé el VDR i independentment del metabolisme del calci (Li YC et al, 2002). També observà que amb absència del VDR (VDR-null) hi havia una elevació de renina i angiotensina II que conduïa a la HTA, hipertròfia cardíaca, i augment de la ingesta d'aigua.

Hi ha evidència que el teixit adipós dels subjectes obesos produeixen angiotensinogen, angiotensina II, i enzims del sistema renina angiotensina, els quals són un dels principals components del SRAA que desenvolupa un paper fonamental en el control de la TA (Vinh Quốc Lu'o'ng K et al, 2013; Massiera F et al, 2001). Massiera F et al, en el seu estudi experimental amb rates mostrà que l'angiotensinogen del teixit adipós és secretat al torrent sanguini. Yassue S et al, informà que l'angiotensinogen és substancialment augmentat en subjectes obesos (Yasue S et al, 2010) i, Sarzani R et al, confirmà que l'expressió de l'angiotensinogen es present en el teixit adipós visceral, sent inclús més expressat que en el ronyó (Sarzani R et al, 2010). Seria interessant explorar la interacció entre l'expressió gènica del VDR i l'angiotensinogen al teixit adipós.

8.2.2 Expressió gènica del VDR i el teixit adipós subcutani i visceral

Hi ha evidència que la vitamina D₃ exerceix la seva acció en el teixit adipós per mitjà del VDR, el qual s'ha descrit la seva presència en el teixit adipós humà (Ochs-Balcom HM et al, 2011; Nimiphong H et al, 2012) a nivell subcutani com visceral (Clement-Postigo M et al, 2015).

En la tesis, els subjectes obesos presentaren una major expressió del VDR en el teixit adipós visceral vers el subcutani. L'expressió gènica del VDR en

el teixit visceral es podria relacionar per una major expressió d'angiotensinogen en el teixit adipós visceral respecte el subcutani (Dusserre E et al, 2000; Kershaw EE et al, 2004).

8.2.3 Relació entre l'expressió gènica del VDR i el metabolisme de la glucosa

En la tesis s'observà una correlació negativa entre l'expressió gènica del VDR i la sensibilitat a la insulina tant el teixit adipós subcutani com en el teixit adipós visceral en una subcohort de 18 pacients amb obesitat mòrbida ($r = -0,54$; $p = 0,021$ / $r = 0,49$; $p = 0,037$). Així com l'expressió gènica del VDR és major en el teixit visceral que en el subcutani, Virtanen et al, en el seu estudi avaluà la resistència a la insulina en el teixit adipós mitjançant una tecnologia de tomografia d'emissió de fluorodoxiglucosa/ positrons, on mostrà que el consum de glucosa en el teixit adipós estimulat per la insulina, fou aproximadament el doble en el teixit adipós visceral ($20,5 \pm 1,4 \mu\text{mol min}^{-1}\text{kg}^{-1}$) que en el teixit adipós subcutani ($9,8 \pm 0,9 \mu\text{mol min}^{-1}\text{kg}^{-1}$, $p < 0,001$) o en el teixit adipós subcutani femoral ($12,3 \pm 0,6 \mu\text{mol min}^{-1}\text{kg}^{-1}$, $p < 0,001$) i aproximadament un 40% més baixa que el múscul esquelètic ($33,1 \pm 2,5 \mu\text{mol min}^{-1}\text{kg}^{-1}$, $p < 0,001$) (Virtanen KA et al, 2005). De fet, els pacients obesos amb resistència sistèmica a la insulina alterada tenen

més contingut de grassa visceral, més proporció d'adipòcits hipertròfics, major infiltració del teixit adipós per macròfags i menor sensibilitat tisular d'insulina pels adipòcits (Klötting N et al, 2010).

Els subjectes de la mostra varen tenir una mitjana de concentració circulant de vitamina D₃ en el rang baix ($11,3 \pm 5,7$ ng/ml). La hipovitaminosis D₃ és un indicador de major risc de presentar resistència a la insulina i síndrome metabòlic (Chiu KC et al, 2004; Boucher BJ, 2012), i de la progressió de pre-diabetis a DM2 (Deleskog A et al, 2012). Nagpal J et al, en el seu estudi aleatoritzat, a doble cec i controlat amb placebo en homes aparentment sans, de mitjana edat i amb obesitat abdominal, mostrà que una suplementació de vitamina D₃ millora la sensibilitat a la insulina (Nagpal J et al, 2009); Belenchia AM et al, en el seu estudi en adolescents obesos aleatoritzat, a doble cec i controlat amb placebo demostrà que la correcció del dèficit de vitamina D millora la sensibilitat a la insulina (Belenchia AM et al, 2013), i Clemente-Postigo M et al, observà una correlació negativa entre les concentracions circulants de vitamina D₃ i l'HOMA-IR, i la concentració circulant de glucosa en dejú (Clemente-Postigo M et al, 2015).

L'expressió gènica de VDR podria incrementar l'acció de la vitamina D₃ en els adipòcits i ser compensadora de la resistència a la insulina (Nagpal J et

al, 2009), corregint la captació de glucosa (Marcotorchino J et al, 2012) i normalitzant la glicèmia basal plasmàtica.

8.2.4 Relació entre expressió gènica del VDR i citocines

En presència de l'obesitat, el teixit adipós segrega quantitats elevades d'adipoquines en el context de resistència a la insulina (Rodríguez-Rodríguez E et al, 2009). Existeix una associació coneguda entre la resistència a la insulina i els marcadors inflamatoris (Fernández-Real JM et al, 2003). La grassa visceral és considerada un important òrgan endocrí involucrat en la complexa interrelació entre l'obesitat i la inflamació (Thorand B et al, 2011).

TNF-alfa

Els pacients obesos de la cohort 3 mostraren una correlació positiva entre l'expressió gènica del TNF-alfa i l'expressió gènica del VDR en el teixit adipós visceral ($p=0,045$).

Referent al TNF-alfa en el teixit adipós, Gao D et al, indicà que l'administració de 10 nM i 100 nM de 1,25(OH)₂vitamina D₃ disminuïa significativament l'expressió de la producció de proteïna quimioatracent de macròfag (MCP-1) induïda pel TNF-alfa, i amb una administració de 10 nM

de 1,25(OH)₂vitamina D₃ reduïa notablement l'alliberació de la MCP-1, la IL-6, i la interleuquina IL-8 (IL-8) pels prediapòcits (Gao D et al, 2013). Bellia A, en un estudi transversal de 147 subjectes obesos mitjançant un anàlisi de regressió multivariant mostrà que la concentració de 25(OH)vitamina D₃ és inversament relacionada amb elevades concentracions de TNF-alfa circulants (Bellia A et al, 2013). Conseqüentment, la sobreexpressió gènica del VDR podria ser compensatòria davant de la sobreexpressió gènica del TNF-alfa en el teixit visceral. Davant aquest fet, l'expressió gènica del VDR podria estar incrementada per poder interactuar amb la 1,25(OH)₂vitamina D₃ i limitar la producció del TNF-alfa amb dues finalitats: En primer lloc, disminuir la producció de l'endotelina i l'angiotensinogen pel TNF-alfa (Kahaleh MB et al, 1997; Kohan DE et al, 2008) per normalitzar les xifres de la TA, i en segon lloc, augmentar l'absorció de glucosa pels adipòcits (Marcotorchino J et al, 2012) conduint a una millora de la sensibilitat de la insulina.

En resum, l'expressió gènica del VDR adipós podria estar incrementat per poder interactuar amb la vitamina D₃ biològicament activa per generar unes respostes davant l'efecte de la TNF-alfa, ja que s'ha demostrat que la vitamina D₃ pot suprimir la síntesis d'aquesta citocina *in vitro* i les

concentracions de TNF-alfa correlacionen inversament amb la vitamina D₃ circulant *in vivo* (Zhu Y et al, 2005; Zittermann A et al,2003).

IL-10

En l'anàlisi d'aquesta mostra de pacients obesos també s'observà una correlació positiva entre l'expressió gènica del VDR i l'expressió gènica de la interleuquina 10 (IL-10) en el teixit adipós subcutani ($p < 0,001$). Es desconeix el motiu perquè aquesta correlació només es trobà en el teixit adipós subcutani i no el visceral. La literatura indica que les concentracions d'IL-10 són més elevades en els subjectes obesos (Bassols J et al, 2010), i Fain JN et al, en el seu estudi amb mostres de teixit adipós de dones intervingudes de cirurgia abdominal, mostrà una correlació positiva entre l'IMC i l'alliberació d'IL-10 en el teixit adipós subcutani però no en el teixit adipós visceral (Fain JN et al, 2004). Es suggereix, que el teixit adipós blanc trobem components antiinflamatoris com la vitamina D₃ i la IL-10 (Juge-Aubry CE et al, 2005). per limitar la resposta inflamatòria, les lesions arterioscleròtiques i la resistència a la insulina entre altres (Blüher M et al, 2005; Bassols J et al, 2010).

8.3 Limitacions

La principal limitació de la tesi es centrà en no haver pogut establir una relació causal entre la TA i la concentració circulant de vitamina D₃ encara que estiguessin associades entre elles. Gran nombre dels subjectes obesos i obesos mòrbids intervinguts de cirurgia bariàtrica eren pluripatològics, amb un extensiu tractament farmacològic per revertir o millorar els seus signes i símptomes clínics, per tant no es pot descartar una possible interacció entre algun fàrmac i la vitamina D₃.

Caldrà explorar en una sèrie més ampla de subjectes no obesos les associacions estudiades.

9. Conclusions

Vitamina D₃ circulant i hipertensió arterial

- 1) Unes concentracions circulants disminuïdes de vitamina D₃ s'associen a unes xifres incrementades de la TA sistòlica i diastòlica. En concret la concentració circulant de vitamina D₃ està disminuïda amb una TAd ≥ 75 mmHg.
- 2) Les concentracions circulants de vitamina D₃ prèvies a la cirurgia bariàtrica es correlacionen negativament amb la xifra de la TAd postquirúrgica dels 12 i 18 mesos.
- 3) La xifra de la TAs s'associa de forma independent amb la suplementació de vitamina D₃ abans de la cirurgia, i als 12 i 18 mesos post cirurgia bariàtrica; amb l'edat, i la concentració de glucosa en dejú.

Expressió gènica del VDR en el teixit adipós

- 4) L'expressió gènica del VDR en el teixit adipós visceral s'associa positivament amb la xifra de la TAs. En canvi no existeixen associacions significatives entre l'expressió gènica de VDR en el teixit adipós subcutani i la TA.
- 5) L'expressió gènica del VDR en el teixit adipós subcutani i visceral s'associa negativament amb la sensibilitat a la insulina.

- 6) Existeix una associació positiva entre l'expressió gènica del VDR i l'expressió gènica del TNF-alfa en el teixit adipós visceral, i l'expressió gènica de la IL-10 en el teixit adipós subcutani.

En conclusió, la concentració circulant de vitamina D₃ s'associa amb la xifra de la TA en subjectes amb un ampli rang d'adipositat. En subjectes amb obesitat mòrbida, la concentració circulant de vitamina D₃ prèvia a la cirurgia (abans de la pèrdua de pes) s'associà amb les xifres de TA diastòlica als 12 i 18 mesos posteriors al procediment quirúrgic i la pèrdua de pes assolida. Una major expressió gènica del VDR al teixit adipós de pacients obesos es relaciona amb diferents elements de la fisiopatologia de la HTA, com la sensibilitat a la insulina i la inflamació crònica de baix grau (TNF-alfa i IL-10).

10. Bibliografia

- Aasheim ET, Hofsø D, Hjelmessaeth J, Birkeland KI, Bøhmer T. Vitaminstatus in morbidly obese patients: a cross-sectional study. *Am J Clin Nutr.* 2008;87:362-9
- Acevedo M. Insulin resistance and hypertension I: mechanisms. *Medwave.* 2006;6:2305.
- Acosta García, E. Obesidad, tejido adiposo y resistencia a la insulina. *Acta bioquím. clín. latinoam.* [revista en Internet] [citado 2015 mayo 19] Disponible en:
<http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S032529572012000200003.
- Adams JS, Hewison M. Update in vitamin D. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010;95:471-478.
- Afzal S, Bojesen SE, Nordestgaard BG. Low 25-hydroxyvitamin D and risk of type 2 diabetes: a prospective cohort study and metaanalysis. *Clin Chem.* 2013;59:381-91.
- Ahima RS, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. *Trends Endocrinol Metab.* 2000;11:327-332.
- Ahima RS, Flier JS. Leptin. *Annu Rev Physiol.* 2000;62:413-37.
- Al Mheid I, Patel R, Murrow J, Morris A, Rahman A, Fike L, et al. Vitamin D status is associated with arterial stiffness and vascular dysfunction in healthy humans. *J Am Coll Cardiol.* 2011;58:186-92.
- Albala C, Pérez F, Santos JL, Yáñez M, Arroyo P, Díaz J, et al. [Relationship between leptin and insulin blood levels in obese and lean Chilean women]. [Article in Spanish]. *Rev Med Chil.* 2000;128:154-61.
- Almirall J, Vaqueiro M, Baré ML, Anton E. Association of low serum 25-hydroxyvitamin D levels and high arterial blood pressure in the elderly. *Nephrol Dial Transplant.* 2010;25:503-9.
- Anderson JL, May HT, Horne BD, Bair TL, Hall NL, Carlquist JF, et al. Intermountain Heart Collaborative (IHC) Study Group Relation of vitamin D deficiency to cardiovascular risk factors, disease status, and incident events in a general healthcare population. *Am J Cardiol.* 2010;106:963-8.
- Aneja A, El-Atat F, McFarlane SI, Sowers JR. Hypertension and obesity. *Recent Prog Horm Res.* 2004;59:169-205.
- Antuna-Puente B, Feve B, Fellahi S, Bastard JP. Adipokines: the missing link between insulin resistance and obesity. *Diabetes Metab.* 2008;34:2-11.
- Aranceta-Bartrina J, Serra-Majem L, Foz-Sala M, Moreno-Esteban B. Prevalence of obesity in Spain. *Med Clin (Barc).* 2005;125:460-6.

- Arita Y, Kihara S, Ouchi N, Takahashi M, Maeda K, Miyagawa J, et al. Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999;257:79-83.
- Aso Y. Plasminogen activator inhibitor (PAI)-1 in vascular inflammation and thrombosis. *Front Biosci.* 2007;12:2957-66.
- Aucott L, Poobalan A, Smith WC, Avenell A, Jung R, Broom J. Effects of weight loss in overweight/obese individuals and long-term hypertension outcomes: a systematic review. *Hypertension.* 2005;45:1035-41.
- Bassols J, Botas P, Moreno-Navarrete JM, Delgado E, Ortega F, Ricart W, et al. Environmental and genetic factors influence the relationship between circulating IL-10 and obesity phenotypes. *Obesity.* 2010;18:6118.
- Bastidas R.E; Castaño J.M; Enríquez D.M; Giraldo J.F; González J; Güependo D.J Beltrán, y col. Relación entre hipertensión arterial y obesidad en pacientes hipertensos atendidos en ASSBASALUD E.S.E. *Arch Med (Manizales)* [revista internet]. 2011 [consulta el 25 agosto 2014];11:150-158. Disponible en:<http://issuu.com/umzl/docs/archivos-de-medicina-vol-11-2/70>.
- Bays H, Rodbard HW, Schorr AB, González-Campoy JM. Adiposopathy: treating pathogenic adipose tissue to reduce cardiovascular disease risk. *Curr Treat Options Cardiovasc Med.* 2007;9:259-71.
- Belenchia AM, Tosh AK, Hillman LS, Peterson CA. Correcting vitamin D insufficiency improves insulin sensitivity in obese adolescents: a randomized controlled trial. *Am J Clin Nutr.* 2013;97:774-81.
- Bernini G, Carrara D, Bacca A, Carli V, Virdis A, Rugani I, et al. Effect of acute and chronic vitamin D administration on systemic renin angiotensin system in essential hypertensives and controls. *J Endocrinol Invest.* 2013;36:216-20.
- Bhandari SK, Pashayan S, Liu IL, Rasgon SA, Kujubu DA, Tom TY, et al. 25-hydroxyvitamin D levels and hypertension rates. *J Clin Hypertens (Greenwich).* 2011;13:170-7.
- Bikle DD. Vitamin D: newly discovered actions require reconsideration of physiologic requirements. *Trends Endocrinol Metab.* 2010;21:375-84.
- Björntorp P. Neuroendocrine factors in obesity. *J Endocrinol.* 1997;155:193-5.
- Blüher M, Fasshauer M, Tönjes A, Kratzsch J, Schön MR, Paschke R. Association of interleukin-6, C-reactive protein, interleukin-10 and adiponectin plasma concentrations with measures of obesity, insulin sensitivity and glucose metabolism. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 2005;113:534-7.

