



PROGRAMA DE DOCTORADO DE MEDICINA Y CIENCIAS DE LA SALUD

**ESTATUS NUTRICIONAL DE LA VITAMINA D Y METABOLISMO
FOSFOCÁLCICO EN LA SEPSIS**

**RELACIÓN DEL METABOLISMO DE LA VITAMINA D CON LA
INFLAMACIÓN EN LA SEPSIS**

SONIA PÉREZ SAN MARTÍN

**Tesis presentada para aspirar al grado de Doctor en Medicina y
Ciencias de la Salud realizada bajo la dirección de la Doctora:**

MARÍA TERESA GARCÍA UNZUETA

Santander 2021



DÑA. MARÍA TERESA GARCÍA UNZUETA, DOCTORA EN MEDICINA, PROFESORA ASOCIADA POR LA UNIVERSIDAD DE CANTABRIA Y FACULTATIVA ESPECIALISTA DE ÁREA DE BIOQUÍMICA CLÍNICA DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO MARQUÉS DE VALDECILLA DE SANTANDER,

CERTIFICA que la presente TESIS DOCTORAL titulada **ESTATUS NUTRICIONAL DE LA VITAMINA D Y METABOLISMO FOSFOCÁLCICO EN LA SEPSIS. RELACIÓN DEL METABOLISMO DE LA VITAMINA D CON LA INFLAMACIÓN EN LA SEPSIS,** realizada bajo mi dirección por **Dña. Sonia Pérez San Martín,** responde a las exigencias científicas de originalidad y rigor propias de un trabajo de esta índole y son fruto de la capacidad técnica e interpretativa de la doctoranda.

Santander, de 2021

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi más profundo agradecimiento a todas aquellas personas que han contribuido a la elaboración de esta tesis.

En primer lugar, quería agradecer a la Dra. María Teresa García Unzueta, bajo cuya dirección se ha realizado esta tesis doctoral, por la generosidad y confianza mostradas al darme esta oportunidad, por todo lo que me ha enseñado estos años, por su tiempo y su paciencia. GRACIAS.

Al Dr. Borja Suberviola Cañas, que inició este proyecto y sin el cual no habría podido llevarse a cabo pero que, por circunstancias ajenas a la dirección y desarrollo de la tesis, no ha podido ser al final mi director de tesis, aunque se ha implicado como tal hasta el último momento. GRACIAS por tu tiempo, tu dedicación y tu infinita paciencia.

Gracias a Borja y a Miguel Santibañez, porque sin ellos no habría sido posible publicar el artículo de la pentraxina 3.

A todo el personal del Laboratorio de Análisis Clínicos del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, y especialmente a mis compañeras de la sección de Endocrinología, Blanca, Carmen y Ana, por acompañarme y ayudarme en este proyecto.

A Pedro Muñoz, por sus clases magistrales y desinteresadas de bioestadística.

A Tania Iglesias, de la Unidad de Consultoría Estadística de los Servicios Científico-Técnicos de la Universidad de Oviedo por su ayuda en el análisis de supervivencia.

A Mario Corral, responsable de la biblioteca Marquesa de Pelayo, por su ayuda desinteresada con la inmensa búsqueda bibliográfica.

A mis amigos, por escucharme y darme buenos consejos.

A mis padres, gracias por todo y enseñarme que el esfuerzo siempre tiene recompensa.

Por último, a mi marido Jorge y a mi hijo Marcos, gracias por los momentos sacrificados en nuestra vida como familia para poder realizar este proyecto, gracias por estar a mi lado y apoyarme siempre.

Muchísimas gracias a todos.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	23
1.1. SEPSIS.....	23
1.1.1. Definición de sepsis.....	23
1.1.2. Etiopatogenia.....	27
1.1.2.1. Epidemiología.....	27
1.1.2.2. Fisiopatología.....	27
1.1.3. Manifestaciones clínicas	30
1.1.4. Diagnóstico	31
1.1.5. Tratamiento.....	31
1.2. METABOLISMO FOSFOCÁLCICO.....	33
1.2.1. Calcio.....	33
1.2.1.1. Distribución del calcio	33
1.2.1.2. Absorción intestinal.....	33
1.2.1.3. Calcio óseo.....	34
1.2.1.4. Manejo renal del calcio	34
1.2.2. Fósforo	34
1.2.2.1. Distribución del fósforo.....	34
1.2.2.2. Absorción intestinal	35
1.2.2.3. Fósforo óseo	35
1.2.2.4. Manejo renal del fósforo	35
1.2.3. Control homeostático del calcio y fósforo. Regulación hormonal	35
1.2.3.1. PTH.....	36
1.2.3.2. Vitamina D.....	37
1.2.3.3. Calcio	37
1.2.3.4. FGF23.....	38
1.2.3.5. Otros	40
1.2.4. Magnesio	40
1.2.4.1. Distribución del magnesio	40

1.2.4.2. Absorción intestinal	40
1.2.4.3. Magnesio óseo.....	40
1.2.4.4. Manejo renal del magnesio.....	41
1.2.4.5. Regulación del magnesio.....	41
1.3. LA VITAMINA D, PROTEINA TRANSPORTADORA DE VITAMINA D Y PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS.....	42
1.3.1. Fuentes de vitamina D.....	42
1.3.2. Metabolismo de la vitamina D.....	42
1.3.3. Mecanismo de acción de la vitamina D	44
1.3.4. Efectos biológicos de la vitamina D	47
1.3.5. Proteína transportadora de vitamina D.....	48
1.3.5.1. Estructura del gen VDBP.....	48
1.3.5.2. Estructura de la proteína VDBP	49
1.3.5.3. Funciones de la VDBP	52
1.3.5.4. Metodología disponible para la determinación de VDBP sérica	53
1.3.6. Estado de la vitamina D	53
1.3.6.1. Metodología disponible	54
1.3.6.2. Valores de referencia y objetivos de salud	54
1.3.6.3. Vitamina D libre	56
1.3.7. Papel de la vitamina D en el sistema inmune	57
1.3.7.1. Inmunidad innata	57
1.3.7.2. Inmunidad adaptativa.....	59
1.3.8. Péptidos antimicrobianos vitamina D dependientes	60
1.3.8.1. La catelicidina humana (LL-37).....	62
1.3.8.2. La β -2-defensina.....	63
1.4. PAPEL DEL METABOLISMO ÓSEO EN PACIENTES CRÍTICOS.....	63
1.5. PAPEL DE LA VITAMINA D, LA VDBP Y LOS PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS EN LA SEPSIS	64
1.5.1. Vitamina D y sepsis	64
1.5.2. Péptidos antimicrobianos, VDBP y sepsis	65

1.6. PENTRAXINA 3 (PTX3)	66
1.7. PAPEL DE LA PTX3 EN LA SEPSIS	68
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	71
2.1. HIPÓTESIS	71
2.2. OBJETIVO GENERAL	71
2.3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	72
3. METODOLOGÍA	75
3.1. DISEÑO DEL ESTUDIO	75
3.2. APROBACIÓN DEL COMITÉ DE ÉTICA Y CONSENTIMIENTO INFORMADO DEL PACIENTE O SU REPRESENTANTE	75
3.3. PACIENTES	75
3.4. EXTRACCIÓN DE MUESTRAS SANGUÍNEAS Y ANÁLISIS	76
3.4.1. 25(OH) D	76
3.4.2. 1,25(OH) ₂ D	77
3.4.3. 25(OH) D libre medida y calculada	77
3.4.4. VDBP	78
3.4.5. PTH	78
3.4.6. FGF23 intacto	78
3.4.7. Catelicidina	78
3.4.8. β-2-Defensina	79
3.4.9. PTX3	79
3.4.10. Parámetros generales en sangre	79
3.5. TOMA DE MUESTRAS MICROBIOLÓGICAS Y ANÁLISIS	80
3.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	80
3.7. BÚSQUEDA BIBLIOGRÁFICA	81
4. RESULTADOS	85
4.1. POBLACIÓN INCLUIDA EN EL ESTUDIO	85

4.2. PREVALENCIA DE DEFICIENCIA DE VITAMINA D EN PACIENTES CRÍTICOS CON SHOCK SÉPTICO	89
4.3. INFLUENCIA DE LA ESTACIONALIDAD EN LOS NIVELES SÉRICOS DE 25(OH) D, PARÁMETROS DEL METABOLISMO FOSFOCÁLCICO Y PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS DEPENDIENTES DE VITAMINA D	90
4.4. CORRELACIÓN ENTRE LA 25(OH) D TOTAL Y LIBRE CON LOS PARÁMETROS DEL METABOLISMO FOSFOCÁLCICO Y PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS DEPENDIENTES DE VITAMINA D	94
4.5. CORRELACIONES DEL METABOLISMO FOSFOCÁLCICO Y VITAMINA D CON PARÁMETROS DE INFLAMACIÓN Y DE DAÑO TISULAR.....	98
4.6. ANÁLISIS DE LAS DIFERENCIAS EN LOS PARÁMETROS BIOQUÍMICOS Y CLÍNICOS ENTRE PACIENTES CON SUFICIENCIA O NO DE VITAMINA D, SEGÚN LOS DISTINTOS CRITERIOS DE DEFICIENCIA DE VITAMINA D	100
4.7. ANÁLISIS DE LAS DIFERENCIAS EN LOS PARÁMETROS BIOQUÍMICOS Y CLÍNICOS ENTRE PACIENTES CON Y SIN HIPERPARATIROIDISMO SECUNDARIO A DÉFICIT DE VITAMINA D	104
4.8. ANÁLISIS DE LOS PARÁMETROS DEL METABOLISMO DE LA VITAMINA D Y DEL METABOLISMO FOSFOCÁLCICO ANALIZADOS EN RELACIÓN A PARÁMETROS CLÍNICOS.....	107
4.8.1. Estancia hospitalaria y estancia en UCI	107
4.8.2. Foco primario de infección	108
4.8.3. Índices de gravedad.....	109
4.8.4. Bacteriemia.....	111
4.8.5. Tipo de germen.....	112
4.8.6. SDRA.....	113
4.8.7. Ventilación mecánica	114
4.8.8. Necesidad de HFVVC	115
4.9. ANÁLISIS DE LOS PARÁMETROS BIOQUÍMICOS ANALIZADOS EN RELACIÓN CON LA MORTALIDAD HOSPITALARIA.....	116
4.9.1. Análisis de regresión y curvas COR de la 25(OH) D, parámetros del metabolismo fosfocálcico, péptidos antimicrobianos dependientes de la vitamina D y parámetros de inflamación en relación con la mortalidad hospitalaria	118
4.9.2. Análisis de supervivencia	121

5. DISCUSIÓN	129
5.1. HIPOVITAMINOSIS D EN PACIENTES CRÍTICOS CON SHOCK SÉPTICO	129
5.2. EFECTO DE LA ESTACIONALIDAD EN LA 25(OH) D, EN LOS PARÁMETROS DEL METABOLISMO FOSFOCÁLCICO EN LOS PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS DEPENDIENTES DE VITAMINA D	131
5.3. SITUACIÓN DE LOS METABOLITOS DE LA VITAMINA D Y DEL METABOLISMO FOSFOCÁLCICO EN LA SEPSIS.....	132
5.4. RELACIÓN ENTRE LA DEFICIENCIA DE VITAMINA D Y PARÁMETROS CLÍNICOS Y BIOQUÍMICOS.....	134
5.5. UTILIDAD PRONÓSTICA DE LA 25(OH) D, PARÁMETROS DEL METABOLISMO FOSFOCÁLCICO, PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS DEPENDIENTES DE VITAMINA D Y PARÁMETROS INFLAMATORIOS CON RESPECTO A LA MORTALIDAD.....	139
5.6. UTILIDAD PRONÓSTICA DE LA PTX3 CON RESPECTO A LA MORTALIDAD	144
6. CONCLUSIONES	151
7. BIBLIOGRAFÍA	155
8. ANEXOS	183
8.1. APROBACIÓN DEL COMITÉ DE ÉTICA DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA DE CANTABRIA.....	183
8.2. CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA LA PARTICIPACIÓN EN EL ESTUDIO.....	186
8.3. PUBLICACIONES.....	189

ÍNDICE DE TABLAS

- Tabla 1.** Definiciones relacionadas con sepsis en adultos
- Tabla 2.** Escala SOFA
- Tabla 3.** Escala qSOFA
- Tabla 4.** Órganos y tejidos que expresan VDR
- Tabla 5.** Acciones de la vitamina D
- Tabla 6.** Variación genética de los diferentes alelos de la VDBP
- Tabla 7.** Agentes biológicos sensibles al efecto del eje vitamina D-antibióticos vitamina D dependientes
- Tabla 8.** Características demográficas y clínicas al ingreso en la UCI
- Tabla 9.** Parámetros bioquímicos generales y específicos al ingreso en UCI
- Tabla 10.** Estatus de la vitamina D al ingreso en UCI, según la Endocrine Society
- Tabla 11.** Estatus de la vitamina D al ingreso en UCI, según IOM
- Tabla 12.** Estatus de la vitamina D al ingreso en UCI, según la International Conference on Controversies in Vitamin D
- Tabla 13.** Pacientes críticos ingresados en UCI con shock séptico según la estacionalidad
- Tabla 14.** Niveles de 25(OH) D, parámetros del metabolismo fosfocálcico y péptidos antimicrobianos dependientes de vitamina D, según la estacionalidad
- Tabla 15.** Correlaciones entre la 25(OH) D total y libre con parámetros del metabolismo fosfocálcico y péptidos antimicrobianos dependientes de vitamina D
- Tabla 16.** Correlaciones del metabolismo fosfocálcico y vitamina D con parámetros de inflamación y de daño tisular
- Tabla 17.** Características demográficas y clínicas según el estatus de deficiencia y deficiencia severa de 25(OH) D
- Tabla 18.** Características bioquímicas según el estatus de deficiencia y deficiencia severa de 25(OH) D
- Tabla 19.** Características demográficas y clínicas según el estado de hiperparatiroidismo secundario
- Tabla 20.** Características bioquímicas según el estado de hiperparatiroidismo secundario
- Tabla 21.** Correlación de los parámetros bioquímicos estudiados con respecto a la estancia en UCI y hospitalaria

Tabla 22. Asociación de los parámetros bioquímicos estudiados con el foco primario de infección

Tabla 23. Correlación de los parámetros bioquímico estudiados con parámetros de gravedad

Tabla 24. Asociación de los parámetros bioquímicos estudiados con la bacteriemia

Tabla 25. Asociación de los parámetros bioquímicos estudiados con el tipo de germen

Tabla 26. Asociación de parámetros bioquímicos estudiados con el SDRA

Tabla 27. Asociación de los parámetros bioquímicos estudiados con la ventilación mecánica

Tabla 28. Asociación de los parámetros bioquímicos estudiados con la HFVVC

Tabla 29. AUC de los parámetros a estudio en relación a la mortalidad hospitalaria

Tabla 30. Regresión logística univariante y multivariante en relación a la mortalidad hospitalaria

Tabla 31. Modelo de Cox univariante y multivariante para mortalidad global

Tabla 32. Modelo de Cox univariante y multivariante para mortalidad a 30 días

Tabla 33. Modelo de Cox univariante y multivariante para mortalidad a 90 días

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Fisiopatología de la sepsis
- Figura 2.** Resumen del metabolismo fosfocálcico
- Figura 3.** Estructura química de la vitamina D2 y D3
- Figura 4.** Fotobiogénesis de la vitamina D
- Figura 5.** Metabolismo de la vitamina D
- Figura 6.** Mecanismo de acción de la vitamina D
- Figura 7.** Estructura y árbol filogenético del clúster VDBP-albúmina-alfa-fetoproteína
- Figura 8.** Estructura tridimensional de la VDBP
- Figura 9.** Megalina y captación de 25(OH) D en el riñón
- Figura 10.** Vitamina D total, libre y biodisponible
- Figura 11.** Papel de la vitamina D en la inmunidad innata y en la microbiota intestinal
- Figura 12.** Mecanismos de la vitamina D en la inmunidad adaptativa. Tomado de: (23 2)
- Figura 13.** Papel de los péptidos antimicrobianos en la infección localizada y en la sepsis
- Figura 14.** Papel de la PTX3 en la inmunidad innata
- Figura 15.** Histograma de los niveles de 25(OH) D al ingreso en UCI
- Figura 16.** Diagrama de caja de los niveles de 25(OH) D total, 25(OH) D libre medida y calculada, catelicidina y β -2-defensina según la estacionalidad del año
- Figura 17.** Correlación positiva entre los niveles de 25(OH) D total y 25(OH) D libre medida en suero
- Figura 18.** Correlación positiva entre los niveles de 25(OH) D total y 25(OH) D libre calculada en suero
- Figura 19.** Correlación negativa entre los niveles de 25(OH) D total y β -2-defensina en suero
- Figura 20.** Correlación negativa entre los niveles de 25(OH) D libre medida y β -2-defensina en suero
- Figura 21.** Correlación negativa entre los niveles de 25(OH) D libre calculada y β -2-defensina en suero
- Figura 22.** Diagrama de caja de los niveles de albúmina, fósforo, PTX3, FGF23 y

VDBP en relación a la mortalidad hospitalaria

Figura 23. Curvas COR de los parámetros a estudio en relación a la mortalidad hospitalaria

Figura 24. Curvas de Kaplan-Meier para la supervivencia global

Figura 25. Curvas de Kaplan-Meier para supervivencia a 30 días

Figura 26. Curvas de Kaplan-Meier para supervivencia a 90 días

LISTADO DE ABREVIATURAS

Ac: Anticuerpo

ACCP: *American College of Chest Physicians*

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ANP: Péptido natriurético atrial

AMPs: *Antimicrobial peptides* (Péptidos antimicrobianos)

APACHE II: *Acute Physiology And Chronic Health Evaluation II*

ATS: *American Thoracic Society*

AUC: Área bajo la curva

AVVP: *American College of Chest*

CaSR: Receptor sensible al calcio

C4BP: *C4b-binding protein* (Proteína de unión C4b)

C5a: Complemento C5a

cFGF23: Fragmentos C terminal de la FGF23

CD: *Cluster of differentiation* (grupos de diferenciación)

CFHR5: Proteína 5 relacionada con el factor H

CKD: *Chronic kidney disease* (Enfermedad renal crónica)

CLIA: Inmunoensayo por quimioluminiscencia

COR: Curvas de característica operativa del receptor

DAMP: *Danger-associated Molecular Patterns* (Patrones moleculares asociados a daños)

DA: Dopamina

DBT: Dobutamina

DC: Células dendríticas

DE: Desviación estándar

DEQAS: *Vitamin D External Quality Assessment Scheme*

EC: Células enterales

ECA: Enzima convertidora de angiotensina

ELISA: *Enzyme Linked Immuno Sorvent Assay* (Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas)

ESICM: *European Society of Intensive Care Medicine*

EPOC: Enfermedad pulmonar obstructiva crónica

FG: Filtrado glomerular

FGF23: Factor de crecimiento fibroblástico 23

FGFR: Receptor del FGF23

FIO₂: Fracción de oxígeno inspirado

g: gramos

GM: Microbiota intestinal

Hb: hemoglobina

HBD2: β -2-defensina

HFVVC: Hemofiltración veno-venosa continua

HR: *Hazard ratio*

HUMV: Hospital Universitario Marqués de Valdecilla

IC 95%: Intervalo de confianza al 95%

ICAM1: *Intercellular Adhesion Molecule 1* (molécula de adhesión intercelular 1)

IL: Interleuquina

ILC: Células linfoides innatas

IFN γ : Interferon gamma

INR: Razón internacional normalizada

IOM: *Institute of Medicine*

ITU: Infección del tracto urinario

LBD: Dominio de unión al ligando

LC-MS/MS: Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas

LL-37/hCAP18: Catelicidina

MCP-1: Proteína quimioatrayente de monocitos 1

N/A: Noradrenalina/adrenalina

NET: *Neutrophil extracellular traps* (Trampa extracelular de neutrófilos)

NF- κ B: Factor nuclear kappa B

NIST: *National Institute of Standards and Technology*

NK: Células *natural killer*

NKT: Células *natural T killer*

OR: *Odds-Ratio*

PaCO₂: Presión arterial de dióxido de carbono

PAM: Presión arterial media

PAMP: *Pathogen-Associated Molecular Patterns* (Patrones moleculares asociados a patógenos)

PaO₂: Presión arterial de oxígeno

PAS: Presión arterial sistólica

PCR: Proteína C reactiva

PCT: Procalcitonina

PMN: Polimorfonucleares

PPR: *Pattern Recognition Receptors* (Receptores de reconocimiento de patrones)

PTX3: Pentraxina 3

PTH: Hormona paratiroidea/Paratirina

PTH1R: Receptor clásico de PTH

PTHrp: Péptido relacionado con la PTH

qSOFA: quick SOFA

RNAm: RNA mensajero

rpm: Respiraciones por minuto

RXR: *Retinoid X receptor* (Receptor del ácido retinoico)

SaO₂: Saturación arterial de oxígeno periférico

SAP: Componente P del amiloide sérico

SAPS II: *Simplified Acute Physiologic Score II*

SCCM: *Society of Critical Care Medicine*

SDRA: Síndrome de distrés respiratorio

SEIOMM: Sociedad Española de Investigación Ósea y del Metabolismo Mineral

SIRS: Síndrome de respuesta inflamatoria sistémica

SIS: *Surgical Infection Society*

SNP: *Single Nucleotide Polymorphism* (Polimorfismos de un solo nucleótido)

SOFA: *Sequential Organ Failure Assessment*

SRAA: Sistema renina-angiotensina-aldosterona

SIRS: Síndrome de respuesta inflamatoria sistémica

SRM: Material de referencia estándar certificado

SvO₂: Saturación venosa de oxígeno mixta

TACE: *Tumor Necrosis Factor- α converting enzyme* (Enzima convertidora del Factor- α de necrosis tumoral)

TGF β : *Transforming growth factor beta* (Factor de crecimiento transformante beta)

Th: Células T-helper

TLR: *Toll-like receptors* (Receptores tipo Toll)

TNF α : Factor de necrosis tumoral alfa

TP: Tiempo de protrombina

Tr1: Células reguladoras tipo 1

Tregs: Células T reguladoras

TRPV: Canal receptor de catión de potencial transitorio

TTPa: Tiempo de tromboplastina parcial activado

UCI: Unidad de Cuidados Intensivos

VCAM1: *Vascular cell adhesion protein 1* (molécula de adhesión vascular 1)

VDBP: *Vitamin D binding protein* (Proteína transportadora de vitamina D)

VDR: *Vitamin D receptor* (Receptor de la vitamina D)

VDRn: VDR nuclear

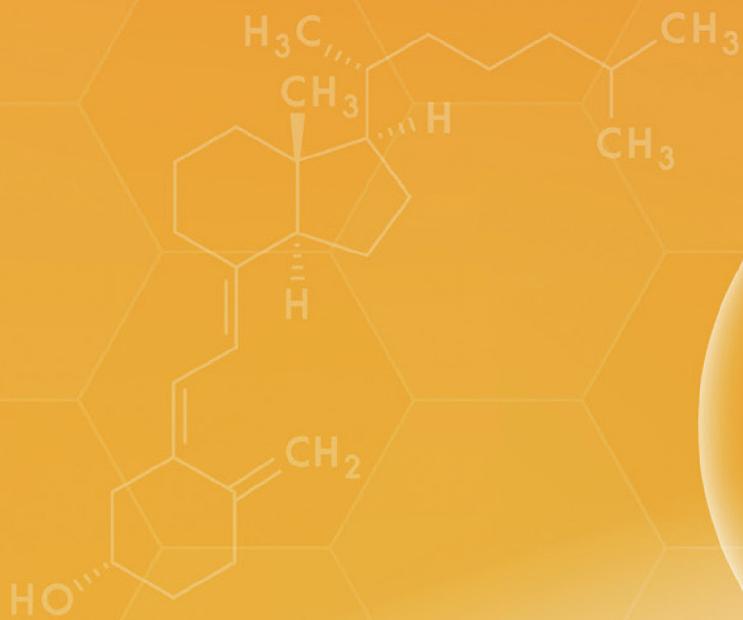
VDRm: VDR de membrana

VDRE: *Vitamin D responsive element* (Regiones promotoras de la vitamina D)

WHA: Asamblea Mundial de la Salud

1,25(OH)₂ D: 1,25-dihidrovitamina D o calcitriol

25(OH) D: 25-hidroxivitamina D o calcidiol



1

INTRODUCCIÓN

1.1. SEPSIS

La sepsis es una de las principales causas de mortalidad en pacientes críticos en todo el mundo y conlleva un importante consumo de recursos económicos. Aunque los avances en el conocimiento de su fisiopatología, en el tratamiento antibiótico, en las medidas para modular la respuesta inmunitaria y la intervención precoz han disminuido su desenlace fatal, su incidencia ha ido en aumento en los últimos años (1). La tasa de mortalidad debida a la sepsis es alta, se estima entre el 25-30% y aumenta al 40-50%, en caso de shock séptico (2).

La Asamblea Mundial de la Salud (WHA) ha reconocido a la sepsis como una prioridad de salud global y ha adoptado una resolución para reducir la carga de sepsis a través de una mejor prevención, diagnóstico y manejo (3).

La sepsis es un tema importante de salud, no sólo por la mortalidad, sino también porque los pacientes que sobreviven a la sepsis con frecuencia sufren problemas físicos, psicológicos y cognitivos prolongados (4).

1.1.1. Definición de sepsis

Hipócrates de Cos (460-377 a.C.) ya conocía las manifestaciones clínicas de la sepsis y fue quien introdujo el término "herida putrefacta". Pero no fue hasta mediados del siglo XVIII, que Louis Pasteur relacionó la putrefacción con bacterias y microorganismos.

No existe un test diagnóstico "gold standard" para la definición de sepsis. Por lo que, la definición de sepsis ha sido propuesta en diferentes conferencias internacionales. En

1992, el *American College of Chest (AVVP)* y la *Society of Critical Care Medicine (SCCM)* convocaron la primera conferencia de consenso, en la que se desarrollaron las definiciones iniciales de sepsis (5), entendida como un síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS) del huésped a la infección. La sepsis complicada con disfunción orgánica recibió el nombre de “sepsis grave”, que podría progresar a shock séptico, definido como “hipotensión persistente inducida por la sepsis a pesar de una adecuada resucitación con fluidos”. Desde entonces, se realizaron considerables avances en la patología, manejo y epidemiología de la sepsis, lo que sugería la necesidad de reevaluación, por lo que la definición de sepsis fue revisada en el año 2001, en la segunda conferencia de consenso (6), en la que participaron las siguientes sociedades científicas: *SCCM*, *European Society of Intensive Care Medicine (ESICM)*, *American College of Chest Physicians (ACCP)*, *American Thoracic Society (ATS)* y *Surgical Infection Society (SIS)* concluyeron que los conceptos de sepsis, sepsis grave y shock séptico seguían siendo útiles aunque no permitían una estadificación precisa o el pronóstico de la respuesta del huésped a la infección y que una lista ampliada de signos y síntomas de sepsis pueden reflejar mejor la respuesta clínica a la infección (parámetros generales, inflamatorios, hemodinámicos y de perfusión tisular).

En 2016, el grupo de Trabajo de las Definiciones de Sepsis (*Sepsis Definitions Task Force*) publicó el consenso SEPSIS-3 con las definiciones actualizadas de sepsis y shock séptico (7). Se define sepsis como “una disfunción orgánica potencialmente mortal causada por una respuesta anómala del huésped a la infección” y shock séptico como “una subcategoría de la sepsis en la que las alteraciones circulatorias y del metabolismo celular son lo suficientemente profundas como para aumentar considerablemente la mortalidad”, proponiendo que los criterios para definir la ocurrencia del shock séptico: hipotensión, requerimiento sostenido de vasopresores para mantener una presión arterial media (PAM)=65 mmHg y un nivel de lactato sérico mayor de 2 mmol/L; convirtiendo en superfluo el término “sepsis grave”.

Sin embargo, la actual definición de sepsis es controvertida, aunque es muy sensible, resulta poco específica e incluye prácticamente cualquier infección, independientemente de su gravedad o repercusión sistémica (8-11).

En la Tabla 1 se resumen las diferentes definiciones utilizadas en las tres conferencias consenso.

Concepto	Definición
Infección	Proceso causado por la invasión por parte de un microorganismo patógeno o potencialmente patógeno de un tejido, cavidad corporal o fluido habitualmente estéril
Bacteriemia	Presencia de bacterias viables en sangre
Síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS)	Respuesta inflamatoria sistémica que aparece como consecuencia de diversas agresiones clínicas, y se manifiesta por dos o más de las siguientes situaciones (en ausencia de otras causas conocidas para su alteración): 1) temperatura > 38 o < 36 °C; 2) frecuencia cardíaca > 90 latidos/min; 3) frecuencia respiratoria > 20 rpm o PaCO ₂ < 32 mmHg; 4) leucocitos sanguíneos > 12×10 ⁹ /L, o < 4×10 ⁹ /L o > 10% de formas inmaduras (bandas)
Signos de inflamación sistémica en respuesta a la infección	1) Generales: fiebre o hipotermia (temperatura central > 38,3 o < 36°C); frecuencia cardíaca > 90 latidos/min; taquipnea; alteración del estado mental; edema significativo o balance positivo (> 20 mL/kg en 24 h); 2) Parámetros inflamatorios: leucocitosis (>12×10 ⁹ /L) o leucopenia (<4×10 ⁹ /L) ó > 10% de formas inmaduras leucocitarias; proteína C reactiva o procalcitonina > 2 DE por encima del valor normal; 3) Parámetros hemodinámicos: hipotensión (PAS<90 mmHg, o PAM < 70 mmHg, o descenso PAS > 40 mmHg o > 2 DE del valor habitual del paciente); SvO ₂ > 70%; IC > 3,5 L/min/m ² . 4) Parámetros de disfunción orgánica: hipoxemia (PaO ₂ /FiO ₂ < 300); oliguria aguda (débito urinario < 0,5 mL/kg/h) o incremento de creatinina >0,5 mg/dL; alteración de la coagulación (INR >1,5, TTPa >60 s); íleo paralítico; trombocitopenia (plaquetas < 100×10 ⁹ /L); hiperbilirrubinemia (bilirrubina total >4 mg/dL); 5) Parámetros de perfusión tisular: hiperlactacidemia (>2 mmol/L, ó 18 mg/dL); disminución del relleno capilar, y livedo reticularis.
Sepsis	Infección con dos o más signos de SIRS (5) o con algunos signos de inflamación sistémica en respuesta a la infección (6). Disfunción orgánica potencialmente mortal causada por una respuesta anómala del huésped a la infección (7).
Sepsis grave	Sepsis asociada a disfunción orgánica, hipoperfusión (acidosis láctica, oliguria o alteración del estado mental) o hipotensión.
Shock séptico	Sepsis grave con hipotensión pese al aporte adecuado de líquidos. También quedan incluidos los pacientes que no están hipotensos tras recibir fármacos inotropos o vasopresores (5,6). Subcategoría de la sepsis en la que las alteraciones circulatorias y del metabolismo celular son lo suficientemente profundas como para aumentar considerablemente la mortalidad (7).
Síndrome de disfunción orgánica múltiple	Presencia de dos o más alteraciones orgánicas en el paciente crítico que no permiten que la homeostasis se mantenga sin intervención

Tabla 1. Definiciones relacionadas con sepsis en adultos. Tomada y modificada de: (5-7).

Este consenso propone para la identificación de la disfunción orgánica, la escala SOFA (*Sequential Organ Failure Assessment*). Una variación de dos o más puntos en la escala SOFA identifica la disfunción orgánica, considerando una puntuación basal de 0 a menos que se conozca que el paciente tuviera una disfunción orgánica previamente a la aparición de la infección. Los pacientes con puntuación SOFA de 2 o más tienen un riesgo de mortalidad de aproximadamente el 10% en una población hospitalaria general con presunta infección (7). Esta puntuación incluye una serie de criterios clínicos, de laboratorio y de manejo.

En la Tabla 2 se resumen los criterios utilizados en la escala SOFA.

Criterio	0	1	2	3	4
Respiración					
PaO ₂ /FIO ₂ (mmHg) o	>400	<400	<300	<200*	<100*
SaO ₂ /FIO ₂		221-301	142-220	67-141	<67
Coagulación					
Plaquetas/mm ³	>150	<150	<100	<50	<20
Hígado					
Bilirrubina (mg/dL)	<1,2	1,2-1,9	2,0-5,9	6,0-11,9	>12,0
Cardiovascular					
Tensión arterial (mmHg)	PAM ≥70	PAM <70	DA <5 o DBT	DA >5,1-15 o N/A ≤0,1	DA >15 o N/A >0,1
Sistema Nervioso Central					
Escala de Glasgow	15	13-14	10-12	6-9	<6
Renal					
Creatinina (mg/dL) o	<1,2	1,2-1,9	2,0-3,4	3,5-4,9	>5,0
Diuresis (mL/día)				<500	<200

*Respiratorio: las puntuaciones 3 y 4 se aplican sólo si el enfermo recibe soporte ventilatorio.

PaO₂/FIO₂ es relación utilizada preferentemente, pero si no esta disponible usaremos la SaO₂/FIO₂;

Medicamentos vasoactivos administrados durante al menos 1 hora (dopamina y norepinefrina como ug/kg/min) para mantener la PAM por encima de 65 mmHg.

Tabla 2. Escala SOFA. Tomada y modificada de: (7).

Otro concepto que se introduce en esta última conferencia es la escala qSOFA (*quick SOFA*, del acrónimo en inglés), que incluye sólo criterios clínicos fácil y rápidamente medibles a pie de cama, que puede resultar útil en la identificación de pacientes que pudieran precisar de un nivel de vigilancia más estrecho y un estudio más específico en la búsqueda de disfunción orgánica (7). En la Tabla 3 se resumen los criterios utilizados en la escala qSOFA.

Frecuencia respiratoria ≥ 22 rpm
Alteración del nivel de conciencia, definido como una puntuación en la escala de Glasgow ≤ 13
Presión arterial sistólica ≤ 100 mmHg

Tabla 3. Escala qSOFA. Tomada y modificada de: (7).

1.1.2. Etiopatogenia

1.1.2.1. Epidemiología

La sepsis es un problema de salud relevante debido a su elevada frecuencia y gravedad. El impacto real de la sepsis a nivel mundial se desconoce. En 2016, en una revisión sistemática en población adulta, entre los años 1995 y 2015, se reportó que la tasa de incidencia global para la sepsis fue de 437 por 100000 habitantes/año, en países de altos ingresos económicos, ya que no refleja las contribuciones de países de ingresos bajos y medios (1).

Presenta una elevada tasa de mortalidad, se estima entre el 10-52% (12) y aumenta progresivamente en función de la gravedad (13).

La incidencia es superior en los varones y en no caucásicos. Por edades, es más frecuente entre los recién nacidos y en adultos mayores de 65 años. Estos últimos representan casi el 65% de todos los casos de sepsis (14).

La admisión en UCI, bacteriemia, edad avanzada (mayor de 65 años), inmunosupresión, diabetes, cáncer, neumonía adquirida en la comunidad, hospitalizaciones previas y susceptibilidad genética, se consideran factores de riesgo para el desarrollo de sepsis (15).

Las infecciones pulmonares (64%), seguidas de las abdominales (20%), la bacteriemia (15%) y las del aparato genitourinario (14%) provocan más del 80% de los casos de sepsis (14,15). Las infecciones bacterianas son la causa más frecuente de sepsis. El porcentaje de casos de sepsis ocasionado por bacterias Gram negativas (*Escherichia coli*, *Klebsiella spp* y *Pseudomonas aeruginosa*) ha ido disminuyendo a lo largo de los años, mientras que el porcentaje de casos asociados a bacterias Gram positivas ha aumentado de manera constante a lo largo de los años y suponen aproximadamente el 47% de los casos, entre las que destacan las debidas a *Staphylococcus aureus* (incluyendo cepas meticilín-resistentes), *Streptococcus spp* y *Enterococcus spp*. Aproximadamente un 5-10% de los casos son debidos a infecciones fúngicas, virales o por protozoos (14, 15).

1.1.2.2. Fisiopatología

Los eventos fisiopatológicos que tienen lugar en la sepsis son múltiples, complejos y afectan a varios sistemas.

En condiciones normales, los patógenos al invadir un organismo activan las células del sistema inmune innato, como las células dendríticas (DC) y monocitos/macrófagos, que expresan receptores de reconocimiento de patrones (PPRs, del acrónimo en inglés Pa-

Pattern Recognition Receptors) que identifican estructuras muy conservadas de los patógenos invasores denominadas patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs, del acrónimo en inglés *Pathogen-Associated Molecular Patterns*) (16).

Los PRR también reconocen y se unen a moléculas endógenas denominadas patrones moleculares asociados a daño (DAMP, del acrónimo en inglés *Danger-associated Molecular Patterns*), que se liberan durante el proceso inflamatorio. Las DAMP son estructuras nucleares, citoplasmáticas o mitocondriales que adquieren nuevas funciones cuando se liberan en el entorno extracelular (16).

Durante la infección se pueden liberar otras estructuras celulares que pueden influir en la respuesta del huésped, como las trampas extracelulares de neutrófilos (NETs, del acrónimo en inglés *neutrophil extracellular traps*). Brinckman et al., en 2004, describieron que la activación de los neutrófilos no sólo podía desencadenar la fagocitosis de los patógenos infectantes sino también la liberación de NETs, estructuras extracelulares similares a una red, formadas principalmente por ADN e histonas y que actuarían como una barrera física que evitaría la diseminación de los microorganismos y facilitaría la destrucción extracelular de los mismos debido a que estas trampas son capaces de mantener concentraciones elevadas de sustancias antimicrobianas, como las proteínas de los gránulos de los neutrófilos y las histonas (17). In vitro, se observó que los neutrófilos de pacientes que sobrevivieron a la sepsis producían más NETs que los de los no supervivientes (18). Este hallazgo puede ser debido a que las NETs tendrían función antimicrobiana en la fase de infección temprana. Sin embargo, cuando la sepsis progresa, las NETs pueden causar daño pulmonar y hepático (19, 20). Por lo que las NETs parecen tener un papel dual en la infección temprana y en la patogénesis del daño orgánico en la sepsis (21).

Dentro de los PRR, se encuentran los receptores tipo Toll (TLR, del acrónimo en inglés *Toll Like Receptors*), que al unirse a sus receptivos ligandos activarían vías de señalización que inducen la respuesta inflamatoria. En este proceso se produce la activación del factor nuclear kappa B (NF- κ B) que induce la transcripción de los genes que codifican citoquinas proinflamatorias, como factor de necrosis tumoral alfa (TNF α), interleuquina 1 β (IL-1 β), interferón- γ (IFN- γ), IL-2, IL-6, IL-10, IL-12, quimiocinas, y aminas vasoactivas que atraen a los polimorfonucleares y activan a los macrófagos. Los leucocitos polimorfonucleares (PMN) se activa y expresan moléculas de adhesión que causan su agregación al endotelio vascular, a su vez el endotelio expresa moléculas de adherencia para atraer a los leucocitos. Los PMN, a través de una serie de pasos migran a la zona dañada. La liberación de mediadores por parte los PMN en el sitio de infección es responsable de los signos de inflamación local: calor y eritema debido a la vasodilatación local e hiperemia y edema rico en proteínas debido al aumento de la permeabilidad microvascular (16).

El balance entre mediadores proinflamatorios, como la IL-6, y antiinflamatorios, como la IL-10, que inhiben la producción de TNF α e IL-1, regulan el proceso inflamatorio que incluye la adherencia, la quimiotaxis, la fagocitosis y posterior destrucción del patógeno. Cuyo resultado final es la reparación y curación de los tejidos.

La sepsis ocurre cuando la liberación de componentes proinflamatorios en respuesta a una infección excede la respuesta local, dando lugar a una respuesta generalizada (Figura 1).

Se desconoce el motivo por el cual se desencadena la activación excesiva y anómala de la respuesta inmunitaria, es probable que dependa de los efectos directos de la invasión

de microorganismos o sus productos tóxicos, la liberación excesiva de mediadores proinflamatorios y la activación del complemento.

Componentes de las paredes bacterianas como las endotoxinas y exotoxinas secretadas extracelularmente por microorganismos podrían contribuir al desencadenamiento de la sepsis (16).

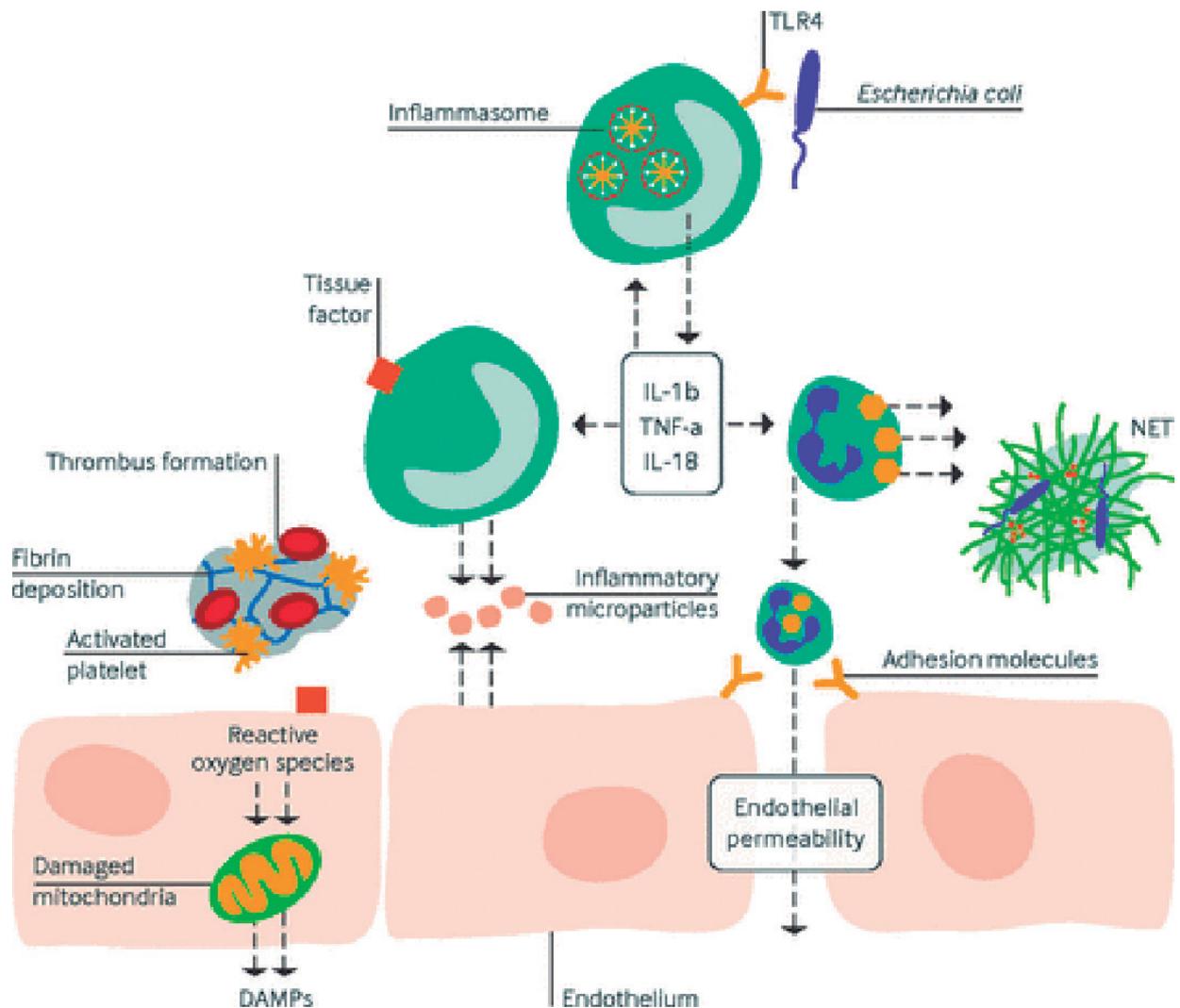


Figura 1. Fisiopatología de la sepsis. Tomado de: (14).

Así como la liberación excesiva de citoquinas proinflamatorias, incluyendo el TNF α y la IL-1. Ambas citoquinas pueden causar fiebre, hipotensión, leucocitosis, la liberación de otras citoquinas proinflamatorias, así como la activación de la coagulación y la fibrinólisis. Niveles circulantes de TNF α están significativamente elevados en pacientes sépticos y en modelos de animales (22). El TNF α se ha convertido en la citoquina pro-inflamatoria más estudiada en la sepsis. En un análisis multiplex en el que se evaluó los niveles plasmáticos de 17 citoquinas en pacientes sépticos se observó que la concentración de IL-1 β , IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-13, IFN γ , MCP-1 and TNF α eran significativamente mayores en pacientes con shock séptico en comparación con pacientes con sepsis grave y que los diferentes perfiles de citoquinas se asociaron con la severidad de la sepsis, la disfunción orgánica y la muerte (23).

El sistema del complemento forma parte de la inmunidad innata y la adquirida y es uno de los sistemas de defensa más antiguos, cuya principal misión es la eliminación de patógenos del organismo y, por otro lado, tiene la capacidad de favorecer la inflamación, que promueven la migración de células del sistema inmune y la secreción de citoquinas proinflamatorias. Existen evidencias de que el sistema del complemento tiene un papel importante en la sepsis, así su inhibición disminuye la inflamación y la mortalidad en modelos animales (16).

Además, ciertos individuos podrían ser genéticamente susceptibles a desarrollar sepsis (15). Varios polimorfismos de un solo nucleótido (SNP, del acrónimo en inglés *Single Nucleotide Polymorphism*) se han asociado con un aumento en la susceptibilidad a infecciones y peores desenlaces, que incluyen genes que codifican citoquinas, receptores de superficie celulares, ligandos lipopolisacáridos, entre otros (24).

Esta activación inmune anómala y excesiva puede inducir un daño celular generalizado, que es el precursor de la disfunción orgánica. No está totalmente esclarecido el mecanismo de la lesión celular, pero se cree que incluyen la isquemia tisular, la lesión citopática (secundaria a mediadores proinflamatorios y/o inflamatorios) y una tasa alterada de apoptosis (15).

En este contexto, diversos estudios sugieren que esta respuesta proinflamatoria generalizada estaría acoplada a una respuesta antiinflamatoria, y en algunos casos se puede llegar a desarrollar una respuesta antiinflamatoria compensatoria, la cual podría provocar un estado de inmunosupresión, incrementando la susceptibilidad a las infecciones (15).

La lesión celular puede progresar a disfunción orgánica. Ningún órgano está protegido de las consecuencias de la sepsis, aunque los órganos más comúnmente involucrados son el sistema circulatorio, el pulmón, el tracto gastrointestinal, el riñón y el sistema nervioso.

A pesar de una clara comprensión de los mecanismos inflamatorios y de coagulación que se desencadenan durante la etapa temprana de la sepsis, no se conocen los aspectos celulares subyacentes a los mecanismos que finalmente conducen a la disfunción orgánica y la muerte, aunque podría estar relacionado con la disminución de la utilización de oxígeno asociada a disfunción mitocondrial que puede ir acompañado además de un suministro insuficiente de oxígeno a los tejidos (12).

1.1.3. Manifestaciones clínicas

Los pacientes con sepsis documentada o sospechada presentan típicamente hipotensión, taquicardia, fiebre y leucocitosis. A medida que se incrementa la gravedad, se desarrollan los signos de shock (ej, hipotermia, cianosis) y disfunción orgánica (oliguria, daño renal agudo, disminución del nivel de conciencia). La presentación es anodina de tal manera que muchas otras condiciones, como la pancreatitis o el síndrome de distrés agudo respiratorio (SDRA), pueden presentarse de manera similar (15).

Aunque los signos y síntomas de sepsis sean inespecíficos, se pueden clasificar en los propios de la infección responsable, los del síndrome séptico (incluidos los de hipoperfusión tisular) y los del fracaso orgánico (Tabla 1).

1.1.4. Diagnóstico

La limitación de las diferentes definiciones de sepsis es la no identificación de aquellos pacientes cuya disfunción orgánica sea verdaderamente secundaria a la infección subyacente. Por ello, el diagnóstico de sepsis y shock séptico requiere de datos clínicos, de laboratorio, radiológicos y microbiológicos.

Es necesario resaltar la importancia de la obtención de cultivos de diferentes orígenes, antes de iniciar el tratamiento antibiótico para intentar confirmar la infección, el agente patógeno responsable y su sensibilidad antibiótica. Sin embargo, sólo el 12-17% de los pacientes con sepsis y el 69% de los pacientes con shock séptico tienen hemocultivos positivos (14).

El diagnóstico diferencial comprende diferentes entidades como la pancreatitis aguda, shock cardiogénico, tromboembolia pulmonar, vasculitis sistémica, intoxicación medicamentosa, hipotermia inducida, fallo hepático fulminante, enfermedades vasculares del colágeno, etc.

1.1.5. Tratamiento

La guía clínica "*Surviving Sepsis Campaign Guidelines for Management of Sepsis and Septic Shock*", se desarrolló para el manejo de la sepsis grave y el shock séptico. Fue publicada por primera vez en 2004 (25) y posteriormente revisada cada 4 años (2008 (26), 2012 (27) y 2016 (28)), según la evidencia científica disponible hasta el momento.

En esta guía, se hace hincapié en que la sepsis y el shock séptico son emergencias médicas que requieren iniciar el tratamiento y la reanimación inmediatamente. La identificación temprana y la rapidez en el tratamiento inicial de la sepsis y mejora la supervivencia.

En la última revisión de 2016 (28), en relación a la reanimación esencial, una vez detectada una probable sepsis, se recomienda que comience de manera inmediata. Se recomienda, en caso de hipoperfusión, administrar 30 mL/kg de cristaloides dentro de las primeras 3 horas y mantener una PAM de 65 mmHg si se requiere vasopresores. Se recomienda reevaluar la situación hemodinámica mediante examen clínico completo y la evaluación de variables clínicas disponibles (frecuencia cardíaca, presión arterial, frecuencia respiratoria, saturación de oxígeno, diuresis) y medidas no invasivas (incluyendo la ecografía/ecocardiografía). Se sugiere la reanimación para conseguir la normalización de los niveles de lactado en caso de hipoperfusión tisular.

También se recomienda disponer de programas hospitalarios de mejora del desempeño para la sepsis, que incluya su detección sistémica en pacientes de riesgo elevado.

En relación con el diagnóstico, se recomienda la obtención de cultivos microbiológicos adecuados, incluyendo hemocultivos, antes de comenzar el tratamiento antibiótico en pacientes con sospecha de sepsis o shock séptico, si no conlleva retraso sustancial en el inicio del tratamiento antibiótico, cuyo plazo máximo es de una hora. Los hemocultivos apropiados incluyen al menos dos series (aeróbica y anaeróbica).

A fin de cubrir todos los patógenos probables, se recomienda un tratamiento empírico de amplio espectro con uno o más antibióticos. También se recomienda atender a las propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas a la hora de optimizar la dosificación

de los antibióticos. En caso de mejoría clínica o identificación del patógeno responsable, se recomienda la reducción gradual del mismo, cuya duración se sugiere sea en torno a 7-10 días para la mayoría de los casos.

En relación al control de la fuente, se recomienda intervenir sobre el mismo, para su control, tan pronto como clínica y logísticamente sea posible una vez realizado el diagnóstico.

En el apartado de tratamiento con líquidos, se recomienda el uso de cristaloides para la rehidratación inicial u posterior reemplazo del volumen intravascular. En cuanto a los medicamentos vasoactivos, se recomienda la norepinefrina como vasopresor de elección.

Se recomienda la transfusión de hematíes sólo cuando la concentración de hemoglobina (Hb) sea inferior a 7 g/dL en adultos.

Se recomienda la administración de insulina, cuando dos niveles de glucemia en sangre consecutivos sean superiores a 180 mg/dL.

En 2018, se publicó un paquete de medidas de tratamiento, basado en la actualización de la guía de 2016 (29), que se centran en la primera hora crítica. Se define paquete de medidas como grupo de intervenciones con los que se consiguen mejores resultados si se aplican de forma conjunta que si se hacen por separado. Los elementos del paquete destinados a iniciarse dentro de la primera hora (paquete *Hour-1*), se centran en cinco pasos de tratamiento:

1. Se debe medir el nivel de lactato en sangre. Si el valor inicial es elevado (superior a 2 mmol/L), se debe reevaluar dentro de las 6 primeras horas.
2. Obtener hemocultivos para identificar la causa de la infección antes de administrar la terapia antibiótica.
3. Administrar antibióticos de amplio espectro.
4. Administrar fluidos intravenosos. Se recomienda la administración de 30 mL/kg de cristaloides si hay hipotensión o si el nivel de lactato es superior a 4 mmol/L.
5. Administrar vasopresores para elevar la presión arterial para alcanzar una presión arterial media igual o superior a 65 mmHg.

Se define "tiempo cero" o "tiempo de presentación" como el momento del triaje en el servicio de urgencias o, si deriva desde otro lugar de cuidado, del primer registro consistente con sepsis o shock séptico.

Debido a la alta mortalidad y morbilidad asociada a la sepsis, se requieren nuevos tratamientos. En las últimas décadas, se ha avanzado considerablemente en la fisiopatología de la sepsis y, por tanto, en el conocimiento de los mediadores implicados en la misma que podrían actuar como potenciales dianas terapéuticas. Sin embargo, casi todos los ensayos clínicos aleatorios realizados no han podido demostrar una mejoría en la supervivencia, a pesar de haber demostrado su efectividad en estudios pre-clínicos (30).

Dentro de las razones que podrían explicar que los ensayos clínicos no hayan encontrado beneficios en relación con la supervivencia se encuentran en la elección de la intervención, de la duración y la dosificación, del resultado y de la población utilizados (31).

En conclusión, debido a la complejidad y heterogeneidad de la sepsis, los ensayos clínicos requieren de una mejor elección de pacientes y variables de valoración adicionales para desarrollar nuevas terapias (31).

1.2. METABOLISMO FOSFOCÁLCICO

El esqueleto es un órgano metabólicamente activo que sufre remodelación a lo largo de la vida. Esta remodelación es necesaria para mantener su estructura integral, así como para servir a las funciones metabólicas como almacén de fósforo y calcio. La remodelación esquelética puede ser estimulada por cambios en las fuerzas mecánicas o daño microscópico, así como por la respuesta hormonal a los cambios del calcio y el fósforo. El esqueleto también sirve como segunda defensa frente a la acidosis (32).

La principal función del metabolismo mineral o fosfocálcico es la regulación de los niveles plasmáticos de calcio y fosfato a través de la regulación de los procesos de absorción intestinal, metabolismo óseo y excreción renal y del control hormonal, este último ejercido fundamentalmente por la hormona paratiroidea (PTH), la 1,25-dihidroxitamina D o calcitriol ($1,25(\text{OH})_2 \text{D}$) y el factor de crecimiento fibroblástico 23 (FGF23). Participan además otras hormonas como el péptido relacionado con la PTH (PTHrp), calcitonina, hormonas tiroideas, esteroides sexuales, glucocorticoides, hormona de crecimiento, diversos factores de crecimiento y citocinas, aunque su papel fisiológico no está completamente esclarecido (33).

1.2.1. Calcio

1.2.1.1. Distribución del calcio

El calcio se localiza mayoritariamente en el hueso (99%), unos 1000 g en un adulto, en forma de hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}[\text{PO}_4]_6[\text{OH}]_2$). Quedando el 1% restante distribuido en los tejidos blandos y en el plasma. Además de su importancia en la mineralización del hueso, esta pequeña fracción de calcio tiene una gran importancia fisiológica, ya que actúa en funciones tan vitales como la coagulación sanguínea, la secreción hormonal, la actividad enzimática, la contracción muscular o la conducción nerviosa (34).

Para la normal realización de estas importantes funciones se precisan concentraciones muy estables de calcio que han de permanecer dentro de unos estrechos márgenes.

La regulación del calcio está mediada fundamentalmente por la PTH y la $1,25(\text{OH})_2 \text{D}$, hormona que regula la absorción intestinal del calcio (35-38).

El calcio circula en el torrente sanguíneo en diferentes formas. Aproximadamente, el 40% circula unido a la albúmina, un 15% formando complejos con otros iones como el citrato, el sulfato o el fosfato y el 45% restante circula como calcio iónico, que es la forma fisiológicamente activa (39).

En general, las modificaciones en la concentración de calcio total son proporcionales a la concentración de calcio iónico, excepto en pacientes con hipoalbuminemia, con trastornos ácido-base o con enfermedad renal crónica (CKD, del acrónimo en inglés *Chronic kidney disease*) (39).

1.2.1.2. Absorción intestinal

La absorción de calcio de la dieta en el intestino tiene lugar mayoritariamente en el duo-

deno y en el yeyuno proximal, a través de un mecanismo activo transcelular mediado por el canal receptor de catión de potencial transitorio subfamilia V, miembro 6 (TRPV6) en la membrana apical del duodeno y el yeyuno proximal (33) y a través del transporte paracelular que se produce a lo largo del intestino (40), fisiológicamente regulado por la $1,25(\text{OH})_2 \text{D}$.

En condiciones normales se absorbe aproximadamente un 30% del calcio dietético.

1.2.1.3. Calcio óseo

La mayor parte del calcio y del fósforo corporal, existe en el hueso como cristales de hidroxiapatita. El hueso actuaría, así como reservorio del calcio, participando en el mantenimiento de la homeostasis del calcio. Este proceso depende de la actividad de los osteoblastos y de los osteoclastos, que están regulados por varias hormonas y proteínas, incluyendo la PTH y la $1,25(\text{OH})_2 \text{D}$.

1.2.1.4. Manejo renal del calcio

Sólo el calcio ionizado se filtra por el glomérulo. Aproximadamente el 70% del calcio ultrafiltrado se reabsorbe pasivamente junto al sodio en el túbulo proximal (41).

Se estima que el 97-99% del calcio filtrado se reabsorbe en segmentos posteriores de la nefrona. Aproximadamente, un 20% es reabsorbido en el asa de Henle a través de un mecanismo pasivo paracelular mediado por la proteína Claudina 16, que actúa como un canal de reabsorción de cationes divalentes (42). La reabsorción del 10-15% de calcio restante ocurre, de forma activa, en el túbulo distal a través de un mecanismo transcelular (43), gracias al canal receptor de catión de potencial transitorio subfamilia V, miembro 5 (TRPV5) (33, 43-45), siendo el segmento donde se produce la mayor regulación de la excreción de calcio.

1.2.2. Fósforo

1.2.2.1. Distribución del fósforo

El fósforo en el organismo habitualmente se encuentra en combinación con el oxígeno, en forma de fosfato.

En el adulto, el contenido de fósforo es de aproximadamente 700g. Un 85% está presente en el esqueleto en forma de hidroxiapatita, formando el componente mineral del hueso. El resto se localiza en los tejidos blandos y en el líquido extracelular.

En la sangre, se encuentra tanto en forma de fosfato inorgánico como orgánico. El fosfato orgánico se encuentra principalmente en las células y el plasma contiene fundamentalmente fosfato inorgánico. Aproximadamente el 10% de fósforo en plasma se encuentra unido a proteínas. Se mide de manera habitual el fósforo inorgánico.

Numerosas funciones dependen del fósforo, como la producción y almacenamiento de energía, la secreción de hidrogeniones, en la formación de bicarbonato en los túbulos

renales. También es un componente fundamental de las membranas y ácidos nucleicos y actúa como cofactor en numerosas reacciones enzimáticas. El organismo requiere mantener la concentración de fósforo en niveles adecuados, si bien su regulación es menos estricta que para el calcio permitiendo oscilaciones más permisivas.

1.2.2.2. Absorción intestinal

Es similar a la descrita para el calcio. El 60-70% del fosfato de la dieta se absorbe en el intestino delgado, especialmente en el yeyuno, mediante vías dependientes e independientes del sodio, que pueden implicar a la vitamina D (34, 46).

1.2.2.3. Fósforo óseo

El hueso, como en el caso del calcio, es el principal depósito de fosfato del organismo. El uso de este reservorio para aumentar la concentración de fosfato plasmático es similar a la utilizada para aumentar el calcio plasmático, aunque otras hormonas como el FGF23 también pueden participar en la movilización del fosfato en el hueso.

1.2.2.4. Manejo renal del fósforo

En condiciones normales, aproximadamente un 85% del fosfato ultrafiltrable se reabsorbe en el túbulo proximal, mientras que el resto se elimina a través de la orina.

La reabsorción de fosfato en el túbulo proximal está mediada por tres proteínas de transporte separadas, cada una de las cuales depende del transporte de sodio concurrente: el cotransportador de fosfato de sodio de tipo IIa (denominado alternativamente Npt2a, NaPi-IIa o SLC34A1), el fosfato de sodio de tipo IIc cotransportador (también conocido como Npt2c, NaPi-IIc o SLC34A3), y el cotransportador de fosfato de sodio tipo III (llamado Pit-2, Ram-1 o SLC20A2 (47, 48).

Aunque la movilización ósea y la absorción intestinal participan en el balance general de los fosfatos, los niveles plasmáticos están regulados principalmente por la tasa de reabsorción en el túbulo proximal.

La reabsorción de fosfato depende de la ingesta dietética de fosfato, la concentración de fosfato sérico y la actividad de la PTH, la 1,25(OH)₂D y el FGF23, junto con su cofactor klotho (46). Así una dieta pobre en fosfato o niveles séricos disminuidos de fosfato dan lugar a un incremento en la reabsorción en el túbulo proximal. Por el contrario, la PTH y el FGF23, ambas hormonas fosfatúricas, provocan un aumento en la excreción de fosfato, dando lugar a una disminución en los niveles séricos de fósforo.

La hipocalcemia, principal responsable de la secreción de PTH, causa fosfaturia (49).

1.2.3. Control homeostático del calcio y fósforo. Regulación hormonal

Los niveles séricos de calcio y fósforo están regulados principalmente por la PTH, la vitamina D y el FGF23, mediante mecanismos con efectos inmediatos, a medio y a largo plazo.

Los inmediatos son mediados exclusivamente por la PTH y sirven para mantener los niveles de calcio dentro de los márgenes de normalidad a través de la reabsorción tubular renal y la reabsorción ósea. Además, la PTH también estimula la conversión de 25-hidroxivitamina D o calcidiol (25(OH) D) en 1,25(OH)₂ D, al activar la enzima 1- α -hidroxilasa en las células tubulares renales, estimulando así la absorción intestinal de calcio y el recambio óseo (50).

1.2.3.1. PTH

La PTH es un polipéptido de 84 aminoácidos sintetizado en la glándula paratiroides a partir de la pre-pro-PTH (polipéptido de 115 aminoácidos), que pasa primero a pro-PTH (90 aminoácidos) y de aquí a la hormona activa que es la PTH 1-84, denominada PTH intacta. La actividad biológica de la PTH intacta se encuentra en el extremo amino terminal de la misma. En este proceso de síntesis, también se forman otros péptidos como la PTH 7-84 y diversos fragmentos C-terminal, en mucha mayor proporción que la PTH intacta. La PTH intacta tiene una vida media de pocos minutos, al contrario que los fragmentos C terminal. En el hígado la PTH intacta es inactivada dando lugar a fragmentos C terminal que posteriormente son aclarados en el riñón. La PTH intacta no metabolizada en el hígado, es eliminada también a través del riñón (51).