- Blüher M, Kratzsch J, Paschke R. Plasma levels of tumor necrosis factor-alpha, angiotensin II, growth hormone, and IGF-I are not elevated in insulin-resistant obese individuals with impaired glucose tolerance. *Diabetes Care*.2001;24:328-34.
- Blum M, Dolnikowski G, Seyoum E, Harris SS, Booth SL, Peterson J, et al. Vitamin D(3) in fat tissue. *Endocrine*. 2008;33:90-4.
- Boucher BJ. Is vitamin D status relevant to metabolic syndrome?.*Dermatoendocrinol*. 2012;4:212-24.
- Bouillon R, Carmeliet G, Verlinden L, van Etten E, Verstuyf A, Luderer HF, et al. Vitamin D and human health: lessons from vitamin D receptor null mice.*Endocr Rev*. 2008;29:726-76.
- Bouillon R, Okamura WH, Norman AW. Structure-Function-Relationships in the Vitamin-D Endocrine System. *Endocr Rev*. 1995;16:200-257.
- Brasier AR, Li J. Mechanisms for inducible control of angiotensinogen gene transcription. *Hypertension*.1996;27:465-75.
- Brumbaugh PF, Haussler MR. 1 Alpha,25-dihydroxycholecalciferol receptors in intestine.I. Association of 1 alpha,25-dihydroxycholecalciferol with intestinal mucosa chromatin. *J Biol Chem*.1974;249:1251-7.
- Buchwald H, Avidor Y, Braunwald E, Jensen MD, Pories W, Fahrbach K, et al. Bariatric surgery: a systematic review and meta-analysis.*JAMA*. 2004;292:1724-37.
- Burgaz A, Byberg L, Rautiainen S, Orsini N, Håkansson N, Arnlöv J, et al. Confirmed hypertension and plasma 25(OH)D concentrations amongst elderly men. *J Intern Med*. 2011;269:211-8.
- Bustamante C Gladys. Síndrome metabólico. Rev. Act. Clin. Med [revista en Internet]. [citada juny 2013]. Disponible en: http://www.revistasbolivianas.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S230437682012000200008.
- Cankaya S, Demir B, Aksakal SE, Dilbaz B, Demirtas C, Goktolga U. Insulin resistance and its relationship with high molecular weight adiponectin in adolescents with polycystic ovary syndrome and a maternal history of polycystic ovary syndrome.*Fertil Steril*. 2014;102:826-30.
- Canoy D, Boekholdt SM, Wareham N, Luben R, Welch A, Bingham S, et al. Body fat distribution and risk of coronary heart disease in men and women in the European Prospective Investigation Into Cancer and Nutrition in Norfolk cohort: a population-based prospective study. *Circulation*. 2007;116:2933-43.

- Carlin AM, Rao DS, Yager KM, Parikh NJ, Kapke A. Treatment of vitamin D depletion after Roux-en-Y gastric bypass: a randomized prospective clinical trial. *Surg Obes Relat Dis*. 2009;5:444-9.
- Carlin AM, Yager KM, Rao DS. Vitamin D depletion impairs hypertension resolution after Roux-en-Y gastric bypass. *Am J Surg*. 2008;195:349-52.
- Carlin AM, Rao DS, Meslemani AM, Genaw JA, Parikh NJ, Levy S, et al. Prevalence of vitamin D depletion among morbidly obese patients seeking gastric bypass surgery. *Surg Obes Relat Dis*. 2006;2:98-103
- Carrara D, Bernini M, Bacca A, Rugani I, Duranti E, Virdis A, et al. Cholecalciferol administration blunts the systemic renin-angiotensin system in essential hypertensives with hypovitaminosis D. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*. 2014;15:82-7.
- Cassaglia PA, Hermes SM, Aicher SA, Brooks VL. Insulin acts in the arcuate nucleus to increase lumbar sympathetic nerve activity and baroreflex function in rats. *J Physiol*. 2011;589:1643-62.
- Chan R, Chan D, Woo J, Ohlsson C, Mellström D, Kwok T, et al. Serum 25-hydroxyvitamin D and parathyroid hormone levels in relation to blood pressure in a cross-sectional study in older Chinese men. *J Hum Hypertens*. 2012;26:20-7.
- Chen S, Sims GP, Chen XX, Gu YY, Chen S, Lipsky PE. Modulatory effects of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ on human B cell differentiation. *J Immunol*. 2007;179:1634-47.
- Chiprut R, Castellanos-Urdaibay A, Sánchez-Hernández C, Martínez-García D, Elena-Cortez M, Chiprut R, et al. [Obesity in the 21st century. Progress in etiopathogenesis and treatment][Article in Spanish]. *Gac Med Mex*. 2001;137:323-34.
- Chiu KC, Chu A, Go VL, Saad MF. Hypovitaminosis D is associated with insulin resistance and beta cell dysfunction. *Am J Clin Nutr*. 2004;79:820-5.
- Christakos S, Ajibade DV, Dhawan P, Fechner AJ, Mady LJ. Vitamin D: metabolism. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2010;39:243-253.
- Chun RF, Adams JS, Hewison M. Back to the future: a new look at 'old' vitamin D. *J Endocrinol*. 2008;198:261-269.
- Cinti S. The adipose organ. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2005;73:9-15.
- Clemente-Postigo M, Muñoz-Garach A, Serrano M, Garrido-Sánchez L, Bernal-López MR, Fernández-García D. Serum 25-hydroxyvitamin d and adipose tissue vitamin d receptor gene expression: relationship with obesity and type 2 diabetes. *Clin Endocrinol Metab*. 2015;100:591-5.

- Cosanzo P, Salerni H. Hipovitaminosis D: afectaciones no clásicas. *Rev argent endocrinol metab.*46(1) [revista Internet]. 2009 [citad 1 agost 2014];. Disponible en: http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S185130342009000100001&lng=es&nrm=iso>.
- Cottam DR, Mattar SG, Barinas-Mitchell E, Eid G, Kuller L, Kelley DE, et al. The chronic inflammatory hypothesis for the morbidity associated with morbid obesity: implications and effects of weight loss. *Obes Surg.*2004;14:589-600.
- Crawford DA, Jeffery RW, French SA. Television viewing, physical inactivity and obesity. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 1999;23:437-40.
- Cuspidi C, Valerio C, Sala C, Negri F, Esposito A, Masaidi M, et al. Metabolic syndrome and biventricular hypertrophy in essential hypertension. *J Hum Hypertens.* 2009;23:168-75.
- Cuspidi C, Sala C, Zanchetti A. Metabolic syndrome and target organ damage: role of blood pressure. *Expert Rev Cardiovasc Ther.* 2008;6:731-43.
- Cuspidi C, Valerio C, Giudici V, Negri F, Sala C, Zanchetti A, et al. Metabolic syndrome and multiple organ damage in essential hypertension. *Blood Press.* 2008;17:195-203.
- Danon-Hersch N, Marques-Vidal P, Bovet P, Chiolero A, Paccaud F, Pécoud A, et al. Prevalence, awareness, treatment and control of high blood pressure in a Swiss city general population: the CoLaus study. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil.*2009;16:66-72.
- Dawson-Hughes B, Heaney RP, Holick MF, Lips P, Meunier PJ, Vieth R. Estimates of optimal vitamin D status. *Osteoporos Int.*2005;16:713-6.
- De la Sierra A, Gorostidi M, Marín R, Redón J, Banegas JR, Armario P et al. Evaluación y tratamiento de la hipertensión arterial en España. Documento de consenso. *Med Clin (Barc).*2008;131:104-1.
- de Zeeuw D, Agarwal R, Amdahl M, Audhya P, Coyne D, Garimella T, et al. Selective vitamin D receptor activation with paricalcitol for reduction of albuminuria in patients with type 2 diabetes (VITAL study): a randomised controlled trial. *Lancet.*2010;376:1543-51.
- Deleskog A, Hilding A, Brismar K, Hamsten A, Efendic S, Östenson CG. Low serum 25-hydroxyvitamin D level predicts progression to type 2 diabetes in individuals with prediabetes but not with normal glucose tolerance. *Diabetologia.* 2012;55:1668-78.
- DeLuca HF. Overview of general physiologic features and functions of vitamin D. *Am J Clin Nutr.* 2004;80:1689-96.

- Deo R, Katz R, Shlipak MG, Sotoodehnia N, Psaty BM, Sarnak MJ, et al. Vitamin D, parathyroid hormone, and sudden cardiac death: results from the Cardiovascular Health Study. *Hypertension*. 2011;58:1021-8.
- Desjardins F, Balligand JL. Nitric oxide-dependent endothelial function and cardiovascular disease. *Acta Clin Belg*. 2006;61:326-34.
- Deurenberg P, Andreoli A, Borg P, Kukkonen-Harjula K, de Lorenzo A, Van Marken Lichtenbelt WD, et al. The validity of predicted body fat percentage from body mass index and from impedance in samples of five European populations. *Eur J Clin Nutr*. 2001;55:973-9.
- Deurenberg P, Van der Kooy K, Leenen R, Weststrate JA, Seidell JC. Sex and age specific prediction formulas for estimating body composition from bioelectrical impedance: a cross-validation study. *Int J Obes*. 1991;15:17-25.
- Díez JJ, Iglesias P. The role of the novel adipocyte-derived hormone adiponectin in human disease. *Eur J Endocrinol*. 2003 Mar;148:293-300.
- Di Gregorio GB, Yao-Borengasser A, Rasouli N, Varma V, Lu T, Miles LM, et al. Expression of CD68 and macrophage chemoattractant protein-1 genes in human adipose and muscle tissues: association with cytokine expression, insulin resistance, and reduction by pioglitazone. *Diabetes*. 2005;54:2305-13.
- Ding C, Gao D, Wilding J, Trayhurn P, Bing C. Vitamin D signalling in adipose tissue. *Br J Nutr*. 2012;108:1915-23.
- Drøyvold WB, Midthjell K, Nilsen TI, Holmen J. Change in body mass index and its impact on blood pressure: a prospective population study. *Int J Obes*. 2005;29:650-5.
- Durden ED, Huse D, Ben-Joseph R, Chu BC. Economic costs of obesity to self-insured employers. *J Occup Environ Med*. 2008;50:991-7.
- Dusserre E, Moulin P, Vidal H. Differences in mRNA expression of the proteins secreted by the adipocytes in human subcutaneous and visceral adipose tissues. *Biochim Biophys Acta*. 2000;1500:88-96.
- Dusso AS, Brown AJ, Slatopolsky E. Vitamin D. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2005;289:8-28.
- Dusso AS, Brown AJ. Mechanism of vitamin D action and its regulation. *Am J Kidney Dis*. 1998;32:13-24.
- Eknoyan G. Adolphe Quetelet (1796-1874)--The averageman and indices of obesity. *Nephrol Dial Transplant*. 2008;23:47-51.
- Elamin MB, Abu Elnour NO, Elamin KB, Fatourehchi MM, Alkatib AA, Almandoz JP, et al. Vitamin D and cardiovascular outcomes: a systematic review and meta-analysis. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011;96:1931-42.

- Engeli S, Böhrneke J, Gorzelniak K, Janke J, Schling P, Bader M, et al. Weight loss and the renin-angiotensin-aldosterone system. *Hypertension*. 2005;45:356-362.
- Esteve Ràfols M. Adipose tissue: cellheterogeneity and functionaldiversity. [Article in English, Spanish]. *Endocrinol Nutr*. 2014;61:100-12.
- Fain JN, Madan AK, Hiler ML, Cheema P, Bahouth SW. Comparison of the release of adipokines by adiposetissue, adiposetissuematrix, and adipocytes from visceral and subcutaneous abdominal adipose tissues of obese humans. *Endocrinology*. 2004;145:2273-82.
- Felipe F, Bonet ML, Ribot J, Palou A. Modulation of resistin expression by retinoic acid and vitamin A status. *Diabetes*. 2004;53:882-9.
- Feneis JF, Arora RR. Role of vitamin D in bloodpressurehomeostasis. *Am J Ther*. 2010;17:221-9.
- Fernández-Real JM, Broch M, Vendrell J, Ricart W. Insulin resistance, inflammation, and serum fatty acid composition. *Diabetes Care*. 2003;26:1362-8.
- Fernandez-Real JM, Vayreda M, Casamitjana R, Saez M, Ricart W. Body mass index (BMI) and percent fat mass. A BMI > 27.5 kg/m² could be indicative of obesity in the Spanish population. *Med Clin*. 2001;117:681-4.
- Fernández-Real JM, Vendrell J, Ricart W, Broch M, Gutiérrez C, Casamitjana R, et al. Polymorphism of the tumor necrosis factor-alpha receptor 2 gene is associated with obesity, leptin levels, and insulin resistance in young subjects and diet-treated type 2 diabetic patients. *Diabetes Care*. 2000;23:831-7.
- Fernández-Real JM, Broch M, Ricart W, Casamitjana R, Gutierrez C, Vendrell J, et al. Plasma levels of the soluble fraction of tumor necrosis factor receptor 2 and insulin resistance. *Diabetes*. 1998; 47:1757-62.
- Fernández-Real JM, Gutierrez C, Ricart W, Casamitjana R, Fernández-Castañer M, Vendrell J, et al. The TNF-alpha gene Nco I polymorphism influences the relationship among insulin resistance, percent body fat, and increased serum leptin levels. *Diabetes*. 1997;46:1468-72.
- Fernández-Veledo S, Vila-Bedmar R, Nieto-Vazquez I, Lorenzo M. c-Jun N-terminal kinase 1/2 activation by tumor necrosis factor-alpha induces insulin resistance in human visceral but not subcutaneous adipocytes: reversal by liver X receptor agonists. *J Clin Endocrinol Metab*. 2009;94:3583-93.
- Ferrannini E, Buzzigoli G, Bonadonna R, Giorico MA, Oleggini M, Graziadei L, et al. Insulin resistance in essential hypertension. *N Engl J Med*. 1987;317:350-7.