En condiciones normales, las formas circulantes de la PTH comprenden (52):

- PTH intacta: 5-30%
- Fragmento C-terminal: 70-95%
- Fragmento amino-terminal: <1%

El calcio es el responsable, de forma precisa y rápida, de la regulación de la síntesis y secreción de la PTH, en todas sus formas moleculares (53), a través del receptor sensor sensible al calcio (CaSR) (54). En condiciones de normocalcemia, la PTH intacta constituye el 20% de las moléculas de PTH circulantes totales. En la hipocalcemia, esta proporción aumenta aproximadamente a un 33% y disminuye a un 4% en la hipercalcemia (53).

La PTH es secretada en respuesta a un descenso a los niveles de calcio iónico mediado por los CaSR situados en la superficie de las células paratiroides, en cuestión de segundos (55). La proteína de membrana sensora que media el proceso se conoce como CaSR (miembro de la superfamilia de receptores unidos a la proteína G), representa el mecanismo molecular a partir del cual las células paratiroides detectan cambios en la concentración sanguínea de calcio ionizado y modulan la secreción de PTH para mantener los niveles séricos de calcio dentro de un estrecho rango fisiológico. La CaSR modula la supresión de la secreción de PTH y la reabsorción renal de calcio en respuesta a un incremento de los niveles circulantes de calcio. Por el contrario, cuando los niveles de calcio disminuyen, la disminución de la actividad del CaSR en las glándulas paratiroides permite aumentar la secreción de PTH, que actúa en el hueso liberando calcio y fósforo (56). La CaSR también se expresa en otros tejidos calcitrópicos, como el riñón y el hueso (55).

La hiperfosfatemia estimula la secreción de PTH y el crecimiento celular en las paratiroides. Este estímulo tiene especial significación en la insuficiencia renal crónica, la causa más común de hiperfosfatemia, donde el hiperparatiroidismo secundario es la manifestación de la disregulación de la homeostasis fosfocálcica (57-59).

La $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ ejerce un efecto inhibitorio sobre la síntesis de la PTH y sobre la proliferación celular paratiroidea.

La FGF23 ejerce acciones directas sobre la glándula paratiroides inhibiendo la síntesis y secreción de PTH (60,61).

La PTH ejerce sus acciones a través de su unión con sus receptores. El receptor clásico de PTH es el receptor PTH1R, también denominado receptor PTH/PTHrp. Se expresa mayoritariamente en el hueso y riñón y reconoce tanto la PTH como a la PTHrp (62).

La PTH actúa de manera inmediata en el hueso y libera calcio al líquido extracelular, estimulando la liberación de calcio y también de fosfato mediante la activación de la resorción ósea, ya que se une a los receptores de PTH situados en los osteoblastos y secundariamente, dando lugar a un aumento en el número y en la actividad de los osteoclastos, que contribuyen a la resorción ósea (61). Además, en el riñón, la PTH favorece la síntesis de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ en el riñón al activar la enzima $1-\alpha$ -hidroxilasa, aumenta la reabsorción del calcio en túbulo contorneado distal y favorece la fosfaturia por acción directa sobre el riñón, inhibiendo la reabsorción en el túbulo proximal a la vez que indirectamente disminuye su reabsorción en el túbulo distal.

Actualmente, la PTH se mide mediante inmunoensayos automatizados tipo sándwich de diferentes generaciones. Estos ensayos utilizan diferentes anticuerpos contra la PTH que no sólo reconocen la PTH intacta, sino también fragmentos de PTH. Además, el proceso de estandarización de los ensayos de la PTH frente a un material de referencia estandarizado aún no está finalizado. La falta de estandarización contribuye a las diferencias en las concentraciones de PTH entre laboratorios incluso cuando se utiliza la misma generación de inmunoensayos (63).

1.2.3.2. Vitamina D

La $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ favorece la absorción intestinal de calcio y fósforo. El principal efecto de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ es favorecer la absorción intestinal de calcio mediante aumentando la expresión del receptor TRPV6 en la membrana apical y activando el transporte en la membrana basolateral.

En el hueso promueve la resorción ósea, movilizándolo tanto el calcio como el fósforo de su principal depósito corporal.

Además, participa en la regulación hormonal de los niveles de calcio, inhibiendo la síntesis de PTH, como se ha comentado anteriormente, actuando en la glándula paratiroides que dispone de receptores para la $1,25(\text{OH})_2\text{D}$, de forma que cuando sus concentraciones son elevadas disminuye la síntesis de PTH e inhibe la enzima $1-\alpha$ -hidroxilasa en el riñón, regulando su propia síntesis.

El metabolismo, el mecanismo de acción y las acciones no clásicas de la vitamina D se describen en el apartado 1.3.

1.2.3.3. Calcio

El calcio puede regular directamente, además de la PTH y la $1,25(\text{OH})_2\text{D}$, sus propios niveles plasmáticos, a través de los CaSR en todos los segmentos de la nefrona (64, 65).

1.2.3.4. FGF23

El FGF23 es un polipéptido circulante de 227 aminoácidos que desempeña un papel clave en el control de las concentraciones de fosfato sérico (66-68) y, por lo tanto, en la regulación del metabolismo mineral.

En condiciones fisiológicas, el FGF23 es secretado por los osteocitos y los osteoblastos óseos (69, 70) en respuesta al $1,25(\text{OH})_2\text{D}$, al aumento de la carga de fosfato en la dieta, la PTH y el calcio (67, 71-75). También se ha observado que la aldosterona, la deficiencia de hierro y las citoquinas proinflamatorias estimulan directa o indirectamente la secreción de FGF23 por los osteocitos y osteoblastos (70, 76-81). Sin embargo, en condiciones fisiopatológicas, otro tipo de células pueden secretar FGF23, como las células inmunes en procesos inflamatorios sistémicos (82) o los cardiomiocitos en enfermedades cardiovasculares (83, 84).

En las células tubulares proximales renales, el FGF23 se une al complejo formado por el receptor FGF (FGFR) y a su co-receptor, klotho, disminuyendo la expresión de los co-transportadores sodio-fosfato 2a y 2c (85, 86). El FGF23 también inhibe la expresión de la enzima 1-alfa-hidroxilasa en el túbulo proximal, lo que lleva a una disminución de la síntesis de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ en el riñón (87), aumenta la expresión de la enzima 24-hidroxilasa, dando lugar a un aumento del catabolismo de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ (85) e inhibe la síntesis de PTH en las glándulas paratiroides (88). Por lo tanto, el FGF23 aumenta directamente la excreción urinaria de fosfato y disminuye indirectamente la absorción intestinal de fosfato al disminuir la producción de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$. El efecto neto de ambas acciones hormonales es disminuir la concentración de fosfato sérico.

En el túbulo distal, aumenta la reabsorción de calcio y sodio aumentando la expresión del canal TRPV5 y del co-transportador sodio-cloro (89, 90). Además, el FGF23 disminuye la expresión de la enzima convertidora de angiotensina (ECA), dando lugar a una activación del sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) en el riñón.

El FGF23 presenta poca afinidad por la familia de receptores FGFRs. La proteína klotho, una proteína transmembrana, no se une directamente al FGF23, pero se requiere para la activación del receptor de FGF23 (91), aumentando la afinidad de unión del FGF23 a su receptor (86, 92).

El complejo FGFR/klotho se expresa en las glándulas paratiroides y en el riñón, principalmente en el túbulo distal mientras que el sitio principal de acción del FGF23 es el túbulo proximal (93). Este hecho no está totalmente esclarecido (94).

Los osteocitos también expresan klotho, que podría desempeñar un papel como potente regulador de la formación ósea y la masa ósea (91). Además, el FGF23 podría regular de forma paracrina/autocrina la mineralización ósea en los osteocitos sin requerir la presencia del co-receptor klotho (95).

Se han hallado concentraciones elevadas de FGF23 en diversas enfermedades genéticas como el raquitismo hipofosfático autosómico dominante, la osteomalacia inducida por tumor o la hipofosfatemia ligada al cromosoma X, que dan lugar a una alteración en el metabolismo óseo y mineral.

En pacientes con CKD, los niveles de FGF23 aumentan progresivamente a medida que la función renal empeora, incluso antes de que aumenten los niveles de PTH y fósforo (76,

96). Los niveles de FGF23 aumentan de 2 a 5 veces por encima del rango normal durante las etapas iniciales e intermedias de la CKD, pero pueden alcanzar niveles 1000 veces por encima de lo normal en la insuficiencia renal avanzada (96-98).

Numerosos estudios epidemiológicos muestran una fuerte asociación entre los niveles de FGF23 y la mortalidad en estos pacientes (99-103).

Además, los niveles de FGF23 se asocian con un mayor riesgo de enfermedad cardiovascular (104, 105) y mortalidad (99, 106) en pacientes con CKD y también en población general (107).

FGF23 se asocia con la inflamación y con niveles elevados de citoquinas proinflamatorias en pacientes con CKD (108), así como en cultivos animales y estudios in vitro. La CKD se asocia, a su vez, a una mayor susceptibilidad a infecciones. En un modelo animal, niveles elevados de FGF23, a través de un mecanismo independiente de klotho, son capaces de inhibir la activación de integrinas y de las quimiocinas activadoras de leucocitos en el endotelio (109). En cultivos de macrófagos peritoneales murinos, FGF23 estimula la secreción del TNF α (82). En ratones, ante un estímulo proinflamatorio sistémico, los macrófagos y las células dendríticas son capaces de secretar FGF23 (82).

De manera similar a la CKD, los niveles séricos de FGF23 aumentan rápidamente en presencia de daño renal aguda tanto en animales como en humanos. En un modelo murino de daño renal agudo inducida por ácido fólico, se observó un aumento significativo de FGF23 a la hora después de inyectar el ácido fólico y 2 horas antes del aumento de los niveles de fosfato (110).

Las acciones renales del FGF23 requieren de la presencia del co-receptor klotho, mientras que las posibles acciones en hueso, cardiomiocitos y sistema inmune no requerirían de la presencia del co-receptor.

En la Figura 2 se resume el control hormonal ejercido en el metabolismo fosfocálcico.

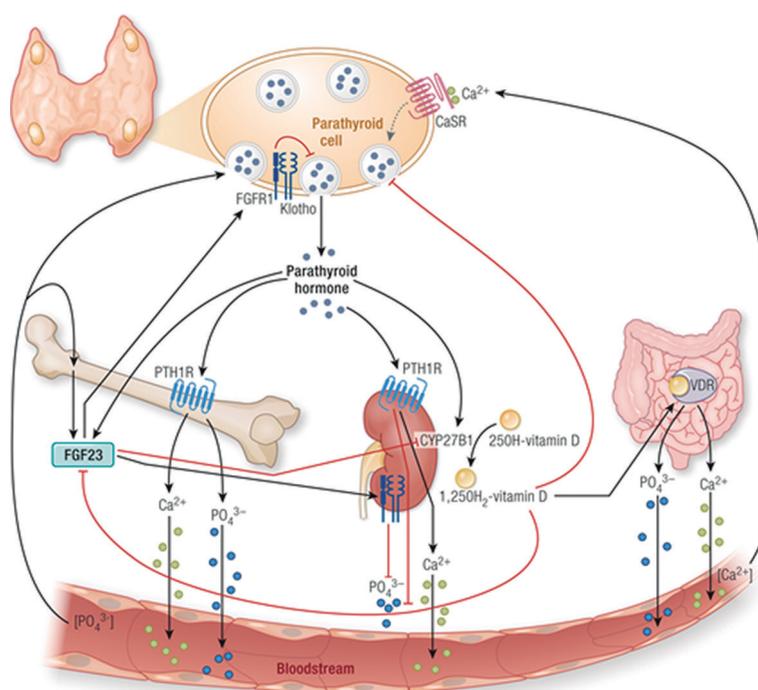


Figura 2. Resumen del metabolismo fosfocálcico. Tomado de: (63).

En cuanto a la metodología disponible para la determinación de FGF23, existen diferentes tipos de inmunoensayos. Unos detectan la FGF23 intacta y otros los fragmentos C terminales (cFGF23). Recientemente se han desarrollado inmunoensayos automatizados (111-113).

En la actualidad, no existe una armonización entre los diferentes ensayos debido al uso de diferentes anticuerpos y calibradores y también a la heterogeneidad entre la proteína intacta y el fragmento C-terminal.

1.2.3.5. Otros

El papel fisiológico de otras hormonas, como la calcitonina y los estrógenos, no está completamente esclarecida (34, 39).

1.2.4. Magnesio

1.2.4.1. Distribución del magnesio

El magnesio, es el cuarto catión más abundante, detrás del sodio, potasio y calcio, y es fundamentalmente intracelular (114). El magnesio tiene funciones importantes, como la señalización intracelular, actúa como cofactor en la síntesis de proteínas y ADN, la fosforilación oxidativa, el tono cardiovascular, la excitabilidad neuromuscular y la formación ósea (34).

En el adulto, el contenido corporal de magnesio es de aproximadamente 22,6 g. En el tejido óseo se encuentra aproximadamente un 70% y el resto en tejidos blandos. Sólo el 1% del magnesio corporal total circula en el plasma, del cual un 55% en forma libre, un 30% se asocia a proteínas principalmente la albúmina y un 15% a aniones como el citrato o el fosfato.

1.2.4.2. Absorción intestinal

La ingesta diaria de magnesio es de aproximadamente 360 mg. Un tercio se absorbe principalmente en el intestino delgado a través de un sistema de transporte saturable y difusión pasiva (115).

1.2.4.3. Magnesio óseo

El hueso es el principal reservorio del magnesio, aunque en menor proporción que el calcio y el fósforo. El líquido intersticial del tejido óseo, muy rico en minerales, puede tener un papel en la reposición del magnesio, como respuesta rápida frente a la acidosis, sin precisar mediación celular (114).

En el adulto sano, no hay ganancia o pérdida neta de magnesio en el hueso, por lo que el equilibrio se logra mediante la excreción urinaria del magnesio a través del riñón.

1.2.4.4. Manejo renal del magnesio

Aproximadamente el 80% del magnesio se filtra en el glomérulo. Entre un 15-25% del magnesio ultrafiltrable se reabsorbe pasivamente en el túbulo proximal y del 5 al 10% en el túbulo distal. El principal sitio de transporte del magnesio es la zona ascendente del asa de Henle, donde se reabsorbe entre un 60-70% del magnesio ultrafiltrable de manera pasiva por difusión paracelular gracias al gradiente eléctrico resultante de la reabsorción de cloruro de sodio (115). Dicha reabsorción podría estar mediada por dos proteínas, la Claudina-16 y la Claudina-19, ya que mutaciones en dichas proteínas dan lugar a la pérdida renal de magnesio (34, 116).

La reabsorción de magnesio en el asa de Henle se ve afectada por la concentración plasmática de magnesio, que es el principal regulador fisiológico de la excreción de magnesio en orina. Así las concentraciones elevadas de magnesio (y calcio) en sangre inhiben la reabsorción mientras que concentraciones disminuidas estimulan la reabsorción renal. Por otro lado, la hipercalcemia también inhibe la reabsorción de magnesio (y calcio), lo que da lugar a hipermagnesuria e hipercalciuria. La alcalosis metabólica estimula la reabsorción en el asa de Henle mientras que la acidosis metabólica, la hipotasemia y la hipofosfatemia la inhiben.

También existe reabsorción de magnesio en el túbulo contorneado distal a través de transporte transcelular, aunque el mecanismo no está totalmente esclarecido (115).

1.2.4.5. Regulación del magnesio

A diferencia de otros iones, el magnesio no está sometido a control hormonal. El magnesio óseo es el principal reservorio de magnesio. Debido a que el magnesio óseo no se intercambia fácilmente con el magnesio circulante, la concentración de magnesio en plasma disminuye rápidamente con un balance negativo de magnesio. Esto conduce a una reducción marcada en la excreción de magnesio, siempre que no se presente pérdida de magnesio en la orina. Por el contrario, no hay protección contra la hipermagnesemia en la insuficiencia renal.

1.3. LA VITAMINA D, PROTEINA TRANSPORTADORA DE VITAMINA D Y PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS

1.3.1. Fuentes de vitamina D

La vitamina D es una vitamina liposoluble que puede ser adquirida de manera exógena a través de los alimentos, de origen vegetal en forma de ergocalciferol (vitamina D2) y de origen animal como colecalciferol (vitamina D3), y de manera endógena, por síntesis cutánea por efecto de los rayos ultravioleta sobre el 7-dehidrocolesterol, siendo esta última la fuente principal. La vitamina D es el término general que abarca tanto a la vitamina D2 como a la D3. Las isoformas de la vitamina D sólo difieren en la estructura de su cadena lateral (Figura 3).

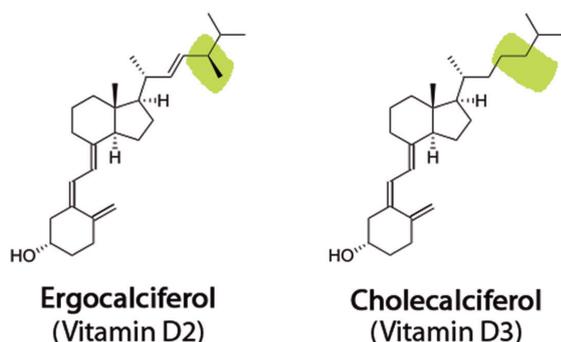


Figura 3. Estructura química de la vitamina D2 y D3.

Los mayores contenidos de vitamina D3 se encuentran en los pescados grasos (atún, caballa, sardina y salmón) y en los aceites de hígado de pescado, mientras que otros alimentos de origen animal, como el hígado de buey, el queso y la yema de huevo contienen pequeñas cantidades. La vitamina D2 se encuentra presente en cantidades variables en algunas setas y levaduras.

El estatus de la vitamina D, sin suplementación dietética, depende estrechamente de la producción endógena de vitamina D, la cual está influenciada por determinantes genéticos, latitud, estacionalidad, pigmentación de la piel, el uso de protectores solares y la manera de vestir (117-119).

1.3.2. Metabolismo de la vitamina D

La primera etapa de la síntesis endógena de la vitamina D se inicia en la dermis cuando la luz ultravioleta solar (longitud de onda entre 290-315 nm) cataliza la fotoconversión del 7-hidrocolesterol en previtamina D o precalciferol, la cual sufre en una segunda etapa, una isomerización química termodependiente, convirtiéndose en vitamina D3.

Este proceso fotoquímico ocurre en la membrana plasmática de las células de la piel. La previtamina D3 es termodinámicamente inestable, por lo que sufre en una segunda etapa, una isomerización química termodependiente, convirtiéndose lenta y progresivamente en vitamina D3. Aproximadamente el 50% de la previtamina D3 se convierte en vitamina D3 dentro de las primeras horas (120).

La exposición prolongada a la radiación solar no produce niveles tóxicos de vitamina D, ya que el exceso de luz solar convierte al precalciferol en dos metabolitos inactivos, el

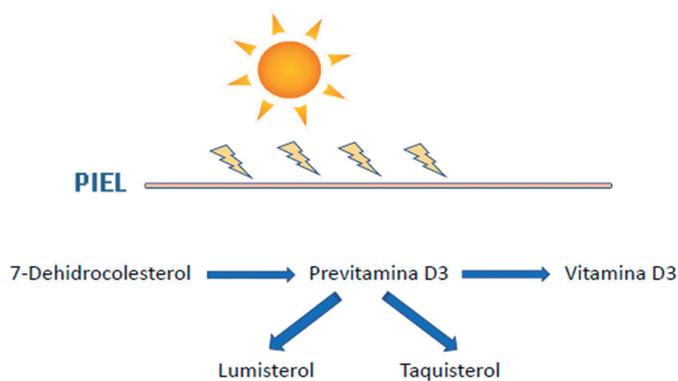


Figura 4. Fotobiogénesis de la vitamina D.

lumisterol y el taquisterol (Figura 4).

La síntesis de vitamina D, a igualdad en el tiempo de exposición a los rayos UVB varía enormemente de un individuo a otro, de tal manera, que los individuos de piel oscura necesitan tiempos de exposición más largos que los de piel clara, ya que la melanina de la piel absorbe la radiación UV, actuando como un protector natural.

El uso de protectores solares con índices de protección superiores a 10-15, para evitar el envejecimiento cutáneo y el riesgo de cáncer de piel, inhiben la síntesis de vitamina D.

La manera de vestir, bien por razones culturales o religiosas, también provoca una disminución en la síntesis endógena de vitamina D, incluso en países soleados.

Una vez sintetizada la vitamina D3, se transporta en sangre hasta el hígado mayoritariamente unida a la proteína transportadora de vitamina D (VDBP, del acrónimo en inglés *Vitamin D binding protein*), por la que posee una alta afinidad, y en menor proporción unida a la albúmina (10-15%), para iniciar su transformación metabólica. La VDBP constituye además el principal lugar de almacenamiento y de depósito de la 25(OH) D. Menos del 1% de la vitamina D circulante se encuentra de forma libre (121, 122).

La vitamina D (tanto en su forma D2 como en la D3) es biológicamente inactiva. Una vez absorbida o sintetizada en la piel se transporta al hígado, donde sufre una primera hidroxilación por la acción de la enzima 25-hidroxilasa, que forma parte de un sistema enzimático dependiente del citocromo P450 (CYP27A1), convirtiéndose en la 25(OH) D, que es la forma circulante más abundante de la vitamina D y puede considerarse como un índice fidedigno del estado de las reservas de vitamina en el organismo (123).

Existen múltiples 25-hidroxilasas, pero las más estudiadas son el CYP27A1 y el CYP2R1. El primero es de origen mitocondrial y el segundo es de origen microsomal. Se considera que el CYP2R1 es la 25-hidroxilasa más importante a la hora de mantener los niveles séricos de 25(OH) D (124, 125).

En el riñón, la 25(OH) D sufre una segunda hidroxilación, transformándose en el metabolito activo, la 1,25(OH)₂ D, por la acción de la enzima 1- α -hidroxilasa (CYP27B1). El CYP27B1 es la única 1- α -hidroxilasa conocida hasta el momento, se expresa en varios tejidos, pero principalmente en el riñón.

Finalmente, tanto el 25(OH) D como la 1,25(OH)₂ D mediante otro proceso de hidroxilación catalizada por la 24-hidroxilasa (CYP24A1) son metabólicamente inactivadas y secretadas por la bilis, limitando así su disponibilidad.

El CYP24A1 es la única 24-hidroxilasa conocida hasta el momento. Posee también actividad 23-hidroxilasa, así el producto de degradación de la ruta 24-hidroxilasa es el ácido calcitrico y el producto de degradación de la ruta 23-hidroxilasa es el 1,25(OH)₂ D-26,23 lactona (125).

Al contrario que el CYPB27B1, la actividad del CYP24A1 es inhibida por la PTH y estimulada por FGF23 en el riñón (125).

La síntesis renal de 1,25(OH)₂ D está regulada por diversas hormonas. Es estimulada principalmente por la PTH e inhibida por el FGF23 producido en los osteocitos y por la propia 1,25(OH)₂ D (125).

La síntesis extrarrenal de 1,25(OH)₂ D se produce en diversos tejidos, como la glándula paratiroides, queratinocitos y células inmunes (126,127). Por ejemplo, el CYP27B1 se expresa en las células T, activado por macrófagos y DC (128-130), permitiendo la formación de 1,25(OH)₂ D en las células inmunes.

La regulación extrarrenal del CYP27B1 estaría bajo el control de estímulos inmunes y no del circuito de retroalimentación clásico que implica a la PTH y el FGF23 (131). También se ha descrito actividad 25-hidroxilasa extrahepática, por detección del CYP27 RNAm en el hueso (132) y en leucocitos (133).

En la figura 5 se representa el metabolismo de la vitamina D.

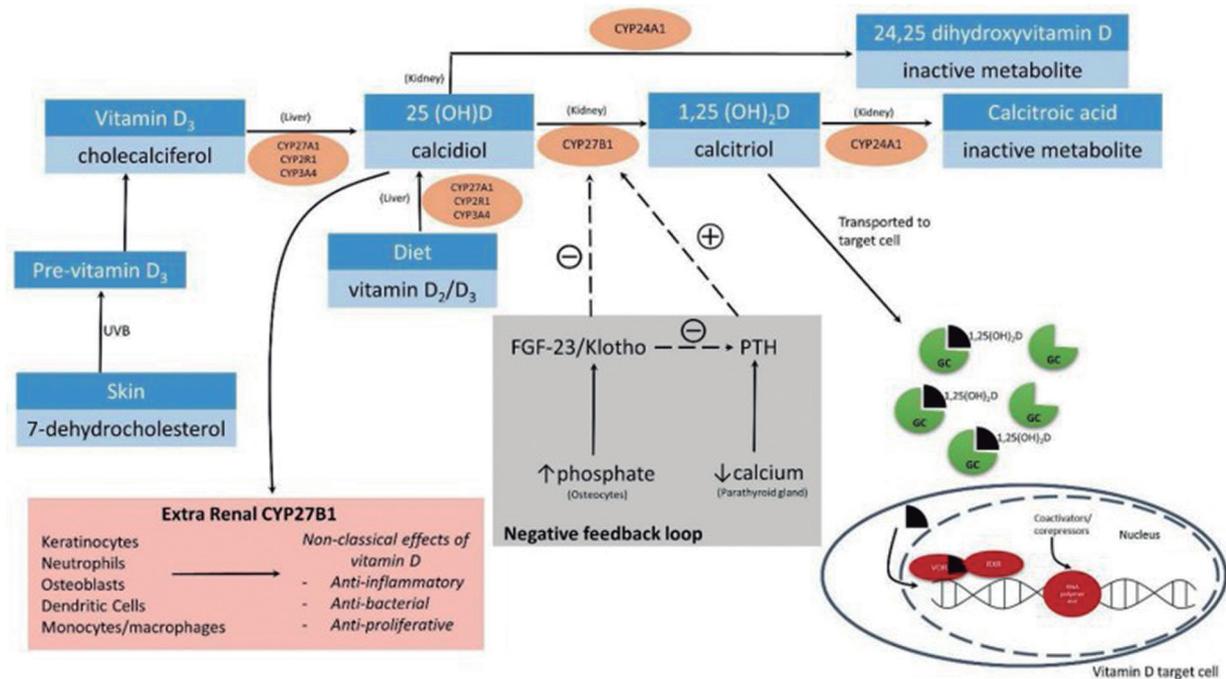


Figura 5. Metabolismo de la vitamina D. Tomado de: (131).

1.3.3. Mecanismo de acción de la vitamina D

Una vez que la $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ llega a la célula diana, se disocia de la VDBP y se transloca al núcleo, donde se une al receptor de vitamina D (VDR, del acrónimo en inglés *Vitamin D receptor*), el cual se ha encontrado en más de 36 tejidos (134, 135) (Tabla 4) y por el que presenta una alta afinidad y selectividad. El mecanismo de acción puede ser a través de la vía genómica o no genómica, siendo ejecutada por VDR nucleares (VDRn) o VDR de membrana (mVDR), respectivamente.

En la vía genómica, la unión del $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ con VDR induce la heterodimerización con el receptor del ácido retinoico (RXR, del acrónimo en inglés *Retinoid X receptor*). Este dímero es reconocido por secuencias específicas en las regiones promotoras, denominadas VDRE (del acrónimo en inglés, *Vitamin D responsive element*), de los genes diana de la vitamina D, siendo el resultado final una disminución o una activación de la transcripción de dichos genes (Figura 6). Existen aproximadamente 1000 genes con regiones promotoras modulables por la vitamina D, que se corresponde con aproximadamente el 10% de genoma (136, 137).

Aparato digestivo: intestino delgado, intestino grueso, hígado, páncreas, estómago

Riñón y vías urinarias: células epiteliales del túbulo proximal y distal, podocitos glomerulares, urotelio

Aparato respiratorio: células alveolares, bronquio

Sistema osteomuscular: osteoblastos, condrocitos, médula ósea

Sistema inmune: Linfocitos B y T, timo, monocitos, macrófagos, células dendríticas, bazo, ganglios linfáticos

Sistema endocrino: Tiroides, paratiroides, glándula pituitaria, glándula adrenal, tejido adiposo

Aparato reproductor: testículo, próstata, mama, ovario, placenta, útero

Piel: epidermis, fibroblastos, queratinocitos, melanocitos, folículos pilosos

Células tumorales

Tabla 4. Órganos y tejidos que expresan VDR. Adaptado de: (134, 135).

El receptor VDR es de localización intracelular y forma parte de la superfamilia de los receptores nucleares que actúa como un factor de transcripción ligando-dependiente de numerosos genes relacionados con la síntesis y secreción de PTH y otras proteínas relacionadas con el metabolismo mineral, el crecimiento y la diferenciación celular. El gen de la VDR se encuentra localizado en el cromosoma 12q13-14 y presenta múltiples polimorfismos, que van a influir en las acciones de la vitamina D en las células diana (138).

Mientras que la señalización genómica depende de las respuestas al nVDR, la señalización no genómica utiliza diferentes vías de transducción de señales y estaría mediada por mVDR situados en la membrana plasmática y en la membrana de las vesículas de las células diana. Esta vía no genómica podría estar mediada por la activación de segundos mensajeros, como la proteína quinasa C, el aumento intracelular de calcio, la modulación

de la fosfolipasa C y la de la adenilato ciclasa. Estas vías de señalización podrían asimismo contribuir a la modulación génica (139).

Así, a nivel sistémico, la vitamina D actúa como una hormona y sus acciones corren a cargo de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}$, con una afinidad para VDR aproximadamente 1000 veces mayor que la $25(\text{OH})\text{D}$. En la regulación a nivel paracrino y autocrino, intervendrían las enzimas $1\text{-}\alpha$ -hidroxilasa y 24 -hidroxilasa, la primera genera el metabolito activo y la segunda lo inactiva (134).

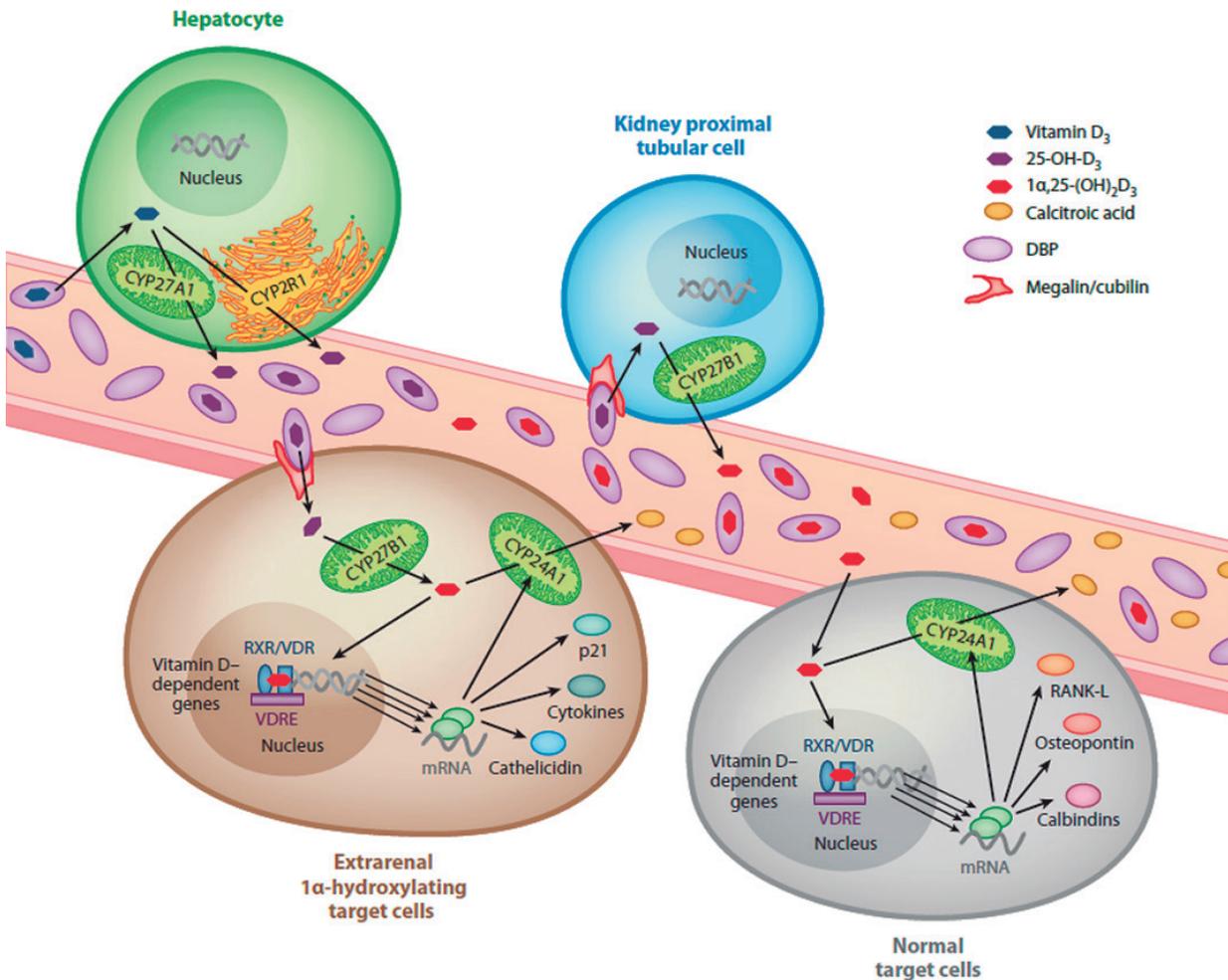


Figura 6. Mecanismo de acción de la vitamina D. Tomado de: (140).

1.3.4. Efectos biológicos de la vitamina D

Dentro de las acciones clásicas de la vitamina D se encuentran la regulación del metabolismo óseo y mineral. Así, en el intestino aumenta la absorción de calcio y fósforo, en el riñón regula la reabsorción de calcio y fósforo, así como la síntesis de $1,25(\text{OH})_2 \text{D}$. En el hueso interviene en la regulación del recambio óseo y en las glándulas paratiroides actúa inhibiendo la síntesis y secreción de PTH.

En otros tejidos, las acciones son múltiples, destacando sus efectos antiproliferativos, inductores de la diferenciación e inmunomoduladores.

En la Tabla 5 se resumen las principales acciones de la vitamina D:

Acciones esqueléticas de la vitamina D			
Protección esqueleto mineral	Activación osteoclastos	Apertura de canales de calcio	
Desarrollo y mantenimiento del esqueleto mineral, mediante la adecuada formación osteoblástica y resorción osteoclástica Prevención y tratamiento del hiperparatiroidismo secundario y enfermedad ósea de alto recambio	Maduración y activación de los osteoclastos mediada por los osteoblastos	Incrementa sus niveles intracelulares favoreciendo la movilidad y cambios conformacionales indispensables para una función osteoblástica adecuada	
Acciones esqueléticas de la vitamina D			
Protección renal	Protección cardiovascular	Control de inflamación sistémica	Regulación de apoptosis
Efectos antiproteinúricos	Inhibición SRAA	Inhibición Th1	Modulación de la expresión genética Aumento de calcio intracelular
Aumento de expresión de nefrina	Regulación ANP	Activación Th2	Apoptosis de células cancerígenas
Inactivación de NF- κ B (acción antiinflamatoria)	Inhibición proliferación células musculares lisas	Inducción de CD4+CD25+	
Inhibición de TACE	Disminución de la aterosclerosis y calcificación vascular	Inhibición del TNF α , ICAM1 y VCAM1	

Tabla 5. Acciones de la vitamina D. Tomado de: (141).

1.3.5. Proteína transportadora de vitamina D

La proteína transportadora de vitamina D (VDBP) es la responsable del transporte de todos los metabolitos de la vitamina D, con mayor afinidad por la 25(OH) D que por la 1,25(OH)₂ D. Por el contrario, el VDR tiene una afinidad más alta por la 1,25(OH)₂ D, el metabolito activo de la vitamina D, que por la 25(OH) D. En la mayoría de las especies, la afinidad de la VDBP es mayor por la vitamina D3 que por la vitamina D2 (142).

En 1959 fue identificada por primera vez mediante inmunolectroforesis el polimorfismo de la alfa-2-globulina humana que se denominó componente específico de grupo o Gc (143), pero no es hasta el año 1975 que se descubre su función como proteína transportadora de vitamina D (144).

1.3.5.1 Estructura del gen VDBP

El gen humano VDBP, que codifica VDBP, está localizado en el cromosoma 4q11-q13, formando parte de un clúster, que incluye a los genes de la albúmina y la alfafetoproteína (AFP). Consta de 13 exones y se expresa en muchos tejidos, principalmente en hígado, riñón, gónadas, tejido adiposo y neutrófilos (Figura 7) (142).

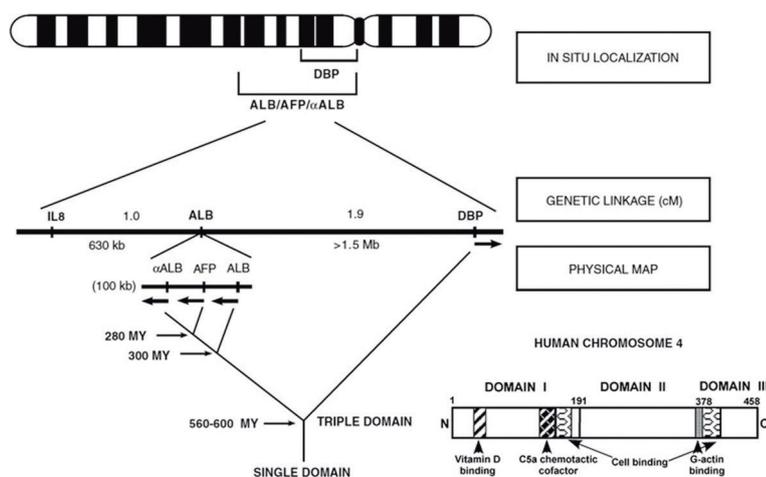


Figura 7. Estructura y árbol filogenético del clúster VDBP-albúmina-alfa-fetoproteína. Tomado de: (142).

El análisis genético muestra que el gen VDBP es el miembro más antiguo del clúster, mientras que la albúmina y la AFP son miembros más recientes (142). Diferentes publicaciones han descrito un cuarto gen de este clúster, denominado α -albúmina o afamina (145, 146). Existen evidencias de que la afamina es capaz de unirse y transportar a la vitamina E (147) y que puede actuar como quimiocina en los osteoblastos cuando es secretada por los osteoclastos (148).

El gen VDBP presenta un elevado polimorfismo. Dos polimorfismos de un solo nucleótido, (rs7041 y rs4588), dan lugar a 3 alelos comunes (GC1F, GC1S y GC2), que presentan diferencias en la movilidad mediante isoelectroenfoque. La isoforma GC1F avanza más rápido que la isoforma GC1S en este tipo de electroforesis. Además, se han identificado más de 120 variantes raras descritas en todo el mundo. La distribución geográfica de estas variantes suele corresponderse a migraciones de población, siendo, por tanto, obje-

to de interés antropológico. Estas variantes raras suelen determinarse por secuenciación de exones amplificados por PCR (142). Los alelos comunes y su diferente composición de aminoácidos se muestran en la Tabla 6.

Codon	Alelo			SNP
	GC1F	GC1S	GC2	
416	Ácido aspártico	Ácido glutámico	Ácido aspártico	rs7041
420	Treonina	Treonina	Lisina	rs4588

Tabla 6. Variación genética de los diferentes alelos de la VDBP

Estos tres alelos comunes presentan una distribución geográfica distinta. La frecuencia del alelo GC1F es muy elevada en población de ascendencia africana, mientras que la población de origen caucásico presenta una mayor frecuencia del alelo GC1S y, además, una mayor frecuencia del alelo GC2 con respecto a las demás razas (149).

Estos polimorfismos podrían afectar a las diferentes funciones de la proteína y a su capacidad de unión a la vitamina D, explicando parcialmente las diferencias raciales y geográficas que presentan dichos alelos, aunque a día de hoy no hay estudios concluyentes.

Diferentes estudios han relacionado la presencia de polimorfismos en el gen VDBP en correlación con ciertas enfermedades, como cáncer, diabetes, enfermedades autoinmunes, asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), tuberculosis, entre otras (150). Por lo que, las variantes genéticas en el gen VDBP podrían ser un factor de riesgo significativo en dichas enfermedades. En la EPOC, los polimorfismos de la VDBP podrían afectar a la progresión de la EPOC, alterando los niveles de 25(OH) D y modulando los efectos directos de la VDBP sobre la inflamación pulmonar (151). Una reciente revisión sistemática y metaanálisis, concluyó que el alelo GC1F supone un riesgo genético significativo de EPOC entre la raza asiática (152).

El polimorfismo de la VDBP sí influye en los niveles séricos de 25(OH) D, aunque el efecto es muy pequeño, como máximo podría explicar el 5% de la variación total de los niveles séricos de 25(OH) D. También podría afectar a la medición sérica de la propia proteína, tanto por inmunoensayo como por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS) (153).

1.3.5.2 Estructura de la proteína VDBP

La VDBP es una alfa-2-globulina polimérfica formada por una sola cadena polipeptídica de aproximadamente 58 kDa de tamaño, dependiendo de su estado de glicosilación.

La VDBP presenta una estructura α -helicoidal formada por tres dominios estructuralmente similares, de forma similar a la albúmina. Se postuló que la VDBP junto con los demás miembros del clúster, evolucionaron a partir de un único progenitor que surgió de la triple repetición de una secuencia de 192 aminoácidos (154), de tal manera, que esta estructura de tres dominios se ha conservado en la VDBP.

Los tres dominios de la VDBP adoptan una forma peculiar, tal como se observa en la

Figura 8, que permiten su unión a la vitamina D y a la actina. A través de las hélices 1-6 del dominio I se une a los diferentes metabolitos de la vitamina D (155).

A pesar de la similitud de secuencia, la única función que la VDBP comparte con el resto de los miembros del clúster es su capacidad de unión a ácidos grasos (156, 157).

El sitio de unión a la vitamina D está formado mayoritariamente por residuos hidrofóbicos, que permiten interactuar favorablemente con la 25(OH) D. La formación de enlaces de hidrógeno permite estabilizar dicha unión. La VDBP presenta una elevada afinidad por la 25(OH) D, mientras que la afinidad por la 1,25 (OH)₂ D es de 10 a 100 veces menor. Este modelo permitiría explicar la menor afinidad de la VDBP por la 1,25 (OH)₂ D, ya que al presentar un grupo hidroxilo adicional, provoca un cambio estructural molecular, que dificulta su unión a la VDBP (142).

La VDBP, al igual que la albúmina y otras proteínas, se produce mayoritariamente en el hígado. Así que enfermedades hepáticas, como la cirrosis o el fallo hepático agudo, se asocian a una disminución de VDBP y de albúmina, dando lugar a una disminución de la concentración sérica de vitamina D total. La VDBP se ha encontrado en plasma, líquido ascítico, líquido cefalorraquídeo y en la superficie de muchos tipos de células.

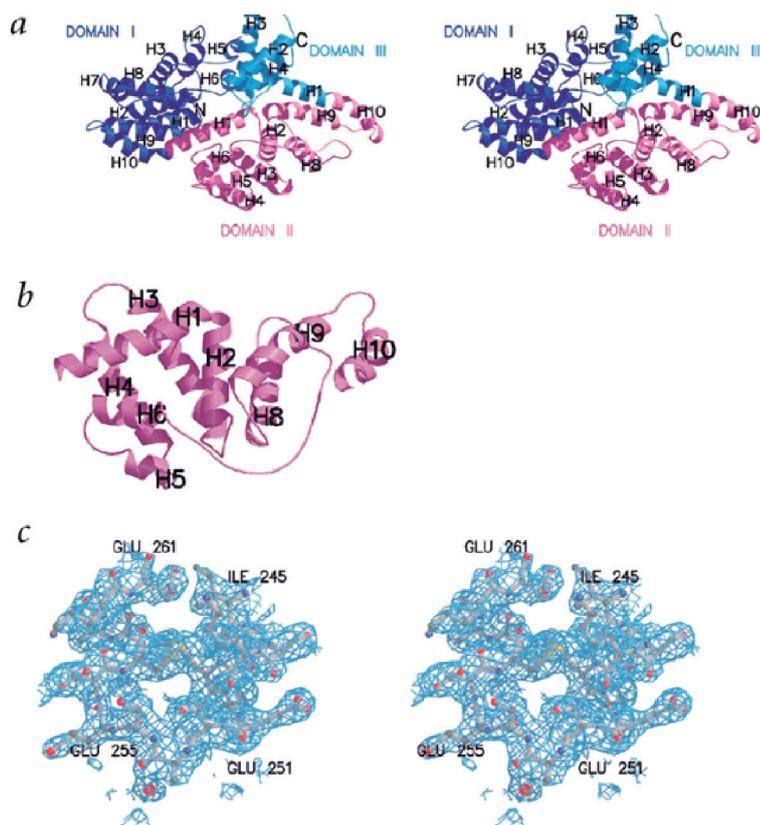


Figura 8. Estructura tridimensional de la VDBP. Tomado de: (155).

La síntesis hepática de VDBP está regulada por hormonas sexuales esteroideas, especialmente estrógenos, que estimulan la síntesis hepática de VDBP. Las mujeres postmenopáusicas, con niveles bajos de estrógenos, presentan las concentraciones más bajas de VDBP, mientras que mujeres premenopáusicas que toman anticonceptivos orales presentan niveles altos de VDBP y, por tanto, de vitamina D total. Durante el embarazo, también se incrementan las concentraciones de VDBP y vitamina D total (158).

La VDBP es filtrada a través del glomérulo y recaptada por la megalina en el túbulo proximal. Enfermedades renales asociadas a daño tubular, especialmente el síndrome nefrótico, provocan que la vitamina D unida a la VDBP no sea recaptada y sea eliminada a través de la orina afectando, por tanto, a la concentración total de vitamina D (122).

Las células epiteliales situadas en el túbulo proximal renal expresan tanto la megalina como la cubilina, que facilitan la entrada del complejo 25(OH) D-VDBP dentro de la célula. Una vez internalizado, mediante endocitosis mediada por la megalina, la 25(OH) D se disocia de la VDBP y puede ser metabolizada en su forma libre biológicamente activa (159) (Figura 9). La megalina también se expresa en otras células, como la placenta, las glándulas mamarias y paratiroides, las cuales presentan actividad 1- α -hidroxilasa extra-renal. Sin embargo, el significado funcional de estos hallazgos aún no está totalmente esclarecido (160).

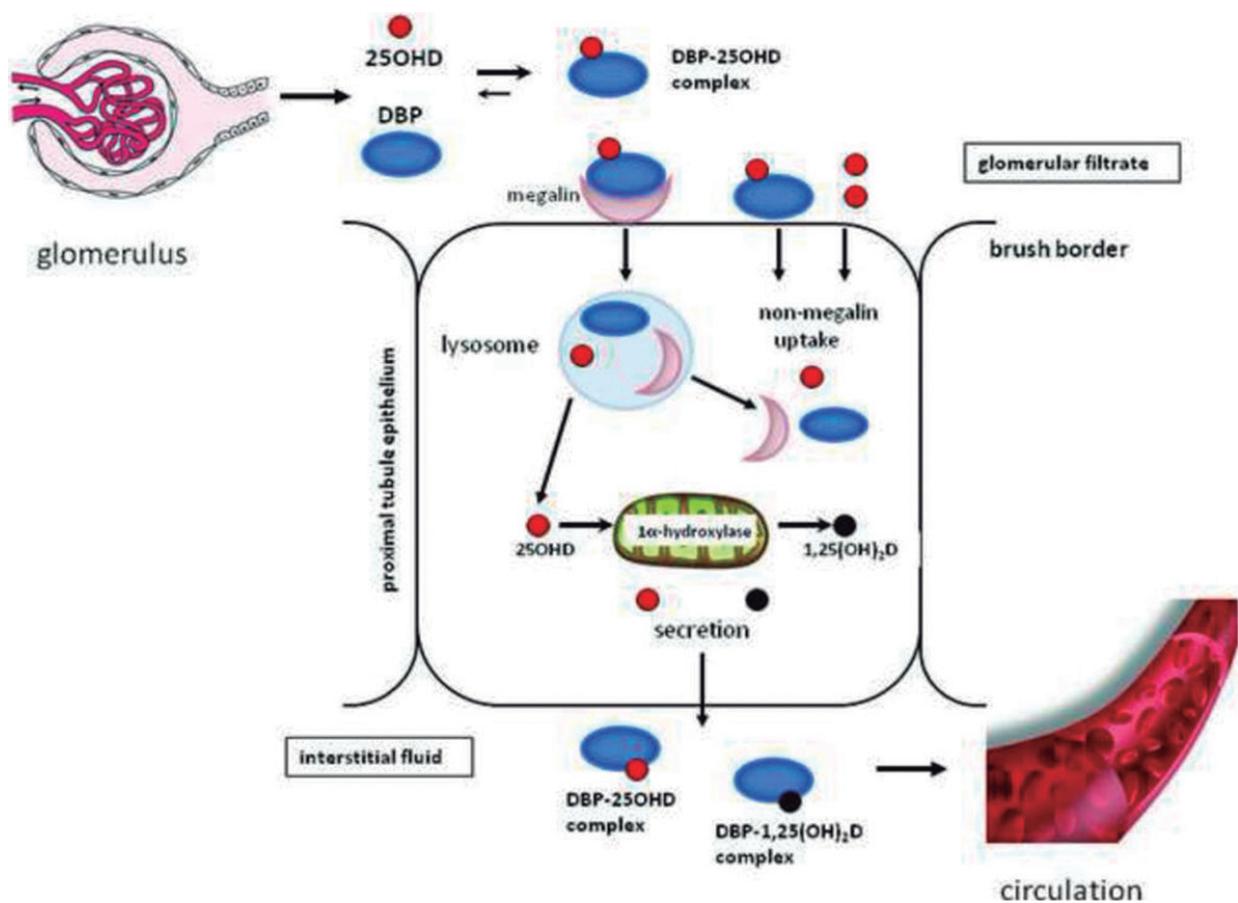


Figura 9. Megalina y captación de 25(OH) D en el riñón. Tomado de: (122).

1.3.5.3. Funciones de la VDBP

Dentro de las funciones de la VDBP, se encuentran:

a) Transporte de Vitamina D

La VDBP es la principal proteína de transporte de la vitamina D (90%), mientras que la albúmina transporta una pequeña fracción (5-10%), a pesar de que su concentración sérica sea mucho más elevada que la de la VDBP.

La hipótesis de la hormona libre postula que la fracción libre de la hormona es la única capaz de ejercer sus efectos fisiológicos en los tejidos diana mientras las hormonas unidas a proteínas son biológicamente inactivas (122).

Esta hipótesis se puede aplicar a las moléculas lipofílicas, como la 25(OH) D, en aquellas células que presentan el sistema de transporte megalina/cubilina. Así, la unión de la 25(OH) D a la VDBP, protege a la 25(OH) D de su biodegradación, ya que limita su acceso a las células diana, dificulta la acción de la 1- α -hidroxilasa y facilita la reabsorción renal de la vitamina D (122).

b) Papel de la VDBP en los procesos inflamatorios y en el sistema inmune

La VDBP tiene función antiinflamatoria e inmunomoduladora, ya que previene la aparición de eventos tromboembólicos debido a la liberación de actina, protege al complemento 5a (C5a) de su degradación, participa en la estimulación de la quimiotaxis de los neutrófilos y en la activación y estimulación de la actividad fagocítica de los macrófagos (161-163).

La quimiotaxis es la migración direccional de las células vivas, como los neutrófilos, los macrófagos y los linfocitos, en respuesta a una señal extracelular, generalmente en forma de gradiente de concentración. *In vitro*, la quimiotaxis de los neutrófilos estimulada por el complemento 5a se potencia en presencia de VDBP, aunque se desconoce el mecanismo de acción (164-168).

c) Depurador de actina

Lesiones celulares graves causadas por trauma, shock, sepsis o necrosis hepática fulminante, provocan la liberación de grandes cantidades de actina a la circulación sanguínea, que provocan un aumento de la viscosidad sanguínea (169) así como la formación de coágulos por su capacidad de agregación plaquetar (170).

La VDBP presenta un sitio de unión a la actina, actuando como depurador o "scavenger" de la actina liberada por las células necróticas. Desempeñando un papel esencial en el aclaramiento de los filamentos de actina de la circulación sanguínea, junto con otra proteína, denominada gelsolina, cuya función es cortar los filamentos de actina, dando lugar a la actina monomérica (actina G), la cual se une a la VDBP. Posteriormente, el complejo VDBP-actina formado es finalmente aclarado a través del riñón.

La unión de la VDBP-actina no obstaculiza la unión de la VDBP a la vitamina D.

1.3.5.4 Metodología disponible para la determinación de VDBP sérica

Con relación a la metodología disponible para la cuantificación de VDBP, existen varios métodos en el mercado: inmunodifusión radial, nefelometría, ELISA manuales y más recientemente, espectrometría de masas.

En cuanto a los inmunoensayos ELISA, son de tipo sándwich que tanto usan anticuerpos monoclonales como policlonales. Los anticuerpos policlonales son capaces de detectar las diferentes isoformas o epítomos de la VDPB mientras que los monoclonales sólo reconocen un solo epítomo.

En 2015, Hoofnagle et al. (171) y Nielson et al. (172) desarrollaron un método basado en la LC-MS/MS. Las concentraciones obtenidas eran reproducibles con las obtenidas con los inmunoensayos policlonales (171, 172), aunque la instrumentación es costosa y requiere personal especializado.

Nielson et al. obtuvieron los siguientes resultados en la determinación de VDBP usando 4 métodos diferentes: (a) ELISA basado en anticuerpos monoclonales, (b) inmunodifusión radial con anticuerpos policlonales, (c) dos ELISA diferentes basados en anticuerpos policlonales. La concentración de VDBP en negros americanos eran un 54% menor usando el ELISA monoclonal comparado con el obtenido en caucásicos, obteniéndose una vitamina D libre calculada significativamente más elevada. Mientras que las diferencias fueron mínimas en la concentración de VDBP usando los tres ensayos policlonales y significativamente menores de niveles de vitamina D libre calculada (172).

1.3.6. Estado de la vitamina D

Existe un amplio consenso en que el mejor marcador para evaluar el estado de la vitamina D es la medición sérica de 25(OH) D (173-175). Este consenso se basa en que (176, 177):

- La 25(OH) D refleja tanto la síntesis cutánea por exposición solar como la ingesta dietética.
- Su síntesis no está regulada hormonalmente, dependiendo principalmente de la disponibilidad de vitamina D.
- La 25(OH) D es un metabolito estable, cuya vida media es de 2-3 semanas, mientras que la vida media de la 1,25(OH)₂ D es de 4 horas.
- Refleja tanto la función endocrina como paracrina, ya que la producción en los tejidos extra-renales de la 1,25(OH)₂ D es dependiente de los niveles circulantes de 25(OH) D.

La 1,25(OH)₂ D, aun siendo la forma biológicamente activa de la vitamina D, no se considera un buen marcador del estado de la vitamina D, debido a que su vida media es muy corta (de 4 a 6 horas), a que su concentración sérica es mucho menor que la de la 25(OH) D y a su naturaleza lipofílica, por lo que su medición es más difícil. Su concentración sólo disminuye cuando la deficiencia de vitamina D es severa y, por último, su concentración está directamente influenciada por el calcio, la PTH, la prolactina, las prostanglandinas, el estradiol, la testosterona, bifosfonatos, corticosteroides, ketoconazol, heparina y diuréticos tiazídicos (176, 177). Sin embargo, su medición es útil en:

- Hipercalcemia de origen desconocido, con sospecha de enfermedad granulomatosa como la sarcoidosis o linfoma.
- Sospecha de raquitismo genético.
- Sospecha de osteomalacia inducida por tumor.
- Nefrolitiasis o hipercalciuria.

Aunque la medición sérica de 25(OH) D se considera el mejor marcador del estado de la vitamina D, cuestiones metodológicas limitan la comparación entre estudios y el establecimiento de puntos de corte para definir la hipovitaminosis D, sobre todo de estudios no recientes (176, 178).

1.3.6.1. Metodología disponible

La determinación de 25(OH) D no resulta fácil debido a sus propiedades hidrofóbicas y a su elevada afinidad a la VDBP, por lo que es susceptible a interferencias por efectos de matriz, siendo los métodos inmunológicos más susceptibles a este tipo de interferencias que los métodos cromatográficos.

Actualmente los inmunoensayos automatizados constituyen el principal método de medida en la mayoría de los laboratorios, aunque los métodos por LC-MS/MS están siendo cada vez más utilizados.

El método por LC-MS/MS es considerado como el de referencia o "gold standard" para la cuantificación de 25(OH) D.

La existencia de una gran variabilidad entre ensayos e interlaboratorio ha sido ampliamente reconocida, habiendo sido un aspecto fundamental la falta de un estándar de referencia para 25(OH) D (179-181). En 2013, el *National Institute of Standards and Technology* (NIST) empezó a comercializar el material de referencia estándar certificado (SRM), SRM 972a, para 25(OH) D (182), lo que ha permitido la evolución hacia la estandarización de estos ensayos y la posibilidad de aplicar un control de calidad externo.

La participación en un programa de control externo de calidad representa una forma excelente de evaluar la variabilidad intra e intermétodos, siendo el programa DEQAS (*Vitamin D External Quality Assessment Scheme*), el más utilizado con aproximadamente 1300 participantes en todo el mundo.

La disponibilidad de materiales de referencia, así como la participación en programas de control de calidad constituye un aspecto fundamental para disminuir la variabilidad metodológica e interlaboratorio, proporcionando un aumento de la fiabilidad de los resultados (176).

1.3.6.2. Valores de referencia y objetivos de salud

Hay que tener en cuenta que la vitamina D presenta una elevada variabilidad intra e interindividual. La exposición solar, principal fuente de vitamina D, depende de una serie de factores como la pigmentación de la piel, la edad, la estacionalidad, la latitud, la vestimenta, la institucionalización, así como el uso de protectores o pantallas solares, la concentración de VDBP y el índice de masa corporal. Existen evidencias de que las

personas obesas presentan insuficiencia de la vitamina D. la obesidad no afecta a la capacidad de síntesis de vitamina D por la piel, sino que altera la liberación de la vitamina D a la circulación, ya que la grasa corporal secuestra a la vitamina D, al tratarse de una vitamina liposoluble.

La variabilidad interindividual puede ser explicada, en parte, debido a la existencia de polimorfismos de diversos genes implicados en el metabolismo de la vitamina D. Los polimorfismos en la enzima 7-dehidrocolesterol reductasa de la piel, las 25-hidroxilidasas (CYP27A1 y CYP2R1), el CYP27B1, el CYP24A1, la VDBP y en el VDR están asociados de forma significativa con los niveles de 25(OH) D (177).

Existe controversia sobre el punto de corte para definir el estatus de vitamina D en base a los valores de 25(OH) D.

El grupo de la *Endocrine Society* propone que la deficiencia de vitamina D corresponde a concentraciones de 25(OH) D inferiores a 20 ng/mL (50 nmol/L), la insuficiencia a concentraciones de 20 a 29.9 ng/mL (52-72 nmol/L) y la suficiencia a concentraciones superiores a 30 ng/mL (75 nmol/L) (182), y el comité del *Institute of Medicine* (IOM), considera un valor inferior a 20 ng/mL (50 nmol/L) como un indicador de insuficiencia de la vitamina D (183).

Las principales discrepancias entre la IOM y la *Endocrine Society* se refieren a punto de corte de salud general. Las recomendaciones de la IOM son para garantizar la salud esquelética y sugiere que no hay nivel de evidencia suficiente para hacer recomendaciones de los posibles beneficios no esqueléticos (184), mientras que la *Endocrine Society* considera que niveles séricos de 25(OH) D superiores a 30 ng/mL proporcionan mayores beneficios para la salud en general comparados con los valores de 20 ng/mL.

La Sociedad Española de Investigación Ósea y del Metabolismo Mineral (SEIOMM) considera que los niveles óptimos de vitamina D deben estar entre 30 y 75 ng/ml, y que son claramente patológicos niveles inferiores a 20 ng/ml (185).

En la actualidad, muchos grupos usan los siguientes valores para definir el estatus de la vitamina D en adultos según las recomendaciones de la *Third International Conference on Controversies in Vitamin D*, celebrada en 2019 (186).

- La suficiencia de vitamina D corresponde con concentraciones de 25(OH) D superiores a 20 ng/mL (50 nmol/L).
- La insuficiencia de vitamina D corresponde a concentraciones de 25(OH) D entre 12-20 ng/mL (30-50 nmol/L).
- La deficiencia de vitamina D corresponde a concentraciones de 25(OH) D inferiores a 12 ng/mL (30 nmol/L).
- Por último, se define toxicidad por vitamina D como aquellos valores de 25(OH) D superiores a 100 ng/mL (> 250 nmol/L).

Recientemente, para la *European Calcified Tissue Society Working Group*, la deficiencia de vitamina D se define como niveles séricos de 25(OH) D inferiores a 20 ng/mL y la deficiencia severa con niveles inferiores a 12 ng/mL (187).

La deficiencia severa de vitamina D, definida como valores de 25(OH) D inferiores a 12 ng/mL (25 nmol/L), es muy común en numerosos países desarrollados. En Europa, según

diferentes estudios, se ha reportado prevalencia de deficiencia severa en un rango entre el 4,6 al 61,4% (187, 188). Mientras, la insuficiencia definida como valores de 25(OH) D, entre 12-20 ng/mL, afectaría a casi un 25% de la población mundial (189, 190).

En resumen, no existe un punto de corte aceptado por todos los expertos para definir la deficiencia de vitamina D (177, 191, 192).

1.3.6.3. Vitamina D libre

La mayoría de la vitamina D circula mayoritariamente unida a la VDBP (85%) y en, menor proporción y con menor afinidad, unida a la albúmina (10-15%). Menos del 1% de la vitamina D circula en su forma libre. En total, más del 99% de las diferentes formas de vitamina D se encuentran unidas bien a la VDBP o a la albúmina.

La vitamina D total medida es la suma de estas tres formas: libre, biodisponible y unida a la VDBP (Figura 10).

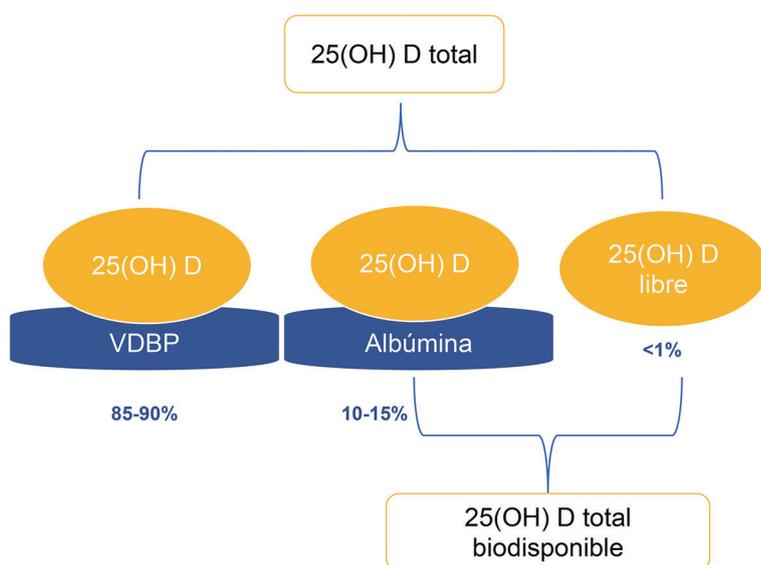


Figura 10. Vitamina D total, libre y biodisponible.