- Ferrario CM. Role of angiotensin II in cardiovascular disease therapeutic implications of more than a century of research. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* 2006;7:3-14.
- Firedman JM, Halaas JL. Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature.* 1998;395:763-70
- Fiscella K, Winters P, Tancredi D, Franks P. Racial disparity in blood pressure: is vitamin D a factor? *J Gen Intern Med.* 2011;26:1105-11.
- Flegal KM, Kit BK, Orpana H, Graubard BI. Association of all-cause mortality with overweight and obesity using standard body mass index categories: a systematic review and meta-analysis. *JAMA.* 2013;309:71-82.
- Flores L, Vidal J, Canivell S, Delgado S, Lacy A, Esmatjes E. Hypertension remission 1 year after bariatric surgery: predictive factors. *Surg Obes Relat Dis.* 2014;10:661-5.
- Fontana L, Eagon JC, Trujillo ME, Scherer PE, Klein S. Visceral fat adipokine secretion is associated with systemic inflammation in obese humans. *Diabetes.* 2007;56:1010-3.
- Ford ES, Ajani UA, McGuire LC, Liu S. Concentrations of serum vitamin D and the metabolic syndrome among U.S. adults. *Diabetes Care.* 2005;28:1228-30.
- Forman JP, Scott JB, Ng K, Drake BF, Suarez EG, Hayden DL, et al. Effect of vitamin D supplementation on blood pressure in blacks. *Hypertension.* 2013;61:779-85.
- Forman JP, Williams JS, Fisher ND. Plasma 25-hydroxyvitamin D and regulation of the renin-angiotensin system in humans. *Hypertension.* 2010;55:1283-8.
- Forman JP, Curhan GC, Taylor EN. Plasma 25-hydroxyvitamin D levels and risk of incident hypertension among young women. *Hypertension.* 2008;52:828-32.
- Forman JP, Giovannucci E, Holmes MD, Bischoff-Ferrari HA, Tworoger SS, Willett WC, et al, Curhan GC. Plasma 25-hydroxyvitamin D levels and risk of incident hypertension. *Hypertension.* 2007;49:1063–1069.
- Forman JP, Bischoff-Ferrari HA, Willett WC, Stampfer MJ, Curhan GC. Vitamin D intake and risk of incident hypertension: results from three large prospective cohort studies. *Hypertension.* 2005; 20:676-82.
- Forrest KY, Stuhldreher WL. Prevalence and correlates of vitamin D deficiency in US adults. *Nutr Res.* 2011;31:48-54.
- Franklin SS, Barboza MG, Pio JR, Wong ND. Blood pressure categories, hypertensive subtypes, and the metabolic syndrome. *J Hypertens.* 2006;24:2009-16.

- Franklin SS, Pio JR, Wond ND, Larson MG, Leip EP, Vasan RS, et al. Predictors of new-onset diastolic and systolic hypertension: the Framingham Heart Study. *Circulation*. 2005;111:1121-7.
- Franklin SS, Jacobs MJ, Wong ND, L'Italien GJ, Lapuerta P. Predominance of isolated systolic hypertension among middle-aged and elderly US hypertensives: analysis based on National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) III. *Hypertension*. 2001;37:869-74.
- Fraser A, Williams D, Lawlor DA. Associations of serum 25-hydroxyvitamin D, parathyroid hormone and calcium with cardiovascular risk factors: analysis of 3 NHANES cycles (2001-2006). *PLoS One*. 2010;5:13882.
- Freundlich M, Quiroz Y, Zhang Z, Zhang Y, Bravo Y, Weisinger JR, et al. Suppression of renin-angiotensin gene expression in the kidney by paricalcitol. *Kidney Int*. 2008;74:1394-402.
- Fried SK, Bunkin DA, Greenberg AS. Omental and subcutaneous adipose tissues of obese subjects release interleukin-6: depot difference and regulation by glucocorticoid. *J Clin Endocrinol Metab*. 1998;83:847-50.
- Friedman J. 20 years of leptin: leptin at 20: an overview. *J Endocrinol*. 2014;223:1-8.
- Furuhashi M, Ura N, Takizawa H, Yoshida D, Moniwa N, Murakami H, et al. Blockade of the renin-angiotensin system increases adiponectin concentrations in patients with essential hypertension. *Hypertension*. 2003;42:76-81.
- Galgani J, Díaz E. Obesidad y ácidos grasos en la etiología de la resistencia insulínica. *Rev Med Chil*. 2000;128:1354-60.
- Gao D, Trayhurn P, Bing C. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 inhibits the cytokine-induced secretion of MCP-1 and reduces monocyte recruitment by human preadipocytes. *Int J Obes (Lond)*. 2013;37:357-65.
- García-Compeán D, Jáquez-Quintana JO, Lavallo-González FJ, González-González JA, Maldonado-Garza HJ, Villarreal-Pérez JZ. Plasma cytokine levels imbalance in cirrhotic patients with impaired glucose tolerance and diabetes mellitus. A prospective study. *Ann Hepatol*. 2014;13:403-10.
- Gelber RP, Gaziano JM, Manson JE, Buring JE, Sesso HD. A prospective study of body mass index and the risk of developing hypertension in men. *Am J Hypertens*. 2007;20:370-7.
- Giovannucci E. Vitamin D status and cancer incidence and mortality. *Adv Exp Med Biol*. 2008; 624:31-42.
- Godínez SA, Marmolejo GE, Marquez E, Siordina J, Baeza R. La grasa visceral y su importancia en obesidad. *Rev Endocrinol Nutr*. 2002;10:121-127.

- Goldner WS, Stoner JA, Thompson J, Taylor K, Larson L, Erickson J, et al. Prevalence of vitamin D insufficiency and deficiency in morbidly obese patients: a comparison with non-obese controls. *Obes Surg.* 2008;18:145-50.
- Green ED, Maffei M, Braden VV, Proenca R, DeSilva U, Zhang Y, et al. The human obese (OB) gene: RNA expression pattern and mapping on the physical, cytogenetic, and genetic maps of chromosome 7. *Genome Res.* 1995;5:5-12.
- Griffin FC, Gadegbeku CA, Sowers MR. Vitamin D and subsequent systolic hypertension among women. *Am J Hypertens.* 2011;24:316-21.
- Gröber U, Spitz J, Reichrath J, Kisters K, Holick MF. Vitamin D: Update: From rickets prophylaxis to general preventive healthcare. *Dermatoendocrinol.* 2013;5:331-347.
- Grupo Colaborativo de la SEEDO. Sociedad Española para el Estudio de la Obesidad (SEEDO). Consenso SEEDO'2000 para la evaluación del sobrepeso y la obesidad y el establecimiento de criterios de intervención terapéutica. *Med Clin.* 2000;115:587-597.
- Guillemette L, Lacroix M, Battista MC, Doyon M, Moreau J, Ménard J, et al. TNF α dynamics during the oral glucose tolerance test vary according to the level of insulin resistance in pregnant women. *J Clin Endocrinol Metab.* 2014;99:1862-9.
- Guillot X, Semerano L, Saidenberg-Kermanac'h N, Falgarone G, Boissier MC. Vitamin D and inflammation. *Joint Bone Spine.* 2010;77:552-7.
- Hajer GR, van Haeften TW, Visseren FL. Adipose tissue dysfunction in obesity, diabetes, and vascular diseases. *Eur Heart J.* 2008;29:2959-71.
- Hajjar I, Kotchen TA. Trends in prevalence, awareness, treatment, and control of hypertension in the United States, 1988-2000. *JAMA.* 2003;290:199-206.
- Halaas JL, Gajiwala KS, Maffei M, Cohen SL, Chait BT, Rabinowitz D, et al. Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. *Science.* 1995;269:543-6.
- Hauner H, Petruschke T, Russ M, Röhrig K, Eckel J. Effects of tumour necrosis factor alpha (TNF alpha) on glucose transport and lipid metabolism of newly-differentiated human fat cells in cell culture. *Diabetologia.* 1995;38:764-71.
- He JL, Scragg RK. Vitamin D, parathyroid hormone, and blood pressure in the National Health and Nutrition Examination Surveys. *Am J Hypertens.* 2011;24:911-7.

- Heaney RP, Horst RL, Cullen DM, Armas LA. Vitamin D3 distribution and status in the body. *J Am Coll Nutr.* Juny de 2009; 28: 252-6.
- Higgins B, Williams B, Williams H, Northedge J, Crimmins J, Lovibond K, et al. Hypertension: The Clinical Management of Primary Hypertension in Adults: Update of Clinical Guidelines 18 and 34 [Internet]. 127.3a ed. UK: National Clinical guideline Center; 2011. [citat 1 maig 2014]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK83274/>
- Hintzpeter B, Mensink GB, Thierfelder W, Müller MJ, Scheidt-Nave C. Vitamin D status and health correlates among German adults. *Eur J Clin Nutr.* 2008;62:1079-89.
- Hitomi H, Kiyomoto H, Nishiyama A. Angiotensin II and oxidative stress. *Curr Opin Cardiol.* 2007;22:311-315.
- Hojgaard B, Olsen KR, Søgaard J, Sørensen TI, Gyrd-Hansen D. Mic costs of abdominal obesity. *Obes Facts.* 2008;1:146-54.
- Holick MF, Binkley NC, Bischoff-Ferrari HA, Gordon CM, Hanley DA, Heaney RP et al. Evaluation, treatment, and prevention of vitamina D deficiency: an Endocrine Society Clinical Practice Guideline. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011; 96:1911-1930.
- Holick MF. Optimal vitamin D status for the prevention and treatment of osteoporosis. *Drugs Aging.* 2007; 24: 1017-1029.
- Holick MF. Vitamin D deficiency. *N Eng J Med.* 2007; 357:266-281.
- Holick MF. Evolution and function of vitamin D. *Recent Results Cancer Res.* 2003;164:3-28.
- Holick MF. The cutaneous photosynthesis of previtamin D3: A unique photoendocrine system. *J Invest Dermatol.* 1981;77:51-8.
- Horiuchi M, Mogi M, Iwai M. Signaling cross talk angiotensin II receptors subtypes and insulin. *Endocr J.* 2006;53:1-5.
- Hotamisligil GS, Arner P, Caro JF, Atkinson RL, Spiegelman BM. Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor- α in human obesity and insulin resistance. *J Clin Invest.* 1995;95:2409-15.
- Hotamisligil GS, Budavari A, Murray D, Spiegelman BM. Reduced tyrosine kinase activity of the insulin receptor in obesity-diabetes. Central role of tumor necrosis factor- α . *J Clin Invest.* 1994;94:1543-9.
- Hotamisligil GS, Murray DL, Choy LN, Spiegelman BM. Tumor necrosis factor α inhibits signaling from the insulin receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994;91:4854-8.

- Hotamisligil GS, Peraldi P, Budavari A, Ellis R, White MF, Spiegelman BM. IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF- α - and obesity-induced insulin resistance. *Science*. 1996;271:665-8.
- Houghton LA, Vieth R. The case against ergocalciferol (vitamin D₂) as a vitamin supplement. *Am J Clin Nutr*. 2006;84:694-7.
- Hukshorn CJ, Lindeman JH, Toet KH, Saris WH, Eilers PH, Westerterp-Plantenga MS, et al. Leptin and the proinflammatory state associated with human obesity. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004;89:1773-8.
- Humphries SE, Luong LA, Ogg MS, Hawe E, Miller GJ. The interleukin-6-174 G/C promoter polymorphism is associated with risk of coronary heart disease and systolic blood pressure in healthy men. *Eur Heart J*. 2001;22:2243-52.
- Hunyady L, Catt KJ. Pleiotropic AT1 receptor signaling pathways mediating physiological and pathogenic actions of angiotensin II. *Mol Endocrinol*. 2006;20:953-70.
- Hyppönen E, Boucher BJ, Berry DJ, Power C. 25-hydroxyvitamin D, IGF-1, and metabolic syndrome at 45 years of age: a cross-sectional study in the 1958 British Birth Cohort. *Diabetes*. 2008;57:298-305.
- Ish-Shalom S, Segal E, Salganik T, Raz B, Bromberg IL, Vieth R. Comparison of daily, weekly, and monthly vitamin D3 in ethanol dosing protocols for two months in elderly hip fracture patients. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008;93:3430-5.
- Ivanov VV, Shakhristova EV, Stepovaya EA, Nosareva OL, Fedorova TS, Ryazantseva NV. Effect of insulin, the glutathione system, and superoxide anion radical in modulation of lipolysis in adipocytes of rats with experimental diabetes. *Biochemistry*. 2015;80:87-96.
- Jaikaran ET, Clark A. Islet amyloid and type 2 diabetes: from molecular misfolding to islet pathophysiology. *Biochim Biophys Acta*. 2001;1537:179-203.
- Jiménez-Cruz A, Castañeda-Gonzalez LM, Bacardí-Gascón M. Poverty is the main environmental factor for obesity in a Mexican-border city. *J Health Care Poor Underserved*. 2013;24:556-65.
- Jocken JW, Langin D, Smit E, Saris WH, Valle C, Hul GB. Adipose triglyceride lipase and hormone-sensitive lipase protein expression is decreased in the obese insulin-resistant state. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007;92:2292-9.
- Jorde R, Figenschau Y, Emaus N, Hutchinson M, Grimnes G. Serum 25-hydroxyvitamin D levels are strongly related to systolic blood pressure but do not predict future hypertension. *Hypertension*. 2010;55:792-8.

- Jorde R, Sneve M, Emaus N, Figenschau Y, Grimnes G. Cross-sectional and longitudinal relation between serum 25-hydroxyvitamin D and body mass index: the Tromsø study. *Eur J Nutr.* 2010;49:401-7.
- Judd SE, Raiser SN, Kumari M, Tangpricha V. 1,25-dihydroxyvitamin D3 reduces systolic blood pressure in hypertensive adults: a pilot feasibility study. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2010;121:445-7.
- Judd SE, Nanes MS, Ziegler TR, Wilson PW, Tangpricha V. Optimal vitamin D status attenuates the age-associated increase in systolic blood pressure in white Americans: results from the third National Health and Nutrition Examination Survey. *Am J Clin Nutr.* 2008;87:136-41.
- Juge-Aubry CE, Somm E, Pernin A, Alizadeh N, Giusti V, Dayer JM, et al. Adipose tissue is a regulated source of interleukin-10. *Cytokine.* 2005;29:270-4.
- Jungert A, Roth HJ, Neuhäuser-Berthold M. Serum 25-hydroxyvitamin D₃ and body composition in an elderly cohort from Germany: a cross-sectional study. *Nutr Metab.* 2012;18:9:42.
- Kaddai V, Jager J, Gonzalez T, Najem-Lendom R, Bonnafous S, Tran A, et al. Involvement of TNF-alpha in abnormal adipocyte and muscle sortilin expression in obese mice and human. *Diabetologia.* 2009; 52: 932-40.
- Kahaleh MB, Fan PS. Effect of cytokines on the production of endothelin by endothelial cells. *Clin Exp Rheumatol.* 1997;15:163-7.
- Kang IS, Pyun WB, Shin J, Kim JH, Kim SG, Shin GJ. Association between central obesity and circadian parameters of blood pressure from the Korean ambulatory blood pressure monitoring registry: Kor-ABP registry. *J Korean Med Sci.* 2013;28:1461-7.
- Kang K, Reilly SM, Karabacak V, Gangl MR, Fitzgerald K, Hatano B, et al. Adipocyte-derived Th2 cytokines and myeloid PPARdelta regulate macrophage polarization and insulin sensitivity. *Cell Metab.* 2008;7:485-95.
- Kannel WB. Elevated systolic blood pressure as a cardiovascular risk factor. *Am J Cardiol.* 2000;85:251-5.
- Kearney PM, Whelton M, Reynolds K, Muntner P, Whelton PK, He J. Global burden of hypertension: analysis of worldwide data. *Lancet.* 2005;365:217-23.
- Kern PA, Ranganathan S, Li C, Wood L, Ranganathan G. Adipose tissue tumor necrosis factor and interleukin-6 expression in human obesity and insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2001;280:745-51.
- Kershaw EE, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004;89:2548-56.