Los niveles de vitamina D libre se mantienen relativamente estables mientras que las concentraciones de 25(OH) D y 1,25(OH)₂ D, incluso en individuos sanos, pueden variar sustancialmente, ya que dependen directamente de los niveles de VDBP, que pueden fluctuar hasta 10 veces (158).

Los niveles de 25(OH) D libre pueden medirse directamente utilizando un inmunoensayo manual tipo ELISA o ser calculada a partir de una fórmula sugerida por Bickle et al. en 1986 (193) y que utiliza las concentraciones de 25(OH) D total, VDBP y albúmina.

$$\text{Vitamina D libre} = \frac{\text{Vitamina D total}}{1 + (K_{\text{alb}} \times \text{albúmina}) + (K_{\text{VDBP}} \times \text{VDBP})}$$

donde la concentración para vitamina D libre, la vitamina D total, la albúmina y la VDBP se miden en mol/L. Para la 25(OH) D, la constante de afinidad entre la vitamina D y la

albúmina, $K_{\text{alb}}=6 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ y la constante de afinidad entre la vitamina D y la VDBP, $K_{\text{VDBP}}=7 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$.

La vitamina D libre calculada va a depender, por un lado, de la constante de afinidad de la VDBP, la cual puede variar tanto en condiciones fisiológicas como patológicas (178, 194-196) y, por otro lado, de los ensayos utilizados para la cuantificación de la VDBP. Los valores obtenidos de vitamina D libre calculada sobreestiman los obtenidos directamente, especialmente si se utilizan ensayos monoclonales para la determinación de VDBP (171, 178), particularmente en cohortes multi-étnicas.

La determinación directa de la vitamina D libre no está afectada por los factores que limitan la fórmula de la vitamina D calculada. Sin embargo, hay que tener en cuenta que el ensayo directo presenta una menor afinidad por la vitamina D₂ comparada con la vitamina D₃, que puede dar lugar a una infravaloración de la vitamina D libre (197, 198).

Tsuprykov et al., en una revisión de la 25(OH) D tanto libre como biodisponible, concluyeron que la vitamina D libre correlaciona mejor en determinadas patologías, como enfermedades hepáticas, de riñón, cáncer, enfermedades alérgicas, así como en el embarazo que la vitamina D total (158).

Bikle et al., en otra revisión, concluye que, en determinadas enfermedades, como la cirrosis, así como en ancianos con múltiples comorbilidades, en las que la VDBP y la albúmina están reducidas, así como en el último trimestre de embarazo, la medición de vitamina D libre podría ser mejor marcador del estado de la vitamina D (199), aunque actualmente no existe un posicionamiento al respecto de las diferentes sociedades científicas ni tampoco existe un consenso en cuanto a valores de referencia.

1.3.7. Papel de la vitamina D en el sistema inmune

1.3.7.1. Inmunidad innata

El sistema inmunitario innato actúa como primera línea de defensa frente a microorganismos patógenos. Las células natural killer (NK), las células T natural killer (NKT), las células linfoides innatas (ILC), los macrófagos, las DC, los eosinófilos, los neutrófilos y los basófilos, así como citoquinas, quimiocinas y péptidos antimicrobianos (AMPs) que en conjunto generan respuestas inespecíficas constituyendo nuestra inmunidad innata o natural.

En 1986, Rook et al. describieron que la $1,25(\text{OH})_2 \text{ D}$ inhibía el crecimiento de *Mycobacterium tuberculosis* en macrófagos humanos in vitro (200). Dos décadas después se observó que el TLR reconoce al patógeno y activa una cascada intracelular de señalización que lleva a la producción de citoquinas y AMPs (201). Paralelamente se describió que la vitamina D inducía la síntesis de determinados AMPs, para disminuir la inflamación excesiva e inhibir la síntesis de citoquinas proinflamatorias (202, 203), a través de VDRE presentes en la región promotora de genes que codifican los AMPs humanos, la catelicidina (hCAP18, también denominada LL-37) y la β -2-defensina (HBD2) (204).

Liu et al. demostraron que cuando el *M. tuberculosis* era reconocido por los TLRs de la membrana de los monocitos, se inducía la activación de los genes de la CYP27B1 y del VDR, conduciendo a la modulación directa de la expresión génica, favoreciéndose la

producción de catelicidina y β -2-defensina, y también demostraron que la deficiencia de vitamina D limitaba la producción de estos AMPs (57). Otras citoquinas, como el IFN- γ y la IL-4 también pueden influir en la expresión de CYP27B1 (205).

Posteriores estudios han confirmado la capacidad de la $1,25(\text{OH})_2 \text{D}$ de inducir la expresión de catelicidina no sólo en monocitos/macrófagos, sino también en otras células que participan como barreras de defensa dentro del sistema inmune innato, como queratinocitos (206), células del epitelio intestinal y bronquial (207, 208), corneales y en los trofoblastos de la placenta, así como en células mieloides (209).

La síntesis de catelicidina, estimulada en presencia de $1,25(\text{OH})_2 \text{D}$ (204), es esencial para las defensas antimicrobianas y la actividad citotóxica de las células NK contra células tumorales (210). Además, se ha demostrado que participa en la autofagia inducida por la vitamina D en monocitos y macrófagos (211, 212).

La $1,25(\text{OH})_2 \text{D}$ también es capaz de estimular la síntesis de β -2 y β -4-defensina, tanto *in vitro* mediante la estimulación de monocitos (213, 214) como *in vivo* en sangre de pacientes pediátricos (215).

La $1,25(\text{OH})_2 \text{D}$, además de sus propiedades antimicrobianas, tiene propiedades antiinflamatorias, reprimiendo la expresión de TLRs (203) e inhibiendo la producción de citoquinas proinflamatorias en DC y otras células inmunes innatas (216, 217).

En una reciente revisión sistemática de estudios *in vivo*, concluyó que existen evidencias de que la vitamina D influye en la composición de la microbiota intestinal (218). Así, la vitamina D y su VDR regularían la integridad de la barrera intestinal y controlarían tanto la inmunidad innata y adaptativa en el intestino (Figura 11). Además, metabolitos de la flora intestinal podrían a su vez regular la expresión del VDR (219). Se requieren más estudios para esclarecer los mecanismos subyacentes a través de los cuales la vitamina D es capaz de modular el microbioma (218).

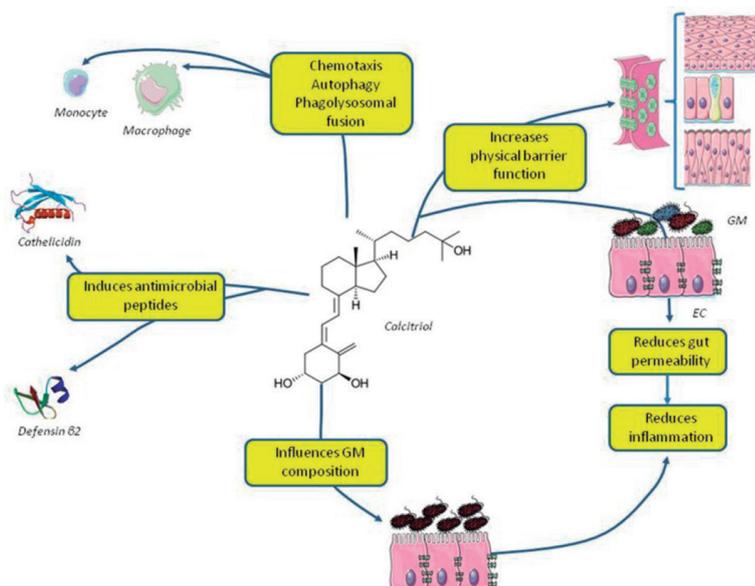


Figura 11. Papel de la vitamina D en la inmunidad innata y en la microbiota intestinal. Tomado de: (233).

1.3.7.2. Inmunidad adaptativa

La inmunidad adaptativa es la segunda defensa contra la infección. Es capaz de reconocer y eliminar de manera selectiva microorganismos y moléculas extrañas específicas. Los linfocitos T y B, son células especializadas con capacidad de modular su respuesta y dirigirla frente a un determinante antigénico concreto. Los linfocitos B producen las inmunoglobulinas o anticuerpos, capaces de interactuar con el antígeno y son los responsables de la inmunidad humoral, mientras que la respuesta inmune mediada por los linfocitos T se conoce como inmunidad celular.

Mientras que los mecanismos de la inmunidad innata son inespecíficos pero rápidos en su actuación, los de la inmunidad adaptativa son tardíos, pero más específicos. Las características importantes de la inmunidad adaptativa son su diversidad, memoria, especialización y tolerancia.

En las células B, la $1,25(\text{OH})_2 \text{D}$ inhibe la diferenciación, la proliferación, el inicio de la apoptosis y disminuye la producción de inmunoglobulinas, de manera indirecta a través de la mediación de las células T-helper (Th) y directamente actuando en la homeostasis de las células B (220).

Hewison propuso cuatro posibles mecanismos a través de los cuales la vitamina D puede influir en la función de las células T (221) (Figura 12):

- i. Efectos endocrinos directos en las células T mediado por $1,25(\text{OH})_2 \text{D}$ vía sistémica.
- ii. Conversión autocrina de $25(\text{OH}) \text{D}$ en $1,25(\text{OH})_2 \text{D}$ en las células T.
- iii. Efectos paracrinos de la $1,25(\text{OH})_2 \text{D}$ en las células T tras la conversión del $25(\text{OH}) \text{D}$ en $1,25(\text{OH})_2 \text{D}$ en monocitos o DC.
- iv. Efectos indirectos de la $1,25(\text{OH})_2 \text{D}$ en la presentación de antígenos a las células T vía APC.

La $1,25(\text{OH})_2 \text{D}$ suprime la proliferación, la diferenciación y la producción de citoquinas de las células Th (222). *In vitro*, disminuye la síntesis de citoquinas proinflamatorias producidas por las células Th1 (IL-2, IL-6, $\text{INF}\gamma$ y $\text{TNF}\alpha$) y promueve las citoquinas antiinflamatorias producidas por las células Th2 (IL-3, IL-4, IL-5, IL-10) (223, 224, 225). La vitamina D también puede inhibir las respuestas de las células T-helper 1 (Th1) mediante la supresión de la producción de IL-12 por DC (223, 226). El complejo $1,25(\text{OH})_2 \text{D}$ -VDR impide la unión de $\text{NF-}\kappa\text{B}$ a la región promotora de la IL-12, inhibiendo la expresión del RNAm de la IL-12. Mientras que la síntesis de IL-12 es inhibida, se aumenta la producción de IL-10 por DC, junto con la inducción de células T reguladoras tipo 1 (Tr1) (226, 227).

También suprime directamente la síntesis de IL-17 por las Th17 a nivel transcripcional (228). Sin embargo, no están totalmente esclarecidos los efectos directos de la $1,25(\text{OH})_2 \text{D}$ en las citoquinas producidas por las células Th2 (229). Otro grupo de células T que pueden ser activadas por la $1,25(\text{OH})_2 \text{D}$ son las células T reguladoras (Tregs), las cuales suprimen las respuestas pro-inflamatorias de otras células T y contribuyen a la homeostasis inmune a través de varios mecanismos, entre los cuales, se encuentran el contacto célula-célula y la secreción de factores anti-inflamatorios, como la IL-10 y el $\text{TGF}\beta$ (230, 231). La $1,25(\text{OH})_2 \text{D}$ inhibe la diferenciación y maduración de las DC, transformándose en DCs tolerogénicas y también induce la diferenciación periférica de las células Tregs (221, 232) (Figura 12).

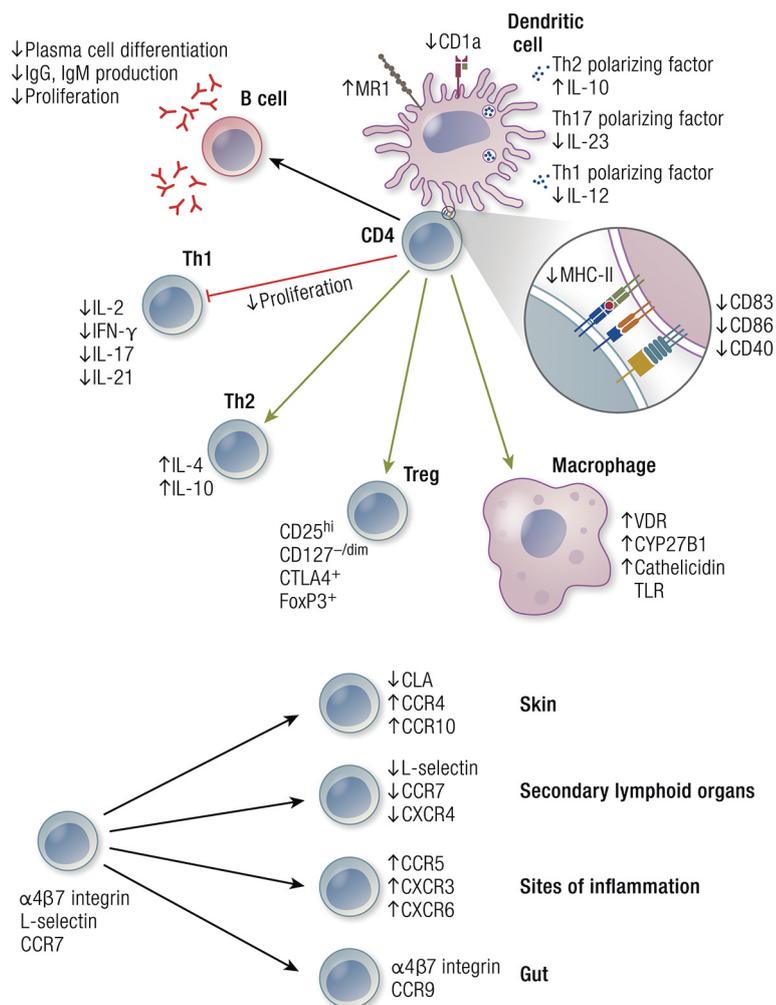


Figura 12. Mecanismos de la vitamina D en la inmunidad adaptativa. Tomado de: (232).

En resumen, existen evidencias del importante papel de la vitamina D como inmunomodulador. Se ha demostrado que la 1,25(OH)₂ D es capaz de estimular al sistema inmune innato para luchar contra los patógenos. Sin embargo, su modulación en el sistema inmune adquirido no está totalmente esclarecido. No existe consenso sobre cual es el nivel óptimo de 25(OH) D para conseguir estos efectos inmunomoduladores, por lo que no existe actualmente un consenso para la suplementación con vitamina D en pacientes con infección y/o enfermedades autoinmunes (233).

1.3.8. Péptidos antimicrobianos vitamina D dependientes

Los AMPs son unos péptidos catiónicos, de pequeño tamaño, multifuncionales, evolutivamente muy primitivos que forman parte de la respuesta inmune innata con efectos antimicrobianos potentes, ya que actúan sobre numerosas bacterias Gram positivas y Gram negativas, hongos, y virus (Tabla 7) y son resistentes a la proteólisis, por lo que los patógenos no desarrollan resistencia frente a ellos (234, 235).

<i>Mycobacterium tuberculosis, leprae, bovis, smegamatis</i>	<i>Borrelia spp.</i>
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
<i>Propionibacterium acnes</i>	<i>Nocardia sp.</i>
<i>Micrococcus luteus</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>
<i>Lactobacillus casei</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
<i>Bacillus anthracis</i>	<i>Achromobacter xylosoxidans</i>
<i>Acinetobacter baumannii</i>	<i>Capnocytophaga spp.</i>
<i>Aggregatibacter actinomycetumcomitans</i>	<i>Brucella suis</i>
<i>Burkholderia pseudomallei, cepacia, thailandensis</i>	<i>Clostridium difficile</i>
<i>Escherichia coli</i>	<i>Francisella novicida</i>
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	<i>Haemophilus influenzae</i>
<i>Helicobacter pylori</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
<i>Leptospira interrogans</i>	<i>Mannheimia haemolytica</i>
<i>Pasteurella multocida</i>	<i>Shigella sp.</i>
<i>Porphyromonas gingivalis, circumdentaria</i>	<i>Salmonella sp.</i>
<i>Prevotella intermedia, loescheii, melanogenica</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	<i>Tannerella forsythia</i>
<i>Treponema pallidum, denticola</i>	<i>Malassezia furfur</i>
<i>Yersinia pestis</i>	<i>Candida albicans</i>
<i>Trichophyton rubrum, mentagrophytes</i>	Adenovirus
Citomegalovirus	Virus de inmunodeficiencia humana-1
Papilomavirus	Virus de la influenza
Virus vacuna	Virus del herpes simple 1
Virus varicela zoster	

Tabla 7. Agentes biológicos sensibles al efecto del eje vitamina D-antibióticos vitamina D dependientes. Tomado de: (234).

Existen cada vez más evidencias de que los AMPs también poseen funciones inmunomoduladoras, que incluirían la cicatrización de heridas, la secreción de citoquinas, la quimiotaxis, la apoptosis, la inflamación, la fagocitosis, entre otros. (236, 237).

1.3.8.1. La catelicidina humana (LL-37)

El único miembro conocido de la familia de las catelicidinas expresado en humanos es la catelicidina humana o LL-37 (leucina-leucina-37) (238), fue identificada por primera vez en 1995. Esta molécula catiónica es un péptido de 37 aminoácidos, que se genera por escisión enzimática a partir de la preprocatelicidina humana (hCAP18). El único gen que la codifica se localiza en el cromosoma 3 y se expresa en diferentes células, tejidos y fluidos corporales.

La LL-37 es producida principalmente en las células implicadas en la inmunidad innata (neutrófilos, monocitos, células NK, mastocitos y células B) y también en los enterocitos, células epiteliales y queratinocitos, y es medible en casi todos los líquidos biológicos humanos.

Su expresión parece estar regulada por un mecanismo complejo que además difiere según el tipo de célula y contexto. Es inducida por la activación de los receptores TLRs mediados por la vitamina D en las células de la inmunidad innata, el INF γ y la IL-15 (238) e inhibida por la IL-6, glucocorticoides, determinadas exotoxinas bacterianas y el FGF23 (234, 238).

Las funciones antimicrobianas de la LL-37 se atribuyen a su estructura secundaria. Así, la hélice N-terminal se relaciona con la quimiotaxis y la resistencia a la proteólisis y la hélice C-terminal es responsable de los efectos antimicrobianos. Cuando alcanza la membrana microbiana, la recubre y la perfora, causando la formación de poros en la misma y su posterior destrucción. Su acción antivírica se debe a su capacidad de interacción con la envoltura de la membrana y la cápside proteica (238).

Actúa como mediador en la inducción de autofagia en los monocitos y macrófagos humanos, permitiendo destruir patógenos intracelulares (237).

In vitro, la LL-37 induce la quimiotaxis, ya que se expresa en las células epiteliales infectadas, pudiendo atraer directamente a las células del sistema inmune innato, como los monocitos, neutrófilos y las DC. Los neutrófilos son células fagocíticas especializadas y la mayor fuente de LL-37, que se almacena en los gránulos y puede ser liberada rápidamente en caso de infección. Estimula la migración y proliferación de células epiteliales y queratinocitos. Además, puede incrementar la reacción inflamatoria suprimiendo la apoptosis y prolongando la supervivencia de los neutrófilos (238).

También puede activar la secreción tanto de citoquinas pro-inflamatorias, como las IL-1 β , IL-6, IL-18, IL-20 y TNF α en diferentes células y también citoquinas anti-inflamatorias, induciendo la síntesis de IL-10 e IL-19 en monocitos y macrófagos. En la actualidad no están definidas las concentraciones fisiológicas y patológicas de la LL-37 (237).

En cuanto a la metodología disponible para su medición, las concentraciones en sangre varían dependiendo del método, tienen una dispersión importante y no se correlacionan con los niveles simultáneos de 25(OH) D, exceptuando en aquellos que presentan deficiencia de vitamina D. Para la interpretación de los resultados debe tenerse en cuenta la fase evolutiva de la enfermedad y su tratamiento, ya que sus niveles varían según evoluciona la enfermedad (234).

1.3.8.2. La β -2-defensina

Las defensinas son otros agentes antimicrobianos evolutivamente muy primitivos (234, 235).

En el ser humano, dentro de la familia de las defensinas, sólo se conoce que la HBD2, esté modulada por la vitamina D. Es un péptido catiónico de pequeño tamaño que se expresa, *in vitro*, en el pulmón, el timo, la piel, el intestino, los leucocitos, el hígado y la tráquea, y cuya secreción está inducida por determinados productos bacterianos y por citoquinas proinflamatorias, como TNF α (236).

El gen de la HBD2 presenta un VDRE en su región promotora, pero la inducción por la vitamina D es más modesta, comparado con la de la LL-37.

Como la LL-37, tiene función antimicrobiana, especialmente contra bacterias Gram negativas, función quimiotáctica e induce la secreción de citoquinas. Las evidencias apuntan que actúan sinérgicamente junto con la LL-37 (237).

1.4. PAPEL DEL METABOLISMO ÓSEO EN PACIENTES CRÍTICOS

Leaf et al., en un estudio de cohortes prospectivo, cuyo objetivo era evaluar la asociación entre los metabolitos de la vitamina D y diversos resultados clínicos en pacientes críticos y no críticos con insuficiencia renal aguda, hallaron que la severidad de la sepsis estaba negativamente asociada con los niveles de 25(OH) D total y biodisponible y positivamente asociada con los niveles de FGF23 y no hallaron asociación con PTH, VDBP, 1,25(OH)₂ D total ni biodisponible. Además, los niveles de 25(OH) D biodisponible presentaron la asociación más robusta con respecto a la severidad de la sepsis ($r=-0,45$, $p<0,001$). Con respecto a la mortalidad, la 25(OH) D biodisponible se asoció inversamente con la mortalidad (OR= 0,05, IC 95%: 0,004-0,64). A diferencia de la 25(OH) D total, la 1,25(OH)₂ D total y biodisponible, la VDBP, la PTH, el calcio, el fósforo, la albúmina y la creatinina que no se asociaron con la mortalidad (239). En un estudio previo con la misma cohorte, hallaron que niveles elevados de FGF23 se asociaban significativamente con la mortalidad (OR=13,73, IC 95%: 1,75-107,5) (240).

Nair et al., en un estudio de cohortes prospectivo, cuyo objetivo era determinar la prevalencia de hipovitaminosis D y caracterizar las alteraciones en el eje PTH-vitamina D-calcio así como evaluar las asociaciones entre la vitamina D y resultados clínicos en pacientes críticos adultos, concluyó que la deficiencia de vitamina D y el hiperparatiroidismo secundario era altamente prevalente en pacientes críticos y que la deficiencia de vitamina D persiste durante la estancia en UCI y se asocia con la gravedad de la enfermedad (241).

Hu et al., en un estudio prospectivo observacional, cuyo objetivo era determinar la prevalencia de deficiencia de vitamina D, caracterizar los cambios en el eje PTH-vitamina D-calcio y asociarlos con la gravedad de la enfermedad y pronóstico en pacientes críticos, observaron que la deficiencia de vitamina D es un factor de riesgo independiente de mortalidad a 90 días y que la hipovitaminosis D con niveles elevados de PTH se asociaba con mayor mortalidad comparado con los pacientes con niveles de PTH normales (242).

Ardehali et al., en un estudio prospectivo transversal, cuyo objetivo era determinar los niveles de PTH, vitamina D, calcio, fósforo y magnesio el primer día en UCI y sus asociaciones con resultados clínicos en pacientes críticos neuroquirúrgicos, concluyó que la deficiencia de vitamina D se asociaba con una mayor estancia en la UCI y además que niveles elevados de PTH se asociaban con mortalidad. Además, pacientes con hiperparatiroidismo secundario presentaron mayores puntuaciones APACHE II y SOFA, mayor estancia y mayor mortalidad comparado con aquellos que tenían niveles de PTH normales (243).

1.5. PAPEL DE LA VITAMINA D, LA VDBP Y LOS PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS EN LA SEPSIS

1.5.1. Vitamina D y sepsis

La detección de deficiencia de vitamina D o hipovitaminosis D se ha incrementado en la población general en los últimos años y se ha asociado con diversas enfermedades, como el infarto de miocardio, diabetes, enfermedades autoinmunes, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, cáncer, tuberculosis y con un incremento en la mortalidad en la población general (123, 244-246).

Diversos estudios, tanto observacionales como retrospectivos, muestran una alta prevalencia de deficiencia de vitamina D (247-251) y una asociación entre la deficiencia pre-ingreso de vitamina D en pacientes críticos adultos y la mortalidad (252-254), el daño renal agudo (255), la incidencia de fallo agudo respiratorio (256) y el desarrollo de sepsis (257). Estudios retrospectivos sugieren que niveles bajos de vitamina D estarían asociados con un incremento de mortalidad en pacientes sépticos (258, 259).

Diversos metaanálisis corroboran estos hallazgos, como el de Haan et al., en 2014, que evalúa el riesgo de sepsis, la mortalidad intrahospitalaria y a los 30 días en pacientes críticos, sugiriendo que la deficiencia de vitamina D incrementa la susceptibilidad de infecciones severas y mortalidad en pacientes críticos (260); o el realizado por Upala et al., en 2015, que concluyó que la deficiencia de vitamina D estaría asociada con un incremento de la susceptibilidad de sepsis (261).

Ambos metaanálisis no están exentos de limitaciones. Una de ellas es que, habiendo sólo un año de diferencia entre ambas, se incluyan diferentes estudios en los dos metaanálisis y que la mayoría de los estudios incluidos sean retrospectivos (262, 263).

Por otra parte, existen estudios que contradicen estos hallazgos. Para Aygencel et al., estudio prospectivo con 201 pacientes, los niveles de vitamina D no son un factor de riesgo independiente para la mortalidad (264). En el trabajo de Barnett et al., estudio de casos-control con 478 pacientes, se demostró que la deficiencia de vitamina D en pacientes críticos con sepsis no estaría asociada con la mortalidad (265). Cecchi et al., estudio de cohortes con 170 pacientes críticos con sepsis, tampoco hallaron asociación con la mortalidad (266). Más recientemente, Ala-Kokko et al., en un estudio prospectivo observacional con 610 pacientes con sepsis grave o shock séptico, observaron que la deficiencia de vitamina D al ingreso en UCI no estaría asociada con la mortalidad a 90 días (267) y Ratzinger et al., en un estudio de cohortes de 461 pacientes sépticos, tampoco

encontraron asociación entre ambas variables (263).

En resumen, el papel de la vitamina D en la sepsis es controvertido y no se ha podido demostrar la causalidad entre la deficiencia de vitamina D y la mortalidad.

Además, las diferencias metodológicas hasta la estandarización en la medición de la vitamina D, así como las definiciones de deficiencia o suficiencia de vitamina D y de sepsis, que son muy heterogéneas, dificulta la comparación entre estudios (262).

1.5.2. Péptidos antimicrobianos, VDBP y sepsis

El número de estudios en los que se hayan cuantificado los niveles de VDBP y AMPs en pacientes críticos es limitado.

En 2009, Jeng et al., estudio de casos y controles, hallaron niveles más bajos de catelicidina y VDBP en pacientes críticos (n=49) comparado con controles sanos (n=21) y hallaron una asociación positiva entre los niveles de catelicidina y el estatus de la vitamina D. En este estudio las muestras fueron extraídas durante los dos días posteriores al ingreso en UCI (247).

En 2013, Barbeiro et al., no encontraron diferencias significativas en los niveles de catelicidina entre pacientes críticos con y sin sepsis al ingreso en UCI (n=130) y no hallaron asociación entre los niveles de catelicidina y los niveles de vitamina D (268).

En 2015, Leaf et al., estudio de cohortes prospectivo, evidenciaron que niveles bajos de 25(OH) D, al ingreso en UCI estaban asociados con valores bajos de catelicidina, los cuales estaban asociados a un mayor riesgo de mortalidad a 90 días. En este último estudio, también se determinaron los niveles de VDBP, no encontrándose diferencias significativas entre supervivientes y no supervivientes (269).

Por otra parte, Greulich et al., estudio de cohortes prospectivo, hallaron niveles elevados de catelicidina en pacientes críticos con sepsis comparado con pacientes críticos no sépticos, al ingreso en UCI y con controles sanos y hallaron asociación negativa entre los niveles de catelicidina y 25(OH) D ($p=0,27$) (251).

El papel de los AMPs en la sepsis no está totalmente esclarecido, pero según Pinheiro (270) existen evidencias de que las catelicidinas pueden tener un carácter dual, actuando como proinflamatorias o antiinflamatorias, dependiendo del modelo experimental y del agente patógeno (Figura 13).

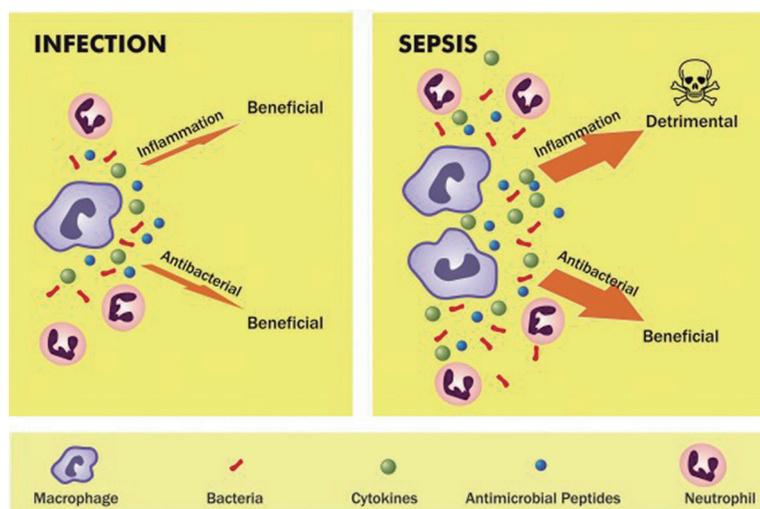


Figura 13. Papel de los péptidos antimicrobianos en la infección localizada y en la sepsis. Tomado de: (270).

1.6. PENTRAXINA 3 (PTX3)

Las pentraxinas son una familia de proteínas evolutivamente muy conservadas, caracterizadas por la presencia de un dominio conservado en su extremo carboxi terminal ("pentraxin domain"), que se clasifican según la longitud del extremo N terminal, en pentraxinas cortas, como la PCR y el componente amiloide P sérico (SAP), producidas por los hepatocitos principalmente en respuesta a la IL6 y en pentraxinas largas, como la pentraxina 3 (PTX3), la pentraxina 1 neuronal (NPTX1), la pentraxina 2 neuronal (NPTX2), el receptor de la pentraxina neuronal (NPTXR) y la pentraxina 4 (271, 272).

La primera pentraxina larga identificada fue la PTX3 (271). La PTX3 es un receptor soluble de PPR, que ejerce un papel esencial en el sistema inmunitario humoral innato (273).

El gen humano PTX3 se localiza en el cromosoma 3q25 y consta de 3 exones. Los dos primeros codifican el péptido y el dominio N-terminal, mientras que el tercer exon codifica el dominio C-terminal (274, 275). Se trata de una glicoproteína multimérica compleja, formada por la unión de dos tetrámeros que se unen dando lugar a una estructura octamérica. Esta multimerización parece tener un papel relevante en la interacción de la PTX3 con diversos ligandos y en el reconocimiento de patógenos (276). La PTX3 está altamente conservada entre diferentes especies, el dominio C-terminal presenta un 57% de homología con la PCR y el SAP, mientras que el dominio N-terminal no se ha relacionado con ninguna proteína conocida (274).

Es liberada por estímulos pro-inflamatorios (componentes bacterianos, PAMPS, DAMPS, IL-1 y TNF α) en diferentes células, como las DC, mieloides, leucocitos, macrófagos, monocitos, fagocitos, células endoteliales vasculares, células del músculo liso, fibroblastos, adipocitos, células de la glia, células del *cumulus oophorus*, *mesangiales* y epiteliales (273, 277, 278). La PTX3 es almacenada en los gránulos secundarios de los neutrófilos, liberándose rápidamente tras su activación y además se localiza en las NETs (279).

La principal función de la PTX3 es el reconocimiento de ciertos patógenos (bacterias, virus y hongos) y su posterior eliminación a través de diferentes mecanismos, como la opsonización, la activación del complemento y la interacción con proteínas anti-microbianas (Figura 14). A pesar de que no existe consenso sobre qué secuencias de PAMPS específicas reconocería la PTX3, sí existe sobre que tiene un papel esencial en la protec-

ción frente a infecciones bacterianas y fúngicas (280).

La PTX3 actuaría como una opsonina vía receptor Fc-gamma, ya que es capaz de unirse a ciertos patógenos, aumentando de esta manera la capacidad fagocítica de macrófagos y neutrófilos (281).

Además, presenta un papel regulador en la inflamación a través de diversos componentes del sistema del complemento como el componente C1q de la vía clásica del sistema del complemento, el factor H de la vía alternativa del componente, la proteína 5 relacionada con el factor H (CFHR5), la proteína de unión al C4 (C4BP, *C4b-binding protein*), la vía de las lectinas del complemento y la selectina P (282). También existen evidencias de que participaría en la regulación de la matriz extracelular y en la hemostasia (283).

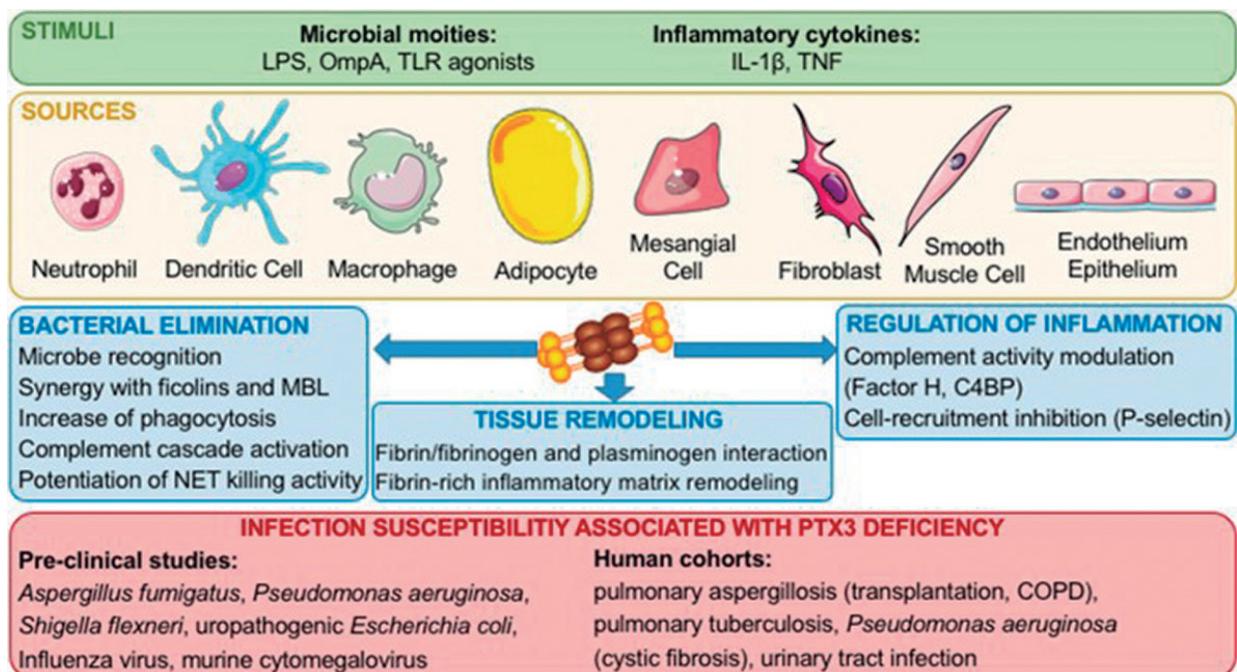


Figura 14. Papel de la PTX3 en la inmunidad innata. Tomado de: (303).

La PTX3 es capaz de interactuar con numerosas proteínas antimicrobianas, como la azurocidina y la mieloperoxidasa, que forman parte de las NETs. Además, se ha observado que la PTX3, también se localiza en las NETs junto con la azurocidina y la mieloperoxidasa (284, 285), aunque no está totalmente esclarecido cómo la PTX3 modularía la actividad bactericida de las mismas (282).

En la sepsis, las NETs previenen la diseminación de los patógenos para su posterior eliminación (286). Sin embargo, existen evidencias de que también causan daño tisular, contribuyendo a la patogénesis de la sepsis (287, 288). En un análisis proteómico, se han identificado a las histonas extracelulares, principal componente de las NETs, como ligandos de la PTX3 circulantes (285). De este modo, en la sepsis, la PTX3 podría tener un papel regulador de las NETs, al atenuar los efectos citotóxicos de las histonas extracelulares.

En humanos, los niveles de PTX3 son inferiores a 2 ng/mL (289) y tienen una vida media de aproximadamente 2 horas (290). Sin embargo, se elevan rápidamente en caso de inflamación y daño tisular, incluyendo enfermedades cardiovasculares, cáncer y sepsis

(291). Este incremento puede llegar a ser hasta de 1000 veces (292, 293), como resultado de la degranulación de los neutrófilos, que actúan como almacén de la PTX3. Esta elevación se mantiene gracias a la producción de novo por las células endoteliales y monocitos, macrófagos y células dendríticas durante el proceso de inflamación (274, 275, 294).

1.7. PAPEL DE LA PTX3 EN LA SEPSIS

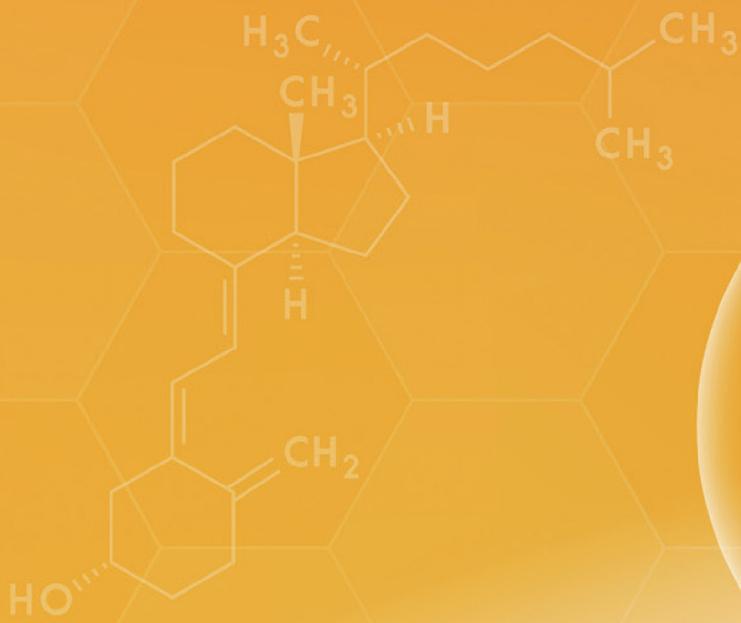
Diversos estudios muestran una elevación de los niveles circulantes de PTX3 en sepsis y shock séptico.

En 2018, Lee et al., en una revisión sistemática y metaanálisis de 16 estudios, concluye que los niveles de PTX3 son significativamente mayores en pacientes con sepsis grave, principalmente con shock séptico, en comparación con aquellos con enfermedad menos grave, y en los no supervivientes en comparación con los supervivientes. Además, niveles elevados incrementan el riesgo de mortalidad (295). De manera similar, en 2014, una revisión sistemática de 11 estudios, concluyó que la PTX3 presenta un valor pronóstico en la sepsis y que correlaciona con la disfunción orgánica (296).

Más recientemente, Caironi et al., en 2017, en un ensayo clínico controlado aleatorizado multicéntrico con 958 pacientes con sepsis o shock séptico, observaron que niveles elevados de PTX3 en el ingreso en UCI predicen la incidencia de nuevas disfunciones orgánicas y que un descenso lento en los días 1 y 2 de los niveles de PTX3 se asocian de manera independientemente a una alta mortalidad (297). Del mismo modo, Hu et al., en un estudio prospectivo con 141 pacientes con diagnóstico de sepsis/shock séptico, sugieren que la PTX3 podría ser un biomarcador útil para predecir la severidad y el desenlace de los pacientes sépticos y que puede ser utilizada para la estratificación del riesgo. En este estudio, el modelo que combina PTX3, procalcitonina y lactato mejora la predicción de mortalidad en estos pacientes (298). En 2018, Albert et al., en un estudio de casos y controles con 30 pacientes con shock séptico observaron, en un modelo de tolerancia a endotoxinas, que las células mononucleares previamente aisladas de sangre periférica, podrían ser las responsables de los niveles persistentemente elevados de PTX3 los primeros días posteriores al inicio de la sepsis (299).

Por otra parte, y en relación a los mecanismos fisiopatológicos, Ketter et al., concluyeron que elevaciones prolongadas de PTX3 no sólo se correlacionaban con la gravedad de la enfermedad (280), sino también indicaban aquellos pacientes con riesgo alto de coagulopatía resultante de la actividad incontrolada de la vía extrínseca (292, 300, 301).

Respecto a la estratificación de pacientes por gravedad destacan dos estudios. Hamed et al., en 2017, en un estudio prospectivo controlado de 213 pacientes con sepsis y shock séptico, concluyeron que los niveles de PTX3 presentaron valor diagnóstico para la sepsis y el shock séptico, durante la primera semana de tratamiento en la UCI, de acuerdo a las definiciones de Sepsis-3 (302). De manera similar la revisión de Porte et al., en 2019, concluyero igualmente que la PTX3, en combinación con otros biomarcadores ya establecidos como la PCR, la procalcitonina, la IL-6 o el lactato, podría ser útil en la estratificación de pacientes con sepsis o shock séptico (303). Así, los niveles de PTX3 podrían contribuir junto al de otros biomarcadores al diagnóstico y monitorización de la sepsis y el shock séptico.



2

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

La vitamina D podría desempeñar un papel importante en la regulación de la respuesta inmune innata y adaptativa, inhibiendo la producción de citoquinas proinflamatorias, e induciendo la síntesis de AMPs, como la catelicidina y la β -2-defensina. La VDBP, proteína de regulación de la biodisponibilidad de la vitamina D, tiene funciones antiinflamatorias y autoinmunes. El desarrollo de la sepsis tiene una compleja fisiopatología que da lugar a una activación excesiva de la inmunidad innata y adaptativa, por lo que, la vitamina D podría estar implicada en la evolución y el pronóstico de la sepsis.

2.1. HIPÓTESIS

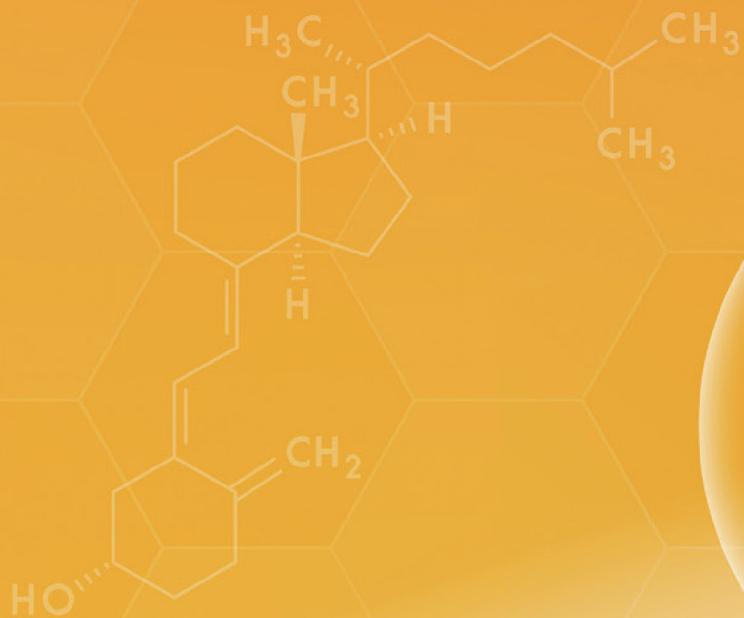
Niveles disminuidos de vitamina D, cuantificada como los niveles de 25(OH) D, podrían estar relacionados con la evolución y el pronóstico de mortalidad en pacientes críticos con shock séptico.

2.2. OBJETIVO GENERAL

Evaluar los niveles de 25(OH) D total y libre al ingreso en UCI de un grupo de pacientes críticos con shock séptico y relacionarlos con parámetros inflamatorios, parámetros del metabolismo fosfocálcico y parámetros de evaluación clínica en estos pacientes. Evaluar si la vitamina D o los parámetros relacionados con su metabolismo están implicados en la evolución, pronóstico y supervivencia de estos pacientes.

2.3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar los niveles de los parámetros directamente relacionados con el metabolismo de la vitamina D y metabolismo fosfocálcico (25(OH) D total y libre, 1,25(OH)₂ D, proteína transportadora de vitamina D (VDBP), calcio, fósforo, magnesio, PTH y FGF23) así como de los péptidos antimicrobianos (AMPs) dependientes de la vitamina D (catelicidina, β-2-defensina) en un grupo de pacientes críticos con shock séptico.
- Analizar los niveles séricos de parámetros de inflamación (leucocitos, PCR, PCT y PTX3) en esta población.
- Determinar la prevalencia de deficiencia de vitamina D en estos pacientes en nuestra área sanitaria al ingreso en UCI.
- Analizar si existen diferencias estacionales en los niveles séricos de los parámetros a estudio y su posible implicación clínica.
- Analizar si existen diferencias en el análisis del estatus de 25(OH) D y sus correlaciones en estos pacientes al analizar la forma libre hormonal en lugar de la total.
- Analizar si existen correlaciones entre los niveles séricos de 25(OH) D, parámetros del metabolismo fosfocálcico y los péptidos antimicrobianos dependientes de vitamina D y los parámetros inflamatorios y de daño tisular (lactato).
- Analizar si existen diferencias en los parámetros clínicos y bioquímicos entre pacientes con suficiencia o no de vitamina D, según los distintos criterios de deficiencia de vitamina D.
- Analizar si existen diferencias en los parámetros clínicos y bioquímicos entre pacientes que presentaron hiperparatiroidismo secundario a deficiencia de vitamina D y los que no.
- Analizar si existen asociaciones entre la 25(OH) D, parámetros del metabolismo fosfocálcico y péptidos antimicrobianos dependientes de la vitamina D con los parámetros clínicos más habituales en la práctica clínica de estos pacientes (estancia hospitalaria y en UCI, foco primario de infección, bacteriemia, tipo de germen, índices de gravedad (SAPS II, APACHE II y SOFA), síndrome de distrés respiratorio (SDRA), necesidad de ventilación mecánica y de hemofiltración veno-venosa continua (HFVVC)).
- Analizar la relación entre los niveles de 25(OH) D, parámetros del metabolismo fosfocálcico y péptidos antimicrobianos dependientes de la vitamina D con el pronóstico/mortalidad.



3

METODOLOGÍA

3.1. DISEÑO DEL ESTUDIO

Se trata de un estudio prospectivo observacional realizado en la UCI de adultos del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla (HUMV) en Santander, entre abril de 2015 a abril de 2016.

3.2. APROBACIÓN DEL COMITÉ DE ÉTICA Y CONSENTIMIENTO INFORMADO DEL PACIENTE O SU REPRESENTANTE

Este proyecto ha sido aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica de Cantabria (ref. 2014.159, anexo 1) y se obtuvo por escrito el consentimiento informado para todos los pacientes (anexo 2). En aquellas circunstancias, en las que el paciente fue incapaz de dar su consentimiento, se obtuvo de su representante legal.

3.3. PACIENTES

Se seleccionaron 75 pacientes mayores de 18 años procedentes del Área de Salud I (Santander) del Servicio Cántabro de Salud (área de referencia del HUMV) que ingresaron de manera consecutiva con diagnóstico de shock séptico, según criterios de la *Second International Consensus Definitions*, en la UCI entre abril de 2015 a abril de 2016.

Posteriormente, se aplicaron las definiciones de Sepsis-3 y todos los pacientes fueron

reclasificados según estas nuevas definiciones.

Se excluyeron aquellos pacientes que no cumplieron los criterios de inclusión o no hubieran dado el consentimiento informado, así como aquellos pacientes con paro cardíaco reciente con retirada de soporte vital o aquellos pacientes sin shock séptico en el momento de ingreso en UCI pero que posteriormente lo desarrollaron durante el ingreso en la misma.

Los datos demográficos y los datos clínicos relevantes se obtuvieron de la historia clínica del paciente y se presentan en los resultados. Todos estos datos se registraron en una base de datos, para su posterior análisis.

Durante todo el estudio, se ha preservado la confidencialidad de la identidad y de los datos procedentes de los pacientes, de acuerdo con la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre de Protección de Datos de Carácter Personal. Para ello se han identificado las muestras procedentes de los pacientes con un número correlativo según el orden de incorporación al estudio.

3.4. EXTRACCIÓN DE MUESTRAS SANGUÍNEAS Y ANÁLISIS

Por protocolo en este hospital al ingreso en UCI, se les realiza a los pacientes una extracción sanguínea para el estudio del perfil de sepsis, que consiste en las determinaciones de glucosa, urea, creatinina, sodio, potasio, bilirrubina total, lactato, procalcitonina (PCT), proteína C reactiva (PCR), gasometría y hemograma. El perfil de sepsis fue realizado en el Laboratorio de Urgencias del HUMV.

El suero/plasma obtenido fue alicuotado y conservado a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su posterior análisis, para determinación de 25(OH) D total y libre, $1,25(\text{OH})_2\text{ D}$, VDBP, calcio, fósforo, magnesio, PTH, FGF23, catelicidina, β -2-defensina y PTX3.

3.4.1. 25(OH) D

Los niveles de 25(OH) D séricos se midieron en el analizador automatizado LIAISON XL (DiaSorin Inc, Stillwater, MN, USA) mediante inmunoensayo por quimioluminiscencia (CLIA), siguiendo las instrucciones del fabricante. Las muestras de suero son sometidas a una fase de pretratamiento para desnaturalizar la VDBP. Estas muestras tratadas se neutralizan después con un tampón y se añade un anticuerpo (Ac) policlonal de oveja anti-25OH vitamina D marcado con un derivado del éster de acridinio. Tras una fase de incubación se añaden partículas magnéticas enlazadas a 25(OH) D. Después de una nueva fase de incubación las partículas magnéticas se capturan utilizando un imán. Tras una fase de lavado y la adición de reactivos desencadenantes, la luz emitida por el acridinio está inversamente relacionada con la concentración de 25(OH) D de la muestra. La sensibilidad fue de 4 ng/mL. El coeficiente de variación (CV) intra e interensayo fue inferior al 5% y al 10%, respectivamente.

La metodología utilizada se encuentra estandarizada frente al material de referencia estándar certificado SRM 972a.

El laboratorio de Bioquímica del HUMV dónde se han medido los niveles de 25(OH) D

participa en el programa de control externo de calidad DEQAS y posee el sello de calidad de dicha entidad.

Para evaluar la prevalencia de deficiencia de vitamina D, se utilizaron criterios de varias sociedades científicas:

- *Endocrine Society*: deficiencia (25(OH) D < 20 ng/mL), insuficiencia (20-29,9 ng/mL) y suficiencia (25(OH) D > 30 ng/mL).
- *IOM*: insuficiencia (25(OH)D < 20 ng/mL), suficiencia (25(OH)D > 20 ng/mL).
- *International Conference on Controversies in Vitamin D*: deficiencia (25(OH) D < 12 ng/mL), insuficiencia (12-20 ng/mL) y suficiencia (25(OH) D > 20 ng/mL).

3.4.2. 1,25(OH)₂ D

Los niveles de 1,25(OH)₂ D séricos se midieron en el analizador automatizado LIAISON XL (DiaSorin Inc, Stillwater, MN, USA) mediante CLIA, siguiendo las instrucciones del fabricante. Durante la primera incubación, se utiliza el dominio de unión del ligando (LBD) del VDR como molécula de captura de la 1,25(OH)₂ D. La unión del LBD con la 1,25(OH)₂ D genera un cambio conformacional en dicho dominio. Después del lavado para eliminar el dominio de unión al ligando no unido, se añade un segundo Ac anti-LBD marcado con isoluminol que se une al complejo 1,25(OH)₂ D-LBD. Se elimina el segundo Ac no unido mediante lavado y se mide la luminiscencia que es proporcional a la cantidad de 1,25(OH)₂ D presente en la muestra. La sensibilidad fue de 1,8 pg/mL. El CV intra e interensayo fue del 3,5% y del 5,8%, respectivamente.

Los valores de referencia en el laboratorio de nuestro hospital son 25-66 pg/mL.

El laboratorio de Bioquímica del HUMV dónde se han medido los niveles de 1,25(OH)₂ D participa en el programa de control externo de calidad DEQAS y posee el sello de calidad de dicha entidad.

3.4.3. 25(OH) D libre medida y calculada

Los niveles de 25(OH) D libre en suero se cuantificaron mediante inmunoensayo ELISA tipo sándwich Free 25OH Vitamin ELISA kit (Future Diagnostics BV, Wijchen, The Netherlands). Durante la primera incubación, la 25(OH) D libre se une al Ac monoclonal anti-Vitamina D que recubre la microplaca, alterando lo menos posible el equilibrio entre ambas formas. Después del lavado, se añadió una cantidad fija de 25(OH) D biotinilada. La 25(OH) D biotinilada no unida se elimina mediante lavado y se añade el conjugado de estreptavidina peroxidasa. En el siguiente paso, se añade el sustrato cromogénico TMB. Finalmente, la reacción se detiene mediante la adición de un reactivo de parada y se mide la absorbancia a 450 nm. La concentración de 25(OH) D libre es inversamente proporcional a la absorbancia en cada pocillo de muestra. La linealidad del test es 2,4-40,3 pg/mL. El CV intraensayo osciló entre 1,9-5,5%, según concentración y el interensayo entre el 4-6,3%, según concentración. El fabricante no aporta datos de valores de referencia indicativos.

Los niveles de 25(OH) D libre calculada fueron cuantificados mediante la fórmula reportada por Bikle et al. (193).

3.4.4. VDBP

La VDBP en suero se cuantificó mediante inmunoensayo ELISA tipo sándwich Quantikine Human Vitamin D Binding Protein ELISA kit (R&D Systems Europe, Abingdon, UK). Durante la primera incubación, la 25(OH) D libre se une al Ac monoclonal anti-VDBP que recubre la microplaca. Después del lavado, se añade un Ac monoclonal específico anti-VDBP ligado a enzima. El Ac monoclonal unido a enzima no unido se elimina mediante lavado y se añade la solución de sustrato. Finalmente, la reacción se detiene mediante la adición de un reactivo de parada y se mide la absorbancia a 450 nm. La concentración de VDBP es directamente proporcional a la absorbancia en cada pocillo de muestra. El test presenta una linealidad entre 15,6-250 ng/mL. La sensibilidad es de 3,74 ng/mL. El CV intraensayo osciló entre 5,7-6,2%, según concentración y el CV interensayo entre 5,1 al 7,4%, según concentración. El fabricante no aporta datos de valores de referencia indicativos.

3.4.5. PTH

La determinación de PTH mediante CLIA en el analizador automatizado YSIS (IDS, Boldon, UK), siendo el rango de linealidad de 5-5000 pg/mL y la sensibilidad de 4,5 pg/mL. El CV intraensayo fue inferior al 6,3% y el interensayo inferior al 8,2%, según concentración.

Los valores de referencia utilizados en nuestro laboratorio de 10-45 pg/mL.

3.4.6. FGF23 intacto

El FGF23 en su forma intacta se determinó en plasma EDTA mediante inmunoensayo ELISA tipo sándwich Human FGF23 (intact) ELISA kit (Immunotopics Inc, San Clemente, CA, USA). Durante la primera incubación, el FGF23 se une al Ac monoclonal anti-FGF23. El Ac no unido se elimina mediante lavado. Después del lavado, se añade biotina conjugada. La biotina no unida se elimina mediante lavado. En el siguiente paso, se añade la solución de estreptavidina -HRP, se vuelve a lavar y se añade el sustrato cromogénico TMB. Finalmente, la reacción se detiene mediante la adición de un reactivo de parada y se mide la absorbancia a 450 nm. La concentración de FGF23 es directamente proporcional a la absorbancia en cada pocillo de muestra. El CV% intraensayo y el interensayo es inferior al 10 y al 12%, respectivamente. La linealidad es de 0,3-75 pg/mL. El fabricante no aporta datos de valores de referencia indicativos.

3.4.7. Catelicidina

La catelicidina (LL-37) en suero se determinó mediante inmunoensayo ELISA tipo sándwich HK321 Human LL-37 ELISA kit (HycultBiotech, Uden, The Netherlands). La catelicidina se une al Ac específico que recubre la microplaca. Después del lavado, se añade el Ac específico biotinilado. Después del lavado, se añade el conjugado de estreptavidina peroxidasa. Después del lavado, se añade el sustrato cromogénico TMB. Finalmente, la reacción se detiene mediante la adición de un reactivo de parada y se mide la absorbancia a 450 nm. La concentración de catelicidina puede determinarse a partir de la curva estándar. La linealidad es de 0,14-100 ng/mL. Tiene una sensibilidad de 0,14 ng/mL. La

variabilidad intra e interensayo es inferior al 5,3 y al 6,1%, respectivamente. Según datos del fabricante, los niveles séricos de catelicidina oscilan entre 25-250 ng/mL.

3.4.8. β -2-Defensina

La β -2-Defensina en suero se determinó mediante inmunoensayo ELISA tipo sándwich Human Beta Defensin 2 ELISA kit (Alpha Diagnostic International, San Antonio, TX). La β -2-Defensina se une al Ac específico que recubre la microplaca. Después del lavado, se añade Ac anti-BD-2. Después del lavado se añade el conjugado de estreptavidina peroxidasa. Después del lavado, se añadió el sustrato cromogénico TMB. Finalmente, la reacción se detiene mediante la adición de un reactivo de parada y se mide la absorbancia a 450 nm. La linealidad es de 40-400 pg/mL. El fabricante no aporta datos de variabilidad intra e interensayo. Según datos del fabricante, los niveles séricos de β -2-defensina oscilan entre 0-700 pg/mL.

3.4.9. PTX3

La PTX3 en plasma EDTA se determinó mediante inmunoensayo ELISA tipo sándwich Quantikine ELISA Human Pentraxin 3/TSG-14 Immunoassay kit (R&D Systems Europe, Abingdon, UK). La PTX3 se une al Ac anti-PTX3 humano biotinilado. Después del lavado se añade el conjugado de PTX3 humana. Después del lavado, se añade solución de sustrato. Finalmente, la reacción se detiene mediante la adición de un reactivo de parada y se mide la absorbancia a 540 nm. La linealidad es de 0,3-20 ng/mL. La concentración de PTX3 puede determinarse a partir de la curva estándar. La sensibilidad es de 0,026 ng/mL. El CV intraensayo osciló entre 1,2-2,6%, según concentración y el interensayo entre el 4,4-6,9%, según concentración. Según datos del fabricante, los niveles plasmáticos en sujetos sanos presentan una media de 0.66 ng/mL (no detectable-1.36 ng/mL).

3.4.10. Parámetros generales en sangre

El hemograma en sangre total se analizó en el analizador Unicel DxH 800 Coulter (Becton Dickinson Coulter, Miami, FL).

Las determinaciones séricas se realizaron mediante análisis automatizado en un Dimension EXL 200 (Siemens Health Care Diagnostics, Gwynedd, UK), usando reactivos y siguiendo las instrucciones suministradas por el fabricante. La glucosa se determinó mediante el método enzimático de la hexoquinasa, la urea mediante el método enzimático de la ureasa/glutamato deshidrogenasa, la creatinina mediante el método enzimático acoplado y tamponada con TAPS, la bilirrubina mediante una modificación del método de Doumas por diazoreacción, el lactato mediante el método enzimático de la deshidrogenasa láctica, los iones (sodio y potasio) mediante potenciometría indirecta, la determinación de calcio mediante la modificación de la reacción calcio o-cresolftaleína complexona (OCPC) de Schwartzbach, la determinación de fósforo mediante la modificación del método clásico de fosfomolibdato de Fiske-Subbarow, la determinación de magnesio mediante la modificación del procedimiento complexométrico del azul de metiltimol, la determinación de albúmina mediante la adaptación del método de fijación del colorante púrpura de bromocresol de Carter y la PCR mediante inmunoensayo tur-

bidimétrico mejorado de partículas.

Los valores de referencia utilizados en nuestro laboratorio para nuestra población son los siguientes: Calcio (8,5-10,2 mg/dL), albúmina (3,5-5,2 mg/dL), fósforo (3- 5 mg/dL), magnesio (1,6-2,5 mg/dL) y PCR (<0,5 mg/dL).

La determinación de procalcitonina se realizó en el analizador automatizado Cobas e411 (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) mediante inmunoensayo por electroquimioluminiscencia, siendo el valor de referencia <0,5 ng/mL.

La determinación de pH y de la saturación venosa central de oxígeno (SvO₂) se realizaron en el analizador ABL825 Flex (Radiometer Medical ApS, Copenhagen, Denmark) mediante electrodo selectivo.

3.5. TOMA DE MUESTRAS MICROBIOLÓGICAS Y ANÁLISIS

La toma de muestras microbiológicas (hemocultivos, exudados y otras procedencias) y su posterior análisis se realizaron siguiendo los protocolos establecidos en el Servicio de Microbiología del HUMV.

3.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Las variables categóricas se expresaron como frecuencia y porcentaje. Para la comparación de variables categóricas fue utilizado el test de Chi cuadrado o el test exacto de Fisher, según se cumpla o no la hipótesis sobre frecuencias esperadas.

Se ha utilizado el test de Kolmogorov-Smirnov para la evaluación de la normalidad de las variables cuantitativas.

Las variables cuantitativas se expresaron como mediana y rango intercuartílico. Para la comparación de variables cuantitativas se utilizó el test de Mann-Whitney o el test de Kruskal-Wallis.

Para comprobar la relación entre variables cuantitativas se utilizaron los coeficientes de correlación de Spearman.

Para el estudio del efecto de la estacionalidad en las variables a estudio, los meses se agruparon de la siguiente manera: invierno (diciembre, enero, febrero), primavera (marzo, abril, mayo), verano (junio, julio, agosto) y otoño (septiembre, octubre, noviembre).

Se utilizó el análisis de regresión lineal para evaluar la relación entre la 25(OH) D libre medida y calculada.

Se usaron las curvas de característica operativa del receptor (*Receiver Operating Characteristic Curves*; curvas COR) para determinar y comparar la utilidad predictiva en relación a la mortalidad hospitalaria de los distintos parámetros a estudio. La variable de resultado (*outcome*) fue la mortalidad hospitalaria.

Se utilizó el índice Youden para determinar el punto de corte óptimo para la mortalidad hospitalaria de los parámetros a estudio.

Las variables cuantitativas (albúmina, fósforo, PTX3, FGF23, VDBP) se dividieron en variables dicotómicas de acuerdo al punto de corte óptimo obtenido a partir del índice de Youden para la mortalidad hospitalaria. Se construyó un modelo logístico binario multivariante paso a paso para determinar las variables que ayuden a predecir el exitus. Las odds ratio y sus intervalos de confianza al 95% (IC 95%) fueron calculadas usando dicho modelo.

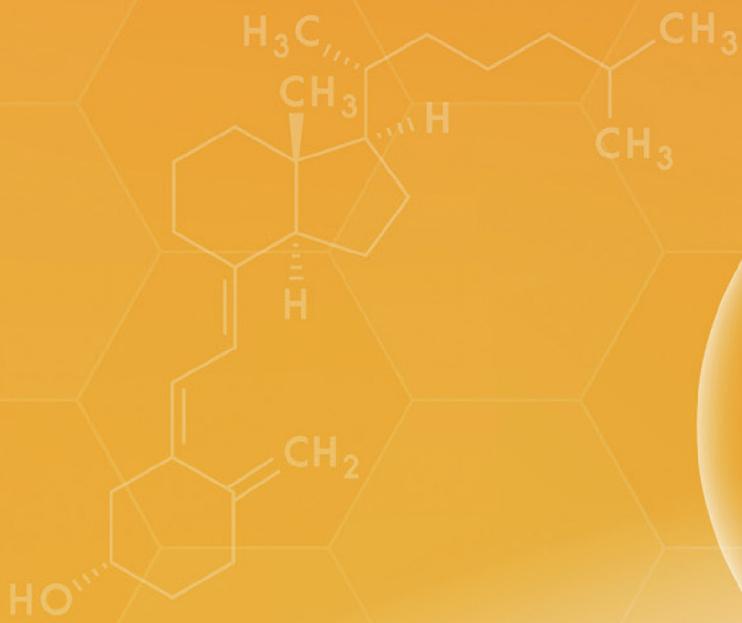
Por último, se realizó un análisis de supervivencia, considerando como tiempo de seguimiento el tiempo transcurrido entre la fecha de ingreso y la fecha de exitus, si éste llega a producirse, o la fecha de alta en otro caso. Se estudiaron las diferencias entre curvas de supervivencia a través del test log-rank y obteniéndose las curvas Kaplan-Meier. Se construyeron modelos de regresión de Cox univariantes y multivariantes para estudiar el riesgo de fallecer en función de las variables a estudio. Las hazard ratio (HR) y sus IC 95% fueron calculadas usando dicho modelo.

Todos los test fueron de dos colas y un valor de $p < 0,05$ fue considerado estadísticamente significativo.

El análisis estadístico fue realizado con el programa *Statistical Package for Social Sciences* (SPSS, Inc, Chicago, IL, USA) versión 24.0 para Windows, excepto para el cálculo del índice de Youden y el análisis de supervivencia, que se efectuó mediante el programa R (*R Development Core Team*), versión 3.6.0, y en concreto las librerías *Optimal-Cutpoints*, *survival* y *survminer* (304-306).

3.7. BÚSQUEDA BIBLIOGRÁFICA

La búsqueda bibliográfica se realizó mediante la búsqueda de las palabras clave: *sepsis*, *shock septic*, *25(OH) D*, *vitamin D deficiency*, *free vitamin D*, *VDBP*, *cathelicidin*, *β -2-defensin*, *PTH*, *FGF23*, *PTX3*, *bone*, *calcium homeostasis*, *vitamin D metabolism*, *secondary hyperparathyroidism*, *mortality*, de manera agrupada o aislada, en las siguientes bases de datos *PubMed*, *UpToDate*, *Clinical Key*, *Scopus*, *Science Direct* y *Web of Science*.



4

RESULTADOS

4.1. POBLACIÓN INCLUIDA EN EL ESTUDIO

Las características demográficas y clínicas de los pacientes incluidos en este estudio se presentan en la Tabla 8 y las bioquímicas en la Tabla 9.

En este estudio, se incluyeron un total de 75 pacientes diagnosticados de shock séptico al ingreso en UCI, de los cuales 53 (70,7%) fueron hombres y 22 (29,3%) mujeres, con una mediana de edad de 64 (49-74) años.

Un total de 25 pacientes (33,3%) presentaron inmunosupresión y una mediana del índice Charlson de 4 (2-6,6). La causa más frecuente de inmunosupresión fue la enfermedad hematológica (36%) y el uso de corticoides inmunosupresores (36%).

La mayoría de los pacientes procedían del Servicio de Urgencias (48,7%), seguido de planta médica (15,8%) y quirófano (14,5%). El resto de procedencias se pueden ver en la Tabla 8.

La principal causa de infección fue de origen pulmonar, con un 41,3% de los casos. 24 pacientes (32%) presentaron infección abdominal y 9 (12%), infección del tracto urinario. El 79,5% de las infecciones fueron causadas por bacterias Gram positivas y el 20,5% por Gram negativas. El 60% de los pacientes presentaban infección de origen nosocomial y el 30,7% bacteriemia (Tabla 8).

La mediana de la puntuación de la escala SAPS II, APACHE II y SOFA el día de ingreso en la UCI fue de 42, 22 y 10, respectivamente.

Un total de 39 pacientes (52%) necesitaron de ventilación mecánica. 11 pacientes (14,7%) presentaron síndrome de distrés respiratorio agudo. Además, 11 pacientes (14,7%) necesitaron de hemofiltración veno-venosa continua.

53 pacientes (70,7%) presentaron comorbilidades. Dentro de las comorbilidades, el 50,9% de los pacientes presentaron HTA, el 22,6% diabetes, el 22,6% cardiopatía, 17% EPOC y un 7,5% cirrosis.

La estancia en UCI fue de 4,9 días y la hospitalaria de 13,9 días.

La mortalidad en UCI fue del 24% y la mortalidad hospitalaria del 28%.

Parámetros	Población total (n = 75)	Supervivientes (n = 54)	No supervivientes (n = 21)	P
Edad (años)	64 (49-74)	63 (47-70)	71 (59-76)	0,12
Masculino	53 (70,7)	37 (68,5)	16 (76,2)	0,58
Inmunosupresión	25 (33,3)	14 (25,9)	11 (52,4)	0,05
Índice Charlson	4 (2-6,6)	3,9 (1,1-6,4)	5,6 (3,4-7,2)	0,28
Comorbilidad	53 (70,7)	38 (70,3)	15 (71,4)	0,23
Procedencia				0,18
Urgencias	37 (48,7)	30 (55,6)	7 (33,3)	
Planta médica	12 (15,8)	6 (11,1)	6 (28,6)	
Planta quirúrgica	6 (7,9)	5 (9,2)	1 (4,8)	
Quirófano	11 (14,5)	8 (14,8)	3 (14,3)	
UCI	1 (1,3)	0 (0)	1 (4,8)	
Otros hospitales	8 (10,5)	5 (9,2)	3 (14,3)	
Foco primario de infección				0,053
Pulmón	31 (41,3)	22 (40,7)	9 (42,9)	
Abdomen	24 (32)	15 (27,8)	9 (42,9)	
Tracto urinario	9 (12)	9 (16,7)	0 (0)	
Piel y tejidos blandos	5 (6,7)	5 (9,3)	1 (4,8)	
Catéter	3 (4)	2 (3,7)	1 (4,8)	
Otros	3 (4)	1 (1,9)	1 (4,8)	
SAPS II	42 (32-63)	36 (29,5-50,2)	61 (53,5-69)	<0,001
APACHE II	22 (15-28)	19,5 (14-25,2)	25 (22-30)	0,006
SOFA	10 (7-13)	9 (7-12)	14 (10-17,5)	<0,001
Nº disfunciones orgánicas	3 (2-4)	2 (1-3,2)	4 (3-5)	<0,001
SDRA	11 (14,7)	3 (5,6)	8 (38,1)	0,001
Ventilación mecánica	39 (52)	19 (35,2)	20 (95,2)	<0,001
HFVVC	11 (14,7)	4 (7,4)	7 (33,3)	0,009
Estancia en UCI (días)	4,9 (2,9-9,9)	5,9 (2,9-9,9)	4,9 (1,9-9,9)	0,45
Estancia hospitalaria (días)	13,9 (8,9-20,9)	15,5 (10,2-23,9)	6,9 (2,2-14,7)	0,005
Mortalidad en UCI	18 (24)	-	-	-
Mortalidad hospitalaria	21 (28)	-	-	-

Tabla 8. Características demográficas y clínicas al ingreso en la UCI. Los datos se expresan como frecuencia (porcentaje) o como mediana (rango intercuartílico).

Parámetros bioquímicos	Población total (n=75)	Supervivientes (n=54)	No supervivientes (n=21)	p
Leucocitos (x10 ³ /μL)	11,4 (6,5-18,2)	11,3 (5,2-20,5)	11,2 (6,6-16,2)	0,84
Hb (g/dL)	11,9 (9,5-14,2)	11,9 (9,9-14,3)	12,1 (9,7-14,1)	0,97
Plaquetas (x10 ³ /μL)	162 (95-232)	169 (119-250)	109 (49-191)	0,016
TP (%)	64 (50-81)	72 (55-87)	47 (35-72)	0,003
pH	7,34 (7,25-7,37)	7,34 (7,29-7,38)	7,25 (7,21-7,37)	0,049
SvO ₂	73 (61 -79)	73 (62-79)	74 (60-78)	0,92
Glucosa (mg/dL)	122 (96-157)	126 (107-167)	97 (76-140)	0,029
Urea (mg/dL)	75 (49-132)	68 (47 -151)	99 (74-133)	0,06
Creatinina (mg/dL)	1,85 (0,94-3,30)	1,99 (0,88-3,44)	1,60 (0,97-2,82)	0,78
Sodio (mmol/L)	138 (136-141)	138 (135-141)	139 (136-142)	0,65
Potasio (mmol/L)	4,3 (3,6-5,0)	4,2 (3,6-5,0)	4,7 (3,7-5,5)	0,15
Bilirrubina total (mg/dL)	0,9 (0,6-2,0)	0,8 (0,5-1,1)	1,70 (0,9-4,5)	0,001
Calcio (mg/dL)	7,8 (7,4-8,2)	7,9 (7,5-8,2)	7,6 (7,0-8,3)	0,43
Albúmina (mg/dL)	2,6 (2,2-3,0)	2,7 (2,2-3,0)	2,4 (1,9-3,0)	0,024
Fósforo (mg/dL)	3,7 (3,0-4,9)	3,5 (2,6-4,5)	4,5 (3,7-6,0)	0,004
Magnesio (mg/dL)	1,84 (1,67-2,26)	1,84 (1,66-2,20)	1,93 (1,74-2,32)	0,278
Lactato (mg/dL)	2,7 (1,3-4,6)	2,1 (1-3,5)	4,6 (2,7-8,5)	<0,001
PCT (ng/mL)	11,88 (1,55-40,65)	11,39 (1,26-54,75)	12,98 (3,77-24,75)	0,67
PCR (mg/dL)	23 (11-25)	23 (11-25)	21 (8-25)	0,93
PTX3 (ng/mL)	63,8 (24,2-187)	41,9 (14,3-124,3)	114,4 (56,1-250)	0,009
PTH (pg/mL)	69 (39-186)	76 (38-190)	69 (48-173)	0,98
FGF23 (pg/mL)	2,0 (2,0-61)	2,0 (2,0-55,1)	28,5 (2,0-212,4)	0,029
25(OH) D (ng/mL)	9,0 (5,0-15,0)	9,2 (5,0-15,2)	8,8 (4,9-15,0)	0,61
25(OH)D libre medida (pg/mL)	2,03 (0,77-4,67)	1,82 (0,53-4,45)	2,64 (1,11-5,60)	0,242
25(OH)D libre calculada (pg/mL)	5,34 (2,51-9,27)	4,44 (2,34-7,94)	6,29 (3,88-11,22)	0,067
1,25(OH) ₂ D (pg/mL)	19 (10-34)	19,5 (10,7-38,6)	19 (7,5-23,5)	0,49
VDBP (ng/mL)	144393 (91397-187991)	155067 (127411-206900)	85572 (62973-147691)	<0,001
Catelicidina (ng/mL)	1,3 (0,8-2,0)	1,3 (0,8-2,1)	0,9 (0,4-1,7)	0,074
β-2-defensina (pg/mL)	464 (222-1193)	482 (217-1213)	430 (251-1895)	0,67

Tabla 9. Parámetros bioquímicos generales y específicos al ingreso en UCI, expresados como mediana (rango intercuartílico).

La mediana de los niveles séricos de calcio al ingreso en UCI fue de 7,8 mg/dL (7,4-8,2), siendo el valor mínimo de 5,5 y el valor máximo de 9,9 mg/dL. 66 pacientes (88%) presentaron hipocalcemia y ninguno presentó hipercalcemia.

En relación a las determinaciones séricas de albúmina al ingreso en UCI. La mediana fue de 2,6 g/dL (2,2-3,0), siendo el valor mínimo de 0,6 y el valor máximo de 4,2 g/dL. Un 93,3% de los pacientes presentaron niveles disminuidos de albúmina, por debajo del límite inferior de referencia y ninguno presentó niveles aumentados de albúmina.

La mediana de los valores séricos de fósforo al ingreso en UCI fue de 3,7 mg/dL (3,0-4,9), siendo el valor mínimo de 1,1 y el valor máximo de 11,1 mg/dL. Un 24% de los pacientes presentaron hipofosfatemia y un 22,7% hiperfosfatemia.

Con respecto a la mediana de los niveles séricos de magnesio al ingreso en UCI fue de 1,84 mg/dL (1,67-2,26), siendo el valor mínimo de 1,08 y el valor máximo de 3,26 mg/dL. 11 pacientes (14,7%) presentaron niveles disminuidos de magnesio, por debajo del límite inferior de referencia y 9 pacientes (12%) presentaron niveles aumentados de magnesio, por encima del límite superior de referencia.

En relación a los parámetros de inflamación, la mediana de la PCT al ingreso en UCI fue de 11,88 ng/mL (1,55-40,65), siendo el valor mínimo de 0,5 y el máximo de 277 ng/mL.

La mediana de los niveles séricos de PCR al ingreso en UCI fue de 23 mg/dL (11-25), siendo el valor mínimo de 0,9 y el máximo de 125 mg/dL.

La mediana de los niveles de PTX3 fue de 63,8 ng/mL (24,3-187) al ingreso en UCI, siendo el valor mínimo de 2,7 y el máximo de 250 ng/mL.

La mediana de los niveles séricos de PTH al ingreso en UCI fue de 69,4 pg/mL (38,7-185,7), siendo el valor mínimo de 5 y el valor máximo de 899,4 pg/mL.

La mediana de los niveles plasmáticos de FGF23 al ingreso en UCI fue de 2 pg/mL (2-64), siendo el valor mínimo de 2 y el valor máximo 2500 pg/mL.

La mediana de los niveles séricos de 25(OH) D libre medida al ingreso en UCI fue de 2,4 pg/mL (2,4-4,67), siendo el valor mínimo de 2,4 y el valor máximo de 11,45.

La mediana de los niveles séricos de la 25(OH) D libre calculada al ingreso en UCI fue de 5,34 pg/mL (2,51-9,27), siendo el valor mínimo de 0,62 y el valor máximo de 27,37 pg/mL.

Además, los niveles de 25(OH) D libre medidos fueron significativamente menores que los niveles de 25(OH) D libre calculados. Mediante regresión lineal, la fórmula sería $25(\text{OH})\text{ D calculada} = 0,246 * 25(\text{OH})\text{ D libre} + 2,32$, $p < 0,001$, $r^2 = 0,186$.

La mediana de los valores séricos de $1,25(\text{OH})_2\text{ D}$ al ingreso en UCI fue de 19,9 pg/mL (10-34), siendo el valor mínimo 3 de y el valor máximo de 113 pg/mL. Un total de 44 pacientes (58,6%) presentaron niveles séricos de $1,25(\text{OH})_2\text{ D}$ inferiores al límite inferior de referencia y 4 pacientes (5,3%) presentaron niveles superiores al límite superior de referencia.

Al ingreso en UCI, la mediana de los niveles de VDBP fue de 144393 ng/mL (91397-187991), siendo el valor mínimo de 35454 y el máximo de 345560 ng/mL.

La mediana de los niveles plasmáticos de catelicidina al ingreso en UCI fueron de 1,3 ng/mL (0,7-2,0), siendo el valor mínimo de 0,1 y el valor máximo de 4,9 ng/mL.

La mediana de los niveles séricos de β -2-defensina al ingreso en UCI fue de 464 pg/mL (222-1193), siendo el valor mínimo de 44 y el valor máximo de 4000 pg/mL.

4.2. PREVALENCIA DE DEFICIENCIA DE VITAMINA D EN PACIENTES CRÍTICOS CON SHOCK SÉPTICO

De los 75 pacientes estudiados, la mediana de los valores séricos de 25(OH) D al ingreso en UCI fue de 9,0 ng/mL (5,0-15,0) (Figura 15), siendo el valor mínimo de 3,0 y el valor máximo de 44,3 ng/mL.

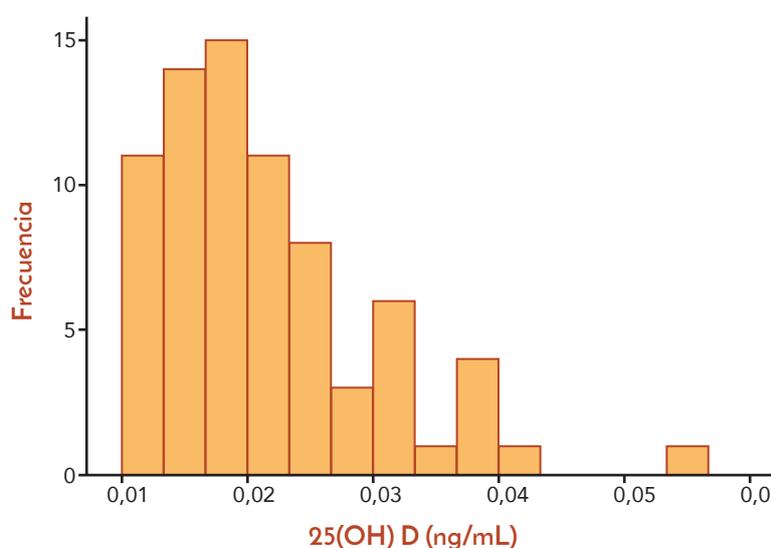


Figura 15. Histograma de los niveles de 25(OH) D al ingreso en UCI.

La insuficiencia/deficiencia de vitamina D tiene diferentes criterios diagnósticos según las diferentes sociedades científicas y hasta hoy no hay un claro consenso. Así, en nuestra población de estudio tenemos diferentes grupos según el criterio utilizado.

Según las recomendaciones de la *Endocrine Society*, de un total de 75 pacientes, 62 pacientes (82,8%) presentaron déficit de vitamina D, 11 (14,6%) niveles insuficientes de vitamina D y solamente 2 (2,6%) presentaron niveles suficientes de vitamina D (Tabla 10).

Estatus 25(OH) D <i>Endocrine Society</i> (ng/mL)	n (%)
Suficiencia (>30)	2 (2,6)
Insuficiencia (20-29,9)	11 (14,7)
Deficiencia (<20)	62 (82,7)

Tabla 10. Estatus de la vitamina D al ingreso en UCI, según la *Endocrine Society*. Los datos se expresan como frecuencia (porcentaje).

Según los criterios de la IOM, 62 pacientes (82,7%) presentaron déficit de vitamina D y 13 pacientes (17,3%) presentaron suficiencia de vitamina D (Tabla 11).

Estatus 25(OH) D IOM (ng/mL)	n (%)
Suficiencia (>20)	13 (17,3)
Insuficiencia (<20)	62 (82,7)

Tabla 11. Estatus de la vitamina D al ingreso en UCI, según IOM. Los datos se expresan como frecuencia (porcentaje).

Según la *Third International Conference on Controversies in Vitamin D*, 50 pacientes (66,7%) presentaron deficiencia, 12 (16%) presentaron niveles insuficientes y 13 (17,3%) presentaron niveles suficientes de vitamina D (Tabla 12). Ninguno de los pacientes presentó niveles tóxicos (>100 ng/mL).

Estatus 25(OH) D IOM <i>International Conference</i> (ng/mL)	n (%)
Suficiencia (>20)	13 (17,3)
Insuficiencia (12-20)	12 (16,0)
Deficiencia (<12)	50 (66,7)

Tabla 12. Estatus de la vitamina D al ingreso en UCI, según la *International Conference on Controversies in vitamin D*. Los datos se expresan como frecuencia (porcentaje).

4.3. INFLUENCIA DE LA ESTACIONALIDAD EN LOS NIVELES SÉRICOS DE 25(OH) D, PARÁMETROS DEL METABOLISMO FOSFOCÁLCICO Y PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS DEPENDIENTES DE VITAMINA D

La mayoría de los pacientes, 25 (33,3%) ingresaron en invierno, seguido de un 36% de pacientes que ingresaron en primavera. En la Tabla 13 se muestran el número de pacientes críticos ingresados en UCI con diagnóstico de shock séptico según la estación del año.

Según estación	n (%)
Invierno	25 (33,3)
Primavera	27 (36,0)
Verano	19 (25,3)
Otoño	4 (5,4)

Tabla 13. Pacientes críticos ingresados en UCI con shock séptico según la estacionalidad. Los datos se expresan como frecuencia (porcentaje).

En la Tabla 14 se muestran los valores de la 25(OH) D, 1,25 (OH)₂ D, VDBP, FGF23, PTH, catelicidina y β-2-defensina, 25(OH) D libre medida y calculada, calcio, fósforo y magnesio, según la estación del año.

	Estación del año			
	Primavera	Verano	Otoño	Invierno
Calcio (mg/dL)	7,79 (7,57-8,23)	7,83 (7,49-8,14)	7,71 (7,41-8,18)	7,98 (7,46-8,33)
Albúmina (mg/dL)	2,5 (2,1-3)	2,7 (2,2-3)	2,8 (2,3-3,2)	2,5 (2,2-3,1)
Fósforo (mg/dL)	3,67 (3,08-4,96)	3,67 (2,35-4,51)	6,29 (4,26-8,13)	4,04 (2,85-5,25)
Magnesio (mg/dL)	1,77 (1,66-2,01)	1,83 (1,61-2,27)	2,23 (1,75-2,47)	2,04 (1,79-2,35)
PTH (pg/mL)	79 (37,9-210,5)	101,6 (41,1-185,7)	47,7 (23,5-150,9)	64,9 (33,7-122,2)
FGF23 (pg/mL)	2,0 (2,0-47,0)	2,0 (2,0-64,8)	2,0 (82,0-108,0)	2,0 (2,0-112,7)
25(OH) D (ng/mL)	8,3 (5,2-11,6)	17,1 (6,9-25,8)	22,1 (19,2-27,8)	7,9 (4,0-11,0)
25(OH) D libre medida (pg/mL)	2,39 (0,3-4,29)	4,22 (1,11-6,39)	7,48 (4,26-9,62)	1,74 (0,3-2,7)
25(OH) D libre calculada (pg/mL)	4,33 (2,4-7,37)	7,62 (4,89-11,25)	13,53 (10,36-24,53)	3,61 (1,85-6,23)
1,25 (OH) ₂ D (pg/mL)	23 (15-36)	25 (16-38)	18 (13-38)	16 (11-38)
VDBP (ng/mL)	150779 (104885-201110)	136300 (85388-186562)	113164 (72495-156132)	139576 (120265-184801)
Catelicidina (pg/mL)	1,6 (1,2-2,3)	1,5 (1,0-2,4)	1,4 (0,8-1,6)	0,8 (0,5-1,2)
β-2-defensina (pg/mL)	481 (269-1356)	245 (146-570)	286 (224-1933)	710 (270-2372)

Tabla 14. Niveles de 25(OH) D, parámetros del metabolismo fosfocálcico y metabolitos relacionados, según la estacionalidad. Los datos se expresan como mediana (rango intercuartílico).

Se compararon globalmente los niveles de 25(OH) D según la estación del año en la que ingresó el paciente, durante el tiempo que duró el estudio, encontrándose diferencias estadísticamente significativas entre las distintas estaciones ($p=0,001$). Igualmente se encontraron diferencias estadísticamente significativas para la 25(OH) D libre medida y calculada ($p=0,003$ y $p=0,001$; respectivamente) así como para los niveles de catelicidina ($p=0,001$) según la estación del año.

En las comparaciones trimestre a trimestre, se observa que los niveles séricos de 25(OH) D en primavera son significativamente menores que los obtenidos en verano y el otoño ($p=0,014$ y $p<0,001$, respectivamente) y que los niveles en invierno son significativamente menores que los del verano y el otoño ($p=0,006$ y $p=0,004$, respectivamente). No se observan diferencias estadísticamente significativas entre la primavera y el invierno ($p=0,37$) y el verano y el otoño ($p=0,21$) (Figura 16).

Además, se observa que la prevalencia de deficiencia de vitamina D es mayor en los meses de invierno y primavera comparados con los meses de verano y otoño. En otoño, sólo el 25% de los pacientes presentaron niveles deficientes de vitamina D mientras que este porcentaje aumenta a un 53% en verano, a un 96% en invierno y a un 100% en primavera.

En las comparaciones trimestre a trimestre, se observa que los niveles séricos de la 25(OH) D libre medida en primavera son significativamente menores que los obtenidos en otoño ($p=0,005$) y que los del invierno son significativamente menores que los obtenidos en verano y en otoño ($p=0,016$ y $p=0,002$, respectivamente). No se observan

diferencias estadísticamente significativas entre la primavera y el verano ($p=0,067$), la primavera y el invierno ($p=0,198$) y el verano y el otoño ($p=0,081$).

En cuanto a las comparaciones trimestre a trimestre, se observa que los niveles séricos de la 25(OH)D libre calculada en primavera son significativamente menores que los valores obtenidos en verano y en otoño ($p=0,023$ y $p=0,001$, respectivamente). Los niveles obtenidos en invierno son significativamente menores que los obtenidos en verano y en otoño ($p=0,008$ y $p=0,002$, respectivamente). Además, se observan niveles significativamente más altos en otoño que en verano ($p=0,044$). No se observan diferencias estadísticamente significativas entre la primavera y el invierno ($p=0,42$) (Figura 16).

En resumen, tanto la 25(OH) D total como libre (medida y calculada) siguen un patrón estacional similar, siendo los niveles significativamente menores en primavera e invierno con respecto al verano y al otoño.

En las comparaciones trimestre a trimestre, se observan niveles de catelicidina en primavera significativamente mayores que los valores obtenidos en invierno ($p<0,001$). No se observan diferencias estadísticamente significativas entre la primavera y el verano ($p=0,78$), la primavera y el otoño ($p=0,36$), el verano y el otoño ($p=0,69$), el verano y el invierno ($p=0,05$) y el otoño y el invierno ($p=0,11$) (Figura 16).

Sin embargo, no se observaron diferencias estadísticamente significativas para los niveles de $1,25(\text{OH})_2 \text{D}$ ($p=0,556$), para los niveles de VDBP ($p=0,69$), para la PTH ($p=0,506$), para el FGF23 ($p=0,768$), para el calcio ($p=0,933$), para el fósforo ($p=0,152$), para el magnesio ($p=0,178$), la albúmina ($p=0,936$) y, por último, se observó una tendencia para los niveles de β -2-defensina ($p=0,093$) según la estación del año.

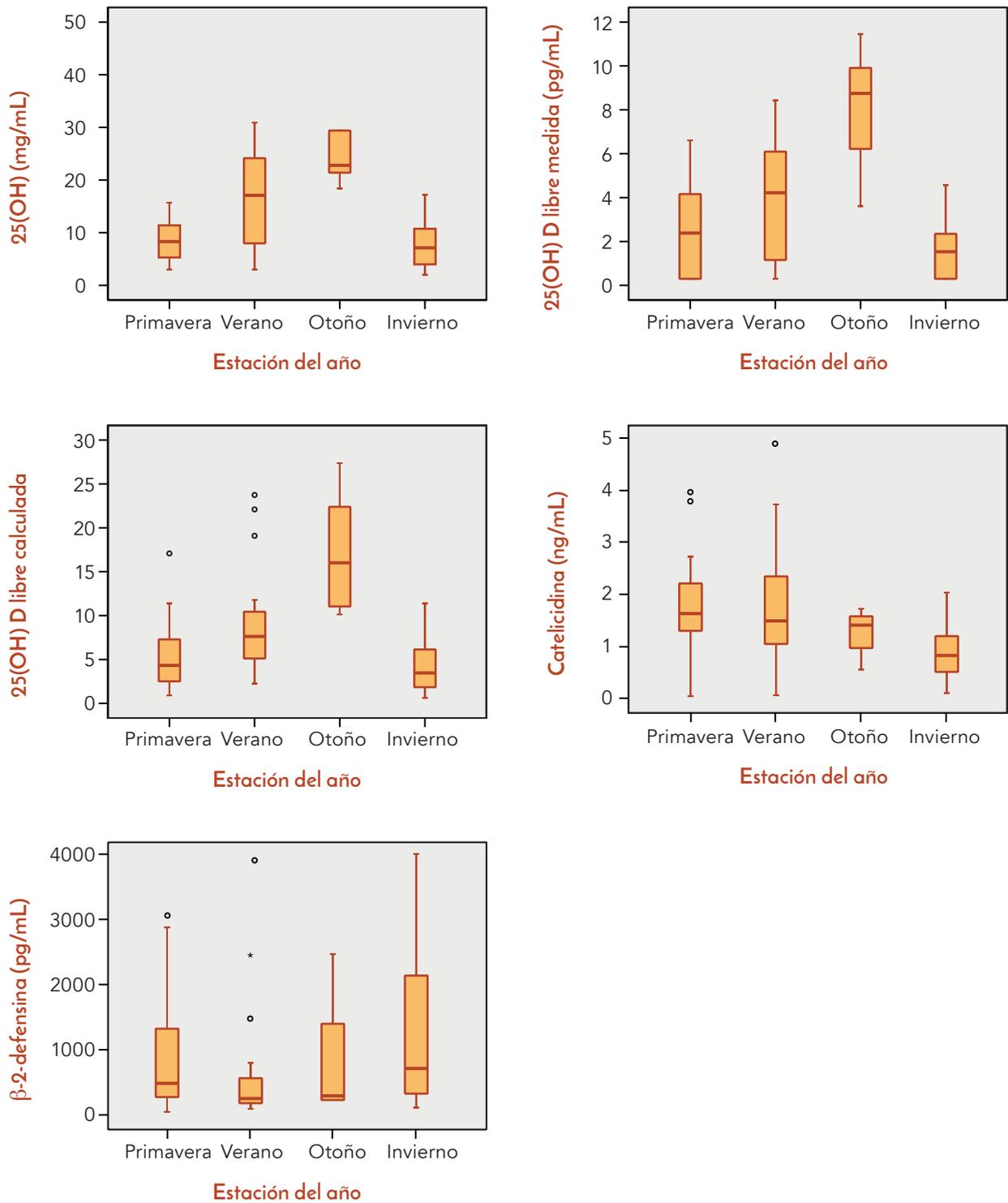


Figura 16. Diagrama de caja de los niveles de 25(OH) D total, 25(OH) D libre medida y calculada, catelicidina y β -2-defensina según la estacionalidad del año.

4.4. CORRELACIÓN ENTRE LA 25(OH) D TOTAL Y LIBRE CON LOS PARÁMETROS DEL METABOLISMO FOSFOCÁLCICO Y PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS DEPENDIENTES DE VITAMINA D

En el análisis de correlación de Spearman se obtuvieron los siguientes resultados (Tabla 15).

En el primer día de ingreso en UCI, los niveles séricos de 25(OH) D total muestran una fuerte correlación positiva con los niveles de 25(OH)D libre medida y calculada ($r=0,805$, $p<0,001$; $r=0,829$, $p<0,001$, respectivamente) (Figura 17 y 18) y más moderada con los niveles de $1,25(\text{OH})_2 \text{ D}$ ($r=0,312$, $p=0,006$). Los niveles de 25(OH) D se correlacionan negativamente con la PTH ($r=-0,243$, $p=0,036$), el magnesio ($r=-0,258$, $p=0,026$) y la β -2-defensina ($r=-0,297$, $p=0,01$) (Figura 19).

La 25(OH) libre medida y calculada se correlacionan negativamente con la β -2-defensina ($r=-0,264$, $p=0,022$, $r=-0,285$, $p=0,013$) (Figura 20 y 21) pero no muestran asociación significativa con la catelicidina ($p=0,203$ y $p=0,219$, respectivamente).

La $1,25(\text{OH})_2 \text{ D}$ se correlaciona positivamente con la 25(OH) libre medida ($r=0,247$, $p=0,032$), la VDBP ($r=0,369$, $p=0,001$), el calcio ($r=0,311$, $p=0,007$), la albúmina ($r=0,565$, $p<0,001$) y negativamente con el fósforo ($r=-0,250$, $p=0,04$) y el FGF23 ($r=-0,305$, $p=0,008$).

La VDBP se correlaciona positivamente con el calcio ($r=0,301$, $p=0,009$) y la albúmina ($r=0,582$, $p<0,001$) y negativamente con la 25(OH) D calculada ($r=-0,437$, $p<0,001$).

EL FGF23 se asocia positivamente con el fósforo ($r=0,374$, $p=0,003$).

La PTH se correlaciona negativamente con el calcio ($r=-0,353$, $p=0,002$), la 25(OH) D libre ($r=-0,254$, $p=0,028$) y la 25(OH) D calculada ($r=-0,267$, $p=0,021$).

El fósforo se correlaciona negativamente con la albúmina ($r=-0,244$, $p=0,035$).

El magnesio se correlaciona negativamente con la 25(OH) D total ($r=-0,258$, $p=0,026$) y libre calculada ($r=-0,267$, $p=0,020$).

	25(OH) D libre medida	25(OH) D libre calculada	1,25(OH) ₂ D	VDBP	PTH	FGF23	Calcio	Fósforo	Magnesio	Albúmina	Catelcidina	β-2-Defensina
25(OH)D	r=0,805 p<0,001	r=0,829 p<0,001	r=0,312 p=0,006	r=0,078 p=0,504	r=-0,243 p=0,036	r=-0,017 p=0,884	r=0,081 p=0,491	r=0,008 p=0,943	r=-0,258 p=0,026	r=0,219 p=0,060	r=0,176 p=0,133	r=-0,297 p=0,01
25(OH)D libre medida		r=0,756 p<0,001	r=0,247 p=0,032	r=-0,094 p=0,423	r=-0,254 p=0,028	r=0,067 p=0,566	r=0,041 p=0,727	r=0,087 p=0,460	r=-0,178 p=0,126	r=0,063 p=0,589	r=0,149 p=0,203	r=-0,264 p=0,022
25(OH)D libre calculada			r=0,053 p=0,653	r=-0,437 p<0,001	r=-0,267 p=0,021	r=0,038 p=0,743	r=-0,113 p=0,333	r=0,102 p=0,382	r=-0,267 p=0,020	r=0,161 p=0,169	r=0,144 p=0,219	r=-0,285 p=0,013
1,25(OH) ₂ D				r=0,363 p=0,001	r=-0,062 p=0,596	r=-0,305 p=0,008	r=0,311 p=0,007	r=-0,250 p=0,04	r=-0,026 p=0,826	r=0,565 p<0,001	r=-0,157 p=0,183	r=-0,048 p=0,687
VDBP					r=0,156 p=0,182	r=-0,055 p=0,641	r=0,301 p=0,009	r=-0,162 p=0,165	r=-0,026 p=0,824	r=0,582 p<0,001	r=0,047 p=0,688	r=0,061 p=0,604
PTH						r=-0,024 p=0,840	r=-0,328 p=0,004	r=0,081 p=0,491	r=0,167 p=0,151	r=-0,140 p=0,231	r=-0,037 p=0,755	r=0,174 p=0,138
FGF23							r=0,018 p=0,880	r=0,374 p=0,003	r=0,151 p=0,196	r=-0,109 p=0,351	r=-0,023 p=0,845	r=0,039 p=0,744
Calcio								r=-0,237 p=0,041	r=-0,054 p=0,644	r=0,684 p<0,001	r=0,014 p=0,908	r=-0,035 p=0,768
Fósforo									r=0,180 p=0,123	r=-0,244 p=0,035	r=-0,089 p=0,453	r=0,055 p=0,731
Magnesio										r=-0,105 p=0,369	r=-0,294 p=0,011	r=0,161 p=0,169
Albúmina											r=0,035 p=0,77	r=-0,03 p=0,80
Catelcidina												r=0,078 p=0,511

Tabla 15. Correlaciones entre la 25(OH) D total y libre con parámetros del metabolismo fosfocálcico y péptidos antimicrobianos dependientes de vitamina D.

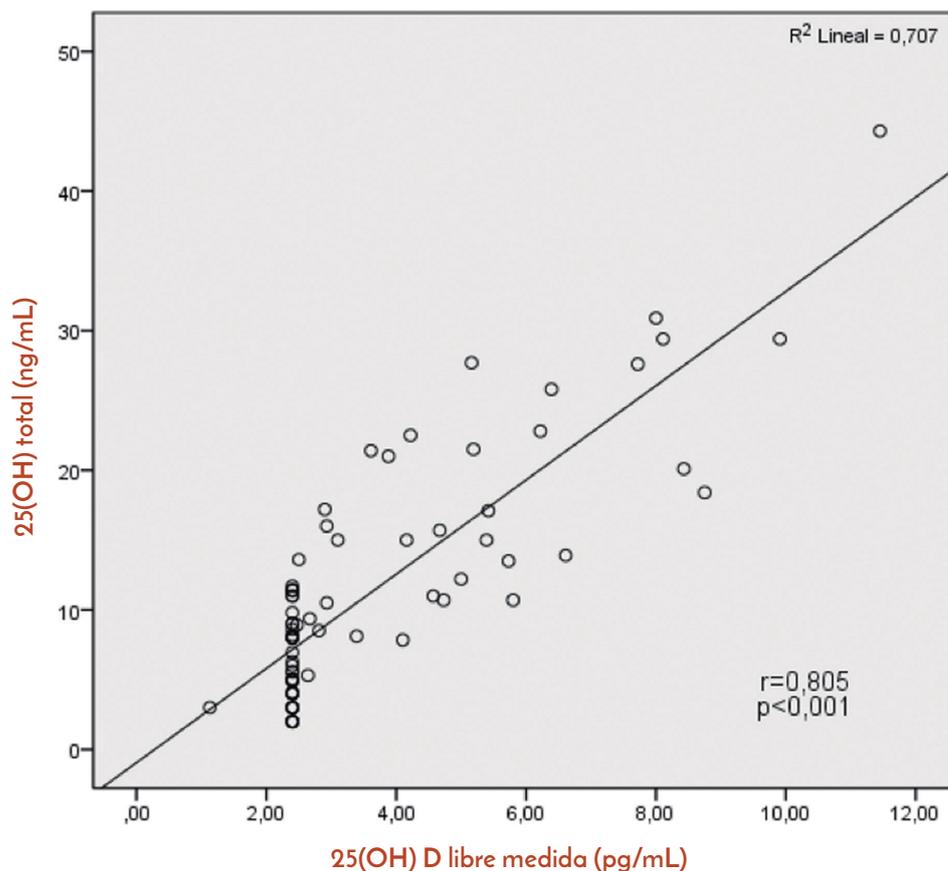


Figura 17. Correlación positiva entre los niveles de 25(OH) D total y 25(OH) D libre medida en suero.

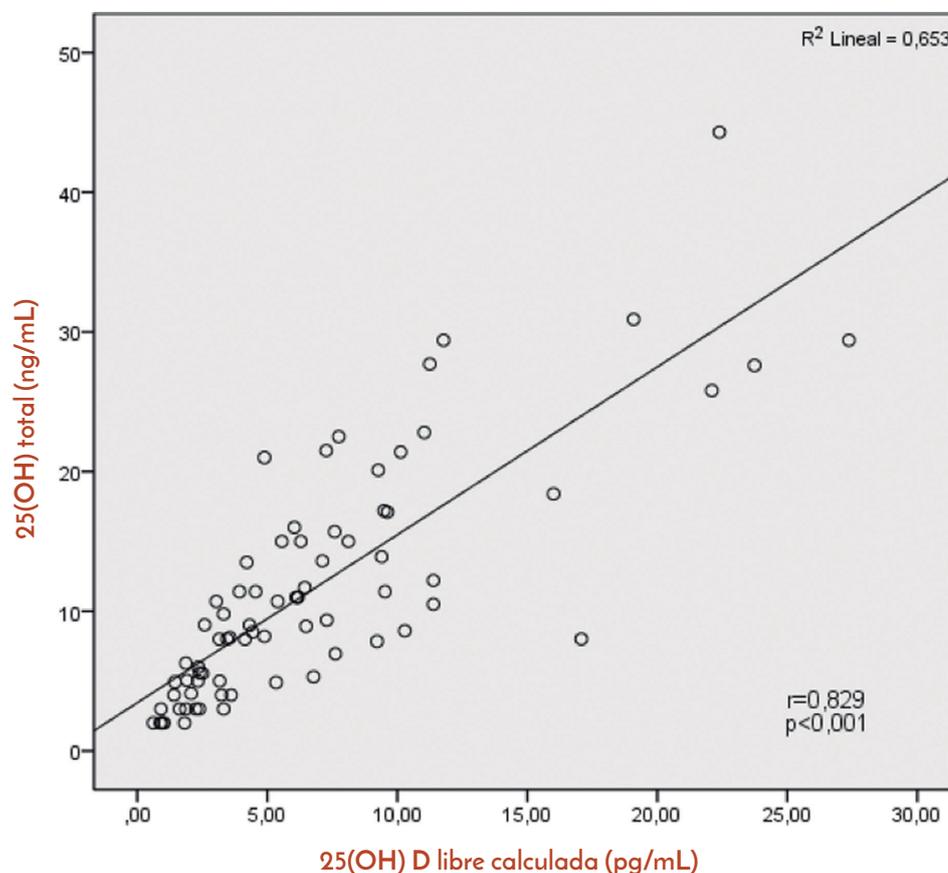


Figura 18. Correlación positiva entre los niveles de 25(OH) D total y 25(OH) D libre calculada en suero.

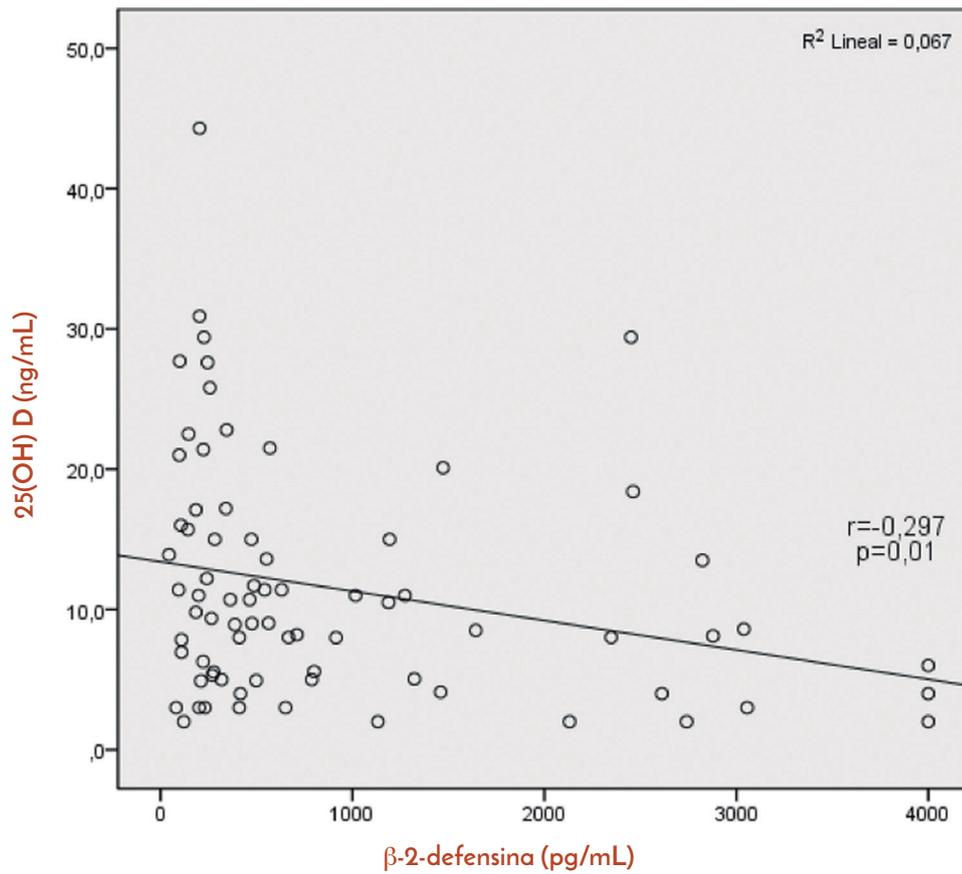


Figura 19. Correlación negativa entre los niveles de 25(OH) D total y β -2-defensina en suero.

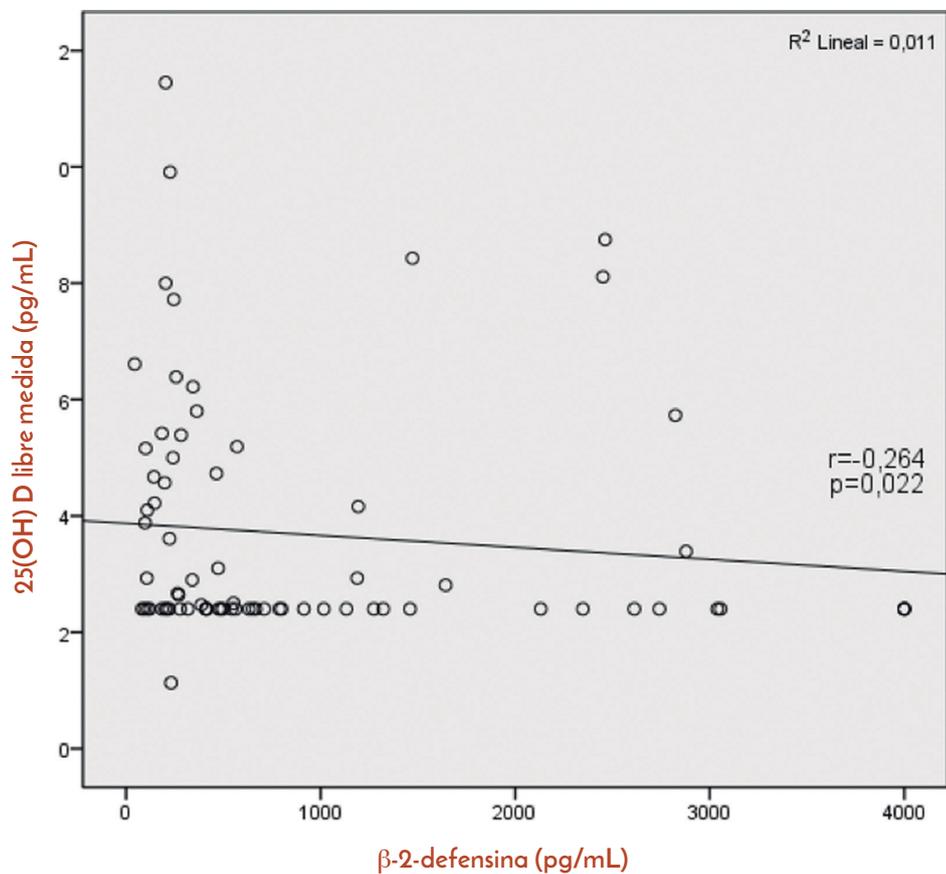


Figura 20. Correlación negativa entre los niveles de 25(OH) D libre medida y β -2-defensina en suero.

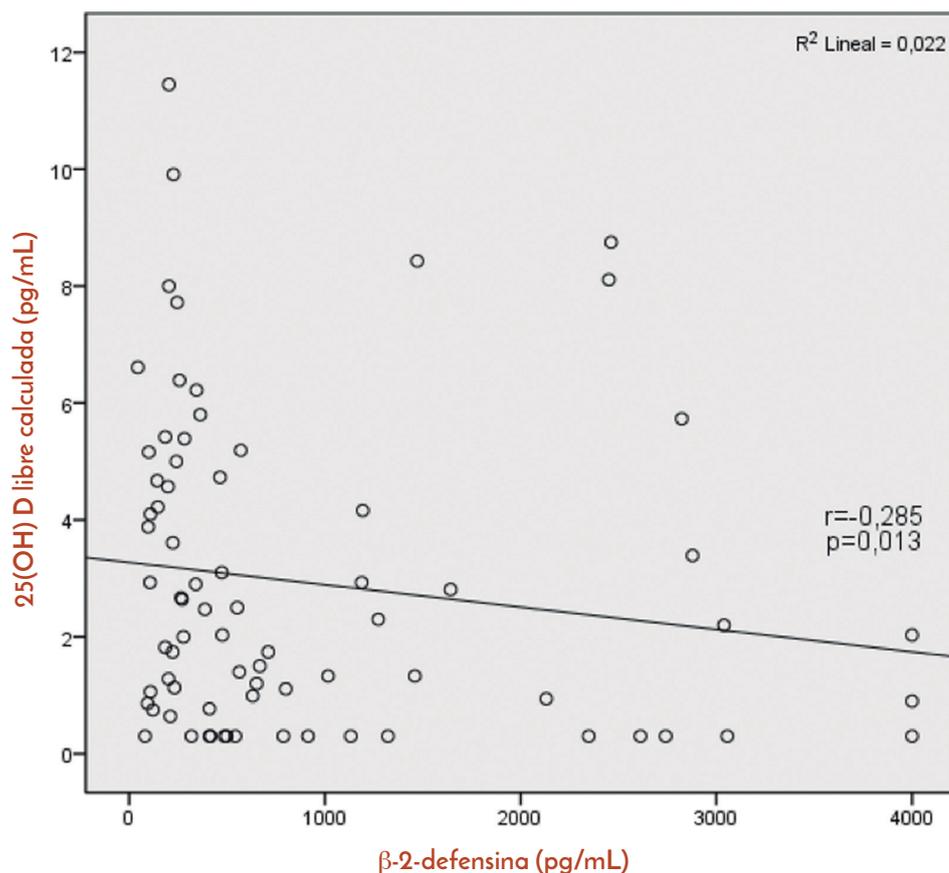


Figura 21. Correlación negativa entre los niveles de 25(OH) D libre calculada y β -2-defensina en suero.

4.5. CORRELACIONES DEL METABOLISMO FOSFOCÁLCICO Y VITAMINA D CON LOS PARÁMETROS DE INFLAMACIÓN Y DE DAÑO TISULAR

En el estudio de correlación de Spearman de los niveles de 25(OH) D y demás parámetros relacionados con la vitamina D con parámetros de inflamación (leucocitos, PCR, PCT y PTX3) (Tabla 16), se ha hallado que los niveles de FGF23 y catelicidina, se correlacionan positivamente con los leucocitos ($r=0,454$, $p<0,001$; $r=0,250$, $p=0,034$, respectivamente).

La VDBP muestra una asociación significativa negativa con los niveles de PTX3 ($r=-0,311$, $p=0,07$) y muestra una tendencia negativa con la PCT ($r=-0,230$, $p=0,052$).

Los niveles de PTX3 se correlacionan positivamente con los niveles de 25(OH) libre medida ($r=0,299$, $p=0,009$) y calculada ($r=0,308$, $p=0,007$) y con la PCT ($r=0,329$, $p=0,005$) pero no muestra asociación significativa con la PCR ($p=0,187$).

El lactato se correlaciona positivamente con la β -2-defensina ($r=0,280$, $p=0,018$) y negativamente con la VDBP ($r=-0,486$, $p<0,001$).

	25(OH)D	25(OH)D libre medida	25(OH)D libre calculada	1,25(OH) ₂ D	VDBP	PTH	FGF23	Calcio	Fósforo	Magnesio	Albúmina	Catelecidina	Defensina
Leucocitos	r=-0,040 p=0,740	r=-0,057 p=0,632	r=-0,064 p=0,593	r=-0,090 p=0,452	r=0,070 p=0,562	r=0,090 p=0,441	r=0,454 p<0,001	r=0,068 p=0,570	r=0,053 p=0,660	r=0,131 p=0,274	r=0,06 p=0,597	r=0,262 p=0,026	r=-0,055 p=0,647
PCR	r=0,142 p=0,235	r=0,157 p=0,189	r=0,104 p=0,387	r=-0,045 p=0,706	r=-0,055 p=0,644	r=0,14 p=0,234	r=0,245 p=0,038	r=0,119 p=0,319	r=0,009 p=0,941	r=0,305 p=0,009	r=-0,195 p=0,101	r=-0,074 p=0,539	r=-0,003 p=0,979
PCT	r=-0,076 p=0,526	r=0,08 p=0,946	r=0,066 p=0,580	r=-0,213 p=0,072	r=-0,230 p=0,052	r=0,245 p=0,038	r=-0,177 p=0,138	r=-0,215 p=0,070	r=0,096 p=0,424	r=0,001 p=0,990	r=-0,242 p=0,040	r=-0,163 p=0,172	r=0,118 p=0,322
PTX3	r=0,132 p=0,259	r=0,299 p=0,009	r=0,308 p=0,007	r=-0,208 p=0,076	r=-0,311 p=0,007	r=0,090 p=0,441	r=-0,080 p=0,494	r=-0,334 p=0,003	r=0,183 p=0,116	r=0,079 p=0,498	r=-0,346 p=0,002	r=-0,188 p=0,109	r=0,190 p=0,105
Lactato	r=-0,064 p=0,597	r=0,141 p=0,242	r=0,222 p=0,630	r=-0,152 p=0,202	r=-0,486 p<0,001	r=-0,115 p=0,354	r=0,097 p=0,433	r=-0,161 p=0,180	r=0,183 p=0,126	r=0,030 p=0,809	r=-0,278 p=0,023	r=-0,199 p=0,106	r=0,280 p=0,018

Tabla 16. Correlaciones del metabolismo fosfocálcico y vitamina D con parámetros de inflamación y de daño tisular.

4.6. ANÁLISIS DE LAS DIFERENCIAS EN LOS PARÁMETROS BIOQUÍMICOS Y CLÍNICOS ENTRE PACIENTES CON SUFICIENCIA O NO DE VITAMINA D, SEGÚN LOS DISTINTOS CRITERIOS DE DEFICIENCIA DE VITAMINA D

Para la comparación estadística para analizar las diferencias en los parámetros clínicos y bioquímicos, se ha categorizado a los pacientes en dos grupos según el valor de 25(OH) D: no deficientes (>20 ng/mL, que incluyen a la categoría de normales e insuficientes) versus deficientes (25(OH) D <20 ng/mL), ya que solamente 2 pacientes cumplían criterios de suficiencia según la *Endocrine Society* (25(OH) D >30 ng/ml).

Además, teniendo en cuenta los últimos criterios para valorar el estatus nutricional de la vitamina D, se ha categorizado a los pacientes en: deficiencia severa (25(OH) D <12 ng/mL) versus no deficiencia severa (25(OH) D >12 ng/mL).

La Tabla 17 muestra las características basales clínicas y demográficas de acuerdo con el estatus de la vitamina D: grupo deficiente/no deficiente y grupo deficiente severo /no deficiente severo.

No se han hallado diferencias significativas en ninguno de los dos grupos para la edad, sexo, inmunosupresión, foco primario de infección, Apache II, SAPS II, SOFA, número de disfunciones orgánicas, necesidad de ventilación mecánica, necesidad de HFVVC, presencia de SDRA, bacteriemia, mortalidad hospitalaria y en UCI ni con la estancia hospitalaria ni en UCI.

Se observan valores significativamente más elevados del índice Charlson en el grupo de vitamina D no deficientes (25(OH) D >20 ng/mL) (6,6 (3,9-10,9) vs. 3,9 (1,9-6,2); $p=0,037$) pero no se observan diferencias significativas cuando se compararon el grupo de deficientes severos (25(OH) D <12 ng/mL) versus el grupo de no deficientes severos ($p=0,19$).

Tampoco se han hallado diferencias significativas para ambos grupos para los siguientes parámetros bioquímicos: leucocitos, Hb, TP, pH, SvO₂, glucosa, urea, creatinina, filtrado glomerular (FG), sodio, potasio, bilirrubina, lactato, VDBP, catelicidina, FGF23, calcio, albúmina, fósforo, PCT, PCR y PTX3 (Tabla 18).

Con relación a las plaquetas, se observó una tendencia de niveles más altos en el grupo de deficientes severos de vitamina D en comparación con el grupo de no deficientes severos (167,5 (109-264) vs. 140,5 (85,8-188,8); $p=0,086$). Esta tendencia no se observó al comparar el grupo de deficientes de vitamina D con el grupo de no deficientes ($p=0,65$).

La PTH fue significativamente más elevada en la deficiencia severa de 25(OH) D con relación al grupo de no deficientes severos (104,8 pg/mL (50,6-214,9) vs. (41,9 pg/mL (24,9-86,6); $p=0,003$). Esta diferencia significativa no se observó cuando se compararon el grupo de deficientes y el grupo de no deficientes de vitamina D ($p=0,61$).

Se hallaron niveles de 25(OH) D total significativamente más elevados en el grupo de no deficientes con respecto al de deficientes (27,6 ng/mL (21,5-29,4) vs. 8,1 ng/mL (4,7-11,4); $p<0,001$). Asimismo, se observan niveles más elevados de 25(OH) D libre tanto medida como calculada (7,72 pg/mL (5,2-8,4) vs. 1,5 pg/mL (0,3-2,9); $p<0,001$; 11,3 pg/mL (9,3-22,4) vs. 4,2 pg/mL (2,3-6,9); $p<0,001$, respectivamente).

Además, los niveles séricos de 25(OH) D total también fueron significativamente más

elevados en el grupo de no deficientes severos versus al de deficientes severos (19,3 ng/mL (15-27,6) vs. 7,0 ng/mL (4-9,4), $p < 0,001$. Así como los niveles de 25(OH) D libre tanto medida como calculada en suero (5,29 pg/mL (4,02-8,03) vs. 1,11 pg/mL (0,3-2,03); $p < 0,001$; 9,56 pg/mL (7,51-12,84) vs. 3,32 pg/mL (1,91-6,11); $p < 0,001$; respectivamente).

Los niveles séricos de 1,25(OH)₂ D fueron significativamente más elevados en el grupo de no deficientes severos con respecto al grupo de deficientes severos de vitamina D (29 pg/mL (17,5-40,3) vs. 19 pg/mL (12-34); $p = 0,032$) mientras que no se observaron diferencias significativas entre el grupo de no deficiente con respecto al de deficiente ($p = 0,13$).

En relación a los niveles de β -2-defensina, se observaron niveles significativamente menores en el grupo de no deficientes con respecto al grupo de deficientes de vitamina D (226 pg/mL (203-570) vs. 492,5 pg/mL (259-1285,3), $p = 0,04$). Igualmente, se observaron niveles significativamente más disminuidos en el grupo de no deficientes severos en comparación con el grupo de deficientes severos (243 pg/mL (174,5-556,5) vs. 563 pg/mL (277-1459), $p = 0,015$).

Parámetros	Vitamina D deficientes (<20ng/mL) (n=62)	No vitamina D deficientes (>20 ng/mL) (n=13)	P	Vitamina D deficientes severos (<12 ng/mL) (n=50)	Vitamina D no deficientes severos (>12 ng/mL) (n=25)	p
Edad (años)	63 (48-71)	67 (66-75)	0,40	64 (49-70)	66 (53-75)	0,71
Masculino	43 (69,3)	10 (76,9)	0,74	33 (66)	19 (76)	0,59
Inmunosupresión	19 (30,6)	6 (46,2)	0,34	15 (30)	10 (40)	0,45
Índice Charlson	6,6 (3,9-10,9)	3,9 (1,9-6,2)	0,037	5,6 (2,2-7)	3,9 (1,9-6,1)	0,19
Foco primario de infección			0,83			0,20
Pulmón	23 (37,1)	7 (53,8)		16 (32)	14 (56)	
Abdomen	21 (33,9)	3 (23,1)		18 (36)	6 (24)	
Tracto urinario	8 (12,9)	1 (7,7)		8 (16)	1 (4)	
Tejidos blandos	3 (4,8)	2 (15,4)		2 (4)	3 (12)	
Catéter	2 (3,2)	0 (0)		2 (4)	0 (0)	
Otros	5 (8,1)	0 (0)		4 (8)	0 (0)	
Infección nosocomial	22 (35,5)	7 (53,8)	0,35	15 (30)	14 (56)	0,45
APACHE II	22 (15-27)	20 (16-33)	0,62	22 (15,3-26,8)	19,5 (15,3-28,8)	0,87
SAPS II	43 (32-63)	41 (32,5-74)	0,78	42,5 (31,3-63)	43 (32,8-64,3)	0,89
SOFA	9 (5-14)	9 (6-14,5)	0,96	9,5 (5-13,8)	9 (6-14,8)	0,95
Nº disfunción orgánica	3 (2-4)	3 (2-4,5)	0,51	2 (1,3-4)	3 (2-5)	0,33
SDRA	10 (16,1)	1 (7,7)	0,68	6 (12)	5 (20)	0,49
Ventilación mecánica	31 (50)	8 (61,5)	0,55	24 (48)	15 (60)	0,46
HFVVC	10 (16,1)	1 (7,7)	0,68	7 (14)	4 (16)	0,85
Bacteriemia	20 (32,3)	3 (23)	0,74	17 (34)	6 (24)	0,43
Estancia UCI (días)	4,9 (2,9-9,9)	5,9 (2,9-6,9)	0,79	4,9 (2,9-9,9)	5,9 (2,5-7,7)	0,88
Estancia hospitalaria (días)	13,9 (6,9-18,9)	18,9 (10,2-21,9)	0,77	13,9 (6,7-21,9)	14,4 (7,2-21,7)	0,92
Mortalidad UCI	15 (24,2)	3 (23)	0,91	13 (26)	5 (20)	0,58
Mortalidad hospitalaria	18 (29)	3 (23)	0,75	15 (30)	6 (24)	0,59

Tabla 17. Características demográficas y clínicas según el estatus de deficiencia y deficiencia severa de 25(OH)D. Los datos se expresan como mediana (rango intercuartílico) o frecuencia (porcentaje).