- Kim HW, Park CW, Shin YS, Kim YS, Shin SJ, Choi EJ, et al. Calcitriol regresses cardiac hypertrophy and QT dispersion in secondary hyperparathyroidism on hemodialysis. *Nephron Clin pract.* 2006;102:21-29.
- Klötting N, Fasshauer M, Dietrich A, Kovacs P, Schön MR, Kern MS, et al. Insulin-sensitive obesity. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2010;299:506-15.
- Kohan DE. Endothelin-1 and hypertension: from bench to bedside. *Curr Hypertens Rep.* 2008;10:65-9.
- Kohler HP, Grant PJ. Plasminogen-activator inhibitor type 1 and coronary artery disease. *N Engl J Med.* 2000; 342:1792-1801.
- Kong J, Li YC. Molecular mechanism of 1,25-dihydroxyvitamin D3 inhibition of adipogenesis in 3T3-L1 cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2006;290:916-24.
- Krause R, Bühring M, Hopfenmüller W, Holick MF, Sharma AM. Ultraviolet B and blood pressure. *Lancet.* 1998;352:709-10.
- Kyrou I, Tsigos C. Stress mechanisms and metabolic complications. *Horm Metab Res.* 2007;39:430-8.
- Lee ML, Rosner BA, Weiss ST. Relationship of blood pressure to cardiovascular death: the effects of pulse pressure in the elderly. *Ann Epidemiol.* 1999;9:101-7.
- Li J, Byrne ME, Chang E, Jiang Y, Donkin SS, Buhman KK, et al. 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D hydroxylase in adipocytes. *J steroid Biochem Mol Biol.* 2008; 112:122-6.
- Li YC. Molecular Mechanism of vitamin D in the Cardiovascular System. *J Investig Med.* 2011;59:868-71.
- Li YC. Renoprotective effects of vitamin D analogs. *Kidney Int.* 2010;78:134-9.
- Li YC. Vitamin Dregulation of the renin-angiotensin system. *J Cell Biochem.* 2003;88:327-31.
- Li YC, Kong J, Wei M, Chen ZF, Liu SQ, Cao LP. 1,25-Dihydroxyvitamin D(3) is a negative endocrine regulator of the renin-angiotensin system. *J Clin Invest.* 2002;110:229-38.
- Lima MM, Nuccio JC, Villalobos M, Torres Ch, Balladares N. Sistema Renina Angiotensina Y Riesgo Cardio-Metabólico. *Rev. Venez. Endocrinol Metab* [revista en Internet]. [citat 1 agost 2014]. Disponible en http://www.scielo.org/ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S169031102010000100002

- Lind L, Wengle B, Wide L, Ljunghall S. Reduction of blood pressure during long-term treatment with active vitamin D (alphacalcidol) is dependent on plasma renin activity and calcium status. A double-blind, placebo-controlled study. *Am J Hypertens*. 1989;2:20-5.
- Liu LJ, Lv JC, Shi SF, Chen YQ, Zhang H, Wang HY. Oral calcitriol for reduction of proteinuria in patients with IgA nephropathy: a randomized controlled trial. *Am J Kidney Dis*. 2012;59:67-74.
- Llaneza-Suarez D, Llaneza P, González C, De-La-Fuente P, García-Ochoa C, Garrido P, et al. Assessment of follicular fluid leptin levels and insulin resistance as outcome predictors in women undergoing in vitro fertilization-intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril*. 2014;102:1619-25.
- Lolmède K, Duffaut C, Zakaroff-Girard A, Bouloumié A. Immune cells in adipose tissue: key players in metabolic disorders. *Diabetes Metab*. 2011;37:283-90.
- Lovibond K, Jowett S, Barton P, Caulfield M, Heneghan C, Hobbs R, et al. Cost-effectiveness of options for the diagnosis of high bloodpressure in primary care: a modelling study. *Lancet*. 2011;378:1219-30.
- Maeda N, Shimomura I, Kishida K, Nishizawa H, Matsuda M, Nagaretani H, et al. Diet-induced insulin resistance in mice lacking adiponectin/ACRP30. *Nat Med*. 2002;8:731-7.
- Major GC, Alarie F, Doré J, Phouttama S, Tremblay A. Supplementation with calcium + vitamin D enhances the beneficial effect of weight loss on plasma lipid and lipoprotein concentrations. *Am J Clin Nutr*. 2007;85:54-9.
- Makino T, Noguchi Y, Yoshikawa T, Doi C, Nomura K. Circulating interleukin 6 concentrations and insulin resistance in patients with cancer. *Br J Surg*. 1998;85:1658-62.
- Mallat Z, Besnard S, Duriez M, Deleuze V, Emmanuel F, Bureau MF, et al. Protective role of interleukin-10 in atherosclerosis. *Circ Res*. 1999;85:17-24.
- Mancia G, Fagard R, Narkiewicz K, Redon J, Zanchetti A, Böhm M, et al. 2013 ESH/ESC guidelines for the management of arterial hypertension: the Task Force for the Management of Arterial Hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J*. 2013;34:2159-219.
- Mancia G, Guy de Backer, Dominiczak A, Cifkova R, Fagard R, Germano G, et al. 2007 Guidelines for the Management of Arterial Hypertension: The Task Force for the Management of Arterial Hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC). 2007 Guidelines for the Management of Arterial Hypertension. *J Hypertens*. 2007; 25:1005-118.
- Mantzoros CS. The role of leptin in human obesity and disease: a review of current evidence. *Ann Intern Med*. 1999; 130:671-80.

- Marcano Y, Torcat J, Ayala L, Verdi B, Lairet C, Maldonado M et al. Funciones endocrinas del tejido adiposo. *Rev. Venez. Endocrinol. Metab* [revista Internet]. 2006[citat 1 agost 2014]; 4(1):15-21. Disponible en: http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S169031102006000100003&lng=pt.
- Marcotorchino J, Gouranton E, Romier B, Tourniaire F, Astier J, Malezet C, et al. Vitamin D reduces the inflammatory response and restores glucose uptake in adipocytes. *Mol Nutr Food Res*. 2012;56:1771-82.
- Margolis KL, Martin LW, Ray RM, Kerby TJ, Allison MA, Curb JD, et al. A prospective study of serum 25-hydroxyvitamin D levels, blood pressure, and incident hypertension in postmenopausal women. *Am J Epidemiol*. 2012;175:22-32.
- Margolis KL, Ray RM, Van Horn L, Manson JE, Allison MA, Black HR, et al. Effect of calcium and vitamin D supplementation on blood pressure: the Women's Health Initiative Randomized Trial. *Hypertension*. 2008;52:847-55.
- Marrero MB, Fulton D, Stepp D, Stern DM. Angiotensin II-induced insulin resistance and protein tyrosine phosphatases. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004;24:2009-13.
- Martins D, Wolf M, Pan D, Zadshir A, Tareen N, Thadhani R, et al. Prevalence of cardiovascular risk factors and the serum levels of 25-hydroxyvitamin D in the United States: data from the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Arch Intern Med*. 2007;167:1159-65.
- Massiéra F, Bloch-Faure M, Ceiler D, Murakami K, Fukamizu A, Gasc JM, et al. Adipose angiotensinogen is involved in adipose tissue growth and blood pressure regulation. *FASEB J*. 2001;15:2727-9.
- Mathieu P, Lemieux I, Després JP. Obesity, inflammation, and cardiovascular risk. *Clin Pharmacol Ther*. 2010;87:407-16.
- Maury E, Brichard SM. Adipokine dysregulation, adipose tissue inflammation and metabolic syndrome. *Mol Cell Endocrinol*. 2010;314:1-16.
- Mawer EB, Backhouse J, Holman CA, Lumb GA, Stanbury SW. The distribution and storage of vitamin D and its metabolites in human tissues. *Clin Sci*. 1972;43:413-31.
- McCarty MF, Thomas CA. PTH excess may promote weight gain by impeding catecholamine-induced lipolysis-implications for the impact of calcium, vitamin D, and alcohol on body weight. *Med Hypotheses*. 2003;61:535-42.
- McCormick B, Stone I. Corporate Analytical Team. Economic costs of obesity and the case for government intervention. *Obes Rev*. 2007;8:161-4.
- Medici D, Razzaque MS, Deluca S, Rector TL, Hou B, Kang K, et al. FGF-23-Klotho signaling stimulates proliferation and prevents vitamin D-induced apoptosis. *J Cell Biol*. 2008;182:459-65.

- Meijer K, de Vries M, Al-Lahham S, Bruinenberg M, Weening D, Dijkstra M, et al. Human primary adipocytes exhibit immune cell function: adipocytes prime inflammation independent of macrophages. *PLoS One*.2011;6:17154.
- Melamed ML, Michos ED, Post W, Astor B. 25-hydroxyvitamin D levels and the risk of mortality in the general population. *Arch Intern Med*.2008;168:1629-37.
- Mellon WS, Deluca HF. An equilibrium and kinetic study of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ binding to chicken intestinal cytosol employing high specific activity 1,25-dehydroxy[3H-26,27]vitamin D₃. *Arch Biochem Biophys*. 1979; 197:90-95.
- Miller WC, Niederpruem MG, Wallace JP, Lindeman AK. Dietary fat, sugar, and fiber predict body fat content. *J Am Diet Assoc*. 1994;94:612-5.
- Mirrahimov EM, Kerimkulova AS, Lunegova OS, Mirrahimov AE, Nabiev MP, Neronova KV, et al. The association of leptin with dyslipidemia, arterial hypertension and obesity in Kyrgyz (Central Asian nation) population. *BMC Res Notes*.2014;7:411.
- Mohamed-Ali V, Pinkney JH, Coppack SW. Adipose tissue as an endocrine and paracrine organ. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 1998;22:1145-58.
- Mohamed-Ali V, Goodrick S, Rawesh A, Katz DR, Miles JM, Yudkin JS, et al. Subcutaneous adipose tissue releases interleukin-6, but not tumor necrosis factor-alpha, in vivo. *J Clin Endocrinol Metab*.1997;82:4196-200.
- Mokdad AH, Bowman BA, Ford ES, Vinicor F, Marks JS, Koplan JP. The continuing epidemics of obesity and diabetes in the United States.*JAMA*. 2001;286:1195-200.
- Montague CT, O'Rahilly S. The perils of portliness: causes and consequences of visceral adiposity. *Diabetes*. 2000;49:883-8.
- Moon JR, Hull HR, Tobkin SE, Teramoto M, Karabulut M, Roberts MD, et al. Percent body fat estimations in college women using field and laboratory methods: a three-compartment model approach.*J Int Soc Sports Nutr*. 2007;4:16.
- Moreau KL, Deane KD, Meditz AL, Kohrt WM. Tumor necrosis factor- α inhibition improves endothelial function and decreases arterial stiffness in estrogen-deficient postmenopausal women. *Atherosclerosis*. 2013;230:390-6.
- Moreno-Navarrete JM, Ortega FJ, Rodríguez-Hermosa JI, Sabater M, Pardo G, Ricart W, Fernández-Real JM. OCT1 Expression in adipocytes could contribute to increased metformin action in obese subjects.*Diabetes*. 2011;60:168-76.
- Morris HA, Anderson PH. Autocrine and paracrine actions of vitamin D. *Clin Biochem Rev*. 2010;31:129-138.

- Moschen AR, Molnar C, Geiger S, Graziadei I, Ebenbichler CF, Weiss H, et al. Anti-inflammatory effects of excessive weight loss: potent suppression of adipose interleukin 6 and tumour necrosis factor alpha expression. *Gut*. 2010;59:1259-64.
- Mullie P, Autier P, Relation of vitamin d deficiency to cardiovascular disease. *Arch Intern Med*. 2008;168:1340-9.
- Mutt SJ, Hyppönen E, Saarnio J, Järvelin MR, Herzig KH. Vitamin D and adipose tissue-more than storage. *Front Physiol*. 2014;5:228.
- Myrup B, Jensen GF, McNair P. Cardiovascular risk factors during estrogen-norethindrone and cholecalciferol treatment. *Arch Intern Med*. 1992;152:2265-8.
- Nagase H, Bray GA, York DA. Effects of pyruvate and lactate on food intake in rat strains sensitive and resistant to dietary obesity. *Physiol Behav*. 1996;59:555-60.
- Nagpal J, Pande JN, Bhartia A. A double-blind, randomized, placebo-controlled trial of the short-term effect of vitamin D3 supplementation on insulin sensitivity in apparently healthy, middle-aged, centrally obese men. *Diabet Med*. 2009;26:19-27.
- Narvaez CJ, Simmons KM, Brunton J, Salinero A, Chittur SV, Welsh JE. Induction of STEAP4 correlates with 1,25-dihydroxyvitamin D3 stimulation of adipogenesis in mesenchymal progenitor cells derived from human adipose tissue. *J Cell Physiol*. 2013;228:2024-36.
- Narvaez CJ, Matthews D, Broun E, Chan M, Welsh J. Lean phenotype and resistance to diet-induced obesity in vitamin D receptor knockout mice correlates with induction of uncoupling protein-1 in white adipose tissue. *Endocrinology*. 2009;150:651-61.
- Navarro Valverde C, Quesada Gómez J.M. Deficiencia de vitamina D en España: ¿realidad o mito?. *Rev Osteoporos Metab Miner* [revista en la Internet]. [citado 6 sep 2014 Sep]. Disponible en: http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1889-836X2014000500002.
- Nehus E, Furth S, Warady B, Mitsnefes M. Correlates of leptin in children with chronic kidney disease. *Pediatr*. 2014;165:825-9.
- Neter JE, Stam BE, Kok FJ, Grobbee DE, Geleijnse JM. Hypertension. Influence of weight reduction on blood pressure: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Hypertension*. 2003;42:878-84.
- Nguyen MT, Favelyukis S, Nguyen AK, Reichart D, Scott PA, Jenn A. A subpopulation of macrophages infiltrates hypertrophic adipose tissue and is activated by free fatty acids via Toll-like receptors 2 and 4 and JNK-dependent pathways. *J Biol Chem*. 2007;282:35279-92.

- Nguyen NT, Magno CP, Lane KT, Hinojosa MW, Lane JS. Association of hypertension, diabetes, dyslipidemia, and metabolic syndrome with obesity: findings from the National Health and Nutrition Examination Survey, 1999 to 2004. *J Am Coll Surg.* 2008;207:928-34.
- Nimitphong H, Holick MF, Fried SK, Lee MJ. 25-hydroxyvitamin D₃ and 1,25-dihydroxyvitamin D₃ promote the differentiation of human subcutaneous preadipocytes. *PLoS One.* 2012;7:52171.
- Noahsen P, Andersen S. Ethnicity influences BMI as evaluated from reported serum lipid values in Inuit and non-Inuit: raised upper limit of BMI in Inuit?. *Ethn Dis.* 2013; 23:77-82.
- Noria SF, Grantcharov T. Biologicaleffects of bariatric surgery on obesity-relatedcomorbidities. *Can J Surg.* 2013;56:47-57.
- Norman AW. From vitamin D to hormone D: fundamentals of the vitamin D endocrine system essential for good health. *Am J Clin Nutr.*2008;88:491-499.
- Norman AW. Vitamin D receptor: new assignments for an already busy receptor. *Endocrinology.* 2006;147:5542-8.
- Norman AW. Intestinal calcium absorption: a vitamin D-hormone-mediated adaptive response. *Am J Clin Nutr.* 1990;51:290-300.
- O'Rourke MF, Nichols WW. Aortic diameter, aortic stiffness, and wave reflection increase with age and isolated systolic hypertension. *Hypertension.* 2005;45:652-8.
- Oberleithner H, Riethmüller C, Schillers H, MacGregor GA, de Wardener HE, Hausberg M. Plasma sodium stiffens vascular endothelium and reduces nitric oxide release. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104:16281-6.
- Ochs-Balcom HM, Chennamaneni R, Millen AE, Shields PG, Marian C, Trevisan M, et al. Vitamin D receptor gene polymorfisms are associated with adiposity phenotypes. *Am J Clin Nutr.* 2011;93:5-10.
- Odegaard JI, Ricardo-Gonzalez RR, Red Eagle A, Vats D, Morel CR, Goforth MH, et al. Alternative M2 activation of Kupffer cells by PPARdelta ameliorates obesity-induced insulin resistance. *Cell Metab.*2008;7:496-507.
- Oh SW, Baek SH, An JN, Goo HS, Kim S, Na KY, et al. Small increases in plasma sodium are associated with higher risk of mortality in a healthy population. *J Korean Med Sci.* 2013;28:1034-40.
- O'Hara A, Lim FL, Mazzatti DJ, Trayhurn P. Microarray analysis identifies matrix metalloproteinases (MMPs) as key genes whose expression is up-regulated in human adipocytes by macrophage-conditioned medium. *Pflugers Arch.*2009;458:1103-14.
- Olefsky JM, Glass CK. Macrophages, inflammation, and insulin resistance. *Annu Rev Physiol.*2010;72:219-46.
- Olufadi R, Byrne CD. Clinical and laboratory diagnosis of the metabolic syndrome. *J Clin Pathol.* 2008;61:697-706.

- Organizacion Mundial de la Salud (OMS)/World Health Organisation (WHO). Obesity. Accessed November 30, 2008 from: www.who.int/topics/obesity/en/
- O'Rourke RW. Metabolic thrift and the genetic basis of human obesity. *Ann Surg.* 2014;259:642-8.
- Ortega FJ, Mayas D, Moreno-Navarrete JM, Catalán V, Gómez-Ambrosi J, Esteve E, et al. The gene expression of the main lipogenic enzymes is downregulated in visceral adipose tissue of obese subjects. *Obesity.* 2010;18:13-20.
- Ortega FJ, Moreno-Navarrete JM, Ribas V, Esteve E, Rodriguez-Hermosa JI, Ruiz B, et al. Subcutaneous fat shows higher thyroid hormone receptor-alpha1 gene expression than omental fat. *Obesity.* 2009;17:2134-41.
- Ostchega Y, Hughes JP, Terry A, Fakhouri TH, Miller I. Abdominal obesity, body mass index, and hypertension in US adults: NHANES 2007-2010. *Am J Hypertens.* 2012; 25: 1271-8.
- Pacifico L, Anania C, Osborn JF, Ferraro F, Bonci E, Olivero E, et al. Low 25(OH)D3 levels are associated with total adiposity, metabolic syndrome, and hypertension in Caucasian children and adolescents. *Eur J Endocrinol.* 2011;165:603-11.
- Pajvani UB, Hawkins M, Combs TP, Rajala MW, Doebber T, Berger JP, et al. Complex distribution, not absolute amount of adiponectin, correlates with thiazolidinedione-mediated improvement in insulin sensitivity. *J Biol Chem.* 2004 Mar 26;279:12152-62.
- Pal M, Febbraio MA, Whitham M. From cytokine to myokine: the emerging role of interleukin-6 in metabolic regulation. *Immunol Cell Biol.* 2014;92:331-9.
- Palomer X, Pérez A, Blanco-Vaca F. Adiponectina: un nuevo nexo entre obesidad, resistencia a la insulina y enfermedad cardiovascular. *Med Clin.* 2005;124:388-95.
- Pan WH, Wang CY, Li LA, Kao LS, Yeh SH. No significant effect of calcium and vitamin D supplementation on blood pressure and calcium metabolism in elderly Chinese. *Chin J Physiol.* 1993;36:85-94.
- Parra E. Human pigmentation variation: Evolution, genetic basis, and implications for public health. *Am J Phys Anthropol.* 2007;45:85-105.
- Pelleymounter MA, Cullen MJ, Baker MB, Hecht R, Winters D, Boone T, et al. Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice. *Science.* 1995;269:540-3.
- Penna G, Adorini L. 1 Alpha,25-dihydroxyvitamin D3 inhibits differentiation, maturation, activation, and survival of dendritic cells leading to impaired alloreactive T cell activation. *J Immunol.* 2000;16:2405-11.
- Pérez Fernández R, Kaski JC. Interleuquina- 10 y enfermedad coronaria. *Rev Esp Cardiol.* 2002;55:738-50.

- Pérez Miguelsanz M.^a J, Cabrera Parra W, Varela Moreiras G, Garaulet M. Distribución regional de la grasa corporal: Uso de técnicas de imagen como herramienta de diagnóstico nutricional. *Nutr. Hosp.* [revista en Internet]. [citado 14 Mar 2015] Disponible en: http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0212-16112010000200003
- Pérez MM. El adipocito como órgano endocrino. Implicaciones fisiopatológicas y terapéuticas. *Rev Med.* 2007;15:225-42.
- Perry HM Jr, Miller JP, Baty JD, Carmody SE, Sambhi MP. Pretreatment blood pressure as a predictor of 21-year mortality. *Am J Hypertens.* 2000;13:724-33.
- Peterlik M, Cross HS. Vitamin D and calcium deficits predispose for multiple chronic diseases. *Eur J Clin Invest.* 2005;35:290-304.
- Pfeifer M, Begerow B, Minne HW, Nachtigall D, Hansen C. Effects of a short-term vitamin D(3) and calcium supplementation on blood pressure and parathyroid hormone levels in elderly women. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001;86:1633-7.
- Picot J, Jones J, Colquitt JL, Gospodarevskaya E, Loveman E, Baxter L, et al. The clinical-effectiveness and cost-effectiveness of bariatric (weight loss) surgery for obesity: a systematic review and economic evaluation. *Health Technol Assess.* 2009;13:1-190.
- Pilz S, Tomaschitz A. Role of vitamin D in arterial hypertension. *Expert Rev Cardiovasc Ther.* 2010;8:1599-608.
- Pittas AG, Chung M, Trikalinos T, Mitri J, Brendel M, Patel K, et al. Systematic review: Vitamin D and cardiometabolic outcomes. *Ann Intern Med.* 2010;152:307-14.
- Plum LA, DeLuca HF. Vitamina D, disease and therapeutic opportunities. *Nat Rev Drug Discov.* 2010; 9:941-955.
- Plum LA, DeLuca HF. The Functional Metabolism and Molecular Biology of vitamin D action. *Clin Rev Bone Miner Metab.* 2009;7:20-41.
- Poirier P, Giles TD, Bray GA, Hong Y, Stern JS, Pi-Sunyer FX, et al. Obesity and cardiovascular disease: pathophysiology, evaluation, and effect of weight loss: an update of the 1997 American Heart Association Scientific Statement on Obesity and Heart Disease from the Obesity Committee of the Council on Nutrition, Physical Activity, and Metabolism. *Circulation.* 2006;113:898-918.
- Poppitt SD. Energy density of diets and obesity. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 1995;19:20-6.
- Prentice A, Goldberg GR, Schoenmakers I. Vitamin D across the lifecycle: Physiology and biomarkers. *Am J Clin Nutr.* 2008;88:500-6.
- Querales MI, Cruces ME, Rojas S, Sánchez L. Deficiencia de vitamina D: ¿Factor de riesgo de síndrome metabólico? *Rev Med Chil.* 2010;138:1312-8.

- Rahmouni K, Morgan DA, Morgan GM, Mark AL, Haynes WG. Role of selective leptin resistance in diet-induced obesity hypertension. *Diabetes*. 2005;54:2012-8.
- Raij L. Nitric oxide in the pathogenesis of cardiac disease. *J Clin Hypertens*. 2006;8:30-9.
- Ran J, Hirano T, Fukui T, Saito K, Kageyama H, Okada K, et al. Angiotensin II infusion decreases plasma adiponectin level via its type I receptor in rats: an implication for hypertension-related insulin resistance. *Metabolism*. 2006;55:478-488.
- Reboldi G, Gentile G, Angeli F, Ambrosio G, Mancia G, Verdecchia P. Effects of intensive blood pressure reduction on myocardial infarction and stroke in diabetes: a meta-analysis in 73,913 patients. *J Hypertens*. 2011 Jul;29:1253-69.
- Recasens M, Ricart W, Fernández-Real JM. Obesidad y inflamación. *Rev Med Univ Navarra*. 2004;48:49-54.
- Reddy prevostii S, Bona M, Howard PA, Vacek JL. Paper de la vitamina D en la salut cardiovascular. *Am J Cardiol*. 2010; 106: 798-805.
- Reichel H, Koeffler HP, Norman AW. The role of the vitamin D endocrine system in health and disease. *N Engl J Med*. 1989;320:980-91.
- Reis JP, von Mühlen D, Kritz-Silverstein D, Wingard DL, Barrett-Connor E. Vitamin D, parathyroid hormone levels, and the prevalence of metabolic syndrome in community-dwelling older adults. *Diabetes Care*. 2007;30:1549-55.
- Renkema KY, Alexander RT, Bindels RJ, Hoenderop JG. Calcium and phosphate homeostasis: concerted interplay of new regulators. *Ann med*. 2008;40:82-91.
- Resnick LM, Müller FB, Laragh JH. Calcium-regulating hormones in essential hypertension. Relation to plasma renin activity and sodium metabolism. *Ann Intern Med*. 1986;105:649-54.
- Rhéaume C, Leblanc MÈ, Poirier P. Adiposity assessment: explaining the association between obesity, hypertension and stroke. *Expert Rev Cardiovasc Ther*. 2011;9:1557-64.
- Riachy R, Vandewalle B, Moerman E, Belaich S, Lukowiak B, Gmyr V, et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ protects human pancreatic islets against cytokine-induced apoptosis via down-regulation of the Fas receptor. *Apoptosis*. 2006;11:151-9.
- Rodríguez-Rodríguez E, López-Plaza B, López-Sobaler AM, Ortega RM. Prevalencia de sobrepeso y obesidad en adultos espanyoles. *Nutr Hosp*. 2011;26:355-63.
- Rodríguez-Rodríguez E, Perea JM, López-Sobaler AM, Ortega RM. Obesidad, resistència a la insulina y aumento de los niveles de adipoquinas: importància de la dieta y el ejercicio físico. *Nutr Hosp*. 2009;24:415-21.
- Rostand SG. Ultraviolet light may contribute to geographic and racial blood pressure differences. *Hypertension*. 1997;30:150-6.

- Rueda S, Fernández-Fernández C, Romero F, Martínez de Osaba J, Vidal J. Vitamin D, PTH, and the metabolic syndrome in severely obese subjects. *Obes Surg*. 2008;18:151-4.
- Sabanayagam C, Shankar A, Somasundaram S. Serum vitamin D level and prehypertension among subjects free of hypertension. *Kidney Blood Press Res*. 2012;35:106-13.
- Salas-Salvadó J, Bullo M, Perez-Heras A, Ros E. Dietary fibre, nuts and cardiovascular diseases. *Br J Nutr*. 2006;96:46-51.
- Salas-Salvadó J, Rubio MA, Barbany M, Moreno B; Grupo Colaborativo de la SEEDO. [SEEDO 2007 Consensus for the evaluation of overweight and obesity and the establishment of therapeutic intervention criteria]. *Med Clin*. 2007;128:184-96.
- Samaras K, Viardot A, Lee PN, Jenkins A, Botelho NK, Bakopoulos A, et al. Reduced arterial stiffness after weight loss in obese type 2 diabetes and impaired glucose tolerance: the role of immune cell activation and insulin resistance. *Diab Vasc Dis Res*. 2013;10:40-8.
- Sarzani R, Bordicchia M, Marcucci P, Minardi D, Muzzonigro G, Dessì-Fulgheri P, et al. Angiotensinogen promoter variants influence gene expression in human kidney and visceral adipose tissue. *J Hum Hypertens*. 2010;24:213-9.
- Scarborough P, Bhatnagar P, Wickramasinghe KK, Allender S, Foster C, Rayner M. The economic burden of ill health due to diet, physical inactivity, smoking, alcohol and obesity in the UK: an update to 2006-07 NHS costs. *J Public Health*. 2011;33:527-35.
- Scherer PE, Williams S, Fogliano M, Baldini G, Lodish HF. A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes. *J Biol Chem*. 1995;270:26746-9.
- Schleithoff SS, Zittermann A, Tenderich G, Berthold HK, Stehle P, Koerfer R. Vitamin D supplementation improves cytokine profiles in patients with congestive heart failure: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *Am J Clin Nutr*. 2006;83:754-759.
- Schmitz KJ, Skinner HG, Bautista LE, Fingerlin et, Langefeld CD, Hicks PJ, et al. Association of 25-hydroxyvitamin D with blood pressure in predominantly 25-hydroxyvitamin D deficient Hispanic and African Americans. *Am J Hypertens*. 2009;22: 867-70.
- Scragg RK, Camargo CA Jr, Simpson RU. Relation of serum 25-hydroxyvitamin D to heart rate and cardiac work (from the National Health and Nutrition Examination Surveys). *Am J Cardiol*. 2010;105:122-8.
- Scragg R, Sowers M, Bell C. Serum 25-hydroxyvitamin D, ethnicity, and blood pressure in the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Am J Hypertens*. 2007;20:713-9.
- Scragg R, Khaw KT, Murphy S. Effect of winter oral vitamin D3 supplementation on cardiovascular risk factors in elderly adults. *Eur J Clin Nutr*. 1995;49:640-6.

- Senn JJ. Toll-like receptor-2 is essential for the development of palmitate-induced insulin resistance in myotubes. *J Biol Chem.* 2006; 281:26865-75.
- Sethi JK, Vidal-Puig AJ. Adipose tissue function and plasticity orchestrate nutritional adaptation. *J Lipid Res.* 2007;48:1253-1262.
- sheim ET, Björkman S, Søvik TT, Engström M, Hanvold SE, Mala T, et al. Vitamin status after bariatric surgery: a randomized study of gastric bypass and duodenal switch. *Am J Clin Nutr.* 2009;90:15-22.
- Shen W, Wang ZM, Punyanita M, Lai J, Sinav A, Oral JG, et al. Adipose tissue Quantification by imaging methods: a proposed classificatio. *Obesity Res.* 2003;11:5-16.
- Simpson RU, Hershey SH, Nibbelink KA. Characterization of heartsize and bloodpressure in the vitaminDreceptorknockoutmouse. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2007;103:521-4.
- Simpson RU, Thomas GA, Arnold AJ. Identification of 1,25-dihydroxyvitaminD3receptors and activities in muscle. *J Biol Chem.* 1985;260:8882-91.
- Sjöström CD, Peltonen M, Sjöström L. Blood pressure and pulse pressure during long-term weight loss in the obese: the Swedish Obese Subjects (SOS) Intervention Study. *Obes Res.* 2001;9:188-95.
- Sjöström CD, Peltonen M, Wedel H, Sjöström L. Differentiated long-term effects of intentional weight loss on diabetes and hypertension. *Hypertension.* 2000;36:20-5.
- Snehalatha C, Mukesh B, Simon M, Viswanathan V, Haffner SM, Ramachandran A. Plasma adiponectin is an independent predictor of type 2 diabetes in Asian indians. *Diabetes Care.* 2003;26:3226-9.
- Sneve M, Figenschau Y, Jorde R. Supplementation with cholecalciferol does not result in weight reduction in overweight and obese subjects. *Eur J Endocrinol.* 2008;159:675-84.
- Snijder MB, Lips P, Seidell JC, Visser M, Deeg DJ, Dekker JM, et al. Vitamin D status and parathyroid hormone levels in relation to blood pressure: a population-based study in older men and women. *J Intern Med.* 2007;261:558-65.
- Soubassi LP, Chiras TC, Papadakis ED, Poulos GD, Chaniotis DI, Tsapakidis IP, et al. Incidence and risk factors of coronary heart disease in elderly patients on chronic hemodialysis. *Int Urol Nephrol.* 2006;38:795-800.
- Souberbielle JC, Body JJ, Lappe JM, Plebani M, Shoenfeld Y, Wang TJ, et al. Vitamin D and musculoskeletal Health, cardiovascular disease, autoimmunity and cancer: Recommendations for clinical practice. *Autoimmun Rev.* 2010;9:709-715.
- Spranger J, Kroke A, Möhlig M, Bergmann MM, Ristow M, Boeing H, et al. Adiponectin and protection against type 2 diabetes mellitus. *Lancet.* 2003;361:226-8.