Parámetros	Vitamina D deficientes (<20ng/mL) (n=62)	No vitamina D deficientes (>20ng/mL) (n=13)	p	Vitamina D deficientes severos (<12ng/mL) (n=50)	Vitamina D no deficientes severos (>12ng/mL) (n=25)	p
Leucocitos (10 ³ /μL)	11,4 (6,6-17,8)	11,2 (4,2-23)	0,86	11,3 (6-18,5)	11,3 (6-16,9)	0,95
Hb (g/dL)	11,9 (9,7-14)	14,0 (10,7-15,2)	0,18	11,7 (9,6-14)	13,1 (10,4-14,8)	0,19
Plaquetas (10 ³ /μL)	142 (94-223)	170 (95-234)	0,65	168 (109-264)	141 (86-189)	0,086
TP (%)	62,5 (50,5-83,3)	75,0 (47,0-81,0)	0,52	62,0 (51,0-84,0)	73,5 (48,5-81,0)	0,69
pH	7,33 (7,25-7,37)	7,34 (7,25-7,40)	0,24	7,34 (7,27-7,37)	7,32 (7,24-7,37)	0,98
SvO ₂ (%)	73,1 (60,8-78,9)	68,5 (60,5-78,8)	0,87	75,2 (64,8-79,8)	65,8 (59,3-76,6)	0,056
Glucosa (mg/dL)	120 (96-157)	135 (107-165)	0,51	122 (96-155)	120 (93-167)	0,84
Urea (mg/dL)	82 (49-140)	82 (67-151)	0,32	84 (49-163)	67(50-100)	0,075
Creatinina (mg/dL)	1,81 (0,92-3,07)	1,39 (0,91-2,62)	0,62	1,85 (0,91-3,08)	1,50 (0,92-2,37)	0,49
FG (ml/min/1,73 m ²)	44 (19-73)	35 (28-61)	0,54	36 (18-74)	44 (29-64)	0,38
Sodio (mmol/L)	138(136-141)	137(135-140)	0,47	139 (135-142)	137 (136-139)	0,43
Potasio (mmol/L)	4,4 (3,6-5,1)	4,1 (3,6-5,0)	0,52	4,4 (3,6-5,3)	4,2 (3,7-4,9)	0,42
Bilirrubina (mg/dL)	0,9 (0,5-1,9)	1,0 (0,7-3,0)	0,32	0,9 (0,5-1,6)	0,95 (0,6-3,2)	0,32
Calcio (mg/dL)	7,9 (7,5-8,3)	7,6 (7,4-8,0)	0,73	7,9 (7,4-8,2)	7,9 (7,5-8,3)	0,44
Albúmina (g/dL)	2,6 (2,1-3)	2,7 (2,4-3,1)	0,53	2,5 (2,1-3)	2,9 (2,3-3,2)	0,078
Fósforo (mg/dL)	3,8 (3,0-4,8)	3,7 (2,4-6,6)	0,67	3,7 (3,0-4,7)	3,9 (2,9-5,4)	0,86
Magnesio (mg/dL)	1,9 (1,7-2,3)	1,7 (1,6-2,2)	0,11	2,0 (1,7-2,4)	1,8 (1,6-2,2)	0,058
Lactato (mmol/L)	2,9 (1,3-5)	2,8 (1,3-3,2)	0,42	2,8 (1,3-5)	2,6 (1,7-3,4)	0,87
PCT (ng/mL)	12,2 (1,6-54,7)	11 (1,1-21)	0,39	13 (2-64)	7,3 (0,7-23,5)	0,056
PCR (mg/dL)	22,4 (10,2-25)	25 (12,9-25)	0,31	22,7 (11-25)	23,5 (10-25)	0,73
PTX3 (ng/mL)	60 (19,3-177,4)	151,8 (67,1-250)	0,10	63,8 (22-171,6)	87,5 (34,7-250)	0,58
PTH (pg/mL)	67 (40-203)	82 (38-161)	0,61	105 (51-215)	42 (25-87)	0,003
FGF23 (pg/mL)	2,0 (2,0-65,7)	2,0 (2,0-26,2)	0,29	2,0 (2,0-54,7)	2,0 (2,0-70,0)	0,94
25(OH) D (ng/mL)	8,1 (4,7-11,4)	27,6 (21,5-29,4)	<0,001	7,0 (4,0-9,4)	19,3 (15,0-27,6)	<0,001
25(OH) D libre medida (pg/mL)	1,5 (0,3-2,9)	7,72 (5,2-8,4)	<0,001	1,11 (0,30-2,03)	5,29 (4,02-8,03)	<0,001
25(OH) D libre calculada (pg/mL)	4,2 (2,3-6,9)	11,3 (9,3-22,4)	<0,001	3,32 (1,91-6,11)	9,56 (7,51-12,84)	<0,001
1,25(OH) ₂ D (pg/mL)	19,5 (12-32,5)	34,0 (20-44)	0,13	19(12-34)	29 (17,5-40,3)	0,032
VDBP (ng/mL)	138980 (91390-187990)	157450 (113760-186560)	0,37	144150 (92230-188470)	149630 (111770-184910)	0,48
Catelicidina (ng/mL)	1,22 (0,72-1,91)	1,39 (0,56-2,24)	0,51	1,20 (0,77-1,7)	1,41 (0,55-2,22)	0,40
β-2-defensina (pg/mL)	493 (259-1285)	226 (203-570)	0,04	563 (277-1459)	243 (175-557)	0,015

Tabla 18. Características bioquímicas según el estatus de deficiencia y deficiencia severa de 25(OH)D. Los datos se expresan como mediana (rango intercuartílico).

4.7. ANÁLISIS DE LAS DIFERENCIAS EN LOS PARÁMETROS BIOQUÍMICOS Y CLÍNICOS ENTRE PACIENTES CON Y SIN HIPERPARATIROIDISMO SECUNDARIO A DÉFICIT DE VITAMINA D

Un total de 47 pacientes (62,6%) tenían niveles de PTH por encima de 55 pg/mL.

El hiperparatiroidismo secundario a déficit de vitamina D se definió como valores de PTH superiores a 55 pg/mL con valores de 25(OH) D inferiores a 20 ng/mL.

Según esta definición, un total de 38 pacientes (50,7%) de los pacientes presentaron hiperparatiroidismo secundario a déficit de vitamina D. Si se hubieran aplicado los criterios de la *Endocrine Society*, este porcentaje se elevaría a un 57,3%.

41 pacientes (54,7%) presentaron niveles de PTH superiores a 55 pg/mL y niveles de calcio inferiores a 8,5 mg/dL, de los cuales 35 (85,3%) tenían niveles deficientes de 25(OH) D (<20 ng/mL), 5 (12,2%) tenían niveles de 25(OH) D insuficientes (20-30 ng/mL) y sólo 1 paciente (2,5%) presentó niveles de 25(OH) D superiores a 30 ng/mL.

Cuando se comparó el grupo de hiperparatiroidismo secundario con respecto al que no presentó hiperparatiroidismo secundario, se presentaron porcentajes significativamente menores de SDRA. No hay diferencias significativas entre ambos grupos en relación al resto de parámetros demográficos y clínicos (Tabla 19).

En relación a los parámetros bioquímicos, se observaron diferencias significativas para la PTH, entre ambos grupos. El grupo con hiperparatiroidismo secundario presentó niveles de PTH significativamente mayores que los que no presentaron hiperparatiroidismo secundario (132,5 pg/mL (80,1-236,6) vs. 39,2 pg/mL (25,3-57,2); $p < 0,001$) y significativamente menores de 25(OH) D (8 ng/mL (4,5-10,7) vs. 15,3 ng/mL (6,6-21,8); $p < 0,001$) y de 25(OH) D libre medida y calculada (1,28 pg/mL (0,70-2,57) vs. 3,75 pg/mL (1,63-5,62) y 3,56 pg/mL (1,99-6,17) vs. 7,6 pg/mL (3,57-11,09); $p < 0,001$ y $p < 0,001$; respectivamente) así una tendencia de niveles elevados de β -2-defensina (542 (351,5-1104,5) vs. 279,5 (184-1359,5); $p = 0,065$) pero no existen diferencias entre los dos grupos en relación a los niveles de calcio sérico (7,98 mg/dL (7,52-8,39) vs. 7,77 mg/dL (7,44-8,17); $p = 0,14$) ni creatinina (1,5 mg/dL (0,9-2,7) vs. 1,9 mg/dL (1-3,1); $p = 0,26$) ni tampoco con respecto al resto de parámetros (Tabla 20).

Características	No hiperparatiroidismo secundario (n=37)	Hiperparatiroidismo secundario (n=38)	p
Edad (años)	63 (41-72)	68 (58-75)	0,11
Masculino	22 (59,5)	30 (78,9)	0,12
Inmunosupresión	14 (37,8)	11 (28,9)	0,46
Índice Charlson	4,3 (1-6,7)	3,9 (2,9-6,1)	0,64
Foco primario de infección			0,44
Pulmón	19 (51,3)	11 (28,9)	
Abdomen	8 (21,6)	16 (42,1)	
Tracto urinario	4 (10,8)	5 (13,2)	
Tejidos blandos	0 (0)	1 (2,6)	
Cáteter	1 (2,7)	1 (2,6)	
Otros	4 (10,8)	5 (13,2)	
Infección nosocomial	17 (45,9)	12 (31,6)	0,23
SAPS II	41 (34,2-63)	44 (32-64,5)	0,93
APACHE II	20 (14,8-28)	22 (16,5-26,5)	0,88
SOFA	10 (6-15,2)	9 (4,5-13)	0,35
Nº disfunción orgánica	3 (2-4)	2 (2-4)	0,32
Ventilación mecánica	23 (62,6)	16 (42,1)	0,068
SDRA	9 (24,3)	2 (5,3)	0,023
HFVVC	8 (21,6)	3 (7,9)	0,11
Bacteriemia	8 (21,6)	15 (39,5)	0,13
Mortalidad UCI	8 (21,6)	10 (26,3)	0,79
Mortalidad hospitalaria	6 (16,2)	15 (39,5)	0,43
Estancia UCI (días)	5,9 (3,2-9,9)	9,9 (2,9-9,9)	0,32
Estancia hospitalaria (días)	12,9 (10,2-21,9)	14,4 (5,9-19,9)	0,59

Tabla 19. Características demográficas y clínicas según el estado de hiperparatiroidismo secundario. Los datos se expresan como mediana (rango intercuartílico) o frecuencia (porcentaje).

Parámetros	No hiperparatiroidismo secundario (n=37)	Hiperparatiroidismo secundario (n=38)	p
Creatinina (mg/dL)	1,5 (0,9-2,7)	1,9 (1-3,1)	0,26
FG (mL/min/1.73 m ²)	46 (27-80)	35 (18,5-60)	0,18
Calcio (mg/dL)	7,98 (7,52-8,39)	7,77 (7,44-8,17)	0,14
Albúmina (g/dL)	2,71 (2,15-3,15)	2,51 (2,22-3)	0,40
Fósforo (mg/dL)	4,08 (2,67-4,95)	3,73 (3,13-4,81)	0,81
Magnesio (mg/dL)	1,82 (1,65-2,23)	1,89 (1,72-2,33)	0,28
Lactato (mmol/L)	2,7 (1,2-6,5)	2,6 (1,3-4,1)	0,59
PCT (mg/dL)	9,9 (0,94-34,7)	13 (1,9-56)	0,27
PCR (mg/dL)	22,9 (9,1-25)	22,8 (11,9-25)	0,64
PTX3 (ng/mL)	84,7 (25,9-225,9)	50,6 (23,1-183,2)	0,43
PTH (pg/mL)	39,2 (25,3-57,2)	132,5 (80,1-236,6)	<0,001
FGF23 (pg/mL)	2,0 (2,0-57,8)	2,0 (2,0-63,5)	0,23
25(OH)D (ng/mL)	15,3 (6,6-21,8)	8 (4,5-10,7)	<0,001
25(OH) D libre medida (pg/mL)	3,75 (1,63-5,62)	1,28 (0,70-2,57)	<0,001
25(OH) D libre calculada (pg/mL)	7,6 (3,57-11,09)	3,56 (1,99-6,17)	<0,001
1,25(OH) ₂ D (pg/mL)	16 (8,5-39,7)	19 (11,8-29)	0,75
VDBP (ng/mL)	143630 (85020-178170)	144380 (110130-197560)	0,28
Catelicidina (ng/mL)	1,35 (0,56-2,18)	1,20 (0,74-2,04)	0,45
β-2-defensina (pg/mL)	279,5 (184-1359,5)	542 (351,5-1104,5)	0,065

Tabla 20. Características bioquímicas según el estado de hiperparatiroidismo secundario. Los datos se expresan como mediana (rango intercuartílico).

4.8. ANÁLISIS DE LOS PARÁMETROS DEL METABOLISMO DE LA VITAMINA D Y DEL METABOLISMO FOSFOCÁLCICO ANALIZADOS EN RELACIÓN A PARÁMETROS CLÍNICOS

4.8.1. Estancia hospitalaria y estancia en UCI

Con respecto a la estancia en UCI, de los parámetros bioquímicos del metabolismo de la vitamina D, metabolismo fosfofórico y de inflamación, se observa una correlación significativa negativa con la albúmina ($r=-0,281$, $p=0,015$) y una tendencia positiva con el magnesio ($r=0,231$, $p=0,051$) (Tabla 21).

Con respecto a la estancia hospitalaria, de los parámetros estudiados, sólo se observa una correlación significativa positiva con la catelicidina ($r=0,271$, $p=0,020$) (Tabla 21).

Parámetros bioquímicos	Estancia UCI		Estancia hospitalaria	
	r	p	r	p
Calcio (mg/dL)	-0,099	0,408	-0,024	0,842
Albúmina (g/dL)	-0,281	0,015	-0,135	0,250
Fósforo (mg/dL)	0,098	0,415	-0,075	0,526
Magnesio (mg/dL)	0,231	0,051	0,030	0,799
Lactato (mmol/L)	0,115	0,336	-0,072	0,550
PCT (mg/dL)	-0,185	0,117	-0,096	0,421
PCR (mg/dL)	-0,003	0,980	0,031	0,792
PTX3 (ng/mL)	0,104	0,382	0,041	0,731
PTH (pg/mL)	-0,087	0,470	0,003	0,981
FGF23 (pg/mL)	0,154	0,196	-0,062	0,601
25(OH)D (ng/mL)	-0,045	0,707	-0,027	0,818
25(OH) D libre medida (pg/mL)	0,005	0,964	0,069	0,559
25(OH) D libre calculada (pg/mL)	0,040	0,736	0,032	0,785
1,25(OH) ₂ D (pg/mL)	-0,038	0,750	-0,237	0,042
VDBP (ng/mL)	-0,098	0,412	-0,001	0,991
Catelicidina (ng/mL)	0,074	0,539	0,271	0,020
β-2-defensina (pg/mL)	0,018	0,879	-0,054	0,648

Tabla 21. Correlación de los parámetros bioquímicos estudiados con respecto a la estancia en UCI y hospitalaria.

4.8.2. Foco primario de infección

Se compararon globalmente los niveles de los diferentes parámetros del metabolismo de la vitamina D, del metabolismo fosfocálcico y de los parámetros de inflamación con respecto al foco primario de infección. Hallándose diferencias significativas para los niveles de calcio ($p=0,007$), albúmina ($p=0,004$), lactato ($p=0,035$), PTX3 ($p=0,026$) y VDBP ($p=0,023$), (Tabla 22).

Parámetros bioquímicos	Foco primario de infección
	P
Calcio (mg/dL)	0,007
Albúmina (g/dL)	0,004
Fósforo (mg/dL)	0,134
Magnesio (mg/dL)	0,723
Lactato (mmol/L)	0,035
PCT (mg/dL)	0,192
PCR (mg/dL)	0,088
PTX3 (ng/mL)	0,026
PTH (pg/mL)	0,302
FGF23 (pg/mL)	0,615
25(OH)D (ng/mL)	0,494
25(OH) D libre medida (pg/mL)	0,082
25(OH) D libre calculada (pg/mL)	0,538
1,25(OH) ₂ D (pg/mL)	0,068
VDBP (ng/mL)	0,023
Catelicidina (ng/mL)	0,676
β -2-defensina (pg/mL)	0,626

Tabla 22. Asociación de los parámetros bioquímicos estudiados con el foco primario de infección.

Cuando se compararon grupo a grupo, se obtuvieron los siguientes resultados.

La mediana de los niveles séricos de calcio fue significativamente menor en pacientes con infección abdominal con respecto a pacientes con infección del tracto urinario (ITU) (7,54 mg/dL (6,93-7,89) vs. 7,99 mg/dL (7,72-8,35); $p=0,023$) y con respecto a aquellos pacientes con infección pulmonar (7,54 mg/dL (6,93-7,89) vs 8,02 mg/dL (7,66-8,35); $p=0,002$).

La mediana de los niveles séricos de albúmina fue significativamente menor en pacientes con infección abdominal con respecto a pacientes con ITU (2,29 g/dL (1,97-2,66) vs. 2,95 g/dL (2,59-3,02); $p=0,001$) y con infección pulmonar (2,29 g/dL (1,97-2,66) vs 2,92 g/dL (2,30-3,18); $p=0,002$).

La mediana de los niveles séricos de PTX3 fue significativamente mayor en pacientes con infección abdominal con respecto a pacientes con ITU (105,05 ng/mL (35,02-250) vs. 14,3 ng/mL (4,35-29,15); $p=0,001$); y significativamente mayores en pacientes con infección pulmonar con respecto a aquellos con ITU (74,80 ng/mL (31,07-156,75) vs (14,3 ng/mL (4,35-29,15); $p=0,015$).

La mediana de los niveles séricos de lactato fue significativamente mayor en pacientes con infección abdominal con respecto a pacientes con infección en piel y/o tejidos blandos (3,1 mmol/L (2-8,9) vs. 1 mmol/L (0,9-2,1); $p=0,006$) y con respecto a pacientes con ITU (3,1 mmol/L (2-8,9) vs. 1,2 mmol/L (0,8-3,4); $p=0,031$).

La mediana de los niveles séricos de VDBP fue significativamente menor en pacientes con infección abdominal con respecto a pacientes con ITU (114006 ng/mL (82734-135834) vs. 188470 ng/mL (117179-262400); $p=0,014$) y con respecto a pacientes que presentaron infección pulmonar (114006 ng/mL (82734-135834) vs. 166542 ng/mL (134637-192186); $p=0,003$).

No se observaron asociaciones significativas entre los demás parámetros y el foco primario de infección.

4.8.3. Índices de gravedad

El índice de gravedad SOFA, exhibió una correlación significativamente negativa con la albúmina ($r=-0,430$, $p<0,001$), los niveles de VDBP ($r=-0,373$, $p=0,001$) y con la catelicidina ($r=-0,246$, $p=0,034$) y positiva con la PTX3 ($r=0,378$, $p=0,001$) y el lactato ($r=0,487$, $p<0,001$), la PTX3 ($r=0,378$, $p=0,001$) y el lactato ($r=0,487$, $p<0,001$) (Tabla 23).

APACHE II mostró una asociación significativa negativa con el calcio ($r=-0,300$, $p=0,009$), la albúmina ($r=-0,405$, $p<0,001$), la $1,25(\text{OH})_2 \text{ D}$ ($r=-0,304$, $p=0,008$), con la VDBP ($r=-0,530$, $p=0,002$) y la catelicidina ($r=-0,231$, $p=0,048$), y una asociación significativa positiva con el fósforo ($r=0,352$, $p=0,002$), con la PCT ($r=0,264$, $p=0,025$), con la PTX3 ($r=0,402$, $p<0,001$), con el lactato ($r=0,351$, $p=0,003$) y con los niveles de FGF23 ($r=0,275$, $p=0,018$) (Tabla 23).

SAPS II se correlacionó positivamente con el fósforo ($r=0,382$, $p=0,001$), la PTX3 ($r=0,449$, $p<0,001$), el lactato ($r=0,420$, $p<0,001$), el FGF23 ($r=0,301$, $p=0,009$) y con la $25(\text{OH})$ libre calculada ($r=0,238$, $p=0,041$), y negativamente con los niveles de calcio ($r=-0,231$, $p=0,048$), de albúmina ($r=-0,400$, $p<0,001$), de $1,25(\text{OH})_2 \text{ D}$ ($r=-0,315$, $p=0,006$), de VDBP ($r=-0,332$, $p=0,004$) y de catelicidina ($r=-0,240$, $p=0,039$) (Tabla 23).

Parámetros bioquímicos	SOFA		APACHE II		SAPS II	
	r	p	r	p	r	p
Calcio (mg/dL)	0,140	0,235	-0,300	0,009	-0,231	0,048
Albúmina (g/dL)	-0,430	<0,001	-0,405	<0,001	-0,400	<0,001
Fósforo (mg/dL)	0,190	0,105	0,352	0,002	0,382	0,001
Magnesio (mg/dL)	0,216	0,065	0,009	0,937	0,055	0,641
Lactato (mmol/L)	0,487	<0,001	0,351	0,003	0,420	<0,001
PCT (mg/dL)	0,160	0,179	0,264	0,025	0,158	0,184
PCR (mg/dL)	0,010	0,931	-0,051	0,669	-0,04	0,739
PTX3 (ng/mL)	0,378	0,001	0,402	<0,001	0,449	<0,001
PTH (pg/mL)	-0,079	0,501	0,050	0,672	0,012	0,918
FGF23 (pg/mL)	0,203	0,083	0,275	0,018	0,301	0,009
25(OH)D (ng/mL)	-0,090	0,448	-0,057	0,629	0,007	0,953
25(OH) D libre medida (pg/mL)	0,083	0,484	0,026	0,829	0,069	0,558
25(OH) D libre calculada (pg/mL)	0,183	0,118	0,185	0,114	0,238	0,041
1,25(OH) ₂ D (pg/mL)	-0,260	0,025	-0,304	0,008	-0,315	0,006
VDBP (ng/mL)	-0,373	0,001	-0,530	0,002	-0,332	0,004
Catelicidina (ng/mL)	-0,246	0,034	-0,231	0,048	-0,240	0,039
β-2-defensina (pg/mL)	0,024	0,842	0,110	0,350	0,081	0,495

Tabla 23. Correlación de los parámetros bioquímico estudiados con parámetros de gravedad.

4.8.4. Bacteriemia

No se hallaron diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes parámetros bioquímicos analizados y la presencia o no de bacteriemia (Tabla 24).

Parámetros bioquímicos	Bacteriemia
	p
Calcio (mg/dL)	0,257
Albúmina (g/dL)	0,704
Fósforo (mg/dL)	0,509
Magnesio (mg/dL)	0,288
Lactato (mmol/L)	0,063
PCT (mg/dL)	0,152
PCR (mg/dL)	0,152
PTX3 (ng/mL)	0,646
PTH (pg/mL)	-0,096
FGF23 (pg/mL)	0,313
25(OH)D (ng/mL)	0,236
25(OH) D libre medida (pg/mL)	0,302
25(OH) D libre calculada (pg/mL)	0,513
1,25(OH) ₂ D (pg/mL)	0,547
VDBP (ng/mL)	0,670
Catelicidina (ng/mL)	0,031
β-2-defensina (pg/mL)	0,257

Tabla 24. Asociación de los parámetros bioquímicos estudiados con la bacteriemia.

4.8.5. Tipo de germen

Con respecto al tipo de germen, entre los parámetros bioquímicos analizados, sólo se observaron diferencias en los niveles séricos de catelicidina y calcio. Así, pacientes con infección por germen Gram positivo presentaron niveles significativamente mayores de catelicidina y calcio que aquellos que tuvieran infección por germen Gram negativo (1,35 ng/mL (0,85-2,13) vs. 0,81 ng/mL (0,17-1,27); $p=0,03$; 7,98 mg/dL (7,51-8,36) vs. 7,60 mg/dL (6,91-7,96); $p=0,043$), respectivamente (Tabla 25).

Parámetros bioquímicos	Tipo de germen
	P
Calcio (mg/dL)	0,043
Albúmina (g/dL)	0,704
Fósforo (mg/dL)	0,917
Magnesio (mg/dL)	0,202
Lactato (mmol/L)	0,239
PCT (mg/dL)	0,236
PCR (mg/dL)	0,373
PTX3 (ng/mL)	0,646
PTH (pg/mL)	-0,379
FGF23 (pg/mL)	0,704
25(OH) D (ng/mL)	0,466
25(OH) D libre medida (pg/mL)	0,481
25(OH) D libre calculada (pg/mL)	0,787
1,25(OH) ₂ D (pg/mL)	0,492
VDBP (ng/mL)	0,766
Catelicidina (ng/mL)	0,003
β-2-defensina (pg/mL)	0,506

Tabla 25. Asociación de los parámetros bioquímicos estudiados con el tipo de germen.

4.8.6. SDRA

Sólo se hallaron tendencias no significativas con relación a la presencia de SDRA hacia niveles aumentados de fósforo ($p=0,063$) y disminuidos de VDBP ($p=0,067$) (Tabla 26).

Parámetros bioquímicos	SDRA
	p
Calcio (mg/dL)	0,927
Albúmina (g/dL)	0,162
Fósforo (mg/dL)	0,063
Magnesio (mg/dL)	0,335
Lactato (mmol/L)	0,199
PCT (mg/dL)	0,199
PCR (mg/dL)	0,070
PTX3 (ng/mL)	0,111
PTH (pg/mL)	0,102
FGF23 (pg/mL)	0,78
25(OH) D (ng/mL)	0,632
25(OH) D libre medida (pg/mL)	0,34
25(OH) D libre calculada (pg/mL)	0,47
1,25(OH) ₂ D (pg/mL)	0,319
VDBP (ng/mL)	0,067
Catelicidina (ng/mL)	0,71
β -2-defensina (pg/mL)	0,732

Tabla 26. Asociación de parámetros bioquímicos estudiados con el SDRA.

4.8.7. Ventilación mecánica

Se hallaron diferencias significativas con respecto a la necesidad de ventilación mecánica en los siguientes parámetros: albúmina ($p=0,004$), lactato ($p=0,004$), PTX3 ($p=0,007$), $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ ($p=0,020$) y VDBP ($p=0,003$) (Tabla 27).

Así, como una tendencia en el fósforo ($p=0,055$), el FGF23 ($p=0,099$) y la $25(\text{OH})\text{D}$ libre calculada ($p=0,059$).

Parámetros bioquímicos	Ventilación mecánica
	P
Calcio (mg/dL)	0,281
Albúmina (g/dL)	0,004
Fósforo (mg/dL)	0,055
Magnesio (mg/dL)	0,458
Lactato (mmol/L)	0,004
PCT (mg/dL)	0,783
PCR (mg/dL)	0,630
PTX3 (ng/mL)	0,007
PTH (pg/mL)	0,052
FGF23 (pg/mL)	0,099
$25(\text{OH})\text{D}$ (ng/mL)	0,944
$25(\text{OH})\text{D}$ libre medida (pg/mL)	0,361
$25(\text{OH})\text{D}$ libre calculada (pg/mL)	0,059
$1,25(\text{OH})_2\text{D}$ (pg/mL)	0,020
VDBP (ng/mL)	0,003
Catelicidina (ng/mL)	0,207
β -2-defensina (pg/mL)	0,922

Tabla 27. Asociación de los parámetros bioquímicos estudiados con la ventilación mecánica.

Pacientes que requirieron ventilación mecánica mostraron niveles de albúmina significativamente menores que aquellos que no la necesitaron (2,38 g/dL (2-2,96) vs. 2,9 g/dL (2,48-3,05); $p=0,004$), de PTH (57,75 pg/mL (38,5-127,6) vs. 104,9 pg/mL (52,5-234,8); $p=0,032$), de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ (18,5 pg/mL (10,8-32,5) vs. 25 pg/mL (15-42); $p=0,020$) y de VDBP (133326 ng/mL (74773-172846) vs. (163158 ng/mL (134472-203420); $p=0,003$).

Sin embargo, en los pacientes que necesitaron ventilación mecánica se hallaron niveles significativamente mayores de PTX3 comparado con los pacientes que no la necesitaron (106,7 ng/mL (35,2-250) vs. 38,5 ng/mL (17,6-112,2); $p=0,007$) y de lactato (3,4 mmol/L (2-6,6) vs. 2,1 mmol/L (1-3,4); $p=0,004$).

4.8.8. Necesidad de HFVVC

Se observaron diferencias significativas en relación a la necesidad de HFVVC para la albúmina ($p=0,001$), el fósforo ($p=0,03$), el lactato ($p=0,001$), la PTX3 ($p=0,018$), el FGF23 ($p=0,012$), la $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ ($p=0,038$) y la VDBP ($p=0,001$) (Tabla 28). Además, se observó una tendencia no significativa en los niveles de PTH ($p=0,061$) y de $25(\text{OH})\text{D}$ libre calculada ($p=0,053$).

Parámetros bioquímicos	HFVVC
	p
Calcio (mg/dL)	0,744
Albúmina (g/dL)	0,001
Fósforo (mg/dL)	0,030
Magnesio (mg/dL)	0,216
Lactato (mmol/L)	0,001
PCT (mg/dL)	0,832
PCR (mg/dL)	0,725
PTX3 (ng/mL)	0,018
PTH (pg/mL)	0,061
FGF23 (pg/mL)	0,012
$25(\text{OH})\text{D}$ (ng/mL)	0,808
$25(\text{OH})\text{D}$ libre medida (pg/mL)	0,292
$25(\text{OH})\text{D}$ libre calculada (pg/mL)	0,053
$1,25(\text{OH})_2\text{D}$ (pg/mL)	0,038
VDBP (ng/mL)	0,001
Catelicidina (ng/mL)	0,849
β -2-defensina (pg/mL)	0,958

Tabla 28. Asociación de los parámetros bioquímicos estudiados con la HFVVC.

Pacientes que requirieron HFVVC presentaron niveles de albúmina significativamente menores que aquellos que no la necesitaron (2 g/dL (1,9-2,3) vs. 2,7 g/dL (2,3-3), $p=0,001$), de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ (13,5 pg/mL (7,8-28,8) vs. 22 pg/mL (14,5-38,5), $p=0,038$) y de VDBP (81384 ng/mL (59465-136664) vs. 152192 ng/mL (121752-190839), $p=0,001$).

Sin embargo, aquellos pacientes que necesitaron HFCCV presentaron niveles de FGF23 significativamente mayores que pacientes que no la requirieron (74,3 pg/ml (23,2-253,1) vs. 2 pg/mL (2-36,7); $p=0,012$), de fósforo (4,5 mg/dL (3,8-6) vs. 3,7 mg/dL (2,9-4,8); $p=0,03$), de PTX3 (194,7 ng/mL (60,77-250,00) vs 57,02 ng/mL (17,6-140,80); $p=0,018$) y de lactato (5 mmol/L (3,1-9,3) vs. 2,6 mmol/L (1,2-3,9); $p=0,01$).

4.9. ANÁLISIS DE LOS PARÁMETROS BIOQUÍMICOS ANALIZADOS EN RELACIÓN CON LA MORTALIDAD HOSPITALARIA

En las tablas 8 y 9 se muestran los resultados obtenidos para los parámetros demográficos, clínicos y bioquímicos al ingreso en UCI, en relación con la mortalidad hospitalaria.

Se hallaron diferencias estadísticamente significativas entre supervivientes y no supervivientes para la inmunosupresión ($p=0,05$), los índices de gravedad SAPS II (36 (29,5-50,2) vs. 61 (53,5-69), $p<0,001$), APACHE II (19,5 (14-25,2) vs. 25 (22-30), $p<0,001$) y SOFA (9 (7-12) vs. 14 (10-17,5); $p<0,001$), el número de disfunciones orgánicas (2 (1-3,2) vs. 4 (3-5); $p<0,001$), necesidad de ventilación mecánica ($p<0,001$) y de HFVVC ($p=0,009$) y la estancia hospitalaria (15,5 días (10,5-22,5) vs. 6,9 días (2,5-14,5), $p=0,05$).

No se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas para la edad ($p=0,12$), el sexo ($p=0,58$), la procedencia de los pacientes ($p=0,13$), la infección nosocomial ($p=0,79$), la bacteriemia ($p=0,41$), el tipo de germen ($p=0,75$), la estancia en UCI ($p=0,10$) y el índice Charlson ($p=0,28$), aunque sí una tendencia en relación al foco primario de infección ($p=0,053$).

Así, los no supervivientes estaban más gravemente enfermos, como se refleja en las puntuaciones de los índices de gravedad significativamente más elevadas y un mayor número de disfunciones orgánicas que los supervivientes al ingreso en UCI. También requirieron ventilación mecánica y hemofiltración en un mayor porcentaje de casos en comparación con los supervivientes. Los no supervivientes presentaron significativamente mayores casos de inmunosupresión.

Cuando se compararon los niveles séricos 25(OH) D, los parámetros del metabolismo fosfocálcico y péptidos antimicrobianos dependientes de vitamina D entre el grupo de supervivientes y no supervivientes, no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas para el calcio ($p=0,43$), la PTH ($p=0,97$), la 25(OH) D ($p=0,65$), la 25(OH) D libre medida ($p=0,24$), la 1,25(OH)₂ D ($p=0,11$) y la β -2-defensina ($p=0,67$), aunque sí una tendencia hacia niveles aumentados de 25(OH) D libre calculada ($p=0,067$) y disminuidos de catelicidina ($p=0,086$).

Por el contrario, los supervivientes presentaron niveles séricos de albúmina (2,7 g/dL (2,2-3) vs. 2,4 g/dL (1,9-3); $p=0,024$) y de VDBP significativamente mayores que los no supervivientes (155067ng/mL (127411-206900) vs. 85572 ng/mL (62973-147691); $p<0,001$). Mientras que los supervivientes mostraron niveles significativamente menores de fósforo (3,5 mg/dL (2,6-4,5) vs. 4,5 mg/dL (3,7-6); $p=0,004$), PTX3 (41,9 ng/mL (14,3-124,3) vs. 114,4 (56,1-250); $p=0,09$) y FGF23 (2 pg/mL (2-55,1) vs. 28,5 pg/mL (2-212,4); $p=0,029$) (Tabla 9, Figura 22).

Tampoco se han encontrado diferencias significativas entre supervivientes y no supervivientes con respecto al estado nutricional de la vitamina D según criterios de la *Endocrine Society* ($p=0,588$), ni con los criterios de la IOM ($p=0,64$) ni con los criterios de la International Conference ($p=0,83$). Ni con respecto a la deficiencia severa de vitamina D ($p=0,59$).

Asimismo, tampoco se han encontrado diferencias entre supervivientes y no supervivientes entre los pacientes que presentaron hiperparatiroidismo secundario de los que no ($p=0,61$).

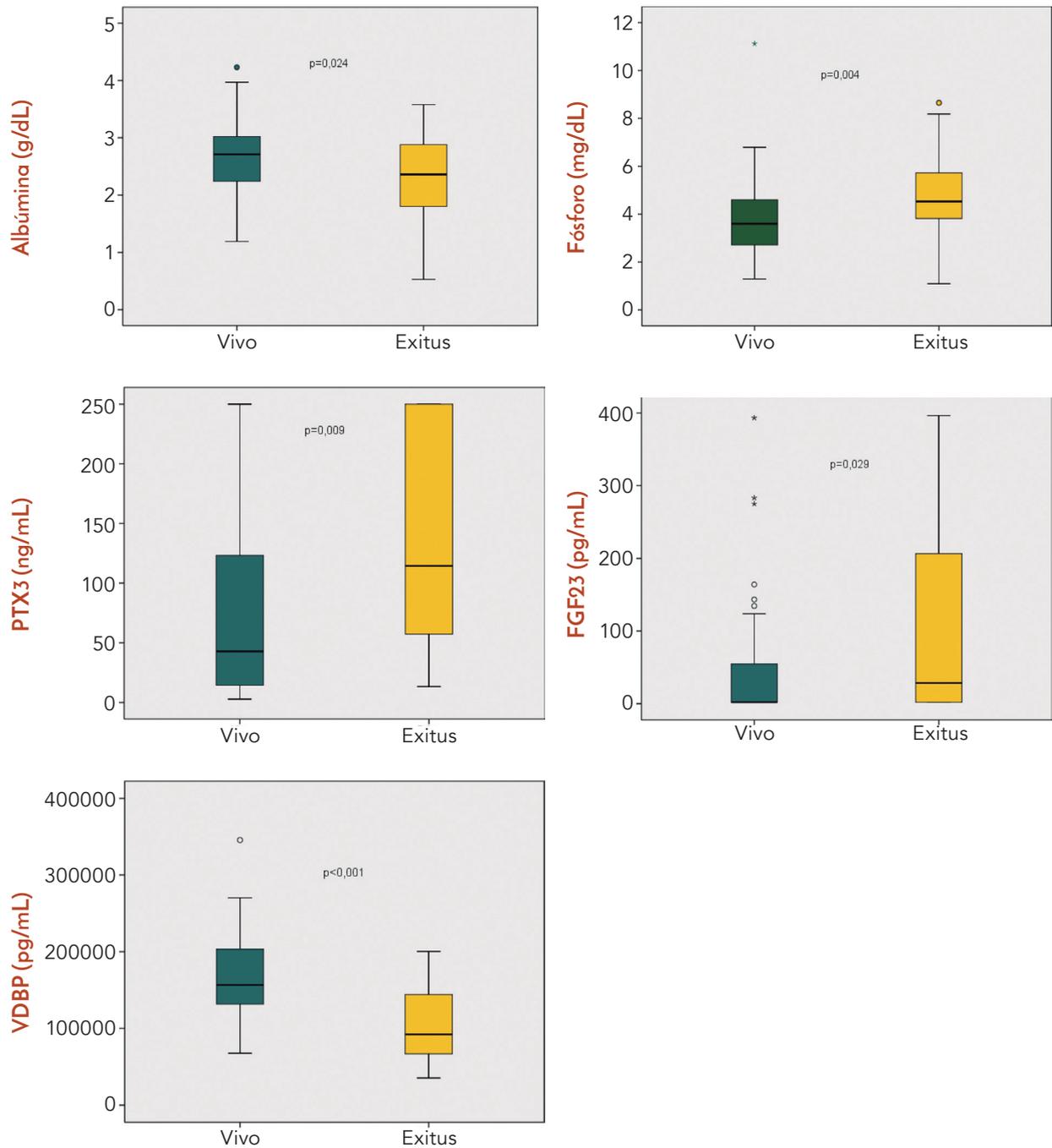


Figura 22. Diagrama de caja de los niveles de albúmina, fósforo, PTX3, FGF23 y VDBP en relación a la mortalidad hospitalaria.

4.9.1. Análisis de regresión y curvas COR de la 25(OH) D, parámetros del metabolismo fosfocálcico, péptidos antimicrobianos dependientes de la vitamina D y parámetros de inflamación en relación con la mortalidad hospitalaria

A continuación, se presentan las curvas COR, de los diferentes parámetros con potencial utilidad pronóstica en relación a la mortalidad hospitalaria (Tabla 29, Figura 23).

Entre los parámetros de gravedad estudiados, el SAPS II es el que presenta una mayor área bajo la curva (AUC=0,81), seguido del SOFA (AUC=0,79) y del APACHE II (AUC=0,73).

Entre los parámetros bioquímicos relacionados con la vitamina D, la VDBP logró la mejor AUC para la predicción de mortalidad hospitalaria (AUC=0,78). El punto de corte óptimo fue de 114250 ng/mL, con una sensibilidad del 62% y una especificidad del 81,1%.

La segunda mejor AUC es la del fósforo (AUC=0,70), seguida de la albúmina (AUC=0,67), el FGF23 (AUC=0,65), la 25(OH) D libre medida (AUC=0,64) y la catelicidina (AUC=0,63).

La curva ROC para la PTX3 obtiene un área bajo la curva cercano al 0,70, más elevada que el AUC para la PCT (AUC=0,53) y la PCR (AUC=0,48) pero más bajo que la del lactato (AUC=0,79).

	AUC	IC 95%	p
APACHE II	0,73	0,61-0,84	0,003
SAPS II	0,81	0,71-0,92	<0,001
SOFA	0,79	0,67-0,90	0,001
Calcio (mg/dL)	0,58	0,41-0,74	0,32
Albúmina (g/dL)	0,67	0,52-0,81	0,027
Fósforo (mg/dL)	0,70	0,57-0,83	0,007
Magnesio (mg/dL)	0,58	0,44-0,73	0,28
Lactato (mmol/L)	0,79	0,69-0,89	<0,001
PCT (ng/mL)	0,53	0,40-0,67	0,75
PCR (mg/dL)	0,48	0,40-0,62	0,92
PTX3 (ng/mL)	0,70	0,58-0,82	0,017
PTH (pg/mL)	0,50	0,36-0,64	0,97
FGF23 (pg/mL)	0,65	0,73-0,83	0,051
25(OH) D (ng/mL)	0,53	0,39-0,68	0,62
1,25(OH) ₂ D (pg/mL)	0,57	0,43-0,71	0,33
25(OH) D libre medida (pg/mL)	0,63	0,50-0,78	0,25
25(OH) D libre calculada (pg/mL)	0,59	0,44-0,73	0,67
VDBP (ng/mL)	0,78	0,66-0,90	<0,001
Catelicidina (ng/mL)	0,63	0,49-0,78	0,074
β-2-defensina (pg/mL)	0,45	0,31-0,60	0,61

Tabla 29. AUC de los parámetros a estudio en relación a la mortalidad hospitalaria.

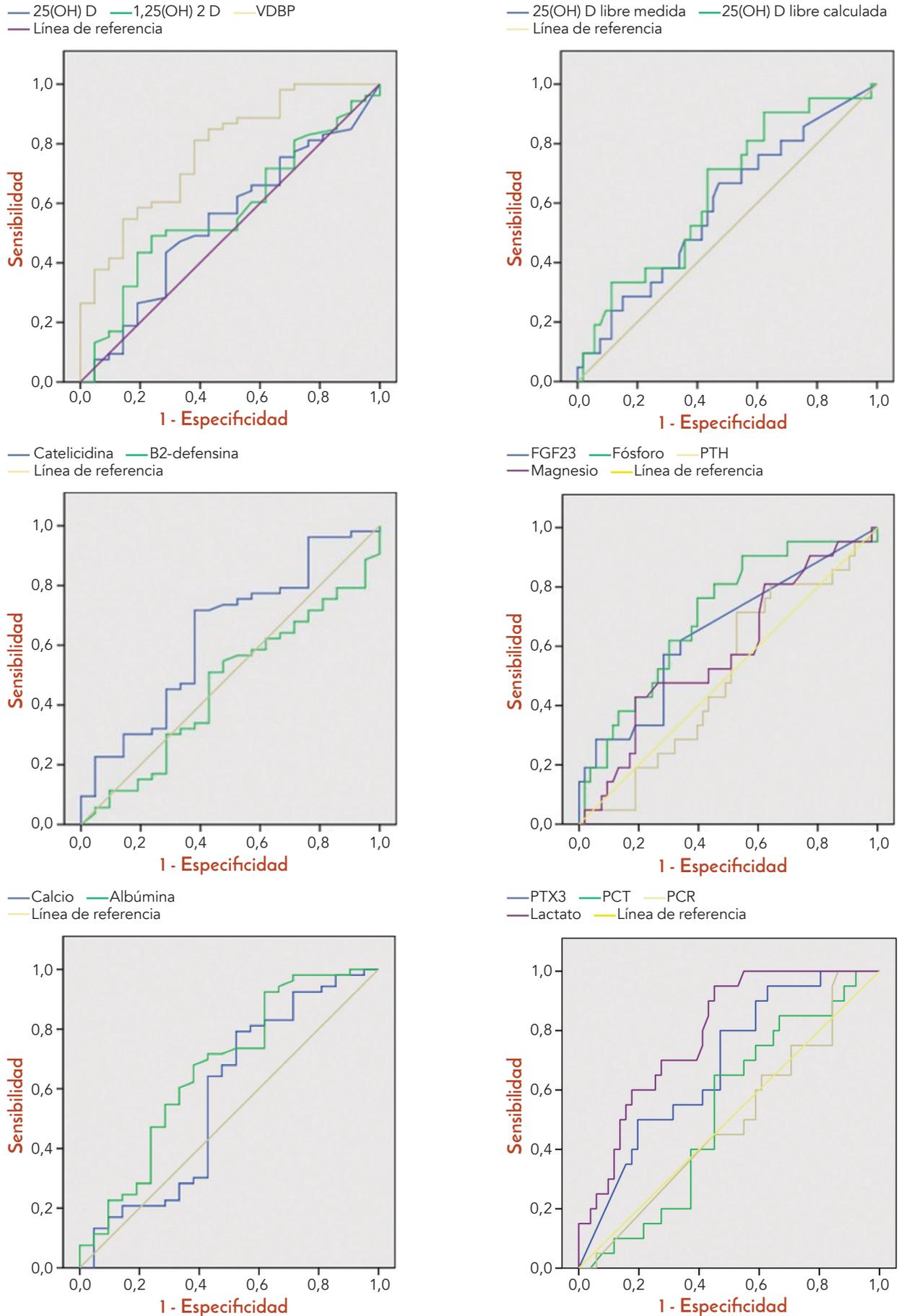


Figura 23. Curvas COR de los parámetros a estudio en relación a la mortalidad hospitalaria.

En la tabla 30 se muestran los odds-ratio (OR) y su IC 95% de las variables clínicas y bioquímicas significativamente diferentes en relación a la mortalidad hospitalaria calculadas mediante un modelo de regresión logística binaria univariante y multivariante obtenido a partir de un algoritmo de selección paso a paso, considerando todas las variables significativas salvo la ventilación mecánica para evitar un efecto de colinealidad. Dicho modelo resulta adecuado según el test de razón de verosimilitud ($p < 0,001$), con una AUC de 0,95 (IC 95%: 0,89-0,99). En el modelo multivariante ya simplificado, las variables significativamente asociadas al exitus, fueron la inmunodepresión, el SDRA, puntuaciones elevadas de SAPS II y niveles disminuidos de VDBP.

	Punto de corte	Univariante			Multivariante		
		OR	IC 95%	p	OR	IC 95%	p
Inmunodepresión	Sí	3,06	1,07-8,77	0,037	33,01	3,98-701,2	0,006
APACHE II		1,09	1,02-1,16	0,012	0,88	0,73-1,02	0,14
SAPS II		1,06	1,03-1,10	<0,001	1,14	1,06-1,28	0,005
SOFA		1,19	1,06-1,33	0,002			
Nº disfunciones orgánicas		2,25	1,46-3,45	<0,001			
SDRA	Sí				41,69	3,1-1382	0,013
Ventilación mecánica	Sí	35,78	4,45-288,1	0,001			
HFVVC	Sí	6,13	1,57-23,97	0,009			
Estancia hospitalaria (días)		0,99	0,99-1,0	0,68	0,99	0,97-1	0,09
Albúmina (g/dL)	>2,03	0,13	0,03-0,51	0,003			
Fósforo (mg/dL)	>3,82	3,81	1,27-11,39	0,017	5,32	0,91-43	0,08
Lactato (mmol/L)	>2,01	17,59	2,19-141,3	0,007			
FGF23 (pg/mL)	>27,9	2,79	0,98-7,92	0,054			
PTX3 (ng/mL)	>55	3,87	1,24-12,1	0,02			
VDBP (ng/mL)	<114250	6,98	2,29-21,37	0,001	0,05	0,003-0,41	0,016

Tabla 30. Regresión logística univariante y multivariante en relación a la mortalidad hospitalaria.

4.9.2. Análisis de supervivencia

a) Supervivencia global

Se produjeron 21 exitus (28,38%) a los 15 días la probabilidad de supervivencia es del 75,6% y a los 30 días de 64,9%.

Se muestra a continuación la curva Kaplan-Meier para la supervivencia global. El test log-rank detectó diferencias en las curvas de supervivencia entre el número de disfunciones, albúmina, inmunodepresión y VDBP (Figura 24).

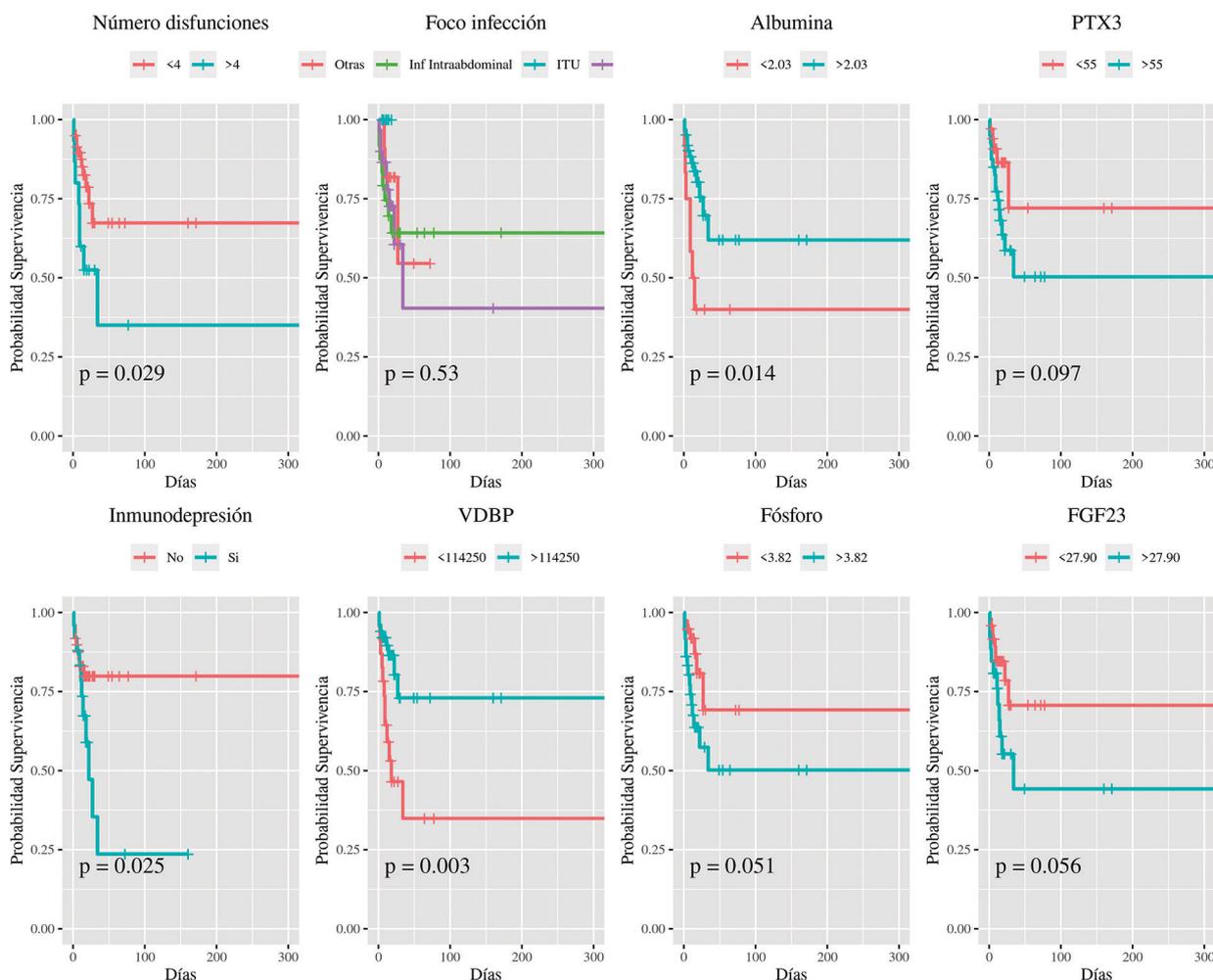


Figura 24. Curvas de Kaplan-Meier para la supervivencia global.

Las variables asociadas a la mortalidad global fueron evaluadas mediante el modelo de Cox univariante y multivariante y se muestran en la tabla 31. La variable foco de infección no se pudo incluir porque hay 0 exitus con origen ITU.

En el modelo univariante, la inmunodepresión, el SDRA, la ventilación mecánica, el número de disfunciones, el SAPS II, el SOFA, el VDBP y la albúmina se asociaron significativamente a la mortalidad global. En el análisis multivariante, las variables asociadas a un mayor riesgo de mortalidad de forma significativa fueron la presencia de inmunodepresión y de necesidad de ventilación mecánica, así como puntuaciones elevadas de SAPS II y de SOFA y niveles disminuidos de VDBP.

	Punto de corte	Univariante			Multivariante		
		HR	IC 95%	p	HR	IC 95%	p
Edad		1,02	0,99-1,05	0,233			
Femenino		0,78	0,28-2,16	0,635			
Inmunodepresión	Sí	2,63	1,09-6,36	0,032	4,83	1,48-15,82	1,48-15,82
APACHE II		1,05	1-1,1	0,052			
SAPS II		1,03	1,01-1,06	0,001	1,04	1,01-1,07	1,01-1,07
SOFA		1,12	1,02-1,23	0,016	0,84	0,73-0,97	0,73-0,97
Nº disfunciones orgánicas	>4	2,63	1,07-6,44	0,035			
SDRA	Sí	3,02	1,2-7,58	0,019	2,75	0,75-10,18	0,75-10,18
Ventilación mecánica	Sí	16,8	2,25-126	0,006	12,72	1,24-130,62	1,24-130,62
HFVVC	Sí	2	0,75-5,27	0,163	0,38	0,1-1,44	0,1-1,44
Albúmina (g/dL)	>2,03	0,33	0,13-0,83	0,018			
Fósforo (mg/dL)	>3,82	2,52	0,97-6,6	0,059			
FGF23 (pg/mL)	>27,9	2,3	0,95-5,57	0,064			
PTX3 (ng/mL)	>55	2,31	0,84-6,37	0,106			
25(OH) D (ng/mL)	<11	1,01	0,96-1,07	0,696			
VDBP (ng/mL)	>114250	0,28	0,12-0,69	0,005	0,161	0,04-0,66	0,04-0,66

Tabla 31. Modelo de Cox univariante y multivariante para mortalidad global.

b) Supervivencia a 30 días

Considerando sólo la supervivencia a 30 días, se producen 19 exitus de un total de 21 (25,68%).

El test log-rank detectó diferencias en las curvas de supervivencia entre albúmina y VDBP, si bien existe tendencia para el número de disfunciones, la inmunodepresión, el fósforo y el FGF23 (Figura 25).

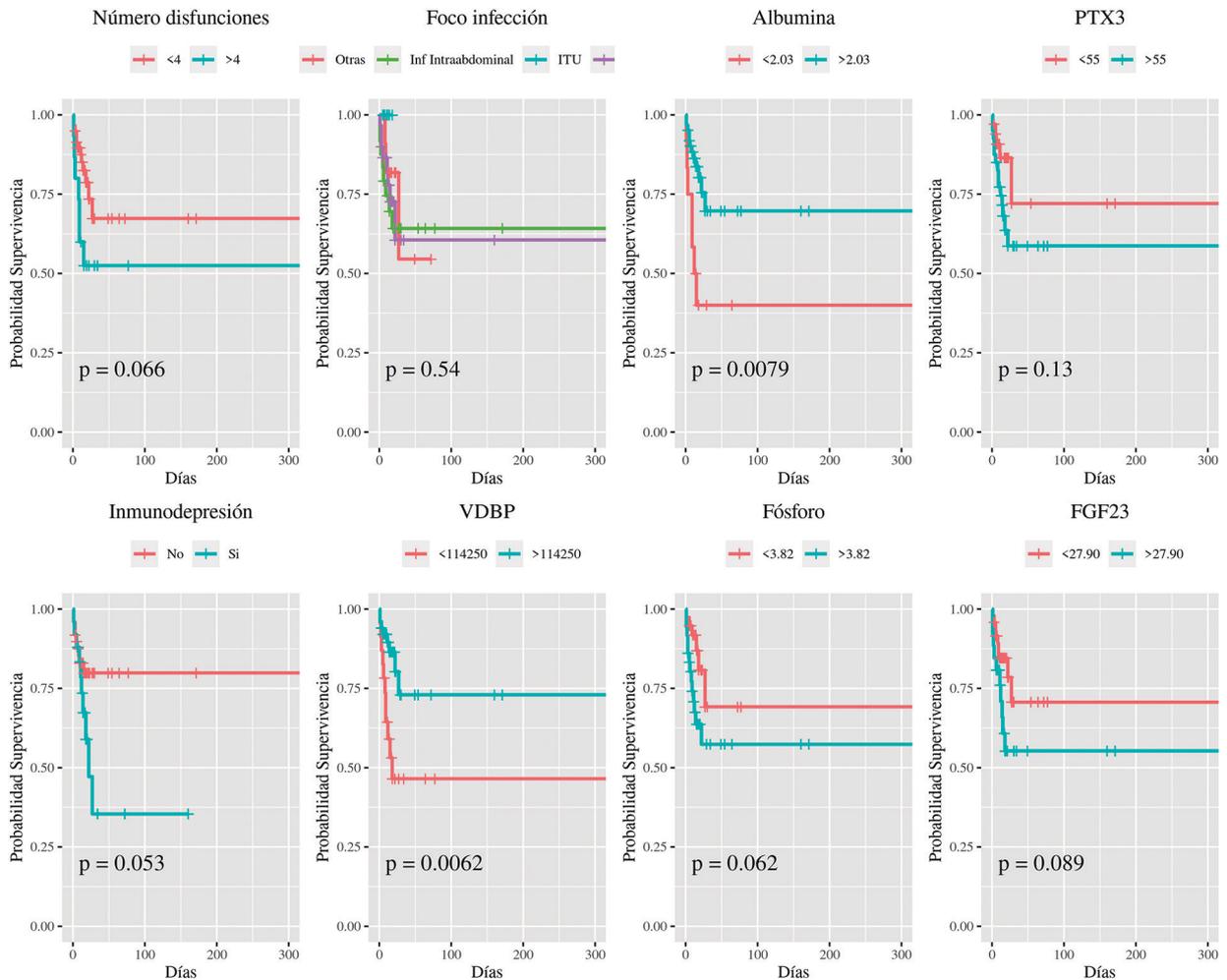


Figura 25. Curvas de Kaplan-Meier para supervivencia a 30 días.

En la tabla 32 se muestra el modelo de Cox univariante para las posibles variables predictoras de mortalidad a 30 días para finalizar de forma multivariante.

En el modelo univariante, la ventilación mecánica, el APACHE II, SAPS II, el SOFA, el VDBP y la albúmina se asociaron significativamente a la mortalidad a 30 días. En el análisis multivariante, las variables asociadas a un mayor riesgo de mortalidad de forma significativa fueron la presencia de inmunodepresión, la necesidad de ventilación mecánica y niveles disminuidos de VDBP.

	Punto de corte	Univariante			Multivariante		
		HR	IC 95%	p	HR	IC 95%	p
Edad		1,03	0,99-1,06	0,143	1,04	0,99-1,07	0,055
Femenino		0,81	0,29-2,27	0,694			
Inmunodepresión	Sí	2,36	0,96-5,83	0,062	3,88	1,27-11,88	0,018
APACHE II		1,05	1-1,1	0,046			
SAPS II		1,04	1,01-1,06	0,001			
SOFA		1,11	1,01-1,22	0,027	0,88	0,78-1	0,051
Nº disfunciones orgánicas	>4	2,35	0,92-5,97	0,073			
SDRA	Sí	2,62	0,99-6,9	0,052			
Ventilación mecánica	Sí	16	2,13-120	0,007	24,67	1,27-230,61	0,005
HFVVC	Sí	1,76	0,63-4,93	0,282			
Albúmina (g/dL)	>2,03	0,30	0,12-0,77	0,012			
Fósforo (mg/dL)	>3,82	2,44	0,93-6,44	0,071			
FGF23 (pg/mL)	>27,9	2,14	0,87-5,27	0,098			
PTX3 (ng/mL)	>55	2,19	0,79-6,08	0,134			
25(OH) D (ng/mL)	<11	1,02	0,96-1,07	0,58			
VDBP (ng/mL)	>114250	0,30	0,12-0,75	0,009	0,21	0,06-0,73	0,014

Tabla 32. Modelo de Cox univariante y multivariante para mortalidad a 30 días.

c) Supervivencia a 90 días

Al considerar la supervivencia a 90 días, se produjeron 20 exitus (27,03%).

El test log-rank detectó diferencias en las curvas de supervivencia entre albúmina y VDBP, así como en el número de disfunciones y la inmunosupresión, si bien existe una tendencia para el fósforo y el FGF23 (Figura 26).

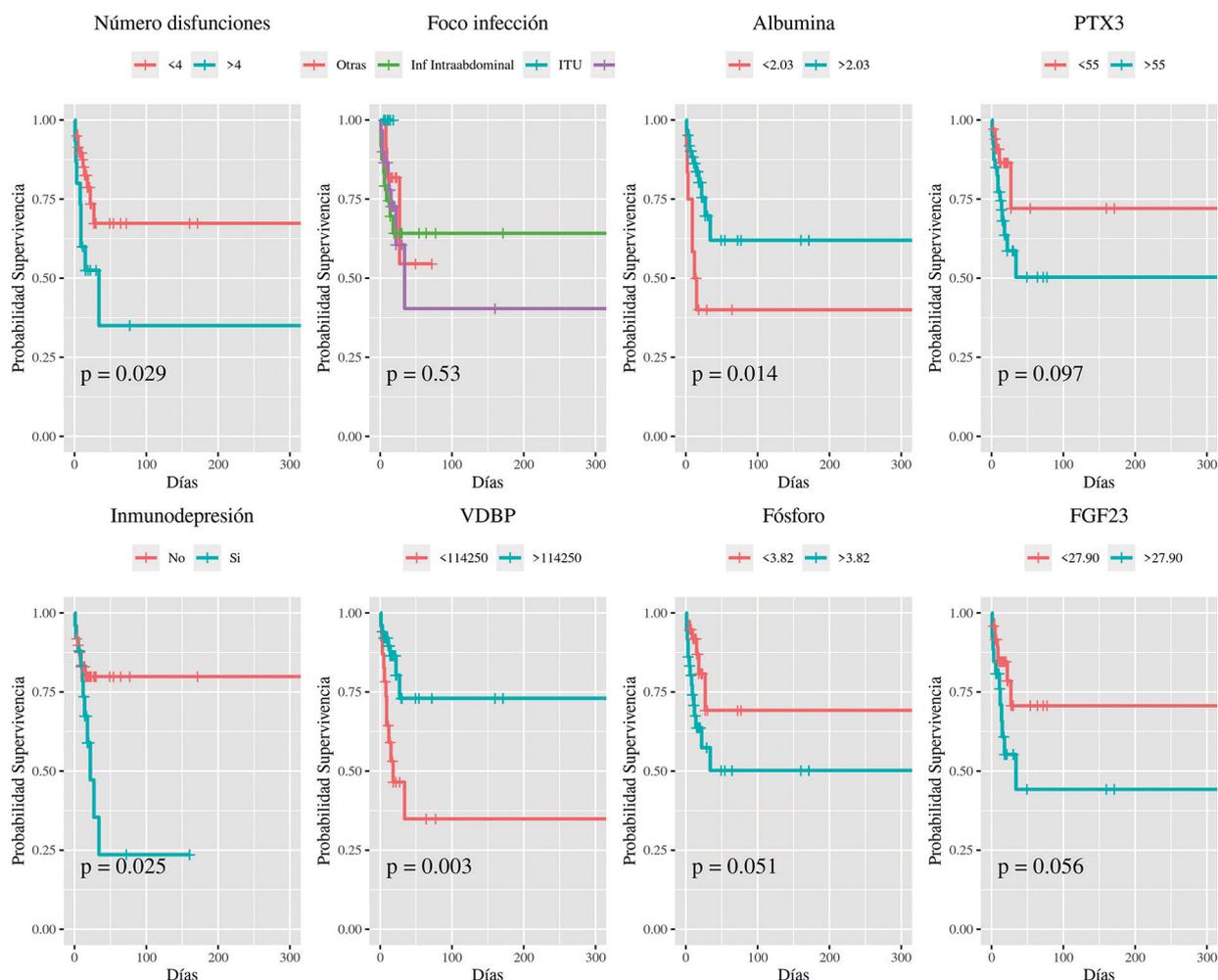


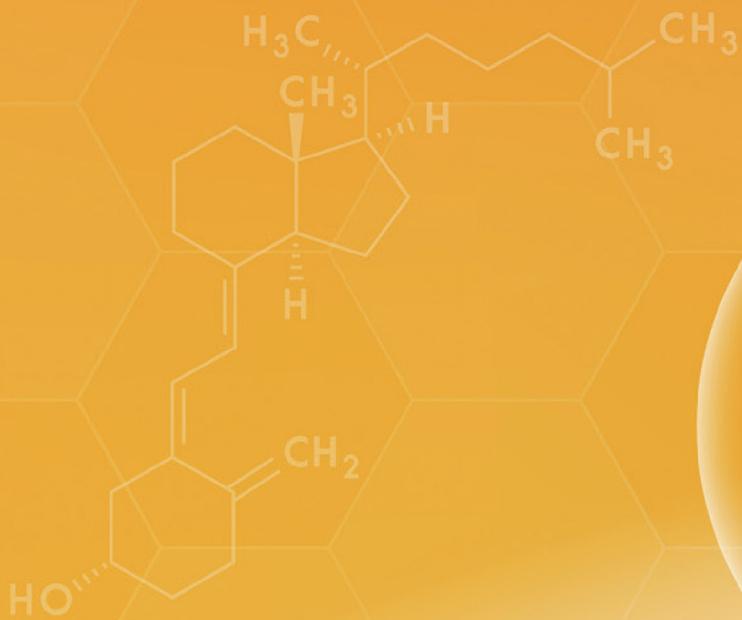
Figura 26. Curvas de Kaplan-Meier para supervivencia a 90 días.

En la tabla 33 se muestra el modelo de Cox univariante y multivariante para las posibles variables predictoras de mortalidad a 90 días.

En el modelo univariante, la inmunodepresión, el SDRA, la ventilación mecánica, el número de disfunciones, el SAPS II, el SOFA, el VDBP y la albúmina se asociaron significativamente a la mortalidad global. En el análisis multivariante, las variables asociadas a un mayor riesgo de mortalidad de forma significativa fueron la presencia de inmunodepresión y de necesidad de ventilación mecánica, así como puntuaciones elevadas de SAPS II y de SOFA y niveles disminuidos de VDBP.

	Punto de corte	Univariante			Multivariante		
		HR	IC 95%	p	HR	IC 95%	p
Edad		1,02	0,99-1,05	0,233			
Femenino		0,78	0,28-2,16	0,635			
Inmunodepresión	Sí	2,63	1,09-6,36	0,032	4,83	1,48-15,82	0,009
APACHE II		1,05	1-1,1	0,052			
SAPS II		1,03	1,01-1,06	0,001	1,04	1,01-1,07	0,034
SOFA		1,12	1,02-1,23	0,016	0,84	0,73-0,97	0,014
Nº disfunciones orgánicas	>4	2,63	1,07-6,44	0,035			
SDRA	Sí	3,02	1,2-7,58	0,019	2,75	0,75-10,18	0,129
Ventilación mecánica	Sí	16,8	2,25-126	0,006	12,72	1,24-130,62	0,033
HFVVC	Sí	2	0,75-5,27	0,163	0,38	0,1-1,44	0,152
Albúmina (g/dL)	>2,03	0,33	0,13-0,83	0,018			
Fósforo (mg/dL)	>3,82	2,52	0,97-6,6	0,059			
FGF23 (pg/mL)	>27,9	2,3	0,95-5,57	0,064			
PTX3 (ng/mL)	>55	2,31	0,84-6,37	0,106			
25(OH) D (ng/mL)	<11	1,01	0,96-1,07	0,696			
VDBP (ng/mL)	>114250	0,28	0,12-0,69	0,005	0,161	0,04-0,66	0,011

Tabla 33. Modelo de Cox univariante y multivariante para mortalidad a 90 días.



5

DISCUSIÓN

5.1. HIPOVITAMINOSIS D EN PACIENTES CRÍTICOS CON SHOCK SÉPTICO

En nuestro estudio prospectivo observacional en pacientes críticos adultos con shock séptico, hemos observado que la prevalencia de deficiencia de vitamina D es muy elevada. Un 82,7% de los pacientes presentaron niveles séricos de 25(OH) D <20 ng/mL y un 66,7% presentaron hipovitaminosis severa (<12 ng/mL).

La prevalencia de deficiencia de vitamina D a nivel mundial es alta. Se han encontrado porcentajes de prevalencia de deficiencia de 25(OH) D, definida como valores inferiores a 20 ng/mL, del 24% en Estados Unidos y del 40% en Europa (307-310). En relación a la prevalencia de deficiencia severa de vitamina D, definida como valores de 25(OH) D inferiores a 12 ng/mL, los porcentajes varían del 5,9% en Estados Unidos hasta el 13% en Europa (307), hallándose valores más bajos en ancianos y en niños (311, 312). En España, también se reproduce esta situación de deficiencia de vitamina D. Esta deficiencia puede ser explicada dado que la mayor parte de España (incluida Cantabria) se encuentra por encima de latitudes de 33°, donde la posibilidad de sintetizar vitamina D es escasa en invierno y primavera y el escaso aporte dietético no puede compensar la falta de síntesis cutánea. En España no hay cultura de suplementar los alimentos con vitamina D ni existe una ley de suplementación, como ocurre en los países del Norte de Europa, y además la mayoría de los españoles tienen una piel más oscura que dificulta la síntesis de vitamina D (313, 314). Además, la edad, el uso de protectores solares y el aumento de la obesidad también se asocian a la deficiencia de vitamina D en la población general.

Nuestros datos son coincidentes con los porcentajes hallados anteriormente en dife-

rentes estudios observacionales tanto en pacientes críticos hospitalizados como en pacientes sépticos, que encontraron una prevalencia de deficiencia de vitamina D en un rango entre el 38% y el 93% en diferentes poblaciones geográficas (248, 249, 258, 266, 267, 315). En estos pacientes, además de los aspectos generales comentados, diversos factores pueden contribuir a esta elevada prevalencia en pacientes críticos, como la hemodilución, la falta de producción y conversión en el hígado, la reducción de la síntesis de la VDBP en el mismo, un mayor consumo durante la fase aguda de la enfermedad y de la inflamación sistémica, y a un aumento de la demanda tisular.

En dos estudios realizados en Centro Europa (Austria), Amrein et al. (258) hallaron que el 60,2% de los pacientes críticos quirúrgicos y no quirúrgicos, presentaron niveles deficientes de vitamina D (<20 ng/mL) y, de manera similar, Ratzinger et al. (263), en un estudio de cohortes prospectivo con 461 pacientes con sospecha de sepsis, que cumplían con dos o más criterios SIRS, midieron la 25(OH) D el primer día después del inicio de los síntomas SIRS siendo la deficiencia de vitamina D del 73,4% (<20 ng/mL). En países del Norte de Europa, Ala-Kokko et al. (267), en un estudio prospectivo observacional en 610 pacientes en el ingreso en la UCI con sepsis grave o shock séptico, observaron que un 55% de los pacientes tenían niveles deficientes de vitamina D (<20 ng/nL). Parekh et al. (250), en un estudio observacional de 61 pacientes con sepsis y sepsis grave hallaron que, de los 41 pacientes con sepsis grave, 36 (87,5 %) presentaban niveles deficientes de vitamina D (<20 ng/mL) y de los 20 pacientes con sepsis, un 62%. En Brasil, Mata-Granados et al. (316), en un estudio de casos y controles, con 33 pacientes sépticos, hallaron que la prevalencia de deficiencia de vitamina D fue más elevada en los pacientes en la UCI (96,7%) comparado con el grupo control (62%), siendo el punto de corte de 20 ng/mL y en población tailandesa, Trongtrakul et al. (317) encontraron una prevalencia de deficiencia de vitamina D del 75% (<20 ng/mL) y un 38% deficiencia severa (<12 ng/mL) en 83 pacientes con sepsis grave.

En EEUU, Rech et al. (259), en un estudio de cohortes retrospectivo con 121 pacientes con sepsis grave o shock séptico, evidenciaron que el 54% de los pacientes presentaron niveles disminuidos de 25(OH) D, siendo el punto de corte de 15 ng/mL. Por último, en un estudio transversal en población iraní, Shojaei et al. (318) observaron que el 61,6% de los 168 pacientes con sepsis que acudieron al servicio de Urgencias, presentaron niveles de 25(OH) D inferiores a 20 ng/mL.

En un estudio reciente realizado en nuestro hospital, la prevalencia de hipovitaminosis D fue significativamente mayor en 216 pacientes ingresados con COVID-19 (82,2%) comparado con el grupo control (192 pacientes, 47,2%), siendo la edad y el sexo similar a nuestra cohorte, pero con distintas comorbilidades. El porcentaje de pacientes que ingresó en UCI fue bajo, del 27,2%, no hallándose relación entre los niveles de 25(OH) D y la admisión en UCI (319, 320). La técnica para medir 25(OH) D fue la misma en ambos estudios

Estas discrepancias en los datos obtenidos en relación a la prevalencia de deficiencia de vitamina D en pacientes críticos, pueden deberse, por un lado, a los distintos puntos de corte aplicados para definir la deficiencia de vitamina D, a la población seleccionada en cada estudio, a la latitud, a la estacionalidad y, por otro lado, a las distintas metodologías usadas para la determinación de la 25(OH) D.

Aunque existe un amplio consenso de que la determinación de 25(OH) D es el mejor

marcador para evaluar el estado nutricional de la vitamina D, su determinación sigue siendo problemática debido a que es una molécula muy lipofílica, y a su elevada afinidad por la VDBP. Aunque el "gold standard" para la determinación de 25(OH) D es la LC-MS/MS, consideramos que nuestra técnica, inmunoensayo específico, es muy sensible para la evaluación de la suficiencia (321-323) y está estandarizada frente al material de referencia SRM 972a, para 25(OH) D.

5.2. EFECTO DE LA ESTACIONALIDAD EN LA 25(OH) D, EN LOS PARÁMETROS DEL METABOLISMO FOSFOCÁLCICO EN LOS PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS DEPENDIENTES DE VITAMINA D

Como se esperaba, encontramos niveles significativamente disminuidos de 25(OH) D en primavera y en invierno en comparación con los obtenidos en verano y en otoño, por lo que nuestros datos demuestran que no se pierde el patrón estacional de la vitamina D en este tipo de pacientes. Estos datos son coincidentes con los datos obtenidos por Amrein et al. (258) y por Ratzinger et al. (263), en pacientes críticos sépticos. Amrein et al. (258) hallaron que los niveles de 25(OH) D en agosto eran significativamente mayores que los obtenidos en los meses de marzo, octubre y noviembre ($p < 0,001$). De manera similar, Ratzinger et al. (263) encontraron que los niveles en verano también eran significativamente mayores que el resto del año ($p < 0,001$).

Así, la variación estacional no sólo afectaría a individuos sanos sino también a pacientes críticos, en los que cabría pensar que debido a su patología la producción endógena de vitamina D estaría notablemente disminuida, encontrándose que los valores mínimos de vitamina D son en invierno, cuando la irradiación solar es mínima y los máximos son en otoño, posteriores a que la irradiación solar es máxima en verano. La prevalencia de pacientes sépticos es mayor en invierno, lo que podría estar relacionado con la estacionalidad de la vitamina D o con la variación estacional que sufren las infecciones del tracto respiratorio, cuyo pico de incidencia es máximo en invierno (324).

Además, nuestro estudio es el primero en demostrar, en nuestro conocimiento, que tanto la 25(OH) D libre medida como la calculada siguen la misma variación estacional que la 25(OH) D total, mientras que la VDBP y la albúmina, principales proteínas transportadoras de la 25(OH) D, y el resto de parámetros del metabolismo de la vitamina D (PTH, FGF23, albúmina, calcio, fósforo, magnesio), que podrían verse afectados por los niveles de 25(OH) D, son estables a lo largo del año, en pacientes con shock séptico. Nuestro hallazgo sobre la VDBP es coincidente con dos estudios previos, uno realizado con 540 controles sanos en Suecia (325) y otro con mujeres embarazadas (326).

En nuestro conocimiento, nuestro estudio también es el primero en evaluar el efecto de la estacionalidad en los niveles séricos de catelicidina en pacientes sépticos. La catelicidina exhibe de manera global una leve variación estacional, aunque cuando se compara trimestre a trimestre, sólo es significativa entre la primavera y el invierno, no siguiendo el patrón de estacionalidad de la 25(OH) D, bien por el pequeño tamaño muestral del estudio o porque la síntesis de catelicidina es compleja y depende de diversos estímulos inmunes no totalmente esclarecidos.

5.3. SITUACIÓN DE LOS METABOLITOS DE LA VITAMINA D Y DEL METABOLISMO FOSFOCÁLCICO EN LA SEPSIS

En nuestro análisis hallamos además que el 62,6% presentan niveles elevados de PTH y el 58,6% de los pacientes con shock séptico presentan valores de $1,25(\text{OH})_2 \text{D}$ por debajo de la normalidad, probablemente de manera secundaria al déficit de $25(\text{OH}) \text{D}$ y daño funcional renal secundario a la sepsis.

Es de sobra conocido que la vitamina D y la PTH tienen un papel fundamental en el metabolismo del calcio (117). Diversos estudios sugieren que niveles de $25(\text{OH})$ en torno a 20-30 ng/mL dan lugar a una supresión máxima de la PTH (327-330). En nuestro estudio observamos niveles significativamente más elevados de PTH en el grupo de pacientes con deficiencia severa de vitamina D, como respuesta fisiológica a los niveles disminuidos de $25(\text{OH}) \text{D}$. Nuestros datos son coincidentes con los reportados por Nair et al. (241), Chen et al. (331) y Trongtrakul et al. (317). Estos dos últimos estudios fueron realizados en pacientes con sepsis y con sepsis grave, respectivamente. Además, la correlación inversa existente entre los niveles de PTH y los de $25(\text{OH}) \text{D}$, confirmarían la prevalencia de hipovitaminosis D en nuestros pacientes y la elevación secundaria de los niveles de PTH.

En nuestro estudio, el hiperparatiroidismo secundario asociado a deficiencia de vitamina D es altamente prevalente (50,7%). Aproximadamente un 49% de pacientes con deficiencia de vitamina D mostraron una respuesta reducida de la PTH, coincidente con estudios previos (241, 242). No están totalmente esclarecidos los mecanismos de esta desregulación de la PTH frente a la deficiencia de vitamina D. Se han sugerido anomalías en el receptor del calcio en el paratiroides, alteración de la 1α -hidroxilasa renal con la edad, función anormal del receptor de la $1,25(\text{OH})_2 \text{D}$, anomalías en el eje FGF23-klotho y otras anomalías genéticas (242, 332). Estudios previos sugieren que la deficiencia de vitamina D con respuesta reducida de la PTH parecería estar asociada con un mejor pronóstico en pacientes críticos (241, 242). Nosotros no hemos hallado en nuestro estudio diferencias entre el subgrupo de pacientes deficientes de vitamina D e hiperparatiroidismo secundario respecto de los insuficientes que no presentaron hiperparatiroidismo en relación a parámetros clínicos. Sin embargo, inesperadamente sí hemos encontrado, siendo el primer estudio en nuestro conocimiento, que el grupo de pacientes con deficiencia de vitamina D que no presentaron hiperparatiroidismo secundario presentaron porcentajes de SDRA significativamente más elevados y una tendencia a requerir más ventilación mecánica que el grupo con hiperparatiroidismo secundario a deficiencia de vitamina D. Un artículo reciente (333) muestra que el SDRA es una complicación muy rara de la crisis hipercalcémica secundaria a hiperparatiroidismo primario asociada en la mayoría de los casos con neoplasias, aunque el mecanismo subyacente no está esclarecido. Estos datos sugieren que niveles elevados de PTH podrían estar relacionados con el SDRA en presencia de niveles disminuidos de vitamina D. Sin embargo, en nuestro estudio, porcentajes más elevados de SDRA se encuentran en los pacientes deficientes sin hiperparatiroidismo secundario. Se requieren más estudios para corroborar estos hallazgos.

Estudios previos en pacientes críticos observaron igualmente niveles de $1,25(\text{OH})_2 \text{D}$ significativamente disminuidos en comparación con los controles (316, 334) y que se correlacionaban de manera directa con la $25(\text{OH}) \text{D}$. Un menor sustrato para hidroxilación

a $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ justificaría en parte estos hallazgos. Además, podría existir una desregulación severa de la enzima 1α -hidroxilasa renal durante el shock séptico a la estimulación de la PTH o un mayor consumo de vitamina D a nivel periférico. Lee et al. sugieren que los tejidos requieren mayores cantidades de vitamina D en pacientes críticos, lo que conlleva a una mayor conversión de la $25(\text{OH})\text{D}$ en su forma activa, la $1,25(\text{OH})_2\text{D}$, lo que también reduciría los niveles séricos de $25(\text{OH})\text{D}$, además de los de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ (163).

Además de estos cambios en los niveles de vitamina D y PTH, hemos observado niveles disminuidos de calcio en nuestra cohorte (88%), siendo coincidente la prevalencia de hipocalcemia en estudios previos en pacientes críticos que oscila entre el 50 y el 88% (241, 243). La hipocalcemia es un hallazgo común en pacientes críticos, generalmente en respuesta a la inflamación (335), que conduce también a un hiperparatiroidismo secundario, para aumentar la conversión de la $25(\text{OH})\text{D}$ en $1,25(\text{OH})_2\text{D}$, la cual estimula la resorción ósea y la absorción intestinal de calcio, cuyo objetivo es mantener la homeostasis del calcio. En nuestra cohorte, los niveles de $25(\text{OH})\text{D}$ no correlacionaron con los niveles de calcio total, lo que indica que la hipocalcemia es debida a múltiples causas y no sólo a la deficiencia de vitamina D. No hemos utilizado la corrección del calcio total por niveles de albúmina, ya que existen evidencias recientes de que sobrestima los niveles del calcio cuando la albúmina es inferior a 3 g/dL (332). Tampoco hemos analizado el calcio iónico, que es mejor indicador del estado fisiológico del calcio en estos pacientes con alteraciones importantes del equilibrio hidroelectrolítico que su concentración total.

La hipomagnesemia es también un hallazgo común en pacientes críticos, que puede causar hipocalcemia. En nuestra cohorte, la prevalencia de deficiencia de magnesio fue del 14,7%, menor que la reportada en un estudio previo en pacientes críticos (18-65%) (243). Estos datos sugieren que los niveles disminuidos de magnesio no serían fundamentales en la hipocalcemia detectada en nuestro estudio.

Cuando se compararon los niveles de $25(\text{OH})\text{D}$ libre medidos de forma directa (por inmunoensayo específico) con los calculados mediante fórmula (193), hallamos que la concentración medida fue significativamente menor que la calculada, un hallazgo respaldado por estudios anteriores en población sana de todas las razas y en pacientes con enfermedad hepática o fibrosis quística (172, 195, 198, 337, 338, 339). Aunque existe una correlación significativa entre ambas, en nuestro estudio sólo el 18,6% de la variabilidad de la $25(\text{OH})\text{D}$ libre calculada es explicada por la $25(\text{OH})\text{D}$ libre medida. Estos datos podrían ser explicados por la diferente afinidad de $25(\text{OH})\text{D}$ por la VDBP y la albúmina en diversas situaciones clínicas, independientemente del polimorfismo de la VDBP.

En nuestro estudio encontramos una elevada correlación entre los niveles de $25(\text{OH})\text{D}$ libre tanto medida como calculada y los niveles de $25(\text{OH})\text{D}$ totales. Además, la $25(\text{OH})\text{D}$ libre tanto medida como calculada presentan una correlación inversa con los niveles séricos de PTH, similares a los obtenidos con la $25(\text{OH})\text{D}$ total. Estos hallazgos son coincidentes con los obtenidos por Oleröd et al. (325) y por Schwartz et al. (195), estudio prospectivo realizado con pacientes sanos, cirróticos y mujeres embarazadas, con relación a la $25(\text{OH})\text{D}$ libre. Cabe resaltar que hemos hallado que los niveles de $25(\text{OH})\text{D}$ libre calculada presentan una correlación con la $25(\text{OH})\text{D}$, similar a la obtenida entre la $25(\text{OH})\text{D}$ libre medida y la $25(\text{OH})\text{D}$, así como con la PTH. Mientras que en el estudio de Oleröd et al., la correlación entre la $25(\text{OH})\text{D}$ total y la libre calculada es significativa pero más débil, lo mismo sucede con la PTH, en el estudio de Schwartz et al., la $25(\text{OH})$

libre calculada no correlaciona ni con la 25(OH) D total ni con la PTH. Estas discrepancias pueden deberse al uso de distintas metodologías a la hora de medir los distintos analitos y a la población seleccionada en cada estudio. La incorporación de la LC/MS/MS, técnica "gold standard" para la determinación de 25(OH) D total, para medir el resto de los metabolitos de la vitamina D podría reducir la variación en la medición de los mismos entre los diferentes laboratorios (340, 341).

La hipótesis de la hormona libre postula que sólo la fracción no unida (la fracción libre) de las hormonas, puede entrar en las células y ejercer las acciones biológicas. En el caso de la 25(OH) D, menos del 1% circula de forma libre. Sin embargo, en el riñón, las glándulas paratiroides y la placenta, el complejo megalina/cubilina, puede transportar la vitamina D total unida a la VDBP dentro de las células. Esto sugiere que la vitamina D libre podría ser más importante para las acciones locales (intra/paracrina) que la vitamina D total. Enfermedades o condiciones clínicas que afecten a la síntesis de la VDBP tendrían un impacto importante en los niveles circulantes de vitamina D total.

En una reciente revisión (199), se muestra que en una serie de situaciones clínicas (enfermedad hepática o renal, embarazo, personas ancianas con múltiples comorbilidades y en menor medida, en personas obesas o con haplotipos VDBP diferentes) medir la 25(OH) D libre podría proporcionar un mejor índice del estado de la vitamina D que la total, por lo que cabría presuponer que, en personas con shock séptico, en los que los niveles de VDBP están disminuidos, incrementando por tanto la proporción de 25(OH) D biodisponible, la vitamina D libre podría ser mejor marcador del estatus de la vitamina D.

Según los datos obtenidos en nuestro estudio, no hallamos ventajas en medir 25(OH) D libre en vez de la 25(OH) D total a la hora de evaluar el estatus nutricional de la vitamina D y sus consecuencias en pacientes con shock séptico.

5.4. RELACIÓN ENTRE LA DEFICIENCIA DE VITAMINA D Y PARÁMETROS CLÍNICOS Y BIOQUÍMICOS

Sexo

En nuestro estudio, la deficiencia de vitamina D no se asocia con el sexo. Nuestros resultados son coincidentes con un estudio previo realizado con pacientes sépticos (327) y con dos estudios realizados en pacientes críticos (264, 342). Sin embargo, en otros estudios realizados en pacientes críticos, el sexo masculino se asoció con un mayor riesgo de deficiencia (253, 254) e incluso existe un estudio donde se asocia mayor deficiencia al sexo femenino en pacientes con sepsis grave (317). Estas discrepancias pueden deberse al tipo de población seleccionado en cada estudio, comorbilidades asociadas y al pequeño tamaño muestral de nuestro estudio.

Índice de comorbilidad de Charlson

Niveles de 25(OH) D inferiores a 20 ng/mL al ingreso en UCI tienen un mayor número de comorbilidades, según el índice de comorbilidad de Charlson, el cual relaciona la mor-

talidad a largo plazo con la comorbilidad del paciente. Nuestros resultados son coincidentes con Gomes et al. (343), aunque ellos hallaron asociación entre el índice Charlson con niveles de 25(OH) D <12 ng/mL en pacientes críticos. Estas discrepancias pueden deberse al tipo de población seleccionada en el estudio, ya que el tamaño muestral es similar y a que en el estudio de Gomes et al. los niveles de 25(OH) D fueron cuantificados dentro de las 48 horas de la admisión en UCI mientras que en el nuestro fueron cuantificados al ingreso en UCI.

Estancia hospitalaria y en UCI

La deficiencia de vitamina D no se asocia con la estancia hospitalaria ni con la estancia en UCI. Nuestros resultados son coincidentes con los hallazgos de estudios previos (249, 253, 258, 264, 317, 342). Mientras que McKinney et al. (315) demostraron que pacientes críticos con niveles de 25(OH) D <20 ng/mL presentaban un riesgo casi dos veces mayor de estancia en UCI (RR 1,81). Igualmente, Mathews et al. (344) hallaron que la deficiencia moderada y severa estaba inversamente asociada a la estancia hospitalaria. De otra parte, Amrein et al. encontraron que la administración de vitamina D3 comparada con placebo no mejoraba ni la estancia hospitalaria ni en UCI (345).

SDRA y ventilación mecánica

En nuestro estudio, no encontramos asociación entre los niveles de 25(OH) D y el SDRA. El SDRA es una afección clínica definida como una insuficiencia respiratoria aguda que ocurre de *novo* como resultado de lesiones pulmonares y no pulmonares claramente definidas (346). Se debe a una variedad de mecanismos que incluyen tormenta de citocinas/quimiocinas, desregulación del sistema renina-angiotensina, activación de neutrófilos y aumento de la coagulabilidad y trombosis (347). Según diversos estudios preclínicos y estudios observacionales en humanos, el SDRA puede verse agravado por la deficiencia de 25(OH) D (348), y disminuido por la activación del receptor de la vitamina D (347), pero los mecanismos a través de los cuales contribuye al desarrollo de SDRA no están totalmente esclarecidos.

El estudio de Dancer et al. (348) también mostró una asociación entre niveles disminuidos de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ y de VDBP con el SDRA. Sin embargo, en nuestro estudio no hemos observado asociación entre los niveles de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ y el SDRA, pero sí una tendencia de niveles disminuidos de VDBP en pacientes con SDRA, que podrían deberse a una disminución de su síntesis o a un aumento de su aclaramiento renal. Estas discrepancias entre ambos estudios pueden deberse al diferente tipo de población (pacientes con SDRA y/o en riesgo vs. pacientes con shock séptico), a la diferente metodología utilizada para analizar los distintos parámetros y a que nuestro tamaño muestral pudiera no haber permitido hallar esta asociación.

Niveles óptimos de vitamina D parecen ser importantes en la prevención de la inflamación alveolar y en el mantenimiento del epitelio respiratorio y de la integridad de la mucosa (348). En nuestro estudio, la deficiencia de vitamina D no tiene un impacto significativo en la necesidad de ventilación mecánica, coincidente con estudios previos (253, 317, 349). Nuestros hallazgos no son coincidentes con los resultados obtenidos por Quraishi et al. (350), en el cual los niveles de 25(OH) D medidos a la admisión en UCI se

asociaron inversamente a la duración del soporte respiratorio. Además, Ardehali et al. (243), también demostraron que pacientes con deficiencia moderada y severa de 25(OH) D presentaron significativamente una mayor necesidad de ventilación mecánica y mayor estancia hospitalaria. Estas discrepancias pueden deberse, por un lado, a que en estos estudios examinaron a pacientes críticos quirúrgicos y neuroquirúrgicos, respectivamente mientras que nosotros, a pacientes con shock séptico. En estos dos últimos estudios observaron además que el grupo de deficientes de vitamina D presentaban mayores puntuaciones de APACHE II comparado con el grupo de no deficientes.

Sí hemos observado que niveles disminuidos de 1,25(OH)₂ D y de VDBP se asocian a una mayor necesidad de ventilación mecánica. Existen evidencias de que la vitamina D y la VDBP contribuyen a la infección pulmonar y a la inflamación (161). La vitamina D favorece la función respiratoria mediante la promoción de las funciones antimicrobianas necesarias para la eliminación eficiente de patógenos y la atenuación de la inflamación que potencialmente pueden dañar la estructura pulmonar y perjudicar el intercambio gaseoso (351). El papel de la VDBP está menos esclarecido, pero diversos estudios destacan su capacidad de determinar la biodisponibilidad de la vitamina D y sus efectos directos en la inmunidad innata, como su contribución a la activación de los macrófagos alveolares (352). En nuestro conocimiento, nuestro estudio es el primero en encontrar una asociación entre los niveles disminuidos de 1,25(OH)₂ D y de VDBP con la ventilación mecánica en pacientes con shock séptico. Se requieren más estudios para corroborar nuestros hallazgos y establecer los mecanismos subyacentes a los mismos.

HFVVC

Respecto a la hemodiálisis, mientras que Aygencel et al. (264) hallaron que niveles deficientes de 25(OH) D (<20 ng/mL) presentaban mayor requerimiento de hemodiálisis en pacientes críticos, en nuestro estudio no encontramos asociación entre la deficiencia de vitamina D y la necesidad de hemofiltración ni con los niveles de 25(OH) D. Estas discrepancias pueden deberse a que, en dicho estudio realizado en pacientes críticos (35,8% sepsis/shock séptico), se observaron puntuaciones de APACHE II, SOFA, PCT, calcio ionizado, albúmina y creatinina significativamente diferentes entre el grupo de deficientes y no deficientes, que pudieran predisponer a un mayor requerimiento de hemodiálisis, mientras que en nuestro estudio no se observaron dichas diferencias. Además, la determinación de 25(OH) D fue realizada durante las primeras 24 horas del ingreso en UCI, mientras que en nuestro estudio se realizó en el momento de admisión en UCI. Sin embargo, sí hemos observado niveles disminuidos de 1,25(OH)₂ D y de VDBP y aumentados de FGF23 asociados a una mayor necesidad de hemofiltración.

Foco primario de infección. Bacteriemia

Las infecciones pulmonares y abdominales son las que presentan una mayor mortalidad en pacientes con shock séptico, coincidente con un estudio reciente realizado a nivel nacional en EEUU (353). En nuestro estudio no hemos encontrado asociación entre la 25(OH) D y los diferentes focos, hecho que contrasta con estudios previos que mostraron la asociación entre la deficiencia de 25(OH) D con la incidencia y la severidad de infecciones del tracto respiratorio tanto en adultos como en niños (354, 355). Además,

un reciente metaanálisis mostró que la suplementación con vitamina D2 o D3 podría proteger contra el desarrollo de infecciones agudas del tracto respiratorio comparado con placebo (OR 0,88, IC 95% 0,81-0,96) (356).

Nuestro estudio es el primero, según nuestro conocimiento, en descubrir una asociación significativa entre los niveles de VDBP y el foco primario de infección en pacientes sépticos, siendo los niveles de VDBP significativamente menores en infecciones abdominales comparado con ITU e infección pulmonar. Por último, también hemos encontrado diferencias en los niveles de PTX3 entre los diferentes focos de infección, siendo los niveles de PTX3 significativamente mayores en infección abdominal y pulmonar comparado con ITU. Sin embargo, Song et al. (357) no hallaron asociación entre los niveles de PTX3 y el foco primario de infección y Mauri et al. (358) hallaron que los pacientes con ITU tenían niveles significativamente mayores de PTX3 en pacientes con sepsis y shock séptico, aunque la mortalidad entre los pacientes con ITU fuese del 0%, este último dato coincidente con nuestro estudio.

La bacteriemia no está asociada a los niveles séricos de 25(OH) D, ni globalmente ni según el estatus de la vitamina D, coincidente con los resultados obtenidos por Amrein et al. (258), realizado en un subgrupo de 244 pacientes con sepsis. Esta falta de asociación podría ser debida al pequeño tamaño muestral, ya que Braun et al. (252) observaron, en un estudio con 1160 pacientes críticos, que el riesgo de padecer bacteriemia era 1,6 veces mayor que en aquellos pacientes con niveles de 25(OH) D pre-admisión deficientes (<15 ng/mL) (OR 1,64, p=0,03).

Índices de gravedad

Nair et al. (241) hallaron que los niveles de 25(OH) D al ingreso correlacionaban con los índices de gravedad SAPS-II y APACHE-II en pacientes críticos. Aunque SAPS-II y APACHE-II se asociaron a un mayor riesgo de mortalidad, no hallaron asociación entre los niveles de 25(OH) D y mortalidad. Lee et al., en un estudio retrospectivo con 186 pacientes críticos quirúrgicos, encontraron una correlación significativa negativa en los niveles de 25(OH) D y el parámetro SOFA (359). En nuestro estudio, no hallamos correlación entre los niveles de 25(OH) D ni con SOFA, SAPS-II ni APACHE II, datos coincidentes con estudios previos (360, 361). Por el contrario, si encontramos que niveles disminuidos de VDBP se correlacionan negativamente con los tres parámetros, especialmente con APACHE II, por lo que la VDBP se correlacionaría con la severidad de la sepsis y con la disfunción orgánica. Los niveles de 1,25(OH)₂ D también se correlacionan negativamente con los tres índices, aunque de manera más moderada.

Parámetros bioquímicos

En relación a biomarcadores séricos, hemos encontrando niveles significativamente más elevados de catelicidina en infecciones por bacterias Gram positivas comparado con las causadas por bacterias Gram negativas. La catelicidina humana, LL-37, funciona como inmunomodulador y tiene funciones antimicrobianas directas contra bacterias Gram positivas y Gram negativas (362, 363).

Nuestros datos contrastan con los obtenidos en dos estudios previos, en el que se en-

contraron que la media de los niveles de catelicidina eran mayores en el grupo de Gram negativos comparado con el de Gram positivos (364, 365). Estas discrepancias pueden deberse a que en este estudio utilizaron un test de ELISA diferente al utilizado en nuestro estudio y al tipo de población seleccionada.

Respecto a la β -2-defensina, hemos encontrado niveles significativamente mayores de β -2-defensina tanto en el grupo de deficiencia severa (25(OH) D <12 ng/mL) como en el grupo de deficiencia (25(OH) D <20 ng/mL) comparado con el grupo de no deficientes severos y no deficientes, respectivamente. Además, la correlación inversa hallada entre los niveles de 25(OH) D y los niveles de β -2-defensina, que también es significativa entre los niveles de 25(OH) D libre y la β -2-defensina, apoyarían este hallazgo. A través de su unión al VDR, la vitamina D modularía su actividad tanto en la inmunidad inmune como adaptativa (246). Wang et al. (204) demostraron en cultivo celular, que la $1,25(\text{OH})_2$ D provocaba la liberación de β -2-defensina, aunque en menor proporción, que la de catelicidina. En un modelo murino, se demostró que la deficiencia de 25(OH) D limitaba la producción de catelicidina y β -2-defensina (205). Estudios in vitro sugieren que los efectos inmunomoduladores y quimiotácticos de las defensinas constituyen un arma de doble filo en la patogénesis de la sepsis, que facilita la eliminación de los patógenos, así como la exacerbación de la inflamación y la lesión de los propios tejidos (363, 366).

El número de trabajos en los que se ha analizado los niveles β -2-defensina son más bien escasos. Se ha observado un incremento significativo en los niveles de α -defensina, pero no de catelicidina en pacientes sépticos con respecto a controles sanos (367) o con respecto a pacientes con meningitis bacteriana (368). Además, en un estudio en niños pretérmino, niveles disminuidos de β -2-defensina podrían estar asociados a un mayor riesgo de sepsis de aparición tardía (369). En el estudio prospectivo de Book et al. (370) mostraron que los niveles de β -2-defensina en 16 pacientes con sepsis grave eran significativamente mayores y que la expresión de RNAm de la β -2-defensina en células sanguíneas periféricas estaría disminuida comparado con los controles y pacientes críticos no sépticos. Nuestros datos concuerdan con la idea de que la estimulación de la β -2-defensina mediada por la vitamina D es significativa pero moderada, que niveles bajos β -2-defensina podrían predisponer a la infección y que en la sepsis existiría una expresión anormal de la β -2-defensina que podría contribuir a la disfunción inmunológica en la sepsis por mecanismos no esclarecidos hasta la fecha. Se requieren estudios con mayor número de pacientes que corroboren estos hallazgos.

5.5. UTILIDAD PRONÓSTICA DE LA 25(OH) D, PARÁMETROS DEL METABOLISMO FOSFOCÁLCICO, PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS DEPENDIENTES DE VITAMINA D Y PARÁMETROS INFLAMATORIOS CON RESPECTO A LA MORTALIDAD

En nuestro estudio encontramos niveles bajos de 25(OH) D en pacientes críticos adultos con shock séptico, pero no encontramos diferencias entre supervivientes y no supervivientes y por tanto una falta de asociación con la mortalidad, en contra de lo postulado en nuestra hipótesis. Los niveles de 25(OH) D están medidos al ingreso en UCI y ajustados de acuerdo al aporte de fluidos en las primeras 24 horas.

Metaanálisis previos han concluido que la deficiencia de vitamina D se asocia a un incremento en la susceptibilidad a sepsis (260, 261). Estos datos han sido corroborados en un estudio reciente de cohortes con 711 pacientes sépticos y 992 participantes aleatorios del estudio REGARDS (*Reasons for Geographic and Racial Differences in Stroke*), que mostró, que niveles disminuidos de 25(OH) D medidos en un estado relativo de salud estaban independientemente asociados con un incremento del riesgo de sepsis (371). Sin embargo, a pesar de dichos estudios, los resultados no son concluyentes. Diversos estudios sugieren que niveles bajos de vitamina D estarían asociados con un incremento de mortalidad en pacientes críticos sépticos (258-261). Así, Zhang et al. (372), en un metaanálisis del año 2014, que incluyó 4 estudios prospectivos y 3 retrospectivos y, de Haan et al. (260), en un metaanálisis del año 2015, con 9 estudios prospectivos y 5 retrospectivos, concluyeron que la deficiencia de vitamina D estaría asociada a un incremento de mortalidad en pacientes críticos. Cabe destacar que, sólo habiendo un año de diferencia entre ambos metaanálisis, no incluyan los mismos estudios.

Sin embargo, Zhou et al. (373), en un metaanálisis que incluyó 24 estudios, cinco de ellos prospectivos, encontró que los pacientes sépticos presentaban niveles más bajos de vitamina D que los pacientes no sépticos. Sin embargo, el estatus de la vitamina D no correlacionaba con parámetros como la albúmina, plaquetas, IL-6 o PCR, ni con la mortalidad.

Recientemente se ha publicado un metaanálisis (374), que incluye 4 estudios prospectivos, incluyendo un trabajo de nuestro grupo (375) y otros 4 retrospectivos, que concluye que niveles disminuidos de 25(OH) D al ingreso en UCI estarían independientemente asociados con un incremento del riesgo de mortalidad en pacientes con sepsis.

Los hallazgos de nuestro estudio sobre la 25(OH) D son coincidentes con estudios prospectivos previos, como el de Barnett et al., estudio de casos-control con 478 pacientes críticos (265); Aygencel et al., estudio observacional con 201 pacientes críticos (264); Cecchi et al., estudio de cohortes con 170 pacientes críticos con sepsis (266); Ala-Kokko et al., estudio observacional con 610 pacientes con sepsis grave o shock séptico (267); Ratzinger et al., estudio de cohortes con 461 pacientes críticos sépticos (263) y Nguyen et al. (376), estudio prospectivo observacional con 91 pacientes sépticos, que encontraron deficiencia de vitamina D, pero no diferencias entre supervivientes y no supervivientes.

El papel de la vitamina D en la sepsis es contradictorio y no se ha podido demostrar la causalidad entre la deficiencia de la vitamina D y la mortalidad en pacientes sépticos. Además, se ha de tener en cuenta, la heterogeneidad en las definiciones de sepsis, en las definiciones de suficiencia e insuficiencia de vitamina D y las diferencias metodológicas, que dificultan la comparación entre los estudios.

Dado que la vitamina D tiene un papel importante en la respuesta inmune tanto innata como adaptativa, se ha propuesto que incrementar o normalizar los niveles de vitamina D podría mejorar las condiciones clínicas del paciente y reducir la mortalidad en los procesos infecciosos/sépticos. Sin embargo, en relación a los beneficios de la suplementación con vitamina D en pacientes críticos, los resultados tampoco son concluyentes. Recientes metaanálisis (377-379), evaluaron los beneficios clínicos de la administración de dosis de vitamina D (oral, enteral o parenteral) en pacientes críticos, sin encontrarse beneficios significativos en ninguno de los datos clínicos evaluados. Además, Langlois et al. también remarcaron que los resultados obtenidos pueden deberse por un lado al número escaso de ensayos y de pacientes, y a la heterogeneidad de la población incluida en dichos ensayos (377).

En nuestro estudio no encontramos diferencias en los niveles de PTH entre supervivientes y no supervivientes, lo que en principio nos hace pensar que valores elevados de PTH no se encuentran asociados a un incremento de la mortalidad. Respecto a la PTH como marcador pronóstico de mortalidad, existen resultados contradictorios en la literatura. Nuestros resultados son coincidentes con los de Nair et al. (241). Sin embargo, Ardehali et al. (243) hallaron que niveles elevados de PTH se asociaban a un mayor riesgo de mortalidad. En la misma línea encontramos que el estudio de Hu et al. (242), en el que los niveles de PTH no se asociaron a mortalidad, pero la deficiencia de vitamina D con niveles elevados de PTH sí se asociaba con una mayor mortalidad en comparación con aquellos pacientes que no presentaron hiperparatiroidismo secundario. Estas discrepancias pueden deberse, por un lado, a la población seleccionada en cada estudio, a la diferente metodología utilizada para analizar la PTH y a los distintos puntos de corte utilizados para definir la presencia o no de hiperparatiroidismo secundario (63).

Con respecto a la 25(OH) D libre, existen muy pocos estudios que valoren sus niveles en pacientes críticos. No hemos encontrado asociación entre los niveles de 25(OH) D libre y la mortalidad hospitalaria. Estos datos son coincidentes con los publicados por Leaf et al. (269), en los que no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los niveles de 25(OH) D libre calculada al ingreso en UCI con respecto a la mortalidad a 90 días y por Yoo et al. (380), donde la 25(OH) D libre calculada tampoco se asoció con la mortalidad a 30 días.

Aunque el análisis de los niveles de 25(OH) D es el método más sensible para detectar insuficiencia, en nuestro estudio analizamos la implicación de la forma activa de la vitamina D, que también se ha analizado en relación a la sepsis sin datos concluyentes entre los diferentes estudios. Así, Zitterman et al. (381), en un estudio de cohortes con 510 pacientes con patología cardíaca, demostró la superioridad de la 1,25(OH)₂ D para predecir un mayor riesgo de mortalidad comparado con la 25(OH) D. De igual manera, Nguyen et al. (376), en un estudio prospectivo observacional con 91 pacientes sépticos, encontraron niveles significativamente mayores de 1,25(OH)₂ D, pero de no 25(OH) D, en supervivientes que en no supervivientes y que estarían independientemente asociados a la mortalidad a 90 días. De igual manera, Quraishi et al. (361), encontraron resultados similares en pacientes críticos quirúrgicos, tanto de 1,25(OH)₂ D total y biodisponible como de 25(OH) D total como biodisponible, siendo los 4 parámetros predictores de mortalidad a 90 días. Nosotros no hemos encontrado diferencias entre supervivientes y no supervivientes en relación a los niveles de 1,25(OH)₂ D. Estos datos son coincidentes con los reportados por Ratzinger et al. (263), en los que ni la 25(OH) D ni la 1,25(OH)₂ D

podieron predecir ni sepsis ni mortalidad. Estas discrepancias pueden deberse a la población seleccionada en cada estudio, al tamaño muestral, a la metodología usada para determinar la $1,25(\text{OH})_2 \text{D}$ y al tiempo de análisis de mortalidad utilizado (mortalidad hospitalaria vs. mortalidad 90 días/1 año).

Con respecto a la FGF23 sí que hemos hallado niveles significativamente más elevados en no supervivientes con respecto a supervivientes. Sin embargo, en el análisis de regresión univariante no obtenemos que sea un marcador independiente de mortalidad hospitalaria, aunque si hay una clara tendencia hacia un aumento de mortalidad con niveles elevados de FGF23 ($p=0,054$). Leaf et al. (240), en dos cohortes con pacientes críticos, la primera con 817 pacientes con insuficiencia renal aguda y la segunda con 710 pacientes con daño pulmonar agudo, concluyeron que niveles aumentados de FGF23 estaban independientemente asociados con una mayor mortalidad a 60 días. Estos datos son coincidentes con estudios previos que han demostrado una asociación entre niveles altos de FGF23 y resultados clínicos adversos en pacientes con CKD (99, 104, 106) y en pacientes críticos con insuficiencia renal aguda (382-384). En nuestra serie existe una clara tendencia, pero probablemente el pequeño tamaño muestral no nos ha permitido alcanzar significación estadística. Además, la falta de estandarización en los ensayos del FGF23, limitan la comparación entre diferentes ensayos y estudios (385).

En relación a los AMPs dependientes de vitamina D, hay suficientes evidencias que apuntan a su importante papel en la respuesta inmune. Las evidencias apuntan a que el papel de la vitamina D a nivel del sistema inmunológico, implican una activación de la expresión de los AMPs a través de la estimulación directa de las células inmunes y la coestimulación del receptor tipo *Toll* por el ligando derivado del patógeno (205).

Sin embargo, no está totalmente esclarecido su papel en la sepsis (363). Uno de los problemas está en que no se pueden utilizar directamente para el tratamiento de pacientes sépticos ya que son nefro y neurotóxicos, por lo que se requiere el desarrollo de AMPs sintéticos para mejorar los resultados clínicos en pacientes sépticos (366, 386). Leaf et al. realizaron un ensayo clínico aleatorizado con 67 pacientes con sepsis grave o shock séptico cuyo objetivo era investigar si la suplementación con $1,25(\text{OH})_2 \text{D}$ podría tener efectos beneficiosos en la inmunidad innata, para lo cual midieron los niveles de catelicidina a las 24 horas de la suplementación. Sin embargo, la suplementación con $1,25(\text{OH})_2 \text{D}$ no incrementó los niveles plasmáticos de catelicidina en este grupo de pacientes (387).

Con respecto a la catelicidina, Jeng et al. (247), en un estudio de casos-control, hallaron niveles disminuidos de catelicidina en pacientes críticos, tanto en sépticos como en no sépticos comparado con controles sanos y asociación positiva entre los niveles de catelicidina y los de $25(\text{OH}) \text{D}$ (84). En la misma línea, Leaf et al. (269), en un estudio de cohortes prospectivo en 121 pacientes críticos (14% con shock séptico), evidenciaron que niveles bajos de $25(\text{OH}) \text{D}$ al ingreso en UCI estaban asociados a niveles bajos de catelicidina y que ambos estaban asociados a un mayor riesgo de mortalidad a 90 días. Barbeiro et al. (268), estudio de cohortes prospectivo, no hallaron diferencias significativas entre los niveles de catelicidina entre pacientes críticos con sepsis grave y shock séptico ($n=130$) con respecto al grupo control ni tampoco asociación entre los niveles de catelicidina y los de $25(\text{OH}) \text{D}$. Por otro lado, Greulich et al. (251), estudio de cohortes prospectivo, encontraron niveles elevados de catelicidina, en pacientes críticos sépticos ($n=32$) comparado con pacientes críticos no sépticos ($n=16$) y con controles sanos ($n=16$),

y que los niveles de catelicidina presentaban una asociación negativa con los niveles de 25(OH) D. Por tanto, existen resultados contradictorios respecto a la catelicidina que probablemente esté relacionado con la variabilidad en la metodología de ensayo.

En nuestro estudio no hemos encontrado asociación entre los niveles de catelicidina y los niveles de 25(OH) D, coincidentes con los hallados por Barbeiro et al. (268), único estudio que incluye pacientes con shock séptico. Estos datos contradictorios parecen sugerir que tanto la enfermedad subyacente como su gravedad pueden alterar la relación entre los niveles de vitamina D y los de la catelicidina y que la deficiencia de vitamina D parece no afectar a las concentraciones sistémicas de la catelicidina. Así, podría ser que la catelicidina y la 25(OH) D estarían estrechamente correlacionadas en pacientes sanos (388) y en el primer día de admisión en pacientes críticos, pero que esta asociación se perdería cuando los pacientes desarrollan shock séptico. Tampoco hemos hallado que los niveles de catelicidina estén asociados a un mayor riesgo de mortalidad, aunque sí existe una tendencia hacia un mayor riesgo de mortalidad en los pacientes con niveles disminuidos de catelicidina. Se ha de tener en cuenta, por un lado, que la población de estos estudios previos es diferente a la nuestra (sanos, críticos con y sin sepsis vs. shock séptico), que nuestro tamaño muestral es relativamente pequeño y que la catelicidina es un parámetro nuevo y que su determinación es metodológicamente muy variable y no estandarizada, por lo que se requieren más estudios para verificar estos hallazgos.

Aunque hemos hallado niveles significativamente aumentados de β -2-defensina en el grupo de pacientes con deficiencia y deficiencia severa de vitamina D comparado con el grupo con no deficiencia y no deficiencia severa respectivamente, no encontramos diferencias entre supervivientes y no supervivientes, por lo que no parece existir asociación con la mortalidad. Igual que la catelicidina, se trata de un parámetro nuevo no estandarizado, por lo que se requieren más estudios que corroboren estos hallazgos.

Los hallazgos más originales e interesantes de nuestro estudio los encontramos en la VDBP. Hemos encontrado diferencias significativas entre supervivientes y no supervivientes para los niveles séricos de VDBP. La VDBP presentaría una relación inversa con la mortalidad, por lo que niveles altos de VDBP parecen ser protectores. Pacientes con niveles disminuidos de VDBP al ingreso en UCI tendrían un riesgo seis veces mayor de mortalidad. Esta asociación no está afectada por los niveles de los demás parámetros del metabolismo de la vitamina D y del metabolismo fosfocálcico y están ajustados de acuerdo al aporte de fluidos en las primeras 24 horas. Así, nuestros datos sugieren que los niveles de VDBP son un mejor predictor de mortalidad hospitalaria que el resto de parámetros analizados.

Sin embargo, tenemos que destacar que en nuestro trabajo previo (375), se demostró el efecto de la disfunción hepática en la asociación de la VDBP con la mortalidad hospitalaria. Aunque la OR ajustada por la disfunción hepática (OR 3,45) fue la más elevada entre los parámetros estudiados, la asociación entre ambas variables dejó de ser significativa, probablemente debido al pequeño tamaño muestral.

La VDBP es una proteína abundante y ubicua, que está presente en diversos fluidos corporales (suero, orina, líquido ascítico y líquido cefalorraquídeo) así como en la superficie de linfocitos, neutrófilos y monocitos. Además de ser la proteína específica de transporte de la vitamina D, la VDBP es una proteína multifuncional, ya que tiene función antiinflamatoria e inmunomoduladora (389, 390). Sólo el 1-2% de la VDBP circulante se une a

la vitamina D y nunca sobrepasa el 5% (326), sugiriendo que estas otras funciones serían también esenciales. Contribuye a la activación de los macrófagos, especialmente en el pulmón. La VDBP mejora significativamente la actividad quimiotáctica de los quimioatrayentes de los neutrófilos tanto *in vivo* como *in vitro*. Estudios *in vivo* muestran que la VDBP induce selectivamente el reclutamiento de neutrófilos y que su función como cofactor no está solamente restringida al complemento C5a, sino que puede mejorar la quimiotaxis de otras quimiocinas. La VDBP actúa como un depurador extracelular de la actina liberada durante el daño celular, así la formación del complejo VDBP-actina es una respuesta inmediata del huésped frente al daño tisular. *In vitro*, existen evidencias que la VDBP unida a la actina funcionaría como un cofactor indirecto pero esencial para la migración de los neutrófilos (391). Además, la VDBP influye en las respuestas de las células T y del factor de activación de VDBP-macrófagos (DBP-MAF), que participa en el metabolismo óseo (390).

Nuestros datos son comparables con los obtenidos por Dahl et al. (392) que hallaron que niveles bajos de VDBP estaban asociados con un mayor riesgo de fallo respiratorio, desarrollo de sepsis y de disfunción orgánica en pacientes con trauma severo y con los de Jeng et al. (247), quienes encontraron niveles más bajos de VDBP en pacientes críticos sépticos comparado con pacientes críticos no sépticos. En la misma línea, Yoo et al. (380), en un estudio prospectivo con 98 pacientes sépticos, hallaron que los niveles de VDBP eran significativamente mayores en supervivientes que en no supervivientes y en el análisis de regresión univariante, asociación de los niveles de VDBP con la mortalidad a 30 días ($p=0,023$), aunque en el análisis multivariante, sólo se encontró asociación entre la mortalidad a 30 días y el fallo renal agudo y la puntuación APACHE-II, pero no con la VDBP ($p=0,642$). Existe también un estudio de Leaf et al., que no encontró asociación entre los niveles de VDBP y la mortalidad a 90 días al ingreso en UCI (269).

A pesar de las discrepancias entre estudios que pueden deberse a la selección de la población a estudio, definiciones de sepsis utilizadas o al tiempo de análisis de mortalidad (mortalidad hospitalaria vs. mortalidad a 30/90 días), en este caso predominan claramente los estudios que encuentran relación entre los niveles disminuidos de VDBP y resultados clínicos.

Nuestro estudio es el primero que ha demostrado, según nuestro conocimiento, que la VDBP parece ser un potencial predictor no sólo de mortalidad hospitalaria, sino también de riesgo de mortalidad global, a 30 y a 90 días en pacientes con shock séptico. Esta asociación es independiente y tampoco está afectada por el resto de parámetros del metabolismo de la vitamina D y del metabolismo fosfocálcico ni por el volumen de líquidos empleados en la reanimación.

Así, nuestros datos sugieren que los niveles de VDBP podrían ser utilizados como biomarcador pronóstico en pacientes con shock séptico. Así, la determinación de sus niveles al ingreso en UCI podría contribuir a una correcta estratificación y reconocimiento de los pacientes con mayor riesgo de mortalidad, que permitiría una intervención terapéutica temprana para mejorar el pronóstico de dichos pacientes. En esta línea, sería interesante el desarrollo de estudios que investiguen el potencial efecto terapéutico de la suplementación con VDBP recombinante en pacientes sépticos.

5.6. UTILIDAD PRONÓSTICA DE LA PTX3 CON RESPECTO A LA MORTALIDAD

En nuestro estudio, también evaluamos el valor pronóstico de la PTX3 en comparación con la PCT y la PCR. Nuestros hallazgos sugieren que la PTX3 plasmática podría ser un potencial predictor de mortalidad, teniendo un valor pronóstico superior a la PCT y la PCR, de acuerdo a los resultados obtenidos. Además, hemos encontrado que los niveles elevados de PTX3 muestran una correlación fuerte con la gravedad de la enfermedad, el fallo orgánico y otros parámetros clínicos comparado con la PCT y la PCR.

Coincidente con un estudio previo, la PCR está elevada pero no mostró diferencias significativas entre supervivientes y no supervivientes (358). Aunque la PTX3 y la PCR son componentes de la familia de las pentraxinas, la PTX3 difiere de la PCR en términos de organización y localización de genes, reconocimiento de ligando, fuente celular y señal inductora (271, 393). La PTX3 es una proteína de fase aguda secretada por varias células en respuesta a señales proinflamatorias, al contrario que la PCR, que es producida en el hígado e inducida por la IL-6. En condiciones fisiológicas, los niveles plasmáticos de PTX3 son bajos (<2 ng/mL) pero pueden aumentar hasta 1000 veces (280) como resultado de la degranulación de neutrófilos en la sepsis (279), dependiendo de la gravedad de la enfermedad (394) con niveles mantenidos a través de la producción de novo por células endoteliales y algunas células monocíticas (275, 294), ya que la vida media de la PTX3 es corta, de aproximadamente 2 horas (395). La PTX3 se incrementa rápidamente, alcanzando el pico a las 6- 8 h tras el estímulo infeccioso, en comparación con las 24-30 h de la PCR (303, 393).

El valor predictivo obtenido a través de las AUC es menor que el de los 3 índices de gravedad (SAPS II, SOFA y APACHE II), pero superior a la PCR y la PCT en predecir el riesgo de mortalidad en pacientes con shock séptico. La asociación entre la PTX3 y el riesgo de mortalidad hospitalaria se mantiene después de ajustar con los principales factores de confusión (edad, sexo e inmunosupresión), corroborando la independencia de dicha asociación. Además, hemos hallado que niveles elevados tienen mayor riesgo de mortalidad. Así, pacientes con niveles elevados (tercer tercil) tienen aproximadamente 8 veces más riesgo de mortalidad comparado con los pacientes con niveles bajos de PTX3 (396).

La sepsis ocurre cuando la liberación de mediadores proinflamatorios en respuesta a una infección se extiende más allá de los límites del entorno local, dando lugar a una respuesta inflamatoria descontrolada y generalizada, que lesiona los propios tejidos y órganos, llegando a producir el fracaso de alguno de ellos e incluso la muerte. Esto hace difícil que una única determinación de un único marcador pueda predecir los diferentes aspectos clínicos de la sepsis.

Las escalas pronósticas utilizadas para predecir la mortalidad en pacientes críticos presentan ciertas limitaciones, ya que la mortalidad esperada a través de estos sistemas de predicción puede ser inexacta en determinadas enfermedades específicas ya que han sido validados para un gran conjunto de datos de pacientes de la UCI, pudiendo presentar sesgo de tiempo y requerir de actualizaciones periódicas (397-399). Además, suelen utilizarse más en el campo de investigación que en la práctica clínica diaria. Por esta razón, aunque el valor de discriminación de la PTX3 no fue tan bueno como el de los índices de gravedad, especialmente el SAPS II, es un factor a tener en cuenta.

La PCR es sensible pero no específica, ya que aumenta en todos los trastornos inflamatorios, mientras que la PCT diferencia mejor que la PCR entre causas infecciosas y no infecciosas en pacientes críticos (400). Además, proporcionan información limitada en relación al pronóstico en pacientes críticos (401, 402). Un metaanálisis de 21 estudios con un total de 6007 pacientes concluyó que el nivel inicial de PCT tenía un valor pronóstico limitado en pacientes con sepsis (403). En otro metaanálisis de 25 estudios con 2353 pacientes, Arora et al. (404) encontraron que, en un subgrupo de pacientes con sepsis grave y shock séptico, no hubo diferencias en los valores de PCT entre supervivientes y no supervivientes el día 1 ($p=0,62$). También hay que tener en cuenta que se puede producir un aumento de PCT en otras situaciones como es el caso de la cirugía mayor reciente, pancreatitis, trauma severo, quemaduras graves y shock cardiogénico (405-407). Nuestros datos mostraron una correlación significativa entre la PCT y la PTX3 al ingreso en UCI, pero la PCT no fue un marcador independiente de mortalidad, tampoco la PCR. Al ingreso en UCI, el AUC de una sola medida de PTX3 al ingreso en UCI fue significativamente mejor que la de la PCR y la PCT en predecir mortalidad hospitalaria.

Nuestro estudio es coincidente con estudios previos que examinaron a la PTX3 como marcador pronóstico en sepsis (295, 297, 358, 394, 408, 409, 410, 411). Los niveles de PTX3 se correlacionaron con la severidad de la enfermedad, la disfunción orgánica y marcadores de activación de la coagulación y, en comparación con otros biomarcadores (IL-6, TNF α y PCR), mostraron una mayor correlación con parámetros clínicos (358). En una revisión sistemática y metaanálisis, la PTX3 fue identificada como un marcador de severidad de la sepsis y como predictor de mortalidad, pero con una especificidad limitada (295). En un grupo de 112 pacientes con shock séptico, los niveles basales de PTX3 fueron un predictor independiente de mortalidad a 28 días, a diferencia de la PCR y la PCT (411).

A diferencia de nuestro estudio, Mauri et al. (358) hallaron que, aunque los niveles altos de PTX3 durante los primeros 5 días desde el inicio de la sepsis se correlacionaron con peores resultados, los niveles iniciales de PTX3 al ingreso en UCI no difieren entre los supervivientes y no supervivientes. Además, Caironi et al. (297), en un ensayo controlado aleatorio multicéntrico, encontraron que las concentraciones plasmáticas de PTX3 eran más altas en los no supervivientes en comparación con los supervivientes en el día 1 y se correlacionan con la gravedad. Sin embargo, los niveles de PTX3 en el día 1, después de ajustar por los factores de confusión, no se asociaron con la mortalidad a 90 días mientras que sí se encontró asociación entre los niveles de PTX3 en el día 7 y la mortalidad a 90 días en pacientes con sepsis grave o shock séptico. Estos resultados contradictorios pueden deberse a la heterogeneidad de la población a estudio. Ambos estudios fueron diseñados con pacientes con sepsis grave y shock séptico según el primer criterio de sepsis basado en el concepto de SIRS. Por el contrario, nuestro estudio se realizó en un grupo homogéneo de pacientes que cumplían con la definición actualizada de shock séptico. Además, el tiempo del análisis de mortalidad fue diferente (mortalidad a 90 días vs. mortalidad hospitalaria).

Cabe destacar que nuestros resultados son también consistentes con recientes estudios prospectivos, según las definiciones del consenso Sepsis-3 (298, 357, 412, 413).

Aunque ciertos estudios mostraron una asociación entre la deficiencia de vitamina D e inflamación (414, 415), nosotros no hemos encontrado asociación entre los niveles de

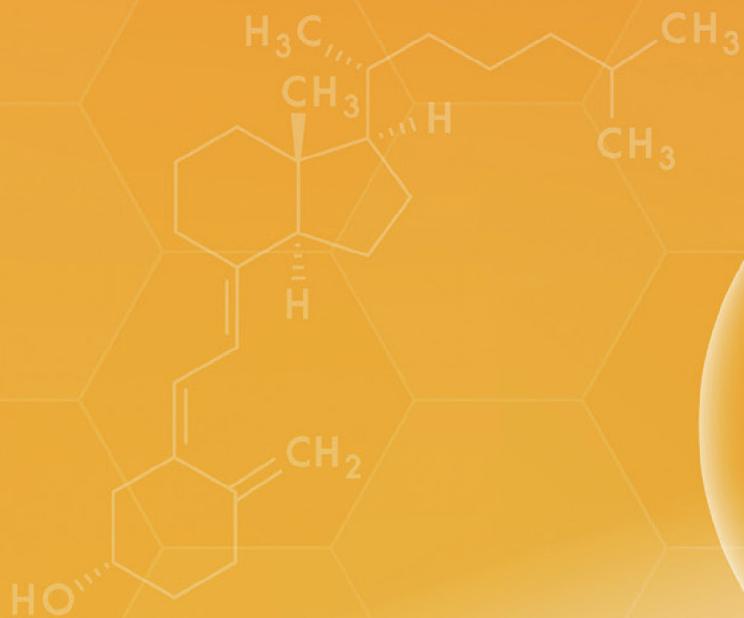
PCR y los niveles de 25(OH) D, ni tampoco con la PCT al ingreso en UCI. Estas discrepancias pueden ser debidas a la heterogeneidad de la población entre los diferentes estudios y a las diferentes metodologías utilizadas para medir los diferentes analitos, así como al tamaño muestral. Sin embargo, sí hemos encontrado por primera vez, una correlación inversa moderada entre la VDBP y la PTX3 ($r=-0,311$, $p=0,007$). Este hallazgo podría atribuirse a que ambos biomarcadores parecen ejercer un papel significativo en la inmunidad innata durante la inflamación y la infección. Sin embargo, no hemos hallado correlación entre la VDBP y la PCR, que podría ser debida a diferentes mecanismos en la infección o que la PCR es un marcador más tardío y alcanza su pico máximo a las 24-30 h de la respuesta a la infección. Además, la 25(OH) D libre pero no la total también se correlaciona de forma significativa pero moderada con la PTX3 ($r=0,299$, $p=0,009$), pero esta relación desaparece en el análisis de regresión. También hemos encontrado que el lactato muestra una correlación significativa negativa con la VDBP ($r=-0,486$, $p<0,001$) y positiva con la β -2-defensina ($r=0,28$, $p=0,018$). El lactato es un marcador de hipoxia tisular que se utiliza como indicador de severidad y pronóstico en el contexto de sepsis/shock séptico (7). Estudios recientes sugieren que la activación de las células inmunes requeriría del metabolismo de la glucólisis aeróbica y el lactato producido en dicha glucólisis podría tener un papel inmunosupresor en la sepsis (416). Este papel inmunosupresor del lactato podría explicar su asociación con la VDBP y la β -2-defensina. Se requieren más estudios que corroboren estos hallazgos preliminares.