- St-Arnaud R. The direct role of vitamin D on bone homeostasis. *Arch biochem biophys.* 2008;40:82-91.
- Stefan N, Vozarova B, Funahashi T, Matsuzawa Y, Weyer C, Lindsay RS, et al. Plasma adiponectin concentration is associated with skeletal muscle insulin receptor tyrosine phosphorylation, and low plasma concentration precedes a decrease in whole-body insulin sensitivity in humans. *Diabetes.* 2002;51:1884-8.
- Subramanian V, Rothenberg A, Gomez C, Cohen AW, Garcia A, Bhattacharyya S, et al. Perilipin A mediates the reversible binding of CGI-58 to lipid droplets in 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem.* 2004;279:42062-71.
- Sugden JA, Davies JJ, Witham MD, Morris AD, Struthers AD. Vitamin D improves endothelial function in patients with Type 2 diabetes mellitus and low vitamin D levels. *Diabet Med.* 2008;25:320-5.
- Tamez H, Kalim S, Thadhani RI. Does vitamin D modulate blood pressure?. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2013;22:204-9.
- Tamez H, Thadhani RI. Vitamin D and hypertension: an update and review. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2012;21:492-9.
- Tarcin O, Yavuz DG, Ozben B, Telli A, Ogunc AV, Yuksel M, et al. Effect of vitamin D deficiency and replacement on endothelial function in asymptomatic subjects. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009;94:4023-30.
- Tateya S, Kim F, Tamori Y. Recent advances in obesity-induced inflammation and insulin resistance. *Front Endocrinol.* 2013;4:93.
- Tchoukalova YD, Sarr MG, Jensen MD. Measuring committed preadipocytes in human adipose tissue from severely obese patients by using adipocyte fatty acid binding protein. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2004;287:1132-40.
- Thadhani R, Appelbaum E, Pritchett Y, Chang Y, Wenger J, Tamez H, et al. Vitamin D therapy and cardiac structure and function in patients with chronic kidney disease: the PRIMO randomized controlled trial. *JAMA.* 2012;307:674-84.
- Thomas MK, Demay MB. Vitamin D deficiency and disorders of vitamin D metabolism. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2000; 29:611-627.
- Thorand B, Zierer A, Huth C, Linseisen J, Meisinger C, Roden M, et al. Effect of serum 25-hydroxyvitamin D on risk for type 2 diabetes may be partially mediated by subclinical inflammation: results from the MONICA/KORA Augsburg study. *Diabetes Care.* 2011;34:2320-2.
- Tinsley JH, South S, Chiasson VL, Mitchell BM. Interleukin-10 reduces inflammation, endothelial dysfunction, and blood pressure in hypertensive pregnant rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2010; 298:713-9.

- Tziakas DN, Chalikias GK, Kaski JC, Kekes A, Hatzinikolaou EI, Stakos DA, et al. Inflammatory and anti-inflammatory variable clusters and risk prediction in acute coronary syndrome patients: a factor analysis approach. *Atherosclerosis*. 2007;193:196-203.
- USDHHS: US Department of Health and Human Services [internet]. Atlanta: USDHHS; [1996: citat 3 maig 2014], Physical activity and health: A report of the Surgeon General. [aprox. 300 pàgines]. Disponible en: <https://www.google.com/search?q=Physical+activity+and+health%3A+A+report+of+the+Surgeon+General.+Atlanta%3A+U.S.+Department+of+Health+and+Human+Services,+Centers+for+Disease+Control+and+Prevention.>
- Vaidya A, Sun B, Forman JP, Hopkins PN, Brown NJ, Kolatkar NS, et al. The FokI vitamin D receptor gene polymorphism is associated with plasma renin activity in Caucasians. *Clin Endocrinol*. 2011;74:783-90.
- Valenzuela A. Tejido adiposo: algo más que grasa corporal. *Rev Esp Obes*. 2004;2:327-350.
- van Ballegooijen AJ, Snijder MB, Visser M, van den Hurk K, Kamp O, Dekker JM, et al. Vitamin D in relation to myocardial structure and function after eight years of follow-up: the Hoorn study. *Ann Nutr Metab*. 2012;60:69-77.
- Van Harmelen V, Lönnqvist F, Thörne A, Wennlund A, Large V, Reynisdóttir S. Noradrenaline-induced lipolysis in isolated mesenteric, omental and subcutaneous adipocytes from obese subjects. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 1997;21:972-9.
- Vanhoutte PM. How We Learned to Say NO. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2009;29:1156-60.
- Vendrell J, Broch M, Fernandez-Real JM, Gutiérrez C, Simón I, Megia A, et al. Tumour necrosis factor receptors (TNFRs) in Type 2 diabetes. Analysis of soluble plasma fractions and genetic variations of TNFR2 gene in a case-control study. *Diabet Med*. 2005;22:387-92.
- Verhave G, Siebert CE. Role of vitamin D in cardiovascular disease. *Neth J Med*. 2010;68:113-118.
- Villar F, Banegas JR, Gil E, Aranda P. For a greater control of hypertension in Spain. *Rev Esp Salud Publica*. 1996;70:131-8.
- Vimalaswaran KS, Cavadino A, Berry DJ; LifeLines Cohort Study investigators, Jorde R, Dieffenbach AK, et al. Association of vitamin D status with arterial blood pressure and hypertension risk: a mendelian randomisation study. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2014;2:719-29.
- vinh quốc Lu'o'ng K, Nguyễn LT. The beneficial role of vitamin D in obesity: possible genetic and cell signaling mechanisms. *Nutr J*. 2013;12:89.

- Virtanen KA, Iozzo P, Hällsten K, Huupponen R, Parkkola R, Janatuinen T, et al. Increased fat mass compensates for insulin resistance in abdominal obesity and type 2 diabetes: a positron-emitting tomography study. *Diabetes*. 2005;54:2720-6.
- Vlasova M, Purhonen AK, Jarvelin MR, Rodilla E, Pascual J, Herzig KH. Role of adipokines in obesity-associated hypertension. *Acta Physiol*. 2010;200:107-27.
- Von Hurst PR, Stonehouse W, Coad J. Vitamin D supplementation reduces insulin resistance in South Asian women living in New Zealand who are insulin resistant and vitamin D deficient—a randomised, placebo-controlled trial. *Br J Nutr*. 2010;103:549-55.
- Von Lengerke T, Krauth C. Economic costs of adult obesity: a review of recent European studies with a focus on subgroup-specific costs. *Maturitas*. 2011;69:220-9.
- Vozarova B, Weyer C, Hanson K, Tataranni PA, Bogardus C, Pratley RE. Circulating interleukin-6 in relation to adiposity, insulin action, and insulin secretion. *Obes Res*. 2001;9:414-7.
- Wamberg L, Christiansen T, Paulsen SK, Fisker S, Rask P, Rejnmark L, et al. Expression of vitamin D-metabolizing enzymes in human adipose tissue: the effect of obesity and diet-induced weight loss. *Int J Obes*. 2013;37:651-7.
- Wang T, Pencina M, Booth S, Jacques P, Inelsson E, Lanier K, et al. Vitamin D deficiency and risk of cardiovascular disease. *Circulation*. 2008;117:503-11.
- Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW Jr. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest*. 2003;112:1796-808.
- White WB. The systolic blood pressure versus pulse pressure controversy. *Am J Cardiol*. 2001;87:1278-81.
- Wilborn C, Beckham J, Campbell B, Harvey T, Galbreath M, La Bounty P, et al. Obesity: prevalence, theories, medical consequences, management, and research directions. *J Int Soc Sports Nutr*. 2005;2:4-31.
- Williams B. Hypertension in the young: preventing the evolution of disease versus prevention of clinical events. *J Am Coll Cardiol*. 2007;50:840-2.
- Williams DM, Fraser A, Lawlor DA. Associations of vitamin D, parathyroid hormone and calcium with cardiovascular risk factors in US adolescents. *Heart*. 2011;97:315-20.
- Wilson PW, D'Agostino RB, Sullivan L, Parise H, Kannel WB. Overweight and obesity as determinants of cardiovascular risk: the Framingham experience. *Arch Intern Med*. 2002;162:1867-1872.

- Witham MD, Nadir MA, Struthers AD. Effect of vitamin D on blood pressure: a systematic review and meta-analysis. *J Hypertens*. 2009;27:1948-54.
- Wolf-Maier K, Cooper RS, Banegas JR, Giampaoli S, Hense HW, Joffres M, et al. Hypertension prevalence and blood pressure levels in 6 European countries, Canada, and the United States. *JAMA*.2003;289:2363-9.
- Wong MS, Delansorne R, Man RY, Vanhoutte PM. Vitamin D derivatives acutely reduce endothelium-dependent contractions in the aorta of the spontaneously hypertensive rat. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*.2008;295:289-96.
- Wood RJ. VitaminD and adipogenesis: newmolecularsights. *Nutr Rev*. 2008;66:40-6.
- World Health Organization. Obesity: preventing and managing the global epidemic.[internet].894. 2000.Geneva: Report of WHO consultation; 2000[1999; consultat 1 maig 2014].Disponibile en:http://www.who.int/nutrition/publications/obesity/WHO_TRS_894/en/
- Wortzman J, Matsuoka LY, Chen TC, Lu Z, Holick MF. Decreased bioavailability of vitamin D in obesity. *Am J Clin Nutr*.2000;72:690-3.
- Wu PW, Rhew EY, Dyer AR, Dunlop DD, Langman CB, Price H, et al. 25-hydroxyvitamin D and cardiovascular risk factors in women with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*.2009;61:1387-95.
- Wu-Wong JR, Nakane M, Ma J, Ruan X, Kroeger PE. Effects of Vitamin Danalogs on gene expression profiling in human coronary artery smooth muscle cells. *Atherosclerosis*. 2006;186:20-8.
- Wu-Wong JR, Nakane M, Ma J, Ruan X, Kroeger PE. Elevated phosphorus modulates vitamin D receptor-mediated gene expression in human vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Renal Physiol*.2007;293:1592-1604.
- Xiang W, Kong J, Chen S, Cao LP, Qiao G, Zheng W, et al. Cardiac hypertrophy in vitamin D receptor knockout mice: role of the systemic and cardiac renin-angiotensin systems. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2005;288:125-32.
- Xu D, Liu H, Komai-Koma M. Direct and indirect role of Toll-like receptors in T cell mediated immunity. *Cell Mol Immunol*. 2004;1:239-46.
- Xue B, Greenberg AG, Kraemer FB, Zemel MB. Mechanism of intracellular calcium ([Ca²⁺]) inhibition of lipolysis in human adipocytes.*FASEB J*. 2001;15:2527-9.
- Xydakis AM, Case CC, Jones PH, Hoogeveen RC, Liu MY, Smith EO, et al. Adiponectin, inflammation, and the expression of the metabolic syndrome in obese individuals: the impact of rapid weight loss through caloric restriction. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004;89:2697-703.

- Yang L, Ma J, Zhang X, Fan Y, Wang L. Protective role of the vitamin D receptor. *Cell Immunol.* 2012;279:160-6.
- Yasue S, Masuzaki H, Okada S, Ishii T, Kozuka C, Tanaka T, et al. Adipose tissue-specific regulation of angiotensinogen in obese humans and mice: impact of nutritional status and adipocyte hypertrophy. *Am J Hypertens.* 2010;23:425-31.
- Yu Li, Lin Ding, Waseem Hassan, Daoud Abdelkader, Jing Shang. Adipokines and Hepatic Insulin Resistance. *Diabetes Res.* 2013;2013:170532.
- Yuan W, Pan W, Kong J, Zheng W, Szeto FL, Wong KE, et al. 1,25-dihydroxyvitamin D₃ suppresses renin gene transcription by blocking the activity of the cyclic AMP response element in the renin gene promoter. *J Biol Chem.* 2007; 282:29821–29830.
- Zagura M, Serg M, Kampus P, Zilmer M, Eha J, Unt E, et al. Aortic stiffness and vitamin D are independent markers of aortic calcification in patients with peripheral arterial disease and in healthy subjects. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2011;42:689-95.
- Zhang J, Patel MB, Griffiths R, Mao A, Song YS, Karlovich NS, et al. Tumor necrosis factor- α produced in the kidney contributes to angiotensin II-dependent hypertension. *Hypertension.* 2014;64:1275-81.
- Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature.* 1994;372:425-32.
- Zhao G, Ford ES, Li C, Kris-Etherton PM, Etherton TD, Balluz LS. Independent associations of serum concentrations of 25-hydroxyvitamin D and parathyroid hormone with blood pressure among US adults. *J Hypertens.* 2010;28:1821-8.
- Zhou C, Lu F, Cao K, Xu D, Goltzman D, Miao D. Calcium-independent and 1,25(OH)₂D₃-dependent regulation of the renin-angiotensin system in 1 α -hydroxylase knockout mice. *Kidney Int.* 2008;74:170-9.
- Zhu Y, Mahon B, Froicu M, Cantorna M. Calcium and 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ target the TNF- α pathway to suppress experimental inflammatory bowel disease. *Eur J Immunol.* 2005; 35:217-224.
- Zinman B, Hanley AJ, Harris SB, Kwan J, Fantus IG. Circulating tumor necrosis factor- α concentrations in a native Canadian population with high rates of type 2 diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999;84:272-8.

- Zittermann A, Frisch S, Berthold HK, Götting C, Kuhn J, Kleesiek K, et al. Vitamin D supplementation enhances the beneficial effects of weight loss on cardiovascular disease risk markers. *Am J Clin Nutr.* 2009;89:1321-7.
- Zittermann A, Koerfer R. Protective and toxic effects of vitamin D on vascular calcification: clinical implications. *Mol Aspects Med.* 2008;29:423-32.
- Zittermann A. Vitamin D and disease prevention with special reference to cardiovascular disease. *Prog Biophys Mol Biol.* 2006;92:39-48.
- Zittermann A, Schleithoff ss, Koerfer R. putting cardiovascular disease and vitamin D insufficiency into perspective. *Br J Nutr.* 2005;94:483-492.
- Zittermann A, Dembinski J, Stehle P. Low vitamin D status is associated with low cord blood levels of the immunosuppressive cytokine interleukin- 10. *Pediatr Allergy Immunol.* 2004; 15:242-246.
- Zittermann A. Vitamin D in preventive medicine: are we ignoring the evidence? *Br J Nutr.* 2003; 89:552-572.
- Zulet MA, Puchau B, Navarro C, Martí A, Martínez JA. Biomarcadores del estado inflamatorio: nexo de unión con la obesidad y complicaciones asociadas. *Nutr Hosp.* 2007;22:511-27.

11. Annex: Article

Serum 25-Hydroxyvitamin D and Adipose Tissue Vitamin D Receptor Gene Expression: Relationship With Obesity and Type 2 Diabetes

Mercedes Clemente-Postigo, Araceli Muñoz-Garach, Marta Serrano, Lourdes Garrido-Sánchez, M. Rosa Bernal-López, Diego Fernández-García, Inmaculada Moreno-Santos, Nuria Garriga, Daniel Castellano-Castillo, Antonio Camargo, Jose M. Fernández-Real, Fernando Cardona, Francisco J. Tinahones, and Manuel Macías-González

Unidad de Gestión Clínica Endocrinología y Nutrición (M.C.-P., A.M.-G., L.G.-S., D.F.-G., D.C.-C., F.C., F.I.T., M.M.-G.), Instituto de Investigación Biomédica de Málaga (IBIMA), Complejo Hospitalario de Málaga (Virgen de la Victoria)/Universidad de Málaga, 29010 Málaga, Spain; Centro de Investigación Biomédica En Red, Pathophysiology of Obesity and Nutrition (CB06/03) (M.C.-P., L.G.-S., D.F.-G., A.C., J.M.F.-R., F.C., F.I.T., M.M.-G.), 28029, Madrid, Spain; Service of Diabetes, Endocrinology, and Nutrition (M.S., N.G., J.M.F.-R.), Institut d'Investigació Biomèdica de Girona, 17007 Girona, Spain; Biomedical Research Laboratory (M.R.B.-L.), Internal Medicine Department, IBIMA, Regional University Hospital of Málaga (Carlos Haya Hospital), Universidad de Málaga, 29010 Málaga, Spain; Área del Corazón del Complejo Hospitalario de Málaga (Virgen de la Victoria) (J.M.-S.), IBIMA/Universidad de Málaga, Red de Investigación Cardiovascular, 29010 Málaga, Spain; and Lipid and Atherosclerosis Research Unit (IMBAC) (A.C.), Reina Sofía University Hospital, University of Córdoba, 14004 Córdoba, Spain

Context: The relationship between 25-hydroxyvitamin D [25(OH)D] and obesity and type 2 diabetes is not completely understood. Vitamin D receptor (VDR) expression in adipose tissue (AT) is related to obesity and might be regulated by 1,25-dihydroxyvitamin D₃ [1,25(OH)₂D₃].