FORTALEZAS

Dentro de las fortalezas de nuestro estudio se encuentra ser un ensayo sobre una población homogénea de pacientes con shock séptico según las últimas definiciones del consenso Sepsis-3. Por otra parte, y hasta la fecha que nosotros sepamos, es el primero que explora la asociación tanto de los niveles de 25(OH) D, como de parámetros del metabolismo fosfocálcico y péptidos antimicrobianos dependientes de la vitamina D, con la inflamación, con la mortalidad hospitalaria y con la supervivencia en pacientes con shock séptico simultáneamente.

LIMITACIONES

- Nuestro estudio fue realizado en un único centro con un número pequeño de participantes, por lo que nuestros resultados no pueden totalmente generalizables.
- No hemos realizado grupo control de pacientes críticos no sépticos para obtener resultados más concluyentes.
- No conocemos los valores séricos de vitamina D previos al ingreso de los pacientes en la UCI, por lo que desconocemos si la deficiencia de vitamina D ya estaba presente antes del ingreso en UCI o si fue debida al desencadenamiento de la sepsis.
- No se realizó seguimiento de los parámetros analizados a lo largo del proceso, no conociendo el estado final de la vitamina D en los supervivientes en relación con los no supervivientes.
- Los niveles de VDBP fueron determinados por ELISA usando un anticuerpo monoclonal específico para la VDBP. Estudios recientes han encontrado que este inmunoensayo presenta problemas a la hora de detectar la variante GC1F, muy común en población africana. Sin embargo, en nuestro estudio toda la población era caucásica, en la cual este fenotipo es raro, por lo que el uso de este inmunoensayo no debería tener un fuerte impacto en nuestros resultados.
- No se han evaluado los polimorfismos de la VDBP, que afectan a la función de la proteína y a su capacidad de unión a la vitamina D, lo que podría repercutir en la biodisponibilidad de la vitamina D.



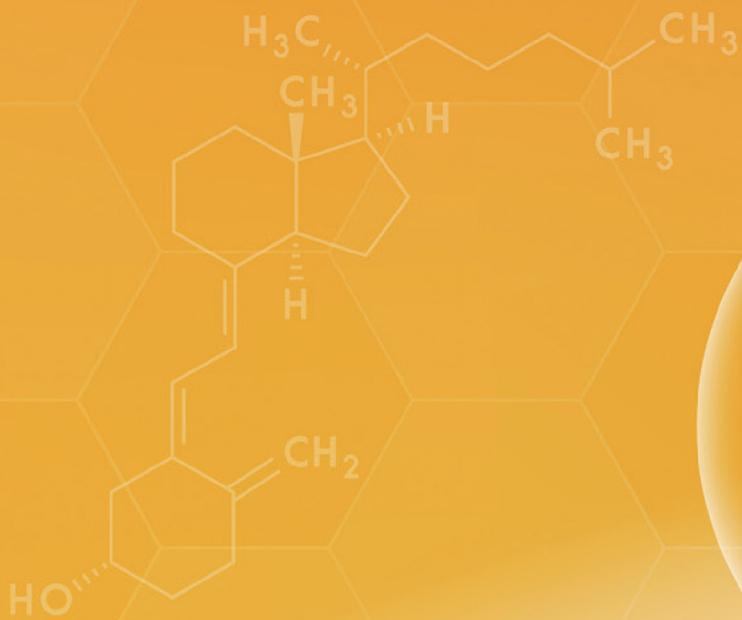
6

CONCLUSIONES

Las conclusiones de este estudio son las siguientes:

1. La prevalencia de deficiencia de vitamina D en nuestro grupo de estudio de pacientes críticos adultos con shock séptico es muy elevada (82,7%). Se observa además un 58,6% de descenso en los niveles de $1,25(\text{OH})_2 \text{D}$.
2. Los niveles séricos de 25(OH) D total y libre presentan un patrón estacional similar, siendo los niveles menores en invierno y en primavera. Los niveles de catelicidina también presentan variación estacional, siendo en este caso los niveles mayores en primavera.
3. Los niveles de 25(OH) D en suero correlacionan positiva y significativamente con los niveles de 25(OH) D libre medida y libre calculada, pero la utilización de la forma libre en vez de la total no parece ofrecer ventajas a la hora de evaluar el estatus nutricional de la vitamina D en pacientes con shock séptico ni presenta diferencias en términos de correlación con el resto de parámetros analizados.
4. Los niveles de 25(OH) D total y libre correlacionan negativamente con los niveles de β -2-defensina. La fracción libre correlaciona con la PTX3, aunque esta relación desaparece en el análisis de regresión.
5. Los niveles de VDBP correlacionan negativamente con los niveles de lactato y PTX3.
6. Pacientes con niveles de 25(OH) D <20 ng/mL presentan valores significativamente más elevados del índice de comorbilidad de Charlson y de β -2-defensina. No se encontraron diferencias entre el resto de parámetros clínicos y bioquímicos entre pacientes con suficiencia o no de vitamina D.

7. El hiperparatiroidismo secundario asociado a deficiencia de vitamina D es altamente prevalente en pacientes con shock séptico (50,7%), aunque no se encontraron diferencias en los parámetros clínicos y bioquímicos entre pacientes que presentaron hiperparatiroidismo secundario y los que no.
8. Se han encontrado niveles de VDBP significativamente disminuidos en los pacientes con foco de infección abdominal comparado con infección urinaria e infección pulmonar y niveles de PTX3 mayores en infección abdominal y pulmonar comparado con foco urinario.
9. El descenso en los niveles de $1,25(\text{OH})_2 \text{D}$ y VDBP se asocian a una mayor necesidad de ventilación mecánica. Se ha encontrado una tendencia de niveles más bajos de VDBP en pacientes con síndrome de distrés respiratorio.
10. Niveles disminuidos de $1,25(\text{OH})_2 \text{D}$ y de VDBP y aumentados de FGF23 se asocian a una mayor necesidad de hemofiltración veno-venosa continua.
11. Niveles séricos disminuidos de $1,25(\text{OH})_2 \text{D}$, VDBP y de catelicidina, así como niveles aumentados de PTX3 se correlacionan con la severidad de la sepsis y con la disfunción orgánica.
12. No se encuentra asociación de los niveles de $25(\text{OH}) \text{D}$ total, $25(\text{OH}) \text{D}$ libre, $1,25(\text{OH})_2 \text{D}$, PTH, FGF23, catelicidina y β -2-defensina con mortalidad en pacientes con shock séptico.
13. Se han encontrado diferencias significativas entre supervivientes y no supervivientes en los niveles de albúmina, fósforo, FGF23 y VDBP. Sin embargo, únicamente los niveles disminuidos de VDBP han mostrado una asociación independiente con la mortalidad hospitalaria, de tal manera que, pacientes con niveles de VDBP inferiores a 114250 ng/mL presentan un riesgo seis veces mayor de mortalidad. Además, sólo la VDBP ha mostrado una asociación independiente con la mortalidad global, a 30 y 90 días, por lo que niveles altos de VDBP parecen ser protectores.
14. La PTX3 presenta una potencial utilidad pronóstica como predictor de mortalidad hospitalaria valorada mediante curvas ROC (AUC=0,70) en pacientes con shock séptico, siendo mejor en comparación con la PCT (AUC=0,43) y la PCR (AUC=0,48), pero inferior a la obtenida por el lactato (AUC=0,79) y la VDBP (AUC=0,78).



7

BIBLIOGRAFÍA

1. Fleischmann C, Scherag A, Adhikari NK, Hartog CS, Tsaganos T, Schlattmann P, et al. Assessment of Global Incidence and Mortality of Hospital-treated Sepsis. Current Estimates and Limitations. *Am J Respir Crit Care Med*. 2016;193(3):259-72.
2. Vincent JL, Marshall JC, Namendys-Silva SA, François B, Martin-Loeches I, Lipman J, et al. Assessment of the worldwide burden of critical illness: the intensive care over nations (ICON) audit. *Lancet Respir Med*. 2014;2(5):380-6.
3. Reinhart K, Daniels R, Kissoon N, Machado FR, Schachter RD, Finfer S. Recognizing sepsis as a global health priority—a WHO resolution. *N Engl J Med*. 2017;377(5):414-7.
4. Iwashyna TJ, Ely EW, Smith DM, Langa KM. Long-term cognitive impairment and functional disability among survivors of severe sepsis. *JAMA*. 2010;304(16):1787-94.
5. Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger ERP, Fein AM, Knaus WA, et al. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest* 1992;101:1644-55.
6. Levy MM, Fink MP, Marshall JC, Abraham E, Angus D, Cook D, et al. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Crit Care Med*. 2003; 31(4):1250-6.
7. Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M, et al. The third international Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis 3). *JAMA*. 2016;315(8):801-10.
8. Sprung CL, Schein RMH, Balk RA. The new sepsis consensus definitions: the good, the bad and the ugly. *Intensive Care Med*. 2016;42(12):2024-6.
9. Abraham E. New definitions for sepsis and septic shock: continuing evolution but with much still to be done. *JAMA*. 2016;315(8):757-9.
10. Simpson SQ. New Sepsis Criteria: A Change We Should Not Make. *Chest*. 2016;149(5):1117-8.
11. Cortés-Puch I, Hartog CS. Opening the Debate on the New Sepsis Definition Change Is Not Necessarily Progress: Revision of the Sepsis Definition Should Be Based on New Scientific Insights. *Am J Respir Crit Care Med*. 2016;194(1):16-8.
12. Neviere R. Sepsis syndromes in adults: Epidemiology, definitions, clinical presentation, diagnosis, and prognosis. [Monografía en Internet]. Wolters Kluwer: UpToDate; 2020 [acceso 27 de abril de 2021]. Disponible en: <http://www.uptodate.com>.
13. Kaukonen KM, Bailey M, Pilcher D, Cooper DJ, Bellomo R. Systemic inflammatory response syndrome criteria in defining severe sepsis. *N Engl J Med*. 2015;372(17):1629-38.
14. Gotts JE, Matthay MA. Sepsis: pathophysiology and clinical management. *BMJ*. 2016;353:i1585.
15. Cecconi M, Evans L, Levy M, Rhodes A. Sepsis and septic shock. *Lancet*. 2018;392(10141):75-87.
16. Neviere R. Pathophysiology of sepsis. [Monografía en Internet]. Wolters Kluwer: UpToDate; 2020 [acceso 27 de abril de 2021]. Disponible en: <http://www.uptodate.com>.
17. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, et al. Neutrophil

- extracellular traps kill bacteria. *Science*. 2004;303(5663):1532-5.
18. Park SY, Shrestha S, Youn YJ, Kim JK, Kim SY, Kim HJ, et al. Autophagy Primes Neutrophils for Neutrophil Extracellular Trap Formation during Sepsis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2017;196(5):577-89.
 19. Saffarzadeh M, Juenemann C, Queisser MA, Lochnit G, Barreto G, Galuska SP, et al. Neutrophil extracellular traps directly induce epithelial and endothelial cell death: a predominant role of histones. *PLoS One*. 2012;7(2):e32366.
 20. Weber C. Liver: Neutrophil extracellular traps mediate bacterial liver damage. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2015;12(5):251.
 21. Sollberger G, Tilley DO, Zychlinsky A. Neutrophil Extracellular Traps: The Biology of Chromatin Externalization. *Dev Cell*. 2018;44(5):542-53.
 22. Mera S, Tatulescu D, Cismaru C, Bondor C, Slavcovici A, Zanc V, et al. Multiplex cytokine profiling in patients with sepsis. *APMIS*. 2011;119(2):155-63.
 23. Bozza FA, Salluh JI, Japiassu AM, Soares M, Assis EF, Gomes RN, et al. Cytokine profiles as markers of disease severity in sepsis: a multiplex analysis. *Crit Care*. 2007;11(2):R49.
 24. Frantz S, Ertl G, Bauersachs J. Mechanisms of disease: Toll-like receptors in cardiovascular disease. *Nat Clin Pract Cardiovas Med*. 2007;8:444-54.
 25. Dellinger RP, Carlet JM, Masur H, Gerlach H, Calandra T, Cohen J, et al. Surviving Sepsis Campaign guidelines for management of severe sepsis and septic shock. *Crit Care Med*. 2004;32(3):858-73.
 26. Dellinger RP, Levy MM, Carlet JM, Bion J, Parker MM, Jaeschke R, et al. Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2008. *Crit Care Med*. 2008;36(1):296-327.
 27. Dellinger RP, Levy MM, Rhodes A, Annane D, Gerlach H, Opal SM, et al. Surviving Sepsis Campaign: International guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2012. *Crit Care Med*. 2012;39(2):580-637.
 28. Rhodes A, Evans LE, Alhazzani W, Levy MM, Antonelli M, Ferrer R, et al. Surviving Sepsis Campaign: International guidelines for Management Guidelines of Sepsis and Septic Shock: 2016. *Crit Care Med*. 2017; 45(3):486-552.
 29. Levy MM, Evans LE, Rhodes A. The Surviving Sepsis Campaign Bundle: 2018 update. *Intensive Care Med*. 2018;44(6):925-8.
 30. Ospina-Tascón GA, Büchele GL, Vincent JL. Multicenter, randomized, controlled trials evaluating mortality in intensive care: doomed to fail? *Crit Care Med*. 2008;36(4):1311-22.
 31. Vincent JL, Sakr Y. Clinical trial design for unmet clinical needs: a spotlight on sepsis. *Expert Rev Clin Pharmacol*. 2019;12(9):893-900.
 32. Raisz LG. Physiology and pathophysiology of bone remodeling [published correction appears in *Clin Chem* 1999 Oct;45(10):1885]. *Clin Chem*. 1999;45(8 Pt 2):1353-8.
 33. Hoenderop JG, Nilius B, Bindels RJ. Calcium absorption across epithelia. *Physiol Rev*. 2005;85(1):373-422.
 34. Blaine J, Chonchol M, Levi M. Renal control of calcium, phosphate, and magnesium ho-

- meostasis [published correction appears in *Clin J Am Soc Nephrol*. 2015 Oct 7;10(10):1886-7]. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2015;10(7):1257-72.
35. Kumar R. Vitamin D and calcium transport. *Kidney Int*. 1991; 40(6):1177-89.
 36. Brown EM. PTH secretion in vivo and in vitro. Regulation by calcium and other secretagogues. *Miner Electrolyte Metab*. 1982; 8(3-4):130-50.
 37. Brown EM, Hebert SC. Calcium-receptor-regulated parathyroid and renal function. *Bone* 1997; 20(4):303-9.
 38. Lambers TT, Bindels RJ, Hoenderop JG. Coordinated control of renal Ca²⁺ handling. *Kidney Int*. 2006; 69(4):650-4.
 39. Hogan J, Goldfarb S. Regulation of calcium and phosphate balance. [Monografía en Internet]. Wolters Kluwer: UpToDate; 2019 [acceso 20 de marzo de 2021]. Disponible en: <http://www.uptodate.com>.
 40. Bronner F, Pansu D, Stein WD. An analysis of intestinal calcium transport across the rat intestine. *Am J Physiol*. 1986;250(5 Pt 1):G561-9.
 41. Moor MB, Bonny O. Ways of calcium reabsorption in the kidney. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2016;310(11): F1337-50.
 42. Yu AS. Claudins and the kidney. *J Am Soc Nephrol*. 2015; 26(1):11-9.
 43. Lambers TT, Bindels RJ, Hoenderop JG. Coordinated control of renal Ca²⁺ handling. *Kidney Int*. 2006;69(4):650-4.
 44. Gkika D, Hsu YJ, van der Kemp AW, Christakos S, Bindels RJ, Hoenderop JG. Critical role of the epithelial Ca²⁺ channel TRPV5 in active Ca²⁺ reabsorption as revealed by TRPV5/calbindin-D28K knockout mice. *J Am Soc Nephrol*. 2006;17(11):3020-7.
 45. Mensenkamp AR, Hoenderop JG, Bindels RJ. TRPV5, the gate way to Ca²⁺ homeostasis. *Handb Exp Pharmacol*. 2007;(179):207-20.
 46. Lederer E. Regulation of serum phosphate. *J Physiol*. 2014;592(18):3985-95.
 47. Lederer E. Renal phosphate transporters. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2014;23(5):502-6.
 48. Levi M, Gratton E, Forster IC, Hernando N, Wagner CA, Biber J, et al. Mechanisms of phosphate transport. *Nat Rev Nephrol*. 2019;15(8):482-500.
 49. García Martín A, Varsavsky M, Cortés Berdonces M, Ávila Rubio V, Alhambra Expósito MR, Novo Rodríguez C, et al. Trastornos del fosfato y actitud clínica ante situaciones de hipofosfatemia e hiperfosfatemia. *Endocrinol Diabetes Nutr*. 2020;67(3):205-15.
 50. Kumar R, Thompson JR. The regulation of parathyroid hormone secretion and synthesis. *J Am Soc Nephrol*. 2011;22(2):216-24.
 51. Murray TM, Rao LG, Divieti P, Bringhurst FR. Parathyroid hormone secretion and action: evidence for discrete receptors for the carboxyl-terminal region and related biological actions of carboxyl-terminal ligands. *Endocr Rev*. 2005;26(1):78-113.
 52. El-Hajj Fuleihan G. Parathyroid hormone assays and their clinical use. [Monografía en Internet]. Wolters Kluwer: UpToDate; 2020 [acceso 15 de abril de 2021]. Disponible en: <http://www.uptodate.com>.
 53. D'Amour P, Räkel A, Brossard JH, Rousseau L, Albert C, Cantor T. Acute regulation of cir-

- culating parathyroid hormone (PTH) molecular forms by calcium: utility of PTH fragments/PTH (1-84) ratios derived from three generations of PTH assays. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006;91(1):283–9.
54. Chen RA, Goodman WG. Role of the calcium-sensing receptor in parathyroid gland physiology. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2004;286(6): F1005–11.
55. Brown EM, Gamba G, Riccardi D, Lombardi M, Butters R, Kifor O, et al. Cloning and characterization of an extracellular Ca (2+)-sensing receptor from bovine parathyroid. *Nature.* 1993;366(6455):575–80.
56. Hannan FM, Kallay E, Chang W, Brandi ML, Thakker RV. The calcium-sensing receptor in physiology and in calcitropic and noncalcitropic diseases. *Nat Rev Endocrinol.* 2018;15(1):33–51.
57. Slatopolsky E, Finch J, Denda M, Ritter C, Zhong M, Dusso A, et al. Phosphorus restriction prevents parathyroid gland growth. High phosphorus directly stimulates PTH secretion in vitro. *J Clin Invest.* 1996;97(11):2534–40.
58. Naveh-Many T, Rahamimov R, Livni N, Silver J. Parathyroid cell proliferation in normal and chronic renal failure rats. The effects of calcium, phosphate, and vitamin D. *J Clin Invest.* 1995;96(4):1786–93.
59. Centeno PP, Herberger A, Mun HC, Tu C, Nemeth EF, Chang W, et al. Phosphate acts directly on the calcium-sensing receptor to stimulate parathyroid hormone secretion. *Nat Commun.* 2019;10(1):4693.
60. Silver J, Naveh-Many T. FGF23 and the parathyroid glands. *Pediatr Nephrol.* 2010;25(11):2241–5.
61. Berndt T, Kumar R. Phosphatonins and the regulation of phosphate homeostasis. *Annu Rev Physiol.* 2007;69:341–59.
62. Martin KJ, Akhtar I, González EA. Parathyroid hormone: new assays, new receptors. *Semin Nephrol.* 2004;24(1):3–9.
63. Smit MA, van Kinschot CMJ, van der Linden J, van Noord C, Kos S. Clinical Guidelines and PTH Measurement: does Assay Generation Matter? [published correction appears in *Endocr Rev.* 2020 Dec 1;41(6):]. *Endocr Rev.* 2019;40(6):1468–80.
64. Boros S, Bindels RJ, Hoenderop JG. Active Ca (2+) reabsorption in the connecting tubule. *Pflugers Arch.* 2009;458(1):99–109.
65. Vezzoli G, Soldati L, Gambaro G. Roles of calcium-sensing receptor (CaSR) in renal mineral ion transport. *Curr Pharm Biotechnol.* 2009;10(3):302–10.
66. Cunningham J, Locatelli F, Rodriguez M. Secondary hyperparathyroidism: pathogenesis, disease progression, and therapeutic options. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2011;6(4):913–21.
67. Liu S, Quarles LD. How fibroblast growth factor 23 works. *J Am Soc Nephrol.* 2007;18(6):1637–47.
68. Liu S, Gupta A, Quarles LD. Emerging role of fibroblast growth factor 23 in a bone-kidney axis regulating systemic phosphate homeostasis and extracellular matrix mineralization. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2007;16(4):329–35.
69. Yoshiko Y, Wang H, Minamizaki T, Ijuin C, Yamamoto R, Suemune S, et al. Mineralized tissue

- cells are a principal source of FGF23. *Bone*. 2007;40(6):1565–73.
70. Martin A, David V, Quarles LD. Regulation and function of the FGF23/klotho endocrine pathways. *Physiol Rev*. 2012;92(1):131–55.
 71. Lavi-Moshayoff V, Wasserman G, Meir T, Silver J, Naveh-Many T. PTH increases FGF23 gene expression and mediates the high-FGF23 levels of experimental kidney failure: a bone parathyroid feedback loop. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2010;299(4):F882-9.
 72. López I, Rodríguez-Ortiz ME, Almadén Y, Guerrero F, de Oca AM, Pineda C, et al. Direct and indirect effects of parathyroid hormone on circulating levels of fibroblast growth factor 23 in vivo. *Kidney Int*. 2011;80(5):475-82.
 73. Quinn SJ, Thomsen AR, Pang JL, Kantham L, Bräuner-Osborne H, Pollak M, et al. Interactions between calcium and phosphorus in the regulation of the production of fibroblast growth factor 23 in vivo. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2013;304(3):E310-20.
 74. Imanishi Y, Inaba M, Nakatsuka K, Nagasue K, Okuno S, Yoshihara A, et al. FGF-23 in patients with end-stage renal disease on hemodialysis. *Kidney Int*. 2004;65(5):1943-6.
 75. Larsson T, Nisbeth U, Ljunggren O, Jüppner H, Jonsson KB. Circulating concentration of FGF-23 increases as renal function declines in patients with chronic kidney disease, but does not change in response to variation in phosphate intake in healthy volunteers. *Kidney Int*. 2003;64(6):2272-9.
 76. Wolf M, White KE. Coupling fibroblast growth factor 23 production and cleavage: iron deficiency, rickets, and kidney disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2014;23(4):411–9.
 77. Ito N, Wijenayaka AR, Prideaux M, Kogawa M, Ormsby RT, Evdokiou A, et al. Regulation of FGF23 expression in IDG-SW3 osteocytes and human bone by pro-inflammatory stimuli. *Mol Cell Endocrinol*. 2015;399:208–18.
 78. David V, Martin A, Isakova T, Spaulding C, Qi Lixin, Ramirez V, et al. Inflammation and functional iron deficiency regulate fibroblast growth factor 23 production. *Kidney Int*. 2016;89(1):135–46.
 79. Pathak JL, Bakker AD, Luyten FP, Verschueren P, Lems WF, Klein-Nulend J, et al. Systemic Inflammation Affects Human Osteocyte-Specific Protein and Cytokine Expression. *Calcif Tissue Int*. 2016;98(6):596–608.
 80. Zhang B, Umbach AT, Chen H, Yan J, Fakhri H, Fajol A, et al. Up-regulation of FGF23 release by aldosterone. *Biochem Biophys Res Commun*. 2016;470(2):384–90.
 81. Ratsma DMA, Zillikens MC, van der Eerden BCJ. Upstream Regulators of Fibroblast Growth Factor 23. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2021;12:588096.
 82. Masuda Y, Ohta H, Morita Y, Nakayama Y, Miyake A, Itoh N, et al. Expression of Fgf23 in activated dendritic cells and macrophages in response to immunological stimuli in mice. *Biol Pharm Bull*. 2015;38(5):687–93.
 83. Andrukhova O, Slavic S, Odörfer KI, Erben RG. Experimental Myocardial Infarction Upregulates Circulating Fibroblast Growth Factor-23. *J Bone Miner Res*. 2015;30(10):1831–9.
 84. Leifheit-Nestler M, GroßeSiemer R, Flasbart K, Richter B, Kirchhoff F, Ziegler WH, et al. Induction of cardiac FGF23/FGFR4 expression is associated with left ventricular hypertrophy in patients with chronic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant*. 2016;31(7):1088–99.

85. Shimada T, Yamazaki Y, Takahashi M, Hasegawa H, Urakama I, Oshima T, et al. Vitamin D receptor-independent FGF23 actions in regulating phosphate and vitamin D metabolism. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2005;289(5):F1088–95.
86. Kuro-o M. Klotho as a regulator of fibroblast growth factor signaling and phosphate/calcium metabolism. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2006;15(4):437–41.
87. Saito H, Kusano K, Kinoshita M, Ito H, Hirata M, Segawa H, et al. Human fibroblast growth factor-23 mutants suppress Na⁺-dependent phosphate co-transport activity and 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ production. *J Biol Chem*. 2003;278(4):2206–11.
88. Krajisnik T, Björklund P, Marsell R, Ljunggren O, Akerström G, Kenneth B, et al. Fibroblast growth factor-23 regulates parathyroid hormone and 1 α -hydroxylase expression in cultured bovine parathyroid cells. *J Endocrinol*. 2007;195(1):125–31.
89. Andrukhova O, Slavic S, Smorodchenko A, Zeitz U, Shalhoub V, Lanske B, et al. FGF23 regulates renal sodium handling and blood pressure. *EMBO Mol Med*. 2014;6(6):744–59.
90. Andrukhova O, Smorodchenko A, Egerbacher M, Streichert C, Zeitz U, Goetz R, et al. FGF23 promotes renal calcium reabsorption through the TRPV5 channel. *EMBO J*. 2014;33(3):229–46.
91. Urakawa I, Yamazaki Y, Shimada T, Iijima K, Hasegawa H, Okawa K, et al. Klotho converts canonical FGF receptor into a specific receptor for FGF23. *Nature*. 2006;444(7120):770–4.
92. Kurosu H, Kuro-O M. The Klotho gene family as a regulator of endocrine fibroblast growth factors. *Mol Cell Endocrinol*. 2009;299(1):72–8.
93. Farrow EG, Davis SI, Summers LJ, White KE. Initial FGF23-mediated signaling occurs in the distal convoluted tubule. *J Am Soc Nephrol*. 2009;20(5):955–60.
94. Bacchetta J, Bardet C, Prié D. Physiology of FGF23 and overview of genetic diseases associated with renal phosphate wasting. *Metabolism*. 2020;103S:153865.
95. Murali SK, Roschger P, Zeitz U, Klaushofer K, Andrukhova O, Erben RG. FGF23 Regulates Bone Mineralization in a 1,25(OH)₂ D₃ and Klotho-Independent Manner. *J Bone Miner Res*. 2016;31(1):129–42.
96. Isakova T, Wahl P, Vargas GS, Gutiérrez OM, Scialla J, Xie H, et al. Fibroblast growth factor 23 is elevated before parathyroid hormone and phosphate in chronic kidney disease [published correction appears in *Kidney Int*. 2012 Aug;82(4):498]. *Kidney Int*. 2011;79(12):1370–8.
97. Shimada T, Urakawa I, Isakova T, Yamazaki Y, Epstein M, Wesseling-Perry K, et al. Circulating fibroblast growth factor 23 in patients with end-stage renal disease treated by peritoneal dialysis is intact and biologically active. *J Clin Endocrinol Metab*. 2010;95(2):578–85.
98. Gutiérrez OM. Fibroblast growth factor 23 and disordered vitamin D metabolism in chronic kidney disease: updating the “trade-off” hypothesis. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2010;5(9):1710–6.
99. Isakova T, Xie H, Yang W, Xie D, Anderson AH, Scialla J, et al. Fibroblast growth factor 23 and risks of mortality and end-stage renal disease in patients with chronic kidney disease. *JAMA*. 2011;305(23):2432–9.
100. Kendrick J, Cheung AK, Kaufman JS, Greene T, Roberts WL, Smits G, et al. FGF-23 associates with death, cardiovascular events, and initiation of chronic dialysis. *J Am Soc of*

- Nephrol. 2011;22(10):1913–22.
101. Parker BD, Schurgers LJ, Brandenburg VM, Christenson RH, Vermeer C, Ketteler M, et al. The associations of fibroblast growth factor 23 and uncarboxylated matrix Gla protein with mortality in coronary artery disease: The Heart and Soul Study. *Ann Intern Med.* 2010;152(10):640–8.
 102. Wolf M, Molnar MZ, Amaral AP, Czira ME, Rudas A, Ujszaszi A, et al. Elevated fibroblast growth factor 23 is a risk factor for kidney transplant loss and mortality. *J Am Soc of Nephrol.* 2011;22(5):956–66.
 103. Ärnlöv J, Carlsson AC, Sundström J, Ingelsson E, Larsson A, Lind L, et al. Higher fibroblast growth factor-23 increases the risk of all-cause and cardiovascular mortality in the community. *Kidney Int.* 2013;83(1):160–6.
 104. Scialla JJ, Xie H, Rahman M, Anderson AH, Isakova T, Ojo A, et al. Fibroblast growth factor-23 and cardiovascular events in CKD. *J Am Soc Nephrol.* 2014;25(2):349–60.
 105. Mehta R, Cai X, Lee J, Scialla JJ, Bansal N, Sondheimer JH, et al. Association of Fibroblast Growth Factor 23 with atrial fibrillation in chronic kidney disease, from the Chronic Renal Insufficiency Cohort Study. *JAMA Cardiol.* 2016;1(5):548–56.
 106. Gutiérrez OM, Mannstadt M, Isakova T, Rauh-Hain JA, Tamez H, Shah A, et al. Fibroblast growth factor 23 and mortality among patients undergoing hemodialysis. *N Engl J Med.* 2008;359(6):584–92.
 107. Ix JH, Katz R, Kestenbaum BR, de Boer IH, Chonchol M, Mukamal KJ, et al. Fibroblast growth factor-23 and death, heart failure, and cardiovascular events in community-living individuals: CHS (Cardiovascular Health Study). *J Am Coll Cardiol.* 2012;60(3):200–7.
 108. Singh S, Grabner A, Yanucil C, Schramm K, Czaya B, Krick S, et al. Fibroblast growth factor 23 directly targets hepatocytes to promote inflammation in chronic kidney disease. *Kidney Int.* 2016;90(5):985–6.
 109. Rossaint J, Oehmichen J, Van Aken H, Reuter S, Pavenstädt HJ, Meersch M, et al. FGF23 signaling impairs neutrophil recruitment and host defense during CKD. *J Clin Invest.* 2016;126(3):962–74.
 110. Christov M, Waikar SS, Pereira RC, Havasi A, Leaf DE, Goltzman D, et al. Plasma FGF23 levels increase rapidly after acute kidney injury. *Kidney Int.* 2013;84(4):776–85.
 111. Donate-Correa J, Muros de Fuentes M, Mora-Fernández C, Navarro-González JF. Pathophysiological implications of fibroblast growth factor-23 and Klotho and their potential role as clinical biomarkers. *Clin Chem.* 2014;60(7):933–40.
 112. Souberbielle JC, Prié D, Piketty ML, Rothenbuhler A, Delanaye P, Chanson P, et al. Evaluation of a New Fully Automated Assay for Plasma Intact FGF23. *Calcif Tissue Int.* 2017;101(5):510–8.
 113. van Helden J, Weiskirchen R. Technical and diagnostic performance of a new fully automated immunoassay for the determination of intact fibroblast growth factor 23 (FGF23). *Scand J Clin Lab Invest.* 2018;78(7-8):584–90.
 114. Riancho Moral JA, González Macías J. Manual práctico de osteoporosis y enfermedades del metabolismo mineral. 1ª edición. Madrid: Jarpyo Editores; 2004.

115. Yu ASL. Regulation of magnesium balance. [Monografía en Internet]. Wolters Kluwer: UpToDate; 2020 [acceso 10 de marzo de 2021]. Disponible en: <http://www.uptodate.com>.
116. de Baaij JH, Hoenderop JG, Bindels RJ. Magnesium in man: implications for health and disease. *Physiol Rev.* 2015;95(1):1-46.
117. Holick M.F. Vitamin D deficiency. *N Engl. J Med.* 2007;357(3):266–81.
118. Wang TJ, Zhang F, Richards JB, Kestenbaum B, van Meurs JB, Berry D et al. Common genetic determinants of vitamin D insufficiency: A genome-wide association study. *Lancet.* 2010; 376(9736):180–8.
119. Holick MF. The vitamin D deficiency pandemic: Approaches for diagnosis, treatment and prevention. *Rev Endocr Metab Disord.* 2017;18(2):153-65.
120. Holick MF. Photobiology of Vitamin D metabolism. En: Hewison M, Feldman D, Wesley Pike J, Giovannucci, Goltzman D, editors. *Vitamin D. Volume 1: Biochemistry, Physiology and Diagnostics.* 4th edition. London: Elsevier; 2017. p. 45-55.
121. Bikle DD, Siiteri PK, Ryzen E, Haddad JG. Serum protein binding of 1,25-dihydroxyvitamin D: a reevaluation by direct measurement of free metabolite levels. *J Clin Endocrinol Metab.* 1985;61(5):969-75.
122. Chun RF, Peercy BE, Orwoll ES, Nielson CM, Adams JS, Hewison M. Vitamin D and DBP: the free hormone hypothesis revisited. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2014;144 Pt A:132-7.
123. Adams JS, Hewison M. Update in vitamin D. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010;95(2):471-8.
124. Jones G, Prosser DE, Kaufmann M. Cytochrome P-450-mediated metabolism of vitamin D. *J Lipid Res.* 2014; 55(1):13-31.
125. Bikle DD. Vitamin D metabolism, mechanism of action, and clinical applications. *Chem Biol.* 2014;21(3):319-29.
126. Gombart AF. The vitamin D-antimicrobial peptide pathway and its role in protection against infection. *Future Microbiol.* 2009;4(9):1151-65.
127. Henry HL. Regulation of vitamin D metabolism. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2011;25(4):531-41.
128. Singmundsdottir H, Pan J, Debes GF, Alt C, Habtezion A, Soler D et al. DCs metabolize sunlight-induced vitamin D3 to “program” T cell attraction to the epidermal chemokine CCL27. *Nat Immunol.* 2007;8(3):285-93.
129. Gottfried E, Rehli M, Hahn J, Holler E, Andreesen R, Kreutz M. Monocyte-derived cells express CYP27A1 and convert vitamin D3 into its active metabolite. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006;349(1):209-13.
130. Stoffels K, Overbergh L, Giuliatti A, Verlinden L, Bouillon R, Mathieu C. Immune regulation of 25-hydroxyvitamin-D3-1alpha-hydroxylase in human monocytes. *J Bone Miner Res.* 2006;21(1):37-47.
131. Suaini NHA, Zhang Y, Vuillermin PJ, Allen KJ, Harrison LC. Immune modulation by vitamin D and its relevance to food allergy. *Nutrients.* 2015;7(8):6088-108.
132. Ichikawa F, Sato K, Nanjo M, Nishii Y, Shinki T, Takahashi N, et al. Mouse primary osteoblasts express vitamin D3 25-hydroxylase mRNA and convert 1 alpha-hydroxyvitamin D3

- into 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D₃. *Bone*. 1995;16(1):129-35.
133. Hewison M, Zehnder D, Bland R, Stewart PM. 1 alpha-hydroxylase and the action of vitamin D. *J Mol Endocrinol*. 2000;25(2):141-8.
134. 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(2):491S-95S.
135. Wang Y, Zhu J, DeLuca HF. Where is the vitamin D receptor? *Arch Biochem Biophys*. 2012;523(1):123–33.
136. Gil A, Plaza-Díaz J, Mesa MD. Vitamin D: Classic and Novel Actions. *Ann Nutr Metab*. 2018;72(2):87–95.
137. Maestro MA, Molnár F, Mouriño A, Carlberg C. Vitamin D receptor 2016: Novel ligands and structural insights. *Expert Opin. Ther Patents*. 2016;26(11):1291–306.
138. Miyamoto K, Kesterson RA, Yamamoto H, Taketani Y, Nishiwaki E, Tatsumi S, et al. Structural organization of the human vitamin D receptor chromosomal gene and its promoter. *Mol Endocrinol*. 1997;11(8):1165-79.
139. Sirajudeen S, Shah I, Al Menhali A. A Narrative Role of Vitamin D and Its Receptor: With Current Evidence on the Gastric Tissues. *Int J Mol Sci*. 2019;20(15):3832.
140. Jones G. Extrarenal Vitamin D activation and interactions between Vitamin D₂, Vitamin D₃, and Vitamin D analogs. *Annu Rev Nutr* 2013;33:23-44.
141. Bover et al. Vitamina D, receptor de la vitamina D e importancia de su activación en el paciente con enfermedad renal crónica. *Nefrología* 2015;35(1):28-41.
142. Bouillon R, Pauwels S. The Vitamin D-Binding Protein. En: Hewison M, Feldman D, Wesley Pike J, Giovannucci, Goltzman D, editors. *Photobiology of Vitamin D metabolism. Vitamin D, Volume 1: Biochemistry, Physiology and Diagnostics*. 4th edition. London: Elsevier; 2017. p. 97-115.
143. Hirschfeld J. Immune-electrophoretic demonstration of qualitative differences in human sera and their relation to the haptoglobins. *Acta Pathol Microbiol Scand*. 1959;47:160-8.
144. Daiger SP, Schanfield MS, Cavalli-Sforza LL. Group-specific component (Gc) proteins bind vitamin D and 25-hydroxyvitamin D. *Proc Natl Acad Sci USA* 1975;72(6):2076-80.
145. Lichenstein HS, Lyons DE, Wurfel MM, Jonson DA, McGinley MD, Leidli JC et al. Afamin is a new member of the albumin, alpha-feto protein, and vitamin d-binding protein gene family. *J Biol Chem*. 1994;269(27):18149-54.
146. Belanger L, Roy S, Allard D.: New albumin gene 3' adjacent to the Alpha (1)-fetoprotein locus. *J Biol Chem*. 1994;269(8):5481-4.
147. Voegelé A.F, Jerkovic L, Wellenzohn B, Eller P, Kronenberg F, Liedl KR, et al. Characterization of the vitamin E-binding properties of human plasma afamin. *Biochemistry* 2002; 41(49):14532-8.
148. Kim BJ, Lee YS, Lee SY, Park SY, Dieplinger H, Ryu SH, et al: Afamin secreted from nonresorbing osteoclasts acts as a chemokine for preosteoblasts via the Akt-signaling pathway. *Bone*. 2012;51(3):431-40.
149. Davey RX. Vitamin D binding protein as it is understood in 2016: is it a critical key with which

- to help to solve the calcitriol conundrum? *Ann Clin Biochem.* 2017;54(2):199-208.
150. Malik S, Fu L, Juras DJ, Karmali M, Wong BYL, Gozdzik A, et al. Common variants of the vitamin D binding protein gene and adverse health outcomes. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 2013;50(1):1-22.
 151. Rozmus D, Ciesielska A, Plominski J, Grzybowski R, Fiedorowicz E, Kordulewska N, et al. Vitamin D binding protein (VDBP) and its gene polymorphisms-The risk of malignant tumors and other diseases. *Int J Mol Sci.* 2020;21(21):7822.
 152. Khanna R, Nandy D, Senapati S. Systematic Review and Meta-analysis to establish the association of common genetic variations in Vitamin D binding protein with chronic obstructive pulmonary disease. *Front Genet.* 2019;10:413.
 153. Pekkinen M, Saarnio E, Viljakainen HT, Kokkonen E, Jakobsen J, Cashman K. Vitamin D binding protein genotype is associated with serum 25-hydroxyvitamin D and PTH concentrations, as well as bone health in children and adolescents in Finland. *PLoS One.* 2014;9(1):e87292.
 154. Cooke NE, McLeod JF, Wang XK, Ray K. Vitamin D binding protein: genomic, structure, functional domains, and mRNA expression in tissues. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 1991;40(4-6):787-93.
 155. Verboven C, Ragijns A, De Maeyer M, Van Balen H, Bouillon R, De Ranter C. A structural basis for the unique binding features of the human Vitamin D-binding protein [published correction appears in *Nat Struct Biol* 2002 Apr;9(4):316]. *Nat Struct Biol.* 2002;9(2):131-6.
 156. Williams MH, Vanalstyne EL, Galbraith RM. Evidence of a novel association of unsaturated fatty-acids with gc (vitamin-D-binding protein). *Biochem Biophys Res Commun.* 1988;153(3):1019-24.
 157. Ena JM, Esteban C, Pérez MD, Uriel J, Calvo M. Fatty acids bound to vitamin D-binding protein (DBP) from human and bovine sera. *Biochem Int.* 1989;19(1):1-7.
 158. Tsuprykov O, Chen X, Hoher CF, Yin L, Hoher B. Why should we measure free 25(OH) vitamin D? *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2018;180:87-104.
 159. Rowling MJ, Kemmis CM, Taffany DA, Welsh J. Megalin-mediated endocytosis of vitamin D binding protein correlates with 25-hydroxycholecalciferol actions in human mammary cells. *J Nutr.* 2006;136(11):2754-9.
 160. Lundgren S, Carling T, Hjälml G, Juhlin C, Rastad J, Pihlgren U. Tissue distribution of human gp330/megalin, a putative Ca (+2)-sensing protein. *J Histochem Cytochem.* 1997;45(3):383-92.
 161. Chishimba L, Thickett DR, Stockley RA, Wood AM. The vitamin D axis in the lung: a key role for vitamin D-binding protein. *Thorax.* 2010;65(5):456-62.
 162. Meier U, Gressner O, Lammert F, Gressner AM. Gc-globulin: roles in response to injury. *Clin Chem.* 2006;52(7):1247-53.
 163. Lee P. Vitamin D metabolism and deficiency in critical illness. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2011;25(5):769-81.
 164. DiMartino SJ, Shah AB, Trujillo G, Kew RR. Elastase controls the binding of the vitamin D-binding protein (Gc-globulin) to neutrophils: a potential role in the regulation of C5a

- co-chemotactic activity. *J Immunol.* 2001;166(4):2688-94.
165. Metcalf JP, Thompson AB, Gossman GL, Nelson KJ, Koyama S, Rennard SI, Robbins RA. Gc-globulin functions as a cochemotaxin in the lower respiratory-tract – a potential mechanism for lung neutrophil recruitment in cigarette smokers. *Am Rev Respir Dis.* 1991;143 (4 Pt 1):844-9.
166. Kew RR, Mollison KW, Webster R. Binding of Gc globulin (vitamin-D-binding protein) to C5a or C5a des Arg is not necessary for co-chemotactic activity. *J Leukoc Biol.* 1995;58(1):55-8.
167. Kew RR, Fisher JA, Webster RO: Co-chemotactic effect of gc-globulin (vitamin-D-binding protein) for C5a – transient conversion into an active co-chemotaxin by neutrophils. *J Immunol.* 1995;155(11):5369-74.
168. Binder R, Kress A, Kan GZ, Herrmann K, Kirschfink M: Neutrophil priming by cytokines and vitamin D binding protein (Gc-globulin): impact on C5a-mediated chemotaxis, degranulation and respiratory burst. *Mol Immunol.* 1999;36(13-14):885-92.
169. Lee WM, Galbraith RM. The extracellular actin-scavenger system and actin toxicity. *N Engl J Med.* 1992;326(20):1335-41.
170. Vasconcellos CA, Lind SE. Coordinated inhibition of actin-induced platelet aggregation by plasma gelsolin and vitamin D-binding protein. *Blood.* 1993; 82(12):3648-57.
171. Hoofnagle AN, Eckfeldt JH, Lutsey PL. Vitamin D-binding protein concentrations quantified by mass spectrometry. *N Eng J Med.* 2015;373(15):1480-2.
172. Nielson CM, Jones KS, Chun RF, Jacobs JM, Wang Y, Hewison M. Free 25-hydroxyvitamin D: impact of vitamin D binding protein assays on racial-genotypic associations. *J Clin Metab.* 2016;101(5):2226-34.
173. Zerwekh JE. Blood biomarkers of vitamin D status. *Am J Clin Nutr.* 2008;87(4):1087S-91S.
174. Kennel KA, Drake MT, Hurley DL. Vitamin D deficiency in adults: when to test and how to treat. *Mayo Clin Proc.* 2010;85(8):752-7.
175. Seamans KM, Cashman KD. Existing and potentially novel functional markers of vitamin D status: a systematic review. *Am J Clin Nutr.* 2009;89(6):1997S-2008S.
176. Córdoba Chicote C, Granado Lorenzo F, coordinadores. *Vitamina D: una perspectiva actual.* Barcelona: Comité de Comunicación de la Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular; 2013.
177. Herrmann M, Farrell C-JL, Pusceddu I, Fabregat-Cabello N, Cavalier E. Assessment of vitamin D status - a changing landscape. *Clin Chem Lab Med.* 2017;55(1):3–26.
178. Jassil NK, Sharma A, Bilke D, Wang X. Vitamin D binding protein and 25-hydroxyvitamin D levels: emerging clinical applications. *Endocr Pract.* 2017;23(5):605-13.
179. Yetley EA, Pfeiffer CM, Schelicher RL, Phinney KW, Lacher DA, Christakos S, et al. NHANES Monitoring of serum 25-hydroxyvitamin D: A roundtable summary. *J Nutr.* 2010;140(11):2030S-45S.
180. De la Hunty A, Wallace AM, Gibson S, Viljakainen H, Lamberr-Allardt C, Ashwell M. UK Food Standards Agency Workshop Consensus Report: the choice of method for measuring 25-hydroxyvitamin D to estimate vitamin –d status for the UK National Diet and Nutrition Survey. *Bri J Nutr.* 2010;104(4):612-9.

181. Wallace AM, Gibson S, de la Hunty A, Lamberg-Allardt C, Ashwell M. Measurement of 25-hydroxyvitamin D in the clinical laboratory: Current procedures, performance characteristics and limitations. *Steroids*. 2010;75(7):477-88.
182. Holick MF, Binkley NC, Bischoff-Ferrari HA, Gordon CM, Hanley DA, et al. Evaluation, Treatment, and Prevention of Vitamin D deficiency: an Endocrine Society Clinical Practice Guideline. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011;96(7):1911-30.
183. Ross AC, Manson JE, Abrams SA, Aloia JF, Brannon PM, Clinton SK, et al. The 2011 Report on Dietary Reference intakes for Calcium and Vitamin D from the Institute of Medicine. What clinicians need to know. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011;96(1):53-8.
184. Rosen CJ, Abrams SA, Aloia JF, Brannon PM, Clinton SK, Durazo-Arvizu RA, et al. IOM committee members respond to Endocrine Society vitamin D guideline. *J Clin Endocrinol Metab*. 2012;97(4):1146-52.
185. Gómez de Tejada Romero MJ, Sosa Henríquez M, Del Pino Montes J, Jódar Gimeno E, Quedasa Gómez JM, Cancelo Hidalgo MJ, et al. Documento de posición sobre las necesidades y niveles óptimos de vitamina D. *Rev Osteoporos Metab Miner*. 2011;3(1):53-64.
186. Giustina A, Bouillon R, Binkley N, et al. Controversies in Vitamin D: A Statement From the Third International Conference. *JBMR Plus*. 2020;4(12):e10417.
187. Lips P, Cashman KD, Lamberg-Allardt C, Bischoff-Ferrari HA, Obermayer-Pietsch B, Biancho ML et al. Current vitamin D status in European and Middle East countries and strategies to prevent vitamin D deficiency: a position statement of the European Calcified Tissue Society. *Eur J Endocrinol*. 2019;180(4):P23-P54.
188. Arabi A, El Rassi R, El-Hajj Fuleihan G. Hypovitaminosis D in developing countries-prevalence risk factors and outcomes. *Nat Rev Endocrinol*. 2010;6(10):550-61.
189. Mithal A, Wahl DA, Bonjour JP, Burckhardt P, Dawson-Hughes B, Eisman JA, et al. Global vitamin D status and determinants of hipovitaminosis D. [published correction appears in *Osteoporos Int*. 2009 Nov;20(11):1821]. *Osteoporos Int*. 2009;20(11):1807-20.
190. Hilger J, Friedel A, Herr R, Rausch T, Roos F, Wahl DA, et al. A systematic review of vitamin D status in populations worldwide. *Br J Nutr*. 2014;111(1):23-45.
191. Bouillon R. Comparative analysis of nutritional guidelines for vitamin D. *Nat Rev Endocrinol*. 2017;13(8):466-79.
192. Binkley N, Dawson-Hughes B, Durazo-Arvizu R, Thamm M, Tian L, Merkel JM, et al. Vitamin D measurement standardization: The way out of the chaos. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2017;173:117-21.
193. Bikle DD, Gee E, Halloran B, Kowalski MA, Ryzen E, Haddad JG. Assessment of the free fraction of 25-hydroxyvitamin D in serum and its regulation by albumin and the vitamin D-binding protein. *J Clin Endocrinol Metab*. 1986;63(4):954-59.
194. Bikle D, Bouillon R, Thadhani R, Schoenmakers I. Vitamin D metabolites in captivity? Should we measure free or total 25(OH)D to assess vitamin D status? *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2017;173:105-16.
195. Schwartz JB, Lai J, Lizaola B, Kane L, Weyland P, Terrault NA, et al. Variability in free 25(OH) vitamin D levels in clinical populations. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2014;144 Pt A:156-8.

196. Weinstein SJ, Stolzenberg-Solomon RZ, Kopp W, Rager H, Virtamo J, Albanes D. Impact of circulating vitamin D binding protein levels on the association between 25-hydroxyvitamin D and pancreatic cancer risk: a nested case-control study. *Cancer Res.* 2012;72(5):1190-8.
197. Heures N, Lindhout E, Swinkels L. A Direct Assay for Measuring Free 25-Hydroxyvitamin D. *J AOAC Int.* 2017;100(5):1318-22.
198. Schwartz JB, Lai J, Lizaola B, Kane L, Markova S, Weyland P, et al. A comparison of measured and calculated free 25(OH) vitamin D levels in clinical populations. *J Clin Endocrinol Metab.* 2014;99(5):1631-7.
199. Bikle DD, Schwartz J. Vitamin D binding protein, total and free vitamin D levels in different physiological and pathophysiological conditions. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2019;10:317.
200. Rook GA, Steele J, Fraher L, Barker S, Karmali R, O'Riordan J et al. Vitamin D3, gamma interferon, and control of proliferation of *Mycobacterium tuberculosis* by human monocytes. *Immunology* 1986;57(1):159-63.
201. Medzhitov R. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature* 2007;449(7164):819-26.
202. Adams JS, Hewison M. Unexpected actions of vitamin D: New perspectives on the regulation of innate and adaptive immunity. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab.* 2008;4(2):80-90.
203. Sadegui K, Wessner B, Laggner U, Ploder M, Tamandl D, Friedl J, et al. Vitamin D3 down-regulates monocyte TLR expression and triggers hyporesponsiveness to pathogen-associated molecular patterns. *Eur J Immunol.* 2006;36(2):361-70.
204. Wang TT, Nestel FP, Bourdeay V, Nagai Y, Wang Q, Liao J et al. Cutting edge: 1,25-dihydroxyvitamin D3 is a direct inducer of antimicrobial peptide gene expression. *J Immunol.* 2004;173(5):2909-12.
205. Liu PT, Stenger S, Hi H, Wenzel L, Tan B, Krutzik SR et al. Toll-like receptor triggering of a vitamin D-mediated human antimicrobial response. *Science.* 2006;311(5768):1770-3.
206. Weber G, Heilborn JD, Chamorro Jiménez CI, Hammarsjö A, Törma H, Stahle M. Vitamin D induces the antimicrobial protein hCAP 18 in human skin. *J Invest Dermatol.* 2005;124(5):1080-2.
207. Yim S, Dhawan P, Rangunath C, Christakos S, Diamond G. Induction of cathelicidin in normal and CF bronchial epithelial cells by 1,25-dihydroxyvitamin D(3). *J Cyst Fibros.* 2007;30(6):403-10.
208. Amado CA, García-Unzueta MT, Fariñas MC, Santos F, Ortiz M, Muñoz-Cacho P, et al. Vitamin D nutritional status and vitamin D regulated antimicrobial peptides in serum and pleural fluid of patients with infectious and noninfectious pleural effusions. *BMC Pulm Med.* 2016;16(1):99.
209. Gombart AF, Borregaard N, Koeffler HP. Human cathelicidin antimicrobial peptide (CAMP) gene is a direct target of the vitamin D receptor and is strongly up-regulated in myeloid cells by 1,25-dihydroxyvitamin D3. *FASEB J.* 2005;19(9):1067-77.
210. Buchau AS, Morizane S, Trowbridge J, Schaubert J, Kotol P, Bui JD, et al. The host defense peptide cathelicidin is required for NK cell-mediated suppression of tumor growth. *J Immunol.* 2010;184(1):369-78.

211. Fabri M, Stenger S, Shin DM, Yuk JM, Liu PT, Realegeno S, et al. Vitamin D is required for IFN- γ -mediated antimicrobial activity of human macrophages. *Sci Transl Med*. 2011;3(104):104ra102.
212. Yuk JM, Shin DM, Lee HM, Yang CS, Jin HS, Kim KK, et al. Vitamin D3 induces autophagy in human monocytes/macrophages via cathelicidin. *Cell Host Microbe*. 2009;6(3):231–43.
213. Liu PT, Schenk M, Walker VP, Dempsey PW, Kanchanapoomi M, Whellwright M, et al. Convergence of IL-1 β and VDR activation pathways in human TLR2/1-induced antimicrobial responses. *PLoS One*. 2009;4(6):e5810.
214. Castañeda-Delgado JE, Araujo Z, Gonzalez-Curiel I, Serrano CJ, Rivas Santiago C, Enciso-Moreno JA, et al. Vitamin D and L-Isoleucine Promote Antimicrobial Peptide hBD-2 Production in Peripheral Blood Mononuclear Cells from Elderly Individuals. *Int J Vitam Nutr Res*. 2016;86(1-2):56-61.
215. Georgieva V, Kamolvit W, Herthelius M, Lühje P, Brauner A, Chromek M. Association between vitamin D, antimicrobial peptides and urinary tract infection in infants and young children. *Acta Paediatr*. 2019;108(3):551-6.
216. Kamen DL, Tangpricha V. Vitamin D and molecular actions on the immune system: Modulation of innate and autoimmunity. *J. Mol. Med (Berl.)* 2010;88(5):441–50.
217. Lim WC, Hanauer SB, Li YC. Mechanisms of disease: Vitamin D and inflammatory bowel disease. *Nat Clin Pract Gastroenterol. Hepatol*. 2005;2(7):308–15.
218. Waterhouse M, Hope B, Krause L, et al. Vitamin D and the gut microbiome: a systematic review of in vivo studies. *Eur J Nutr*. 2019;58(7):2895-910.
219. Akimbekov NS, Digel I, Sherelkhan DK, Lutfor AB, Razzaque MS. Vitamin D and the Host-Gut Microbiome: A Brief Overview. *Acta Histochem Cytochem*. 2020;53(3):33-42.
220. Prietl B, Treiber G, Pieber TR, Amrein K. Vitamin D and immune function. *Nutrients*. 2013;5(7):2502-21.
221. Hewison M. An update on vitamin D and human immunity. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2012;76(3):315-25.
222. Lemire JM, Adams JS, Kermarini-Arab V, Bakle AC, Sakai R, Jordan SC. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 suppresses human T helper/inducer lymphocyte activity in vitro. *J Immunol*. 1985;134(5):3032-35.
223. Lemire JM., Archer DC, Beck L., Spiegelberg HL. Immunosuppressive actions of 1,25-dihydroxyvitamin D3: Preferential inhibition of TH1 functions. *J Nutr*. 1995;125(6 Suppl):1704S–8S.
224. Van Belle TL, Gysemans C, Mathieu C. Vitamin D in autoimmune, infectious and allergic diseases: A vital player? *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2011;25(4):617–32.
225. Palmer MT, Lee YK, Maynard CL, Oliver JR, Bikle DD, Jetten AM et al. Lineage-specific effects of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on the development of effector CD4 T cells. *J Biol Chem*. 2011;286(2):997–1004.
226. Penna G, Adorini L. 1 α ,25-dihydroxyvitamin D3 inhibits differentiation, maturation, activation, and survival of dendritic cells leading to impaired alloreactive T cell activation. *J Immunol*. 2000;164(5):2405–11.

227. Etten EV, Mathieu C. Immunoregulation by 1,25-dihydroxyvitamin D₃: Basic concepts. *J Steroid Biochem Mol. Biol.* 2005;97(1-2):93–101.
228. Joshi S, Pantalena L, Liu XK, Sarah L, Liu H, Rohowsky-Kochan C, et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ ameliorates Th17 autoimmunity via transcriptional modulation of interleukin-17A. *Mol Cell Biol.* 2011;31(17):3653–69.
229. Vangerwegen AS, Gysemans C, Mathieu C. Vitamin D endocrinology on the cross-road between immunity and metabolism. *Mol Cel Endocrinol.* 2017;453:52-67.
230. Zhang Y, Bandala-Sánchez E, Harrison LC. Revisiting regulatory T cells in type 1 diabetes. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* 2013;19(4):271-8.
231. Hawrylowicz CM. Regulatory T cells and IL-10 in allergic inflammation. *J Exp Med.* 2005;202(11):1459-63.
232. Bouillon R, Marcocci C, Carmeliet G, Bikle D, White JH, Dawson-Hughes B, et al. Skeletal and Extraskelatal Actions of Vitamin D: Current Evidence and Outstanding Questions. *Endocr Rev.* 2019;40(4):1109-51.
233. Sassi F, Tamone C, D'Amelio P. Vitamin D: Nutrient, Hormone, and Immunomodulator. *Nutrients.* 2018;10(11):1656.
234. Amado CA, García-Unzueta MT, Fariñas MC, Amado JA. Calcitriol-modulated human antibiotics: New pathophysiological aspects of vitamin D. *Endocrinol Nutr.* 2016;63(2):87-94.
235. Jarczak J, Kosciuczuk EM, Lisowski P, Strzalkowska N, Jóźwik A, Horbanczuk J, et al. Defensins: Natural component of human innate immunity. *Hum Immun.* 2013;74(9):1069-79.
236. Pinheiro da Silva F, Machado MC. Antimicrobial peptides: Clinical relevance and therapeutic implications. *Peptides.* 2012;36(2):308-14.
237. Agier J, Efenberger M, Brzezinska-Blaszczyk E. Cathelicidin impact on inflammatory cells. *Cent Eur J Immunol.* 2015;40(2):225-35.
238. Vandamme D, Landuyt B, Luyten W, Schoofs L. A comprehensive summary of LL-37, the factotum human cathelicidin peptide. *Cell Immunol.* 2012;280(1):22-35.
239. Leaf DE, Waikar SS, Wolf M, Cremers S, Bhan I, Stern L. Dysregulated mineral metabolism in patients with acute kidney injury and risk of adverse outcomes. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2013;79(4):491-8.
240. Leaf DE, Siew ED, Eisenga MF, Singh K, Mc Causland FR, Srivastava A, et al. Fibroblast Growth Factor 23 Associates with Death in Critically Ill Patients. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2018;13(4):531-41.
241. Nair P, Lee P, Reynolds C, Nguyen ND, Myburgh J, Eisman JA, et al. Significant perturbation of vitamin D-parathyroid-calcium axis and adverse clinical outcomes in critically ill patients. *Intensive Care Med.* 2013;39(2):267-74.
242. Hu J, Luo Z, Zhao X, Chen Q, Chen Z, Qin H, et al. Changes in the calcium-parathyroid hormone-vitamin d axis and prognosis for critically ill patients: a prospective observational study. *PLoS One.* 2013;8(9):e75441.
243. Ardehali SH, Dehghan S, Baghestani AR, Velayati A, Vahdat Shariatpanahi Z. Association of admission serum levels of vitamin D, calcium, phosphate, magnesium and parathormone with clinical outcomes in neurosurgical ICU patients. *Sci Rep.* 2018;8(1):2965.