Objective: To analyze serum 25(OH)D and VDR gene expression in AT according to body mass index (BMI) and glycemic status and the effect of 1,25(OH)₂D₃ on AT according to BMI.

Design and Patients: Two cohorts were studied: 1) 118 subjects classified according to their BMI (lean, overweight, obese, or morbidly obese [MO]) and their glycemic status (normoglycemic [NG] and prediabetic and diabetic [P&D]); and 2) 30 obese subjects (BMI > 30 kg/m²) classified as NG and P&D. VDR gene expression was analyzed during preadipocyte differentiation and in vitro stimulation with 1,25(OH)₂D₃ of AT explants from donors with different BMI values.

Setting: University Hospital.

Main Outcome Measures: Serum 25(OH)D, parathyroid hormone (PTH), and AT VDR gene expression.

Results: 25(OH)D levels were lower in P&D than NG subjects, significantly so in the lean and MO groups ($P < .05$). 25(OH)D levels correlated negatively with homeostasis model of assessment for insulin resistance (HOMA-IR) ($r = -0.208$; $P = .032$) and glucose ($r = -0.295$; $P = .001$), but not with BMI. VDR gene expression was higher in MO than in the other BMI groups ($P < .05$). 1,25(OH)₂D₃ increased VDR gene expression in AT from obese patients ($P < .05$) but not from lean subjects.

Conclusions: 25(OH)D levels are diminished in P&D compared to NG subjects, independently of BMI, and are closely related to glucose metabolism variables, suggesting that vitamin D deficiency is associated more with carbohydrate metabolism than with obesity. Moreover, AT has a different response to 1,25(OH)₂D₃ depending on the degree of obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 100: E0000–E0000, 2015

ISSN Print 0021-972X; ISSN Online 1945-7197

Printed in U.S.A.

Copyright © 2015 by the Endocrine Society

Received July 24, 2014; Accepted January 7, 2015

Abbreviations: AT, adipose tissue; BMI, body mass index; HOMA-IR, homeostasis model of assessment for insulin resistance; NG, normoglycemic; 1,25(OH)₂D₃, 1,25-dihydroxyvitamin D₃; 25(OH)D, 25-hydroxyvitamin D; P&D, prediabetic and diabetic; SAT, sc AT; SAT, visceral AT; VD, vitamin D; VDR, VD receptor

doi: 10.1210/jc.2014-3016

J Clin Endocrinol Metab | jcem.endojournals.org | E1

Vitamin D (VD) deficiency has been associated with obesity and diabetes (1–4), although some have found no clear relationship between these variables (5, 6). Most studies that have so far examined 25-hydroxyvitamin D [25(OH)D] levels according to body mass index (BMI) failed to consider whether the participants were or were not diabetic (3, 7), which is noteworthy because most obese patients have altered glucose metabolism (8). This should be considered to discern whether VD deficiency is related to obesity by itself or whether it is a consequence of altered carbohydrate metabolism.

25(OH)D is hydroxylated to produce 1,25-dihydroxyvitamin D₃ [1,25(OH)₂D₃], the biologically active form (9). 1,25(OH)₂D₃ interacts with the VD receptor (VDR), which acts as a transcription factor (9).

VDR is highly expressed in preadipocytes from obese subjects (10), but it is unknown whether its expression during adipogenesis differs depending on BMI, and although total adipose tissue (AT) gene expression has been related to obesity (10, 11), its possible relation with diabetes has not yet been studied. The relationship between VDR in AT and obesity might be mediated by VD, since previous studies suggested a regulation of VDR gene expression and adipogenesis by 1,25(OH)₂D₃ (11, 12) but did not analyze whether the effect of 1,25(OH)₂D₃ on AT differs depending on the degree of obesity.

Thus, the aim of this study was to analyze serum 25(OH)D and VDR gene expression in AT according to a range of BMI values and the glycemic status of the participants. Additionally, we studied the effect of 1,25(OH)₂D₃ on AT explants according to the degree of obesity.

Subjects and Methods

Subjects

Cohort 1 comprised 118 participants recruited at the University Hospital (Malaga, Spain) classified according to their BMI as morbidly obese (MO; BMI > 40 kg/m²), obese (BMI = 30–40 kg/m²), overweight (BMI = 25–30 kg/m²) or lean (BMI < 25 kg/m²) (13) and to their glycemic profile as normoglycemic (NG) (fasting glucose levels < 100 mg/dL, and homeostasis model of assessment for insulin resistance [HOMA-IR; described below] < 3.5) or prediabetic and diabetic (P&D; fasting glucose levels > 100 mg/dL) (14). Cohort 2 comprised 30 obese patients (BMI = 33.5–58.4 kg/m²) recruited at the Hospital Universitari Dr Josep Trueta (Girona, Spain). The participants gave written informed consent, and the study was reviewed and approved by the Ethics and Research Committee (see Supplemental Data).

Before surgery and after an overnight fast, blood samples were obtained, and serum and plasma were separated for biochemical determinations. Visceral AT (VAT), used to study gene expression and perform AT explant cultures, was obtained during bariatric surgery in the MO patients or during hiatal hernia

surgery or cholecystectomy in the lean, overweight, or obese subjects from cohort 1. For cohort 2, VAT and sc AT (SAT), used to study gene expression, were obtained during elective surgical procedures (cholecystectomy, abdominal hernia, or gastric bypass). The AT samples were washed in physiological saline, immediately frozen in liquid nitrogen, and maintained at –80°C until analysis.

Laboratory measurements

Plasma glucose, cholesterol, triglycerides, and high-density lipoprotein cholesterol were measured in a Dimension autoanalyzer (Dade Behring Inc) by enzymatic methods (Randox Laboratories Ltd); insulin was measured by RIA (BioSource International); and leptin and adiponectin were measured by ELISA (DSL and DRG Diagnostics, respectively). Low-density lipoprotein cholesterol was calculated from the Friedewald equation (13), and the HOMA-IR was calculated as follows: HOMA-IR = fasting insulin (μIU/mL) × fasting glucose (mmol/L)/22.5 (8, 13). Serum 25(OH)D and PTH levels from cohort 1 were determined by ELISA (Immunodiagnostik and DRG Diagnostics, respectively) and for cohort 2 by electrochemoluminescence immunoassay (Modular Analytics E170; Roche Diagnostics).

Human preadipocyte differentiation

Visceral and sc human preadipocytes isolated from both obese (BMI > 30 kg/m²) and lean (BMI < 25 kg/m²) donors were purchased from Zen-Bio Inc and cultured (–40 000 cells/cm²) as described in the Supplemental Data.

AT explant culture

VAT from three NG healthy MO donors and three NG healthy lean donors was cut into 5- to 10-mg pieces and treated as described in detail in the Supplemental Data.

RNA isolation and real-time quantitative PCR

Total RNA isolation and cDNA synthesis were performed as described (13). Gene expression was assessed by real-time PCR using an Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR (see Supplemental Data).

Statistical analysis

The sample size was determined with the ENE 3.0 statistical program (GlaxoSmithKline). To detect differences for 25(OH)D concentrations of 25%, at least 12 subjects per group were required for the study (α risk = 0.05; power = 0.8). Comparisons between the study groups were made with ANOVA and Duncan's post hoc tests in cohort 1. Student's *t* test was used for comparisons between the groups in cohort 2 and for in vitro analysis. Pearson's (cohort 1) or Spearman's (cohort 2) correlation analyses were used to study variable associations. Statistical significance was set at *P* < .05. Analyses were performed with SPSS 15.0 (SPSS Iberica).

Results

The biochemical and anthropometric characteristics of each study group are summarized in Table 1.

Serum 25(OH)D levels were significantly higher in NG than in P&D in lean and MO subjects. Significant differ-

TABLE 1. Anthropometric and biochemical variables of the study groups (Cohort 1)

	Lean		Overweight		Obese		Morbidly Obese		P
	NO	P&D	NO	P&D	NO	P&D	NO	P&D	
n	15	18	18	13	13	16	12	15	
Age, y	47.00 ± 14.02	53.89 ± 15.89	47.89 ± 12.68	58.08 ± 10.99	52.08 ± 16.97	53.00 ± 13.06	49.25 ± 8.52	49.43 ± 10.50	.230
% Male	60/60	62.5/57.5	55.6/44.4	53.8/46.2	46.2/53.8	57.5/42.5	50/50	45/60	.817
Female									
BMI, kg/m ²	22.79 ± 1.24 ^a	24.28 ± 1.08 ^a	27.81 ± 1.25 ^b	27.77 ± 1.20 ^b	33.57 ± 3.24 ^c	33.47 ± 5.09 ^c	50.60 ± 6.71 ^d	51.06 ± 5.51 ^d	<.001
Waist, cm	83.97 ± 7.87 ^a	90.13 ± 7.00 ^b	92.06 ± 4.94 ^b	95.09 ± 8.12 ^c	108.23 ± 9.50 ^d	107.25 ± 12.70 ^d	132.70 ± 14.20 ^e	144.36 ± 18.0 ^e	<.001
Insulin, μmol/L	56.95 ± 16.32 ^a	65.70 ± 15.81 ^b	81.30 ± 23.77 ^c	77.78 ± 38.30 ^b	99.02 ± 21.52 ^c	104.61 ± 44.50 ^c	85.15 ± 37.22 ^b	200.15 ± 121.4 ^d	<.001
Glucose, mmol/L	4.86 ± 0.51 ^a	6.00 ± 0.32 ^b	4.93 ± 0.88 ^a	6.88 ± 1.04 ^b	5.01 ± 0.29 ^a	7.54 ± 1.08 ^b	4.92 ± 0.25 ^a	6.87 ± 1.07 ^b	<.001
HOMA-IR	1.46 ± 0.48 ^a	3.08 ± 2.07 ^b	1.62 ± 0.91 ^a	3.51 ± 2.20 ^b	1.90 ± 0.70 ^b	4.76 ± 2.01 ^c	2.66 ± 1.05 ^b	6.48 ± 4.57 ^d	<.001
Cholesterol, mmol/L	5.18 ± 0.98 ^{abc}	5.55 ± 0.77 ^{bc}	5.00 ± 0.74 ^{bc}	5.81 ± 0.88 ^c	5.19 ± 1.04 ^{abc}	5.82 ± 1.24 ^c	4.65 ± 0.85 ^a	4.85 ± 0.79 ^{bc}	.308
Triglycerides, mmol/L	1.08 ± 0.46 ^a	1.70 ± 1.04 ^b	1.16 ± 0.48 ^a	1.57 ± 0.55 ^{ab}	1.36 ± 0.49 ^{ab}	1.75 ± 0.74 ^b	1.38 ± 0.63 ^{ab}	1.61 ± 0.51 ^{ab}	.016
HDL-C, mmol/L	1.42 ± 0.42	1.28 ± 0.31	1.38 ± 0.30	1.33 ± 0.41	1.42 ± 0.18	1.39 ± 0.41	1.18 ± 0.28	1.16 ± 0.29	.276
LDL-C, mmol/L	3.25 ± 0.88 ^{ab}	3.49 ± 0.72 ^b	3.12 ± 0.69 ^{ab}	3.65 ± 0.89 ^b	3.18 ± 0.90 ^{ab}	3.60 ± 0.82 ^b	2.69 ± 0.91 ^a	2.89 ± 0.98 ^{ab}	.042
SBP, mm Hg	124.00 ± 14.28	128.72 ± 19.25	126.22 ± 14.63	133.38 ± 22.88	127.46 ± 21.86	141.58 ± 22.21	129.00 ± 21.59	137.50 ± 17.8	.197
DBP, mm Hg	73.87 ± 8.46	76.63 ± 11.68	75.22 ± 12.60	80.85 ± 15.49	79.62 ± 13.34	81.81 ± 13.63	80.33 ± 10.76	80.92 ± 8.89	.211
Leptin, ng/ml	8.86 ± 12.50 ^a	16.52 ± 18.11 ^b	12.32 ± 14.89 ^a	14.36 ± 6.55 ^b	12.36 ± 7.15 ^a	27.31 ± 8.89 ^b	69.87 ± 27.84 ^c	70.64 ± 31.70 ^c	<.001
Adiponectin, ng/ml	19.32 ± 15.55 ^a	10.59 ± 8.24 ^b	11.06 ± 3.62 ^b	8.55 ± 4.72 ^b	7.97 ± 2.79 ^b	10.78 ± 6.62 ^b	9.84 ± 3.54 ^b	6.55 ± 2.24 ^b	.007

Abbreviations: HDL-C, high-density lipoprotein cholesterol; LDL-C, low-density lipoprotein cholesterol; SBP, systolic blood pressure; DBP, diastolic blood pressure. Values are presented as means ± SD unless otherwise stated.

^{a,b,c,d} Groups not sharing any superscript letters are significantly different ($P < .05$) according to ANOVA (Duncan's post hoc test).

ences between BMI were only found when the glycemic status was also different (Figure 1A). There were no significant differences in PTH levels between NG and P&D subjects with the same BMI. However, PTH levels were significantly lower in NG overweight subjects than in P&D obese patients (Figure 1B).

Serum 25(OH)D levels correlated negatively with both plasma glucose levels ($r = -0.295$; $P = .001$) and HOMA-IR ($r = -0.200$; $P = .032$). A trend was found toward a negative correlation between serum 25(OH)D and PTH levels ($r = -0.135$; $P = .144$). There were no significant correlations with BMI.

The VAT VDR gene expression was significantly higher in both NG and P&D MO subjects compared to the other groups with a lower BMI and tended to be higher in P&D than in NG subjects in the overweight and obese groups (Figure 1C). VAT VDR gene expression correlated positively with BMI ($r = 0.343$; $P = .000$) and leptin ($r = 0.331$; $P = .004$) and tended to correlate with insulin levels ($r = 0.146$; $P = .145$).

Multiple linear regression analysis showed that glucose level was the only variable independently associated with serum 25(OH)D levels. The only variable that remained significantly associated with VAT VDR gene expression was BMI (Supplemental Table 1).

These results were confirmed with an independent cohort, as described in Supplemental Table 2. In this second cohort, VAT and SAT PPAR γ mRNA levels were inversely associated with VDR mRNA levels ($r = -0.493$, $P = .007$; and $r = -0.430$, $P = .014$, respectively). VAT

Cideofat-specific protein 27 (FSP27) correlated negatively with VDR mRNA levels ($r = -0.463$; $P = .015$).

In vitro experiments showed that VDR gene expression was significantly higher in visceral preadipocytes from obese subjects than from lean subjects during the differentiation process, but no differences were found during sc preadipocyte differentiation (Figure 1, E and F).

Moreover, 1,25(OH) $_2$ D $_3$ stimulation significantly increased VDR gene expression in AT explants from MO subjects. However, no effect on VDR mRNA levels was observed in AT explants from lean donors (Figure 1D).

Discussion

The results of this study show that low 25(OH)D levels are associated with diabetes, independently of BMI. We also found that AT VDR gene expression is higher in MO patients compared to subjects with a lower BMI and explored for the first time its relationship with glucose metabolism. Our results also suggest that AT from MO subjects has a different response to 1,25(OH) $_2$ D $_3$ compared to AT from lean subjects.

Recent years have seen increasing studies concerning the association between 25(OH)D levels and both obesity and diabetes, with these conditions found to lead to lower 25(OH)D levels (2–4). Nevertheless, the results are sometimes contradictory, and the role of VD in the development of obesity is still not completely understood (1, 5). A number of confounding factors, such as ethnicity, nutritional

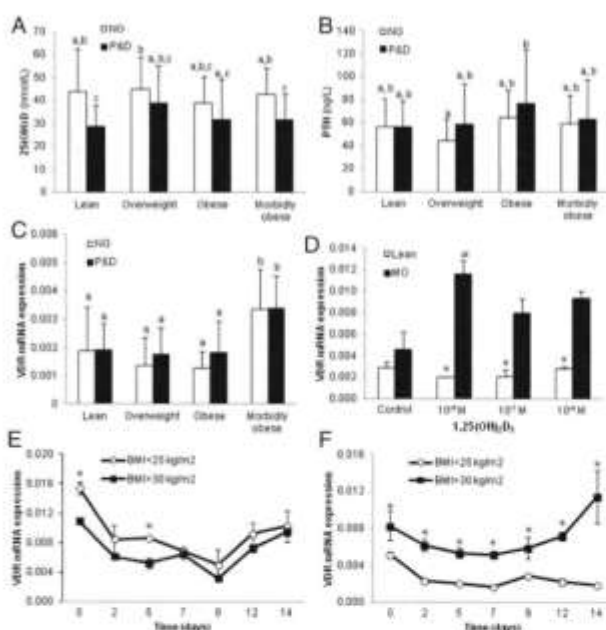


Figure 1. A and B, Serum 25(OH)D (A) and PTH (B) levels in the study groups from cohort 1. C, VDR mRNA expression in the study groups from cohort 1. D, VDR mRNA expression in visceral AT explants cultured with a range of 1,25(OH)₂D₃ concentrations or vehicle (control) from morbidly obese subjects (MO) and lean subjects. E and F, VDR mRNA expression in sc (E) and visceral (F) human preadipocytes during adipogenic differentiation. Values are expressed as means \pm SD. White circles, BMI < 25 kg/m²; black squares, BMI > 30 kg/m². Groups not sharing any subscript letters are significantly different ($P < .05$) according to ANOVA (Duncan's post hoc test). *, $P < .05$ between different BMI. #, $P < .05$ compared to control.

status, or sun exposure, have been proposed to be involved in these inconsistent results (15). Furthermore, obesity is a major risk factor for diabetes (16). In fact, obesity together with VD insufficiency interact synergistically to influence the risk of insulin resistance (2, 16, 17). Despite this, most studies dealing with BMI and VD compared healthy lean subjects with obese patients displaying an impaired glucose metabolism or omitted data about this aspect, which makes it difficult to discern whether the low 25(OH)D levels were really associated with obesity or rather with glycemic status (3, 7).

The major strength of this study is that it is the first cross-sectional study to compare serum 25(OH)D simultaneously between a wide range of BMI values taking into account whether the subjects were P&D or NG. This approach, avoiding the interaction between obesity and diabetes, showed that the P&D patients had the lowest serum 25(OH)D levels, and most interestingly, there were no differences between BMI groups with the same glyce-

mic status. Our results agree with previous studies finding an independent association between VD deficiency and diabetes or prediabetes after adjusting for BMI (4, 16, 18). This association is supported by biological evidence showing that VD influences pancreatic β -cell function directly by binding to VDR or indirectly by the role of VD in regulating extracellular calcium level and calcium flux through the β -cell (4).

Recent studies have shown a role for AT in VD metabolism. Reciprocally, VD has multiple effects on the physiology of adipocytes and AT (9–11, 19). Animal studies support this hypothesis that VD and VDR might be involved in the development of obesity and diabetes (19).

Human studies have shown higher mRNA VDR levels and lower mRNA levels of genes involved in lipid processing in the AT of MO patients compared to lean subjects (11, 13). In agreement with these studies, we found an inverse relationship between VDR and genes involved in AT physiology. Furthermore, we studied for the first time whether VDR gene expression in AT was related to diabetes, finding a trend toward a higher VDR gene expression in P&D compared to NG subjects.

In vitro studies have shown that 1,25(OH)₂D₃ influences VDR gene expression and adipogenesis (14). However, no previous studies have analyzed whether the effect of 1,25(OH)₂D₃ on AT differs according to BMI. Our results showed that VDR gene expression during adipogenesis is higher in visceral preadipocytes from obese than from lean subjects, which agrees with the higher VDR mRNA levels in AT from MO subjects. Furthermore, we demonstrated that the previously described up-regulation of AT VDR expression induced by 1,25(OH)₂D₃ (10, 12) only happens in obesity, with no response in lean subjects. This agrees with an intervention study with nonobese healthy subjects showing that VD supplementation had no effect on the expression of genes related to fat metabolism in AT (20).

Further studies will be necessary to understand the physiological consequences of the different AT response to 1,25(OH)₂D₃, depending on the degree of obesity and its relevance in clinical practice, as well as to confirm the role of VDR in diabetes.

A limitation of this study was that P&D patients were classified in the same group. This was due to the notable difficulty in finding lean diabetic subjects. Moreover, the cross-sectional nature of the study did not allow establishing a temporal association or causality.

In conclusion, 25(OH)D levels showed a close relationship with variables related to glucose metabolism, suggesting that VD deficiency is associated more with carbohydrate metabolism than with obesity. Additionally, AT VDR gene expression might also be related to glucose metabolism disorders, and AT has a different response to 1,25(OH)₂D₃ depending on the degree of obesity.

Acknowledgments

The authors thank all the subjects for their collaboration and Fundación Pública Andaluza para la Investigación de Málaga en Biomedicina y Salud (FIMABIS). We also gratefully acknowledge the help of Ian Johnstone for his expertise in preparing this manuscript, and Juan Alcaide-Torres, Instituto de Investigación Biomédica de Málaga, for his technical contribution.

Address all correspondence and requests for reprints to: F. J. Tinahones and M. Macías-González, Laboratorio Investigación Biomédica, 1ª Planta, Hospital Universitario Virgen de la Victoria, Campus de Teatinos s/n, 29010 Malaga, Spain. E-mail: ftinahones@hotmail.com and mmacias-manuel@gmail.com.

This study was supported by Centros de Investigación Biomédica En Red (CB06/03/0018) of the Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) and Grants PI11/01661, PI08/1655, and PI12/02355 from the ISCIII, Madrid, Spain. M.C.-P. was the recipient of FPU (Formación de Profesorado Universitario) Grant AP2009-4537 from the Education Ministry, Madrid, Spain. L.G.-S. was supported by "Miguel Servet Type I" (CP13/00188), and F.C. by "Miguel Servet Type II" program (CP13/00023) from the ISCIII, Madrid, Spain. M.M.-G. was the recipient of the Nicolas Monard program from the Servicio Andaluz de Salud, Junta de Andalucía, Spain (C-0029-2014).

Disclosure Summary: The authors have nothing to disclose.

References

- Young KA, Engelman CD, Langefeld CD, et al. Association of plasma vitamin D levels with adiposity in Hispanic and African Americans. *J Clin Endocrinol Metab*. 2009;94:3306–3313.
- Kabadi SM, Lee BK, Liu L. Joint effects of obesity and vitamin D insufficiency on insulin resistance and type 2 diabetes: results from the NHANES 2001–2006. *Diabetes Care*. 2012;35:2048–2054.
- Goldner WS, Stoner JA, Thompson J, et al. Prevalence of vitamin D insufficiency and deficiency in morbidly obese patients: a comparison with non-obese controls. *Obes Surg*. 2008;18:145–150.
- Pitas AG, Lau J, Hu FB, Dawson-Hughes B. The role of vitamin D and calcium in type 2 diabetes. A systematic review and meta-analysis. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007;92:2017–2029.
- Earlman CP, Beckman LM, Masodkar K, Sibley SD. The link between obesity and low circulating 25-hydroxyvitamin D concentrations: considerations and implications. *Int J Obes (Lond)*. 2012;36:387–396.
- Robinson JG, Manson JE, Larson J, et al. Lack of association between 25(OH)D levels and incident type 2 diabetes in older women. *Diabetes Care*. 2011;34:628–634.
- Mai XM, Chen Y, Camargo CA Jr, Langhammer A. Cross-sectional and prospective cohort study of serum 25-hydroxyvitamin D level and obesity in adults: the HUNT study. *Am J Epidemiol*. 2012;175:1029–1036.
- Barbarroja N, López-Pedrerá R, Mayas MD, et al. The obese healthy paradox: is inflammation the answer? *Biochem J*. 2010;430:141–149.
- Ding C, Gao D, Wilding J, Trayburn P, Bing C. Vitamin D signalling in adipose tissue. *Br J Nutr*. 2012;108:1915–1923.
- Nimitphong H, Holick MF, Fried SK, Lee MJ. 25-Hydroxyvitamin D₃ and 1,25-dihydroxyvitamin D₃ promote the differentiation of human subcutaneous preadipocytes. *PLoS One*. 2012;7:e52171.
- Wamberg L, Christiansen T, Paulsen SK, et al. Expression of vitamin D-metabolizing enzymes in human adipose tissue – the effect of obesity and diet-induced weight loss. *Int J Obes (Lond)*. 2013;37:651–657.
- Kamei Y, Kawada T, Kazuki R, Ono T, Kato S, Sugimoto E. Vitamin D receptor gene expression is up-regulated by 1, 25-dihydroxyvitamin D₃ in 3T3-L1 preadipocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 1993;193:948–955.
- Clemente-Postigo M, Queipo-Ortuno ML, Fernandez-García D, Gomez-Huelgas R, Tinahones FJ, Cardona F. Adipose tissue gene expression of factors related to lipid processing in obesity. *PLoS One*. 2011;6:e24783.
- American Diabetes Association. Standards of medical care in diabetes—2013. *Diabetes Care*. 2013;36(suppl 1):S11–S66.
- Shapses SA, Manson JE. Vitamin D and prevention of cardiovascular disease and diabetes: why the evidence falls short. *JAMA*. 2011;305:2565–2566.
- Hyppönen E, Power C. Vitamin D status and glucose homeostasis in the 1958 British birth cohort: the role of obesity. *Diabetes Care*. 2006;29:2244–2246.
- Tzotzas T, Papadopoulos FG, Tziomalos K, et al. Rising serum 25-hydroxy-vitamin D levels after weight loss in obese women correlate with improvement in insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab*. 2010;95:4251–4257.
- Shankar A, Sabanayagam C, Kalidindi S. Serum 25-hydroxyvitamin D levels and prediabetes among subjects free of diabetes. *Diabetes Care*. 2011;34:1114–1119.
- Wong KE, Kong J, Zhang W, et al. Targeted expression of human vitamin D receptor in adipocytes decreases energy expenditure and induces obesity in mice. *J Biol Chem*. 2011;286:33804–33810.
- Boon N, Hul GB, Sicard A, et al. The effects of increasing serum calcitriol on energy and fat metabolism and gene expression. *Obesity (Silver Spring)*. 2006;14:1739–1746.

Vitamin D (VD) deficiency has been associated with obesity and diabetes (1–4), although some have found no clear relationship between these variables (5, 6). Most studies that have so far examined 25-hydroxyvitamin D [25(OH)D] levels according to body mass index (BMI) failed to consider whether the participants were or were not diabetic (3, 7), which is noteworthy because most obese patients have altered glucose metabolism (8). This should be considered to discern whether VD deficiency is related to obesity by itself or whether it is a consequence of altered carbohydrate metabolism.

25(OH)D is hydroxylated to produce 1,25-dihydroxyvitamin D₃ [1,25(OH)₂D₃], the biologically active form (9). 1,25(OH)₂D₃ interacts with the VD receptor (VDR), which acts as a transcription factor (9).

VDR is highly expressed in preadipocytes from obese subjects (10), but it is unknown whether its expression during adipogenesis differs depending on BMI, and although total adipose tissue (AT) gene expression has been related to obesity (10, 11), its possible relation with diabetes has not yet been studied. The relationship between VDR in AT and obesity might be mediated by VD, since previous studies suggested a regulation of VDR gene expression and adipogenesis by 1,25(OH)₂D₃ (11, 12) but did not analyze whether the effect of 1,25(OH)₂D₃ on AT differs depending on the degree of obesity.

Thus, the aim of this study was to analyze serum 25(OH)D and VDR gene expression in AT according to a range of BMI values and the glycemic status of the participants. Additionally, we studied the effect of 1,25(OH)₂D₃ on AT explants according to the degree of obesity.

Subjects and Methods

Subjects

Cohort 1 comprised 118 participants recruited at the University Hospital (Malaga, Spain) classified according to their BMI as morbidly obese (MO; BMI > 40 kg/m²), obese (BMI = 30–40 kg/m²), overweight (BMI = 25–30 kg/m²) or lean (BMI < 25 kg/m²) (13) and to their glycemic profile as normoglycemic (NG) (fasting glucose levels < 100 mg/dL, and homeostasis model of assessment for insulin resistance [HOMA-IR; described below] < 3.5) or prediabetic and diabetic (P&D; fasting glucose levels > 100 mg/dL) (14). Cohort 2 comprised 30 obese patients (BMI = 33.5–58.4 kg/m²) recruited at the Hospital Universitari Dr Josep Trueta (Girona, Spain). The participants gave written informed consent, and the study was reviewed and approved by the Ethics and Research Committee (see Supplemental Data).

Before surgery and after an overnight fast, blood samples were obtained, and serum and plasma were separated for biochemical determinations. Visceral AT (VAT), used to study gene expression and perform AT explant cultures, was obtained during bariatric surgery in the MO patients or during hiatal hernia

surgery or cholecystectomy in the lean, overweight, or obese subjects from cohort 1. For cohort 2, VAT and sc AT (SAT), used to study gene expression, were obtained during elective surgical procedures (cholecystectomy, abdominal hernia, or gastric bypass). The AT samples were washed in physiological saline, immediately frozen in liquid nitrogen, and maintained at –80°C until analysis.

Laboratory measurements

Plasma glucose, cholesterol, triglycerides, and high-density lipoprotein cholesterol were measured in a Dimension autoanalyzer (Dade Behring Inc) by enzymatic methods (Randox Laboratories Ltd); insulin was measured by RIA (BioSource International); and leptin and adiponectin were measured by ELISA (DSL and DRG Diagnostics, respectively). Low-density lipoprotein cholesterol was calculated from the Friedewald equation (13), and the HOMA-IR was calculated as follows: HOMA-IR = fasting insulin (μU/mL) × fasting glucose (mmol/L)/22.5 (8, 13). Serum 25(OH)D and PTH levels from cohort 1 were determined by ELISA (Immundiagnostik and DRG Diagnostics, respectively) and for cohort 2 by electrochemiluminescence immunoassay (Modular Analytics E170; Roche Diagnostics).

Human preadipocyte differentiation

Visceral and sc human preadipocytes isolated from both obese (BMI > 30 kg/m²) and lean (BMI < 25 kg/m²) donors were purchased from Zen-Bio Inc and cultured (~40 000 cells/cm²) as described in the Supplemental Data.

AT explant culture

VAT from three NG healthy MO donors and three NG healthy lean donors was cut into 5- to 10-mg pieces and treated as described in detail in the Supplemental Data.

RNA isolation and real-time quantitative PCR

Total RNA isolation and cDNA synthesis were performed as described (13). Gene expression was assessed by real-time PCR using an Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR (see Supplemental Data).

Statistical analysis

The sample size was determined with the ENE 3.0 statistical program (GlaxoSmithKline). To detect differences for 25(OH)D concentrations of 25%, at least 12 subjects per group were required for the study (*α* risk = 0.05; power = 0.8). Comparisons between the study groups were made with ANOVA and Duncan's post hoc tests in cohort 1. Student's *t* test was used for comparisons between the groups in cohort 2 and for *in vitro* analysis. Pearson's (cohort 1) or Spearman's (cohort 2) correlation analyses were used to study variable associations. Statistical significance was set at *P* < .05. Analyses were performed with SPSS 15.0 (SPSS Iberica).

Results

The biochemical and anthropometric characteristics of each study group are summarized in Table 1.

Serum 25(OH)D levels were significantly higher in NG than in P&D in lean and MO subjects. Significant differ-