244. Holick MF. Vitamin D: extraskeletal health. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2010;39(2):381-400.
245. Hossein-nezhad A, Holick MF. Vitamin D for health: a global perspective. *Mayo Clin Proc.* 2013;88(7):720-55.
246. Charoenngam N, Holick MF. Immunologic Effects of Vitamin D on Human Health and Disease. *Nutrients.* 2020;12(7):2097.
247. Jeng L, Yamschchikov AV, Judd SE, Blumberg HM, Martin GS, Ziegler TR, et al. Alterations in vitamin D status and anti-microbial peptide levels in patients in the intensive care unit with sepsis. *J Transl Med.* 2009;7:28.
248. Lee P, Eisman JA, Center JR. Vitamin D deficiency in critically ill patients. *N Eng J Med.* 2009;360(18):1912-4.
249. Lucidarme O, Messal E, Mazzoni T, Arcade M, du Cheyron D. Incidence and risk factors of vitamin D deficiency in critically ill patients: results from a prospective observational study. *Intensive Care Med.* 2010;36(9):1609-11.
250. Parekh D, Patel JM, Scott A, Lax S, Dancer RC, D'Souza V, et al. Vitamin D deficiency in human and murine sepsis. *Crit Care Med.* 2017;45(2):282-9.
251. Greulich T, Regner W, Branscheidt M, Herr C, Koczulla AR, Volgelmeier CF et al. Altered blood level of vitamin D, cathelicidin and parathyroid hormone in patients with sepsis-a pilot study. *Anaesth Intensive Care.* 2017;45(1):36-45.
252. Braun A, Chang D, Mahadevappa K, Gibbons FK, Liu Y. Association of low serum 25-hydroxivitamin D levels and mortality in the critically ill. *Crit Care Med.* 2011;39(4):671-7.
253. Venkatram S, Chilimuri S, Adrish M, Salako A, Patel M, Díaz-Fuentes G. Vitamin D deficiency is associated with mortality in the medical intensive care unit. *Crit Care.* 2011;15(6):R292.
254. Braun AB, Gibbons FK, Litonjua AA, Giovanucci E, Christopher KB. Low serum 25-hydroxivitamin D at critical care initiation is associated with increased mortality. *Crit Care Med.* 2012;40(1):63-72.
255. Braun AB, Litonjua AA, Moromizato T, Gibbons FK, Giovanucci E, Christopher KB. Association of low serum 25-hydroxivitamin D levels and acute kidney injury in the critically ill. *Inflamm Allergy Drug Targets.* 2013;12(4):262-72.
256. Thickett DR, Moromizato T, Litonjua AA, Amrein K, Quraishi SA, Lee-Sarwar KA, et al. Association between prehospital vitamin D status and incident acute respiratory failure in critically ill patients: a retrospective cohort study. *BMJ Open Respir Res.* 2015;2(1):e000074.
257. Moromizato T, Litonjua AA, Braun AB, Gibbons FK, Gibbons FK, Giovannucci E, et al. Association of low serum 25-hydroxivitamin D levels and sepsis in the critically ill. *Crit Care Med.* 2014;42(1):97-107.
258. Amrein K, Zajic P, Schnedl C, Waltensdorfer A, Fruhwald S, Holl A, et al. Vitamin D status and its association with season, hospital and sepsis mortality in critical illness. *Crit Care.* 2014;18(2):R47.
259. Rech MA, Hunsaker T, Rodríguez J. Deficiency in 25-hydroxyvitamin D and 30-day mortality in patients with severe sepsis and septic shock. *Am J Crit Care.* 2014;23(5):e72-9.
260. de Haan K, Broeneveld AB, de Geus HR, Egal M, Struijs A. Vitamin D deficiency as a

- risk factor for infection, sepsis and mortality in the critically ill: systematic review and meta-analysis. *Crit Care* 2014;18(6):660.
261. Upala S, Sanguankeo A, Permpalung N. Significant association between vitamin D and sepsis: a systematic review and meta-analysis. *BMC Anesthesiol.* 2015;15:84.
262. Gois PHF, Ferreira D, Olenski S, Seguro AC. Vitamin D and infectious diseases. Simple bystander or contributing factor? *Nutrients.* 2017;9(7):651.
263. Ratzinger F, Haslacher H, Stadlberger M, Schmidt RLJ, Obermüller M, Schmetterer KG, et al. 25(OH) D and 1,25(OH) D vitamin D fails to predict sepsis and mortality in a prospective cohort study. *Sci Rep.* 2017;7:40646.
264. Aygencel G, Turkoglu M, Tuncel AF, Candir BA, Bildaci YD, Pasaoglu H. Is vitamin d insufficiency associated with mortality of critically ill patients? *Crit Care Res Pract.* 2013;2013:856747.
265. Barnett N, Zhao Z, Koyama T, Janz DR, Wang CH, May AK, et al. Vitamin D deficiency and risk of acute lung injury in severe sepsis and severe trauma: a case-control study. *Ann Intensive Care.* 2014;4(1):5.
266. Cecchi A, Bonizzoli M, Douar S, Mangini M, Paladini S, Gazzini B, et al. Vitamin D deficiency in septic patients at ICU admission is not a mortality predictor. *Minerva Anesthesiol.* 2011;77(12):1184-9.
267. Ala-Kokko TI, Mutt SJ, Nisula SJ, Koskenkari J, Liisanantti J, Ohtonen P, et al. Vitamin D deficiency at admission is not associated with 90-day mortality in patients with severe sepsis or septic shock: Observational FINNAKI cohort study. *Ann Med.* 2016;48(1-2):67-75.
268. Barbeiro DF, Barbeiro HV, Zampieri FG, César MC, Torggler FF, Gomes DM, et al. Cathelicidin LL-37 bloodstream surveillance is down regulated during septic shock. *Microbes Infect.* 2013;15(5): 342-6.
269. Leaf DE, Croy HE, Abrahams SJ, Raed A, Walkar SS. Cathelicidin antimicrobial protein, vitamin D, and risk of death in critically ill patients. *Crit Care.* 2015;19(1):80.
270. Pinheiro da Silva F. The dual role of cathelicidins in systemic inflammation. *Immunol Lett.* 2017;182:57-60.
271. Garlanda C, Bottazzi B, Bastone A, Mantovani A. Pentraxins at the crossroads between innate immunity, inflammation, matrix deposition, and female fertility. *Annu Rev Immunol.* 2005;23:337–66.
272. Goodman AR, Cardozo T, Abagyan R, Altmeyer A, Wisniewski HG, Vilcek J. Long pentraxins: an emerging group of proteins with diverse functions. *Cytokine Growth Factor Rev.* 1996;7(2):191-202.
273. Bottazzi B, Doni A, Garlanda C, Mantovani A. An integrated view of humoral innate immunity: pentraxins as a paradigm. *Annu Rev Immunol.* 2010;28:157-183.
274. Breviario F, d'Aniello EM, Golay J, Peri G, Botazzi B, Bairoch A, et al. Interleukin-1-inducible genes in endothelial cells. Cloning of a new gene related to C-reactive protein and serum amyloid P component. *J Biol Chem.* 1992;267(31):22190-7.
275. Lee GW, Lee TH, Vilcek J. 1993. TSG-14, a tumor necrosis factor- and IL-1 inducible protein, is a novel member of the pentaxin family of acute phase proteins. *J Immunol.*

1993;150(5):1804–12.

276. Moalli F, Jaillon S, Inforzato A, Sironi M, Botazzi B, Mantovani A, et al. Pathogen recognition by the long pentraxin PTX3. *J Biomed Biotechnol.* 2011;2011:830421.
277. Doni A, Peri G, Chieppa M, Allavena P, Pasqualini F, Vago L, et al. Production of the soluble pattern recognition receptor PTX3 by myeloid, but not plasmacytoid, dendritic cells. *Eur J Immunol.* 2003;33(10):2886–93.
278. Woo JM, Kwon MY, Shin DY, Kang YH, Hwang N, Chung SW. Human retinal pigment epithelial cells express the long pentraxin PTX3. *Mol Vis.* 2013;19:303–10.
279. Jaillon S, Peri G, Delneste Y, Frémaux I, Doni A, Moalli F, et al. The humoral pattern recognition receptor PTX3 is stored in neutrophil granules and localizes in extracellular traps. *J Exp Med.* 2007;204(4):793–804.
280. Ketter P, Yu JJ, Cap AP, Forsthuber T, Arulanandam B. Pentraxin 3: an immune modulator of infection and useful marker for disease severity assessment in sepsis. *Expert Rev Clin Immunol.* 2016;12(5):501–7.
281. Moalli F, Doni A, Deban L, Zelante T, Zagarella S, Bottazzi B, et al. Role of complement and Fc{gamma} receptors in the protective activity of the long pentraxin PTX3 against *Aspergillus fumigatus*. *Blood.* 2010;116(24):5170–80.
282. Daigo K, Takamatsu Y, Hamakubo T. The Protective Effect against Extracellular Histones Afforded by Long-Pentraxin PTX3 as a Regulator of NETs. *Front Immunol.* 2016;7:344.
283. Doni A, Garlanda C, Mantovani A. Innate immunity, hemostasis and matrix remodeling: PTX3 as a link. *Semin Immunol.* 2016;28(6):570–7.
284. Razvina O, Jiang S, Matsubara K, Ohashi R, Hasegawa G, Aoyama T, et al. Differential expression of pentraxin 3 in neutrophils. *Exp Mol Pathol.* 2015;98(1):33–40.
285. Daigo K, Yamaguchi N, Kawamura T, Matsubara K, Jiang S, Ohashi R, et al. The proteomic profile of circulating pentraxin 3 (PTX3) complex in sepsis demonstrates the interaction with azurocidin 1 and other components of neutrophil extracellular traps. *Mol Cell Proteomics.* 2012;11(6):M111.015073.
286. McDonald B, Urrutia R, Yipp BG, Jenne CN, Kubes P. Intravascular neutrophil extracellular traps capture bacteria from the bloodstream during sepsis. *Cell Host Microbe.* 2012;12(3):324–33.
287. Kaplan MJ, Radic M. Neutrophil extracellular traps: double-edged swords of innate immunity. *J Immunol.* 2012;189(6):2689–95.
288. Camicia G, Pozner R, de Larrañaga G. Neutrophil extracellular traps in sepsis. *Shock.* 2014;42(4):286–94.
289. Yamasaki K, Kurimura M, Kasai T, Sagara M, Kodama T, Inoue K. Determination of physiological plasma pentraxin 3 (PTX3) levels in healthy populations. *Clin Chem Lab Med.* 2009;47(4):471–7.
290. Deban L, Jaillon S, Garlanda C, Bottazzi B, Mantovani A. Pentraxins in innate immunity: lessons from PTX3. *Cell Tissue Res.* 2011;343(1):237–49.
291. Magrini E, Mantovani A, Garlanda C. The Dual Complexity of PTX3 in Health and Disease: A Balancing Act? *Trends Mol Med.* 2016;22(6):497–510.

292. Ketter PM, Guentzel MN, Schaffer B, Herzig M, Wu X, Montgomery RK, et al. Severe *Acinetobacter baumannii* sepsis is associated with elevation of pentraxin 3. *Infect Immun*. 2014;82(9):3910-8.
293. Deban L, Bottazzi B, Garlanda C, de la Torre YM, Mantovani A. Pentraxins: multifunctional proteins at the interface of innate immunity and inflammation. *Biofactors*. 2009;35(2):138-45.
294. Alles VV, Bottazzi B, Peri G, Golay J, Introna M, Mantovani A. Inducible expression of PTX3, a new member of the pentraxin family, in human mononuclear phagocytes. *Blood*. 1994;84(10):3483-93.
295. Lee YT, Gong M, Chau A, Wong WT, Bazoukis G, Wong SH, et al. Pentraxin-3 as a marker of sepsis severity and predictor of mortality outcomes: A systematic review and meta-analysis. *J Infect*. 2018;76(1):1-10.
296. Liu S, Qu X, Liu F, Wang C. Pentraxin 3 as a prognostic biomarker in patients with systemic inflammation or infection. *Mediators Inflamm*. 2014;2014:421429.
297. Caironi P, Masson S, Mauri T, Bottazzi B, Leone R, Magnoli M, et al. Pentraxin 3 in patients with severe sepsis or shock: the ALBIOS trial. *Eur J Clin Invest*. 2017;47(1):73-83.
298. Hu C, Zhou Y, Liu C, Kang Y. Pentraxin-3, procalcitonin and lactate as prognostic markers in patients with sepsis and septic shock. *Oncotarget*. 2017;9(4):5125-36.
299. Albert Vega C, Mommert M, Boccard M, Rimmelé T, Venet F, Pachot A, et al. Source of Circulating Pentraxin 3 in Septic Shock Patients. *Front Immunol*. 2019;9:3048.
300. Napoleone E, di Santo A, Bastone A, Peri G, Mantovani A, de Gaetano G, et al. Long pentraxin PTX3 upregulates tissue factor expression in human endothelial cells: a novel link between vascular inflammation and clotting activation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2002;22(5):782-7.
301. Napoleone E, di Santo A, Peri G, Mantovani A, de Gaetano G, Donati MB, et al. The long pentraxin PTX3 up-regulates tissue factor in activated monocytes: another link between inflammation and clotting activation. *J Leukoc Biol*. 2004;76(1):203-9.
302. Hamed S, Behnes M, Pauly D, Lepiorz D, Barre M, Becher T, et al. Diagnostic value of Pentraxin-3 in patients with sepsis and septic shock in accordance with latest sepsis-3 definitions. *BMC Infect Dis*. 2017;17(1):554.
303. Porte R, Davoudian S, Asgari F, Parent R, Mantovani A, Garlanda C et al. The long pentraxin PTX3 as a humoral innate immunity functional player and biomarker of infections and sepsis. *Front. Immunol*. 2019;10:794.
304. R Core Team (2018). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Disponible en: <https://www.Rproject.org/>.
305. Therneau T (2015). A Package for Survival Analysis in R. R package version 2.38. Disponible en: <https://CRAN.R-project.org/package=survival>.
306. Terry M. Therneau, Patricia M. Grambsch. Modeling Survival Data: Extending the Cox Model. New York: Springer; 2000. ISBN 0-387-98784-3.
307. Cashman KD, Dowling KG, Škrabáková Z, Gonzalez-Gross M, Valtueña J, De Henauw S, et al. Vitamin D deficiency in Europe: pandemic?. *Am J Clin Nutr*. 2016;103(4):1033-44.
308. Cashman KD, Sheehy T, O'Neill CM. Is vitamin D deficiency a public health concern for

- low middle income countries? A systematic literature review. *Eur J Nutr.* 2019;58(1):433-53.
309. Schleicher RL, Sternberg MR, Lacher DA, Sempos CT, Looker AC, Durazo-Arvizu RA, et al. The vitamin D status of the US population from 1988 to 2010 using standardized serum concentrations of 25-hydroxyvitamin D shows recent modest increases. *Am J Clin Nutr.* 2016;104(2):454-61.
310. Sarafin K, Durazo-Arvizu R, Tian L, Phinney KW, Tai S, Camara JE, et al. Standardizing 25-hydroxyvitamin D values from the Canadian Health Measures Survey. *Am J Clin Nutr.* 2015;102(5):1044-50.
311. Cashman KD. Vitamin D Deficiency: Defining, Prevalence, Causes, and Strategies of Addressing. *Calcif Tissue Int.* 2020;106(1):14-29.
312. Amrein K, Scherkl M, Hoffmann M, Neuwersch-Sommeregger S, Köstenberger M, Tmava Berisha A, et al. Vitamin D deficiency 2.0: an update on the current status worldwide. *Eur J Clin Nutr.* 2020;74(11):1498-513.
313. van Schoor N, Lips P. Global Overview of Vitamin D Status. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2017;46(4):845-80.
314. Navarro Valverde C, Quesada Gómez JM. Deficiencia de vitamina D en España: ¿realidad o mito? *Rev Osteoporos Metab Miner [Internet].* 2014 Mar [citado 2021 mayo 03]; 6(Suppl 1):5-10.
315. McKinney JD, Bailey BA, Garrett LH, Peiris P, Manning T, Peiris AN. Relationship between vitamin D status and ICU outcomes in veterans. *J Am Med Dir Assoc.* 2011;12(3):208-11.
316. Mata-Granados JM, Vargas-Vasserot J, Ferreira-Vera C, Luque de Castro MD, Pavón RG, Quesada Gómez JM. Evaluation of vitamin D endocrine system (VDES) status and response to treatment of patients in intensive care units (ICUs) using an on-line SPE-LC-MS/MS method. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2010;121(1-2):452-5.
317. Trongtrakul K, Feemuchang C. Prevalence and association of vitamin D deficiency and mortality in patients with severe sepsis. *Int J Gen Med.* 2017;10:415-421.
318. Shojaei M, Sabzeghabaei A, Valaei Barhagh H, Soltani S. The Correlation between Serum Level of Vitamin D and Outcome of Sepsis Patients; a Cross-Sectional Study. *Arch Acad Emerg Med.* 2019;7(1):e1.
319. Hernández JL, Nan D, Fernandez-Ayala M, García-Unzueta M, Hernández-Hernández MA, López-Hoyos M, et al. Vitamin D Status in Hospitalized Patients with SARS-CoV-2 Infection. *J Clin Endocrinol Metab.* 2021;106(3):e1343-53.
320. Olmos JM, Hernández JL, García-Velasco P, Martínez J, Llorca J, González-Macías J. Serum 25-hydroxyvitamin D, parathyroid hormone, calcium intake, and bone mineral density in Spanish adults. *Osteoporos Int.* 2016;27(1):105-13.
321. Garg U. 25-Hydroxyvitamin D Testing: Immunoassays Versus Tandem Mass Spectrometry. *Clin Lab Med.* 2018;38(3):439-53.
322. Denimal D, Ducros V, Dupré T, Dousset B, Meunier C, Aho S, et al. Agreement of seven 25-hydroxy vitamin D₃ immunoassays and three high performance liquid chromatography methods with liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Clin Chem Lab Med.* 2014;52(4):511-20.

323. Farrell CJ, Herrmann M. Determination of vitamin D and its metabolites. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2013;27(5):675-88.
324. Danai PA, Sinha S, Moss M, Haber MJ, Martin GS. Seasonal variation in the epidemiology of sepsis. *Crit Care Med.* 2007;35(2):410-5.
325. Oleröd G, Hultén LM, Hammarsten O, Klingberg E. The variation in free 25-hydroxy vitamin D and vitamin D-binding protein with season and vitamin D status. *Endocr Connect.* 2017;6(2):111-20.
326. Bouillon R, Van Assche FA, Van Baelen H, Heyns W, De Moor P. Influence of the vitamin D-binding protein on the serum concentration of 1,25-dihydroxyvitamin D₃. Significance of the free 1,25-dihydroxyvitamin D₃ concentration. *J Clin Invest.* 1981;67(3):589-96.
327. Durazo-Arvizu RA, Dawson-Hughes B, Sempos CT, Yetley EA, Looker AC, Cao G, et al. Three-phase model harmonizes estimates of the maximal suppression of parathyroid hormone by 25-hydroxyvitamin D in persons 65 years of age and older. *J Nutr.* 2010;140(3):595-9.
328. Saliba W, Barnett O, Rennert HS, Lavi I, Rennert G. The relationship between serum 25(OH)D and parathyroid hormone levels. *Am J Med.* 2011;124(12):1165-70.
329. Sai AJ, Walters RW, Fang X, Gallagher JC. Relationship between vitamin D, parathyroid hormone, and bone health. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011;96(3):E436-46.
330. Bouillon R, Van Schoor NM, Gielen E, Boonen S, Mathieu C, Vanderschueren D, Lips P. Optimal vitamin D status: a critical analysis on the basis of evidence-based medicine. *J Clin Endocrinol Metab.* 2013;98(8):E1283-304.
331. Chen Z, Luo Z, Zhao X, Chen Q, Hu J, Qin H, et al. Association of vitamin D status of septic patients in intensive care units with altered procalcitonin levels and mortality. *J Clin Endocrinol Metab.* 2015;100(2):516-23.
332. Fisher A, Srikusalanukul W, Davis M, Smith P. Hip fracture type: important role of parathyroid hormone (PTH) response to hypovitaminosis D. *Bone.* 2010;47(2):400-407.
333. Zagkotsis G, Markou M, Papanikolaou P, Sabanis N. Acute Respiratory Distress Syndrome Induced by Parathyroid Storm. *Cureus.* 2021;13(1):e12881.
334. Van den Berghe G, Van Roosbroeck D, Vanhove P, Wouters PJ, De Pourcq L, Bouillon R. Bone turnover in prolonged critical illness: effect of vitamin D. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003;88(10):4623-32.
335. Aberegg SK. Ionized Calcium in the ICU: Should It Be Measured and Corrected?. *Chest.* 2016;149(3):846-55.
336. Smith JD, Wilson S, Schneider HG. Misclassification of Calcium Status Based on Albumin-Adjusted Calcium: Studies in a Tertiary Hospital Setting. *Clin Chem.* 2018;64(12):1713-22.
337. Nielson CM, Jones KS, Bouillon R; Osteoporotic Fractures in Men (MrOS) Research Group, Chun RF, Jacobs J, et al. Role of Assay Type in Determining Free 25-Hydroxyvitamin D Levels in Diverse Populations. *N Engl J Med.* 2016;374(17):1695-96.
338. Sollid ST, Hutchinson MY, Berg V, et al. Effects of vitamin D binding protein phenotypes and vitamin D supplementation on serum total 25(OH)D and directly measured free

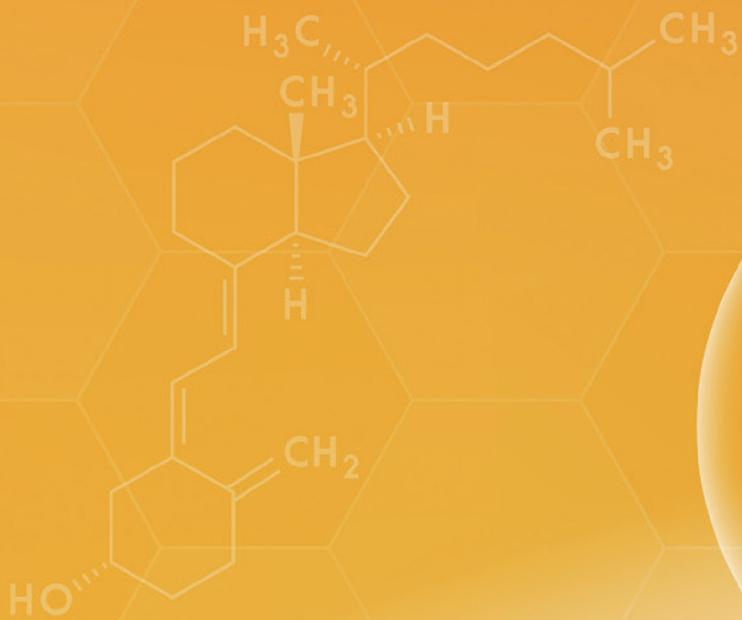
- 25(OH)D. *Eur J Endocrinol.* 2016;174(4):445-52.
339. Lee MJ, Kearns MD, Smith EM, et al. Free 25-Hydroxyvitamin D Concentrations in Cystic Fibrosis [published correction appears in *Am J Med Sci.* 2016 Feb;351(2):227]. *Am J Med Sci.* 2015;350(5):374-9.
340. Tuckey RC, Cheng CYS, Slominski AT. The serum vitamin D metabolome: What we know and what is still to discover. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2019;186:4-21.
341. Müller MJ, Volmer DA. Mass spectrometric profiling of vitamin D metabolites beyond 25-hydroxyvitamin D. *Clin Chem.* 2015;61(8):1033-48.
342. Vassiliou AG, Jahaj E, Mastora Z, Stagaki E, Orfanos SE, Kotanidou A. Serum Admission 25-Hydroxyvitamin D Levels and Outcomes in Initially Non-Septic Critically Ill Patients. *Shock.* 2018;50(5):511-8.
343. Gomes TL, Fernandes RC, Vieira LL, Schincaglia RM, Mota JF, Nóbrega MS, Pichard C, Pimentel GD. Low vitamin D at ICU admission is associated with cancer, infections, acute respiratory insufficiency, and liver failure. *Nutrition.* 2019;60:235-40.
344. Matthews LR, Ahmed Y, Wilson KL, Griggs DD, Danner OK. Worsening severity of vitamin D deficiency is associated with increased length of stay, surgical intensive care unit cost, and mortality rate in surgical intensive care unit patients. *Am J Surg.* 2012;204(1):37-43.
345. Amrein K, Schnedl C, Holl A, Riedl R, Christopher KB, Pachler C, et al. Effect of high-dose vitamin D3 on hospital length of stay in critically ill patients with vitamin D deficiency: the VITdAL-ICU randomized clinical trial [published correction appears in *JAMA.* 2014 Nov 12;312(18):1932]. *JAMA.* 2014;312(15):1520-30.
346. Confalonieri M, Salton F, Fabiano F. Acute respiratory distress syndrome. *Eur Respir Rev.* 2017;26(144):160116.
347. Quesada-Gomez JM, Entrenas-Castillo M, Bouillon R. Vitamin D receptor stimulation to reduce acute respiratory distress syndrome (ARDS) in patients with coronavirus SARS-CoV-2 infections: Revised Ms SBMB 2020_166. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2020;202:105719.
348. Dancer RC, Parekh D, Lax S, D'Souza V, Zheng S, Bassford CR, et al. Vitamin D deficiency contributes directly to the acute respiratory distress syndrome (ARDS). *Thorax.* 2015;70(7):617-24.
349. Yadav S, Joshi P, Dahiya U, Baidya DK, Goswami R, Guleria R, Lakshmy R. Admission Vitamin D status does not predict outcome of critically ill patients on mechanical ventilation: An observational pilot study. *Indian J Anaesth.* 2018;62(1):47-52.
350. Quraishi SA, McCarthy C, Blum L, Cobb JP, Camargo CA Jr. Plasma 25-Hydroxyvitamin D Levels at Initiation of Care and Duration of Mechanical Ventilation in Critically Ill Surgical Patients. *JPEN J Parenter Enteral Nutr.* 2016;40(2):273-8.
351. Dimeloe S, Hawrylowicz C. A direct role for vitamin D-binding protein in the pathogenesis of COPD?. *Thorax.* 2011;66(3):189-90.
352. Wood AM, Bassford C, Webster D, et al. Vitamin D-binding protein contributes to COPD by activation of alveolar macrophages. *Thorax.* 2011;66(3):205-10.
353. Chou EH, Mann S, Hsu TC, Hsu WT, Liu CC, Bhakta T, et al. Incidence, trends, and outcomes of infection sites among hospitalizations of sepsis: A nationwide study. *PLoS One.*

- 2020;15(1):e0227752.
354. Gunville CF, Mourani PM, Ginde AA. The role of vitamin D in prevention and treatment of infection. *Inflamm Allergy Drug Targets*. 2013;12(4):239-45.
355. Ingham T.R., Jones B., Camargo C.A., Kirman J., Dowell A.C., Crane J., Stanley T.V., Grimwood K., The Whiti Te Ra Study G. Association of vitamin D deficiency with severity of acute respiratory infection: A case-control study in New Zealand children. *Eur. Respir. J*. 2014;44:439.
356. Martineau A.R., Jolliffe D.A., Hooper R.L., Greenberg L., Aloia J.F., Bergman P., Dubnov-Raz G., Esposito S., Ganmaa D., Ginde A.A., et al. Vitamin D supplementation to prevent acute respiratory tract infections: Systematic review and meta-analysis of individual participant data. *BMJ*. 2017;356:i6583
357. Song J, Moon S, Park DW, Cho HJ, Kim JY, Park J, Cha JH. Biomarker combination and SOFA score for the prediction of mortality in sepsis and septic shock: A prospective observational study according to the Sepsis-3 definitions. *Medicine (Baltimore)*. 2020;99(22):e20495.
358. Mauri T, Bellani G, Patroniti N, Coppadoro A, Peri G, Cuccovillo I, et al. Persisting high levels of plasma pentraxin 3 over the first days after severe sepsis and septic shock onset are associated with mortality. *Intensive Care Med*. 2010;36(4):621-9.
359. Lee JH, Doo SR, Kim D, Park YK, Park EJ, Lee JM. Vitamin D deficiency and mortality among critically ill surgical patients in an urban Korean hospital [published online ahead of print, 2020 Feb 24]. *Int J Vitam Nutr Res*. 2020;1-8.
360. Higgins DM, Wischmeyer PE, Queensland KM, Sillau SH, Sufit AJ, Heyland DK. Relationship of vitamin D deficiency to clinical outcomes in critically ill patients. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*. 2012;36(6):713-20.
361. Quraishi SA, Bittner EA, Blum L, McCarthy CM, Bhan I, Camargo CA Jr. Prospective study of vitamin D status at initiation of care in critically ill surgical patients and risk of 90-day mortality. *Crit Care Med*. 2014;42(6):1365-71.
362. Yang B, Good D, Mosaib T, Liu W, Ni G, Kaur J, Liu X, Jessop C, Yang L, Fadhil R, Yi Z, Wei MQ. Significance of LL-37 on Immunomodulation and Disease Outcome. *Biomed Res Int*. 2020;2020:8349712.
363. Martin L, van Meegern A, Doemming S, Schuerholz T. Antimicrobial Peptides in Human Sepsis. *Front Immunol*. 2015;6:404.
364. Majewski K, Agier J, Kozłowska E, Brzezińska-Błaszczyk E. Status of cathelicidin IL-37, cytokine TNF, and vitamin D in patients with pulmonary tuberculosis. *J Biol Regul Homeost Agents*. 2018;32(2):321-5.
365. Majewski K, Agier J, Kozłowska E, Brzezińska-Błaszczyk E. Serum level of cathelicidin LL-37 in patients with active tuberculosis and other infectious diseases. *J Biol Regul Homeost Agents*. 2017;31(3):731-6.
366. Xie GH, Chen QX, Cheng BL, Fang XM. Defensins and sepsis. *Biomed Res Int*. 2014;2014:180109.
367. Berkestedt I, Herwald H, Ljunggren L, Nelson A, Bodelsson M. Elevated plasma levels of antimicrobial polypeptides in patients with severe sepsis. *J Innate Immun*. 2010;2(5):478-82.

368. Panyutich AV, Panyutich EA, Krapivin VA, Baturevich EA, Ganz T. Plasma defensin concentrations are elevated in patients with septicemia or bacterial meningitis. *J Lab Clin Med.* 1993;122(2):202-7.
369. Olbrich P, Pavón A, Rosso ML, Molinos A, de Felipe B, Sanchez B, et al. Association of human beta-defensin-2 serum levels and sepsis in preterm neonates*. *Pediatr Crit Care Med.* 2013;14(8):796-800.
370. Book M, Chen Q, Lehmann LE, Klaschik S, Weber S, Schewe JC, et al. Inducibility of the endogenous antibiotic peptide beta-defensin 2 is impaired in patients with severe sepsis. *Crit Care.* 2007;11(1):R19.
371. Kempker JA, Panwar B, Judd SE, Jenny NS, Wang HE, Gutiérrez OM. Plasma 25-Hydroxyvitamin D and the Longitudinal Risk of Sepsis in the REGARDS Cohort. *Clin Infect Dis.* 2019;68(11):1926-31.
372. Zhang Y, Fang F, Tang J, Jia L, Feng Y, Xu P, Faramand A. Association between vitamin D supplementation and mortality: systematic review and meta-analysis. *BMJ.* 2019;366:l4673.
373. Zhou W, Mao S, Wu L, Yu J. Association Between Vitamin D Status and Sepsis. *Clin Lab.* 2018;64(4):451-60.
374. Li Y, Ding S. Serum 25-Hydroxyvitamin D and the risk of mortality in adult patients with Sepsis: a meta-analysis. *BMC Infect Dis.* 2020;20(1):189.
375. Suberviola B, Lavín BA, Jiménez AF, Perez-San Martín S, García-Unzueta M, Santibañez M. *Enferm Infecc Microbiol Clin (Engl Ed).* 2019;37(4):239-43.
376. Nguyen HB, Eshete B, Lau KH, Sai A, Villarin M, Baylink D. Serum 1,25-dihydroxyvitamin D: an outcome prognosticator in human sepsis. *PLoS One.* 2013;8(5):e64348.
377. Langlois PL, Szwec C, D'Aragon F, Heyland DK, Manzanares W. Vitamin D supplementation in the critically ill: A systematic review and meta-analysis. *Clin Nutr.* 2018;37(4):1238-46.
378. Lan SH, Lai CC, Chang SP, Lu LC, Hung SH, Lin WT. Vitamin D supplementation and the outcomes of critically ill adult patients: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Sci Rep.* 2020;10(1):14261.
379. Peng L, Li L, Wang P, Chong W, Li Y, Zha X, et al. Association between Vitamin D supplementation and mortality in critically ill patients: A systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials. *PLoS One.* 2020;15(12):e0243768.
380. Yoo JW, Jung YK, Ju S, Lee SJ, Choo YJ, Jeong YY, et al. Serum vitamin D binding protein, but no serum total, bioavailable, free vitamin D, is higher in 30-days survivors than in nonsurvivors with sepsis. *Medicine (Baltimore).* 2020;99(25):e20756.
381. Zittermann A, Schleithoff SS, Frisch S, Götting C, Kuhn J, Koertke H, Kleesiek K, Tenderich G, Koerfer R. Circulating calcitriol concentrations and total mortality. *Clin Chem.* 2009;55(6):1163-70.
382. Leaf DE, Jacob KA, Srivastava A, Chen ME, Christov M, Jüppner H, Sabbisetti VS, Martin A, Wolf M, Waikar SS. Fibroblast Growth Factor 23 Levels Associate with AKI and Death in Critical Illness. *J Am Soc Nephrol.* 2017;28(6):1877-85.
383. Leaf DE, Wolf M, Waikar SS, et al. FGF-23 levels in patients with AKI and risk of adverse outcomes. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2012;7(8):1217-23.

384. Zhang M, Hsu R, Hsu CY, Kordesch K, Nicasio E, Cortez A, McAlpine I, Brady S, Zhuo H, Kangelaris KN, Stein J, Calfee CS, Liu KD. FGF-23 and PTH levels in patients with acute kidney injury: A cross-sectional case series study. *Ann Intensive Care*. 2011;1(1):21.
385. Fauconnier C, Roy T, Gillerot G, Roy C, Pouleur AC, Gruson D. FGF23: Clinical usefulness and analytical evolution. *Clin Biochem*. 2019;66:1–12.
386. Alford MA, Baquir B, Santana FL, Haney EF, Hancock REW. Cathelicidin host defense peptides and inflammatory signaling: Striking a balance. *Front Microbiol*. 2020;11:1902.
387. Leaf DE, Raed A, Donnino MW, Ginde AA, Waikar SS. Randomized controlled trial of calcitriol in severe sepsis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2014;190(5):533–41.
388. Dixon BM, Barker T, McKinnon T, Cuomo J, Frei B, Borregaard N, et al. Positive correlation between circulating cathelicidin antimicrobial peptide (hCAP18/LL-37) and 25-hydroxyvitamin D levels in healthy adults. *BMC Research Notes*. 2012;5:575.
389. Chun RF, Shieh A, Gottlieb C, Yacoubian V, Wang J, Hewison M, Adams JS. Vitamin D Binding Protein and the Biological Activity of Vitamin D. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2019;10:718.
390. Delanghe JR, Speeckaert R, Speeckaert MM. Behind the scenes of vitamin D binding protein: more than vitamin D binding. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2015;29(5):773–86.
391. Kew RR. The Vitamin D Binding Protein and Inflammatory Injury: A Mediator or Sentinel of Tissue Damage?. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2019;10:470.
392. Dahl B, Schiodt FV, Ott P, Wians F, Lee WM, Balko J, et al. Plasma concentration of Gc-globulin is associated with organ dysfunction and sepsis after injury. *Crit Care Med*. 2003;31(1):152–6.
393. Mantovani A, Garlanda C, Doni A, Bottazzi B. Pentraxins in innate immunity: from C-reactive protein to the long pentraxin PTX3. *J Clin Immunol*. 2008;28(1):1–13.
394. Muller B, Peri G, Doni A, et al. Circulating levels of the long pentraxin PTX3 correlate with severity of infection in critically ill patients. *Crit Care Med*. 2001;29(7):1404–7.
395. Deban L, Russo RC, Sironi M, Moalli F, Scanziani M, Zambelli V, et al. Regulation of leukocyte recruitment by the long pentraxin PTX3. *Nat Immunol*. 2010;11(4):328–34.
396. Perez-San Martin S, Suberviola B, Garcia-Unzueta MT, Lavin BA, Campos S, Santibañez M. Prognostic value of plasma pentraxin 3 levels in patients with septic shock admitted to intensive care. *PLoS One*. 2020;15(12):e0243849.
397. Patel PA, Grant BJ. Application of mortality prediction systems to individual intensive care units. *Intensive Care Med*. 1999;25:977–82.
398. Nassar AP Jr, Mocelin AO, Nunes AL, Giannini FP, Brauer L, Andrade FM, et al. Caution when using prognostic models: a prospective comparison of 3 recent prognostic models. *J Crit Care*. 2012;27(4):423.e1–7.
399. Salluh JI, Soares M. ICU severity of illness scores: APACHE, SAPS and MPM. *Curr Opin Crit Care*. 2014;20(5):557–565.
400. van Engelen TSR, Wiersinga WJ, Scicluna BP, van der Poll T. Biomarkers in Sepsis. *Crit Care Clin*. 2018;34:139–52.

401. Silvestre J, Póvoa P, Coelho L, Almeida E, Moreira P, Fernandes A et al. Is C-reactive protein a good prognostic marker in septic patients?. *Intensive Care Med.* 2009;35:909–13.
402. Kibe S, Adams K, Barlow G. Diagnostic and prognostic biomarkers of sepsis in critical care. *J Antimicrob Chemother.* 2011;66 Suppl2:ii33–40.
403. Liu D, Su L, Han G, Yan P, Xie L. Prognostic Value of Procalcitonin in Adult Patients with Sepsis: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS One.* 2015;10:e0129450
404. Arora S, Singh P, Singh PM, Trikha A. Procalcitonin Levels in Survivors and Nonsurvivors of Sepsis: Systematic Review and Meta-Analysis. *Shock.* 2015;43:212–21.
405. Becker KL, Snider R, Nylen ES. Procalcitonin assay in systemic inflammation, infection, and sepsis: clinical utility and limitations. *Crit Care Med.* 2008;36:941–52.
406. Schuetz P, Bretscher C, Bernasconi L, Mueller B. Overview of procalcitonin assays and procalcitonin-guided protocols for the management of patients with infections and sepsis. *Expert Rev Mol Diagn.* 2017;17:593–601.
407. Samsudin I, Vasikaran SD. Clinical Utility and Measurement of Procalcitonin. *Clin Biochem Rev.* 2017;38:59–68.
408. Bastrup-Birk S, Skjoedt MO, Munthe-Fog L, Strom JJ, Ma YJ, Garred P. Pentraxin-3 serum levels are associated with disease severity and mortality in patients with systemic inflammatory response syndrome. *PLoS One.* 2013;8:e73119.
409. Uusitalo-Seppala R, Huttunen R, Aittoniemi J, Koskinen P, Leino A, Vahlberg T, et al. Pentraxin 3 (PTX3) is associated with severe sepsis and fatal disease in emergency room patients with suspected infection: a prospective cohort study. *PLoS One.* 2013;8:e53661
410. Kim SB, Lee KH, Lee JU, Ann HW, Ahn JY, Jeon YD, et al. Long Pentraxin 3 as a predictive marker of mortality in severe septic patients who received successful early goal-directed therapy. *Yonsei Med J.* 2017;58:370–9.
411. Jie H, Li Y, Pu X, Ye J. Pentraxin 3, a Predictor for 28-Day Mortality in Patients With Septic Shock. *Am J Med Sci.* 2017;353:242–6.
412. Hamed S, Behnes M, Pauly D, Lepiorz D, Barre M, Becher T, et al. Pentraxin-3 Predicts Short- and mid-term mortality in patients with sepsis and septic shock during intensive care treatment. *Clin Lab.* 2018;64:999–1011.
413. Song J, Park DW, Moon S, Cho HJ, Park JH, Seok H, et al. Diagnostic and prognostic value of interleukin-6, pentraxin 3, and procalcitonin levels among sepsis and septic shock patients: a prospective controlled study according to the Sepsis-3 definitions. *BMC Infect Dis.* 2019;19:968.
414. Mellenthin L, Wallaschofski H, Grotevendt A, Völzke H, Nauck M, Hannemann A. Association between serum vitamin D concentrations and inflammatory markers in the general adult population. *Metabolism.* 2014;63(8):1056–62.
415. Quan H, Li B, Couris CM, Fushimi K, Graham P, Hider P, et al. Updating and validating the Charlson comorbidity index and score for risk adjustment in hospital discharge abstracts using data from 6 countries. *Am J Epidemiol.* 2011;173(6):676–82.
416. Nolt B, Tu F, Wang X, Ha T, Winter R, Williams DL, Li C. Lactate and Immunosuppression in Sepsis. *Shock.* 2018;49(2):120–5.



8

ANEXOS

8.1. APROBACIÓN DEL COMITÉ DE ÉTICA DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA DE CANTABRIA



COMITÉ ÉTICO DE INVESTIGACIÓN
CLÍNICA DE CANTABRIA
IDIVAL



CRISTINA IRENE CAMPO HOYOS, Secretario/a del **COMITÉ ÉTICO DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA DE CANTABRIA**

CERTIFICA

Que este Comité ha evaluado la propuesta del Investigador Principal del estudio:

TÍTULO: Papel de la vitamina D en la evolución y el pronóstico de la sepsis grave y el shock séptico.

TIPO DE ESTUDIO: Proyecto de Investigación (Código interno: 2014.159)

y considera que:

- Se cumplen los requisitos necesarios de idoneidad del protocolo en relación con los objetivos del estudio y están justificados los riesgos y molestias previsibles para el sujeto, teniendo en cuenta los beneficios esperados.
- Es adecuado el procedimiento para obtener el consentimiento informado.
- La capacidad del investigador y sus colaboradores, y las instalaciones y medios disponibles, tal y como ha sido informado, son apropiados para llevar a cabo el estudio.

Este CEIC, emite un informe **FAVORABLE** para que dicho Estudio sea realizado en el **HOSPITAL UNIVERSITARIO MARQUÉS DE VALDECILLA**, actuando como investigador principal el Dr. **BORJA SUBERVIOLA CAÑAS**.

Como queda reflejado en el Acta: **24/2014**.

Lo que firmo en Santander, a **1 de agosto de 2014**


CRISTINA IRENE CAMPO HOYOS
Secretario/a del CEIC



8.2. CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA LA PARTICIPACIÓN EN EL ESTUDIO

“UTILIDAD DE LAS MEDICIONES SERIADAS DE 25(OH) VITAMINA D, 1,25(OH)₂ VITAMINA D, CATELICINA Y BETA2-DEFENSINA EN EL PRONÓSTICO DE LOS PACIENTES SÉPTICOS”

Investigador principal: Borja Suberviola Cañas

Servicio de Medicina Intensiva. Hospital Universitario Marqués de Valdecilla

Email: bsuberviola@yahoo.es

INFORMACION AL PARTICIPANTE O A SUS REPRESENTANTES

ESTIMADO/A SEÑOR/A:

Su médico le ha solicitado de palabra participar en este estudio, ahora y en cumplimiento de la Ley de Investigación Biomédica, reiteramos la explicación por escrito con objeto de que nos autorice a incluirlo en este estudio. Es importante que usted conozca la finalidad y los procedimientos llevados a cabo en este estudio, lea atentamente esta información y no dude en comentar con su médico, al investigador o a cualquiera de sus colaboradores todas aquellas cuestiones que no le queden claras.

El estudio ha sido aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica correspondiente y respeta la normativa vigente.

ANTECEDENTES:

Las infecciones graves son causadas por diferentes microorganismos, generalmente bacterias. En la susceptibilidad a la infección por estos microorganismos intervienen diversos factores como el estado nutricional, edad, tabaquismo, consumo de alcohol, inmunosupresión, diabetes, etc. Además, existen diversos factores que hacen que algunos individuos sean más susceptibles a la infección, así como a la evolución y gravedad de ésta.

La vitamina D participa en la respuesta inmune de nuestro organismo frente a las infecciones y su déficit favorece el desarrollo de las mismas. Hasta la fecha, sin embargo, existe muy poca información sobre cómo la deficiencia de vitamina D pueda favorecer el agravamiento de las infecciones o implicar un peor pronóstico de los pacientes que las aquejan. El mayor conocimiento de estos aspectos haría posible detectar a aquellos pacientes con riesgo de sufrir una evolución desfavorable y quizás en un futuro abriría una nueva vía de tratamiento para las infecciones.

PARTICIPACIÓN VOLUNTARIA:

Debe saber que su participación en este estudio es voluntaria y puede decidir no participar. En caso de que decida participar en el estudio puede cambiar su decisión y retirar su consentimiento en cualquier momento, sin que por ello se altere la relación con su médico y sin que se produzca perjuicio alguno en su tratamiento.

DESCRIPCIÓN GENERAL DEL ESTUDIO:

El objetivo de este estudio es analizar diversos parámetros biológicos relacionados con la vitamina D que pueden estar relacionados con el desarrollo y la gravedad de las infecciones de origen bacteriano. Con esta finalidad se le pide que otorgue su consentimiento para la donación de una muestra de sangre que será utilizada para la investigación

de los mismos. Asimismo, se le pide que de su consentimiento para la revisión de datos de su historial clínico para este estudio. La participación en este estudio NO implica ninguna modificación en el diagnóstico o tratamiento de la patología que presenta el participante ni supone la necesidad de llevar a cabo pruebas complementarias añadidas más allá de las anteriormente expuestas.

Este es un estudio observacional, es decir, que no se van a modificar en nada las pruebas que se vayan a hacer para su diagnóstico ni tampoco su tratamiento. Dicho estudio prevé incluir un total de 315 pacientes en un periodo de 28 meses. Se incluirán a los pacientes con un cuadro de sepsis grave o shock séptico. Se excluirán del estudio los pacientes con edad menor de 18 años, aquellos que hayan sufrido una parada cardiaca reciente o que en su historia clínica figuren órdenes de limitación del esfuerzo terapéutico, aquellos en los que no presentando sepsis grave o shock séptico en el momento de su ingreso en la UCI lo hubieran desarrollado durante su estancia en la misma y aquellos que no den su consentimiento para participar en el estudio.

RIESGOS POTENCIALES Y BENEFICIOS:

Para este estudio únicamente se le extraerá una pequeña muestra de sangre en el momento de ingreso en la UCI, a las 72 horas y a la semana del mismo. La sangre será analizada en el Laboratorio y sobre la que se realizarán análisis bioquímicos. Por lo tanto, no se prevé que su participación en el estudio pueda resultar perjudicial para su salud. Sin embargo, puede tener un enorme valor para todos los pacientes que tienen sepsis ya que puede contribuir a detectar pacientes de riesgo y, como consecuencia aplicar acciones de mejora en el tratamiento.

A excepción de lo anterior, no variará la asistencia habitual que recibe en la Unidad de Cuidados Intensivos por el simple hecho de participar en este estudio.

ALTERNATIVAS POSIBLES:

Su participación en este estudio es voluntaria, de tal forma que usted puede decidir no participar y también puede retirarse en cualquier momento del desarrollo del estudio, sin que esa decisión afecte en ningún sentido la atención que usted recibe de sus médicos.

CONFIDENCIALIDAD Y ALMACENAMIENTO DE LAS MUESTRAS:

Siguiendo la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de Protección de datos de carácter personal, todos los datos recogidos en el transcurso del estudio serán tratados de forma estrictamente confidencial, por medio de un sistema de codificación numérica, al cual sólo tendrá acceso el equipo investigador y serán utilizados para la valoración del estudio sin desvelar en ningún momento su nombre ni apellidos. Todas las personas que forman parte del equipo investigador están obligadas a mantener el secreto profesional. Las muestras se mantendrán congeladas en las mejores condiciones con los correspondientes controles de seguridad técnicos y de digitalización de las muestras. Las muestras sólo serán utilizadas para el presente estudio y el remanente de muestra será destruido.

Si tras leer este texto y/o comentar con su médico el contenido del mismo quiere participar en este estudio firme por favor el consentimiento que se le presenta.

CONSENTIMIENTO INFORMADO DEL PACIENTE O SU REPRESENTANTE

TÍTULO DEL ESTUDIO: "Utilidad de las mediciones seriadas de 25(OH) vitamina D,

1,25(OH)₂ vitamina D, catelicidina y β-2-defensina en el pronóstico de los pacientes sépticos"

Persona de contacto: Borja Suberviola Cañas

D/DÑA: con D.N.I.

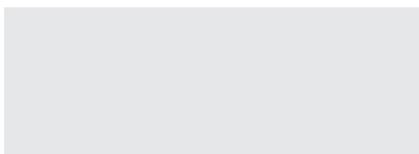
Mediante el presente documento DOY MI AUTORIZACION para participar en este estudio

- He leído la información y he podido hacer preguntas sobre el mismo
- Considero que la información recibida es suficiente.
- He hablado con el Dr. BorjaSuberviola Cañas (investigador)
- Comprendo que mi participación es voluntaria y que puedo retirarme del estudio cuando quiera sin tener que dar explicaciones y sin que repercuta en mis cuidados médicos

Y para que así conste, firmo el presente documento, después de haberlo leído y comprendido, y por mi propia voluntad.

En Santander, a de de 20

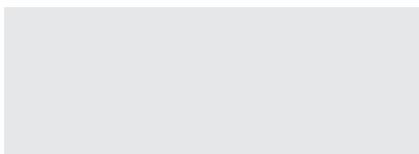
Firma del Participante:



Declaración del familiar, persona allegada o representante legal, en su caso, de que han recibido la información por incapacidad temporal o incompetencia del paciente.

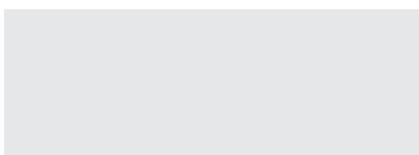
Nombre: D.N.I.

Firma:



Nombre del Médico: Borja Suberviola Cañas

Firma del Médico:



8.3. PUBLICACIONES

RESEARCH ARTICLE

Prognostic value of plasma pentraxin 3 levels in patients with septic shock admitted to intensive care

S. Perez-San Martin¹, B. Suberviola^{1,2*}, M. T. Garcia-Unzueta¹, B. A. Lavin¹, S. Campos², M. Santibañez³

1 Department of Clinical Biochemistry, University Hospital Marqués de Valdecilla-IDIVAL, Santander, Spain, **2** Intensive Care Department, University Hospital Marqués de Valdecilla-IDIVAL, Santander, Spain, **3** Health Research Institute Valdecilla-IDIVAL, School of Nursing, University of Cantabria, Santander, Spain

* borja.suberviola@scsalud.es



Abstract

Objective

To evaluate the usefulness of a new marker, pentraxin, as a prognostic marker in septic shock patients.

Materials and methods

Single-centre prospective observational study that included all consecutive patients 18 years or older who were admitted to the intensive care unit (ICU) with septic shock. Serum levels of procalcitonin (PCT), C-reactive protein (CRP) and pentraxin (PTX3) were measured on ICU admission.

Results

Seventy-five septic shock patients were included in the study. The best predictors of in-hospital mortality were the severity scores: SAPS II (AUC = 0.81), SOFA (AUC = 0.79) and APACHE II (AUC = 0.73). The ROC curve for PTX3 (ng/mL) yielded an AUC of 0.70, higher than the AUC for PCT (0.43) and CRP (0.48), but lower than lactate (0.79). Adding PTX3 to the logistic model increased the predictive capacity in relation to SAPS II, SOFA and APACHE II for in-hospital mortality (AUC 0.814, 0.795, and 0.741, respectively). In crude regression models, significant associations were found between in-hospital mortality and PTX3. This positive association increased after adjusting for age, sex and immunosuppression: adjusted OR T3 for PTX3 = 7.83, 95% CI 1.35–45.49, linear *P trend* = 0.024.

Conclusion

Our results support the prognostic value of a single determination of plasma PTX3 as a predictor of hospital mortality in septic shock patients.

OPEN ACCESS

Citation: Perez-San Martin S, Suberviola B, Garcia-Unzueta MT, Lavin BA, Campos S, Santibañez M (2020) Prognostic value of plasma pentraxin 3 levels in patients with septic shock admitted to intensive care. PLoS ONE 15(12): e0243849. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0243849>

Editor: Aleksandar R. Zivkovic, Heidelberg University Hospital, GERMANY

Received: September 13, 2020

Accepted: November 28, 2020

Published: December 10, 2020

Peer Review History: PLOS recognizes the benefits of transparency in the peer review process; therefore, we enable the publication of all of the content of peer review and author responses alongside final, published articles. The editorial history of this article is available here: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0243849>

Copyright: © 2020 Perez-San Martin et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the manuscript and its [Supporting information](#) files.

Funding: The authors received no specific funding for this work.

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Introduction

In 2017, the World Health Organization established sepsis as a global priority [1]. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3) defines sepsis as life-threatening organ dysfunction caused by a dysregulated host response to infection [2]. It is a major cause of admission to the intensive care unit (ICU) and a leading cause of mortality and critical illness worldwide; it is responsible for more than 5 million deaths annually, with an estimated global mortality of 30% [3].

Sepsis and septic shock are medical emergencies, so prompt identification and appropriate management in the initial hours after onset improve outcomes [4], especially among high-risk patients. Thus, biomarkers allowing early stratification and recognition of patients at higher risk of mortality are needed. The two biomarkers that have been most widely studied and used in patients with sepsis are the short pentraxin C-reactive protein (CRP), and procalcitonin (PCT), the prehormone of calcitonin. Nevertheless, even they have limited abilities to distinguish sepsis from other inflammatory conditions or to predict outcome [5, 6]. PCT can be also used to support shortening of the duration of antimicrobial therapy in sepsis patients (weak recommendation, low quality of evidence), according to the latest Surviving Sepsis Campaign (SCC) [4].

In recent years, pentraxin 3 (PTX3), an acute phase protein, has emerged as a promising biomarker of sepsis. It is a prototypical member of the long pentraxin subfamily and a key component of humoral innate immunity. PTX3 is expressed in a number of tissues, particularly dendritic cells and macrophages, in response proinflammatory stimuli [7, 8]. Additionally, it is stored in neutrophil granules and localises in neutrophil extracellular traps [9]. Once released, PTX3 acts by recognising microbes, activating complement and facilitating pathogen recognition by phagocytes, thus promoting pathogen clearance, tuning inflammatory responses and promoting tissue remodelling [7, 8].

In healthy subjects, plasma PTX3 levels are barely detectable (<2 ng/mL) [10], but can quickly rise in inflammatory and infectious conditions [8]. Levels are elevated in critically ill patients, with a gradient from systemic inflammatory response syndrome (SIRS) to sepsis and septic shock [11]. Thus, it has been proposed as prognostic marker for sepsis [11–17]. In a systematic review and meta-analysis, PTX3 significantly predicted disease severity and mortality in sepsis [18].

The aim of this prospective study was to assess the prognostic value of a single determination of PTX3 in septic shock patients in relation to hospital mortality, comparing it with the prognostic value of a single determination of the classical biomarkers CRP and PCT, on ICU admission. We also aimed to evaluate whether its addition to severity scores could improve their prognostic accuracy.

Materials and methods

Study design and setting

We performed a single-centre prospective observational study of 75 patients admitted to the medical ICU of Marqués de Valdecilla University Hospital in Spain between April 2015 and April 2016. All consecutive patients 18 years or older who were admitted to ICU with septic shock, according to the Sepsis-2 definition, were eligible to participate. The latest Sepsis-3 definitions were applied and all patients were re-classified according to these new definitions. The criteria for septic shock included the requirement for a vasopressor to maintain a mean blood pressure of 65 mmHg and serum lactate level >2 mmol/L. Exclusion criteria included patients under 18 years of age, as well as individuals with recent cardiac arrest or decision to withdraw

life-sustaining treatment; patients who did not have septic shock at the time of ICU admission but who subsequently developed it were also excluded.

Clinical and demographic characteristics were recorded for all patients, and included age, sex and immunosuppression (AIDS, neutropenia [neutrophil count $<1 \times 10^9/L$], glucocorticoid exposure [>0.5 mg/kg for >30 d] and/or immunosuppressive or cytotoxic medications, solid organ transplantation, allogeneic or autologous stem cell transplantation, haematological malignancy, or solid tumour). Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II (APACHE II) score at 24 h, Simplified Acute Physiology Score (SAPS II) and Sequential Organ Failure Assessment (SOFA) score at admission were also recorded.

The study was approved by the Clinical Research Ethics Committee of Cantabria (CEIC: 2014.159), and written informed consent was obtained from each participating patient or their legal representatives, according to the Declaration of Helsinki.

Assay methods

An additional blood sample was drawn coinciding with the first extraction for clinical purposes upon admission of the patient to the ICU. Serum and plasma samples were collected as specified for the different assays, and aliquots for this specific study were stored at -80°C until analysis.

Plasma PTX3 levels were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using a commercial kit (Quantikine Human Pentraxin 3/TSG-14; R&D Systems Europe, Abingdon, UK). The sensitivity of the assay is 0.026 ng/mL. Specificity is $<0.5\%$ cross-reactivity observed with available related molecules; $<50\%$ cross-reactivity observed with species tested. Intra-assay reproducibility of the method is $<2.6\%$ and interassay reproducibility is $<6.9\%$.

Serum PCT levels were measured by electrochemiluminescence immunoassay (ECLIA) on a Cobas e411 autoanalyzer (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany); serum CRP was determined by immunoturbidimetric assay; and plasma lactate by an enzymatic assay using a Dimension EXL autoanalyzer (Siemens Health Care Diagnostics, Gwynedd, UK).

Statistical analysis

Categorical and discrete variables were expressed as counts (percentage). Continuous variables were expressed as median and interquartile ranges (IQR). Statistical differences between groups were assessed with the Chi-square test using Yates' correction or Fisher's exact test, when appropriate, for categorical variables. Continuous variables were compared with the Mann-Whitney U test. The correlation between continuous variables was calculated using Spearman's rank correlation coefficient (ρ).

To determine and compare the predictive value of the biomarkers and severity scores, receiver-operating characteristic (ROC) curves were constructed and the area under the curve (AUC) was calculated. The outcome variable was in-hospital mortality.

To estimate the strength of associations, the biomarkers and severity scores were divided into dichotomous variables (low versus high values) according to the median and adjusted odds ratios (OR) with their 95% confidence intervals (CI); 95% CIs for in-hospital mortality were calculated using unconditional logistic regression. The following potential confounders were pre-established for inclusion in the models: age (as a continuous variable), sex and immunosuppression status (yes/no).

In addition, exposure-response trends (biological gradient) were estimated, using a logistic regression model with all potential confounders, categorizing the prognostic factors as ordinal variables according to tertiles.

The level of statistical significance was set at 0.05 and all tests were two-tailed. Data were analysed using SPSS statistical software package 24.0 (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA).

Results

Study population

Seventy-five septic shock patients were included in the study (53 men and 22 women) with a median age at admission of 64 years (Table 1). At ICU admission, median APACHE II, SOFA and SAPS II scores were 22, 10 and 42, respectively. The most common sites of infection were the lungs (41.3%) and abdomen (32%). The ICU mortality rate was 24% and the in-hospital mortality rate was 28%. Non-survivors were more severely ill, as reflected by significantly higher severity scores and higher number of organ dysfunctions on ICU admission;

Table 1. Baseline characteristics of the study population, in relation to in-hospital mortality.

Characteristics	Overall population	Survivors	Non-survivors	p value
	n = 75	n = 54	n = 21	
Age (years), MD (IQR)	64 (49–74)	63 (47.2–70)	71 (59.5–76.5)	0.08
Male sex, n (%)	53 (70.7)	37 (68.5)	16 (76.2)	0.58
Immunosuppression, n (%)	25 (33.3)	14 (25.9)	11 (52.4)	0.05
Charlson score, MD (IQR)	4 (2–6.6)	3.9 (1.1–6.4)	5.6 (3.4–7.2)	0.28
Site of infection, n (%):				0.05
Lung	31 (41.3)	22 (40.7)	9 (42.9)	
Abdomen	24 (32)	15 (27.8)	9 (42.9)	
Urinary tract	9 (12)	9 (16.7)	0 (0)	
Skin-soft tissues	5 (6.7)	5 (9.3)	1 (4.8)	
Catheter	3 (4)	2 (3.7)	1 (4.8)	
Others	3 (4)	1 (1.9)	1 (4.8)	
Nosocomial infection, n (%)	46 (61.3)	33 (61.1)	12 (57.1)	0.79
APACHE II, MD (IQR)	22 (15–28)	19.5 (14–25.2)	25 (22–30)	0.006
SAPS II, MD (IQR)	42 (32–63)	36 (29.5–50.2)	61 (53.5–69)	<0.001
SOFA, MD (IQR)	10 (7–13)	9 (7–12)	14 (10–17.5)	<0.001
Organ dysfunction (number), MD (IQR)	3 (2–4)	2 (1–3.2)	4 (3–5)	<0.001
Mechanical ventilation, n (%)	39 (52)	19 (35.2)	20 (95.2)	<0.001
ARDS, n (%)	11 (14.7)	3 (5.6)	8 (38.1)	<0.001
CVVHDF, n (%)	11 (14.7)	4 (7.4)	7 (33.3)	0.009
Bacteraemia, n (%)	23 (30.7)	15 (27.8)	8 (38.1)	0.41
SvcO ₂ (%)	72 (61.4–78.6)	72.7 (62.1–78.7)	74.2 (60–78.6)	0.99
Lactate (mmol/L), MD (IQR)	2.7 (1.3–4.6)	2.1 (1–3.5)	4.6 (2.7–8.5)	<0.001
PCT (ng/ml), MD (IQR)	11.8 (1.5–40.6)	9.6 (1.3–51.3)	12.9 (3.7–24.7)	0.47
CRP (mg/dl), MD (IQR)	22.8 (11.1–25)	23 (11.1–25)	20.8 (8.4–25)	0.56
Pentraxin-3 (ng/ml), MD (IQR)	63.8 (24.2–187)	41.8 (14.3–124.3)	114.4 (56.1–250)	0.01
ICU mortality, n (%)	18 (24)	----	----	----
Hospital mortality, n (%)	21 (28)	----	----	----
ICU stay (days), MD (IQR)	4.9 (2.9–9.9)	5.9 (2.9–9.9)	4.9 (1.9–9.9)	0.10

Apache II: Acute Physiology and Chronic Health disease Classification System II; SAPS: Simplified Acute Physiology Score; SOFA: Sequential Organ Failure Assessment; ARDS: Acute respiratory distress syndrome; CVVHDF: Continuous venovenous haemodiafiltration; SvcO₂: Central venous oxygen saturation; PCT: Procalcitonin; CRP: C-reactive protein; VDBP: Vitamin D binding protein. MD (IQR); median (interquartile range). P results based on Mann–Whitney U test.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0243849.t001>

mechanical ventilation and haemodiafiltration were required in a higher percentage of non-survivors compared to survivors.

PTX3 levels were higher than normal in all patients, with a median PTX3 level of 63.8 (24.2–187) ng/mL. Median PCT and CRP levels were 11.8 ng/mL (1.5–40.6) and 22.8 (11.1–25) ng/mL, respectively. Plasma PTX3 concentrations were higher in non-survivors compared to survivors (114.4 vs. 41.8 ng/mL, $P = 0.01$). However, serum PCT and CRP concentrations showed no statistically significant differences between these groups.

At ICU admission, plasma PTX3 levels showed a statistically significant positive correlation with the APACHE II score ($\rho = 0.402$, $P < 0.001$), SOFA score ($\rho = 0.378$, $P = 0.001$), SAPS-II score ($\rho = 0.449$, $P < 0.001$) and PCT ($\rho = 0.329$, $P = 0.005$), but not with CRP ($\rho = 0.157$, $P = 0.187$), ICU length of stay ($\rho = 0.104$, $P = 0.82$) or hospital length of stay ($\rho = 0.041$, $P = 0.73$).

Prognostic value of PTX3: ROC and regression analysis

Among the prognostic factors studied, the best rates of prediction of in-hospital mortality were the severity scores: SAPS II (AUC = 0.81), SOFA (AUC = 0.79) and APACHE II (AUC = 0.73). The ROC curve for PTX3 (ng/mL) yielded an AUC of 0.70, higher than the AUC for PCT (0.43) and CRP (0.48) but lower than the AUC for lactate (0.79) (Table 2) (S1 Fig). Adding PTX3 to the logistic model slightly increased the predictive capacity in relation to SAPS II, SOFA and APACHE II for in-hospital mortality (AUC 0.814, 0.795, and 0.741, respectively) (Table 3).

Tables 4 and 5 show the strength of associations (OR) and exposure-trends (biological gradient) between severity scores and biomarkers, including PTX3, in relation to in-hospital mortality. When categorising the prognostic factors according to the median and tertiles, the results were consistent with the predictive capacity determined using the AUCs. With respect to biomarkers, lactate was statistically significantly associated with in-hospital mortality, but the associations were higher for PTX3 compared to PCT and CRP.

Among the severity scores (SOFA, SAPS II and APACHE II), significant crude positive associations were obtained for in-hospital mortality, crude OR at the highest tertile (OR T3): OR T3 for SAPS II = 30.73, 95% CI 3.57–264.49 P trend < 0.001 ; OR T3 for SOFA = 59.80, 95% CI 0.65–19.84, P trend = 0.001; and OR T3 for APACHE II = 5.90, 95% CI 1.37–25.36, P trend = 0.016). After adjusting for age, sex and immunosuppression, these positive associations increased for all severity scores.

Regarding biomarkers, non-significant associations with no dose-response P trends were found for PCT and CRP. In crude regression models, significant associations with significant

Table 2. Area under the curve (AUCs) with 95% confidence intervals (CIs) for severity scores and biomarkers in relation to in-hospital mortality.

	AUC ^a	(95% CI)
APACHE II	0.728	0.612 0.843
SAPS II	0.814	0.713 0.915
SOFA	0.785	0.672 0.899
PCT (ng/ml)	0.534	0.398 0.671
CRP (mg/dl)	0.481	0.339 0.623
Lactate (mmol/L)	0.794	0.692 0.895
Pentraxin-3 (ng/ml)	0.698	0.575 0.822

^a AUC denotes Area Under the Curve ROC; 95% CI Confidence interval at 95%.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0243849.t002>

Table 3. Area under the curve (AUCs) with 95% confidence intervals (CIs) estimated through regression models for different combinations of APACHE II, SAPS II, SOFA and pentraxin-3 in relation to in-hospital mortality.

	AUC ^a	(95% CI)	
APACHE II + Pentraxin-3 (ng/ml)	0.741	0.624	0.858
SAPS II + Pentraxin-3 (ng/ml)	0.817	0.719	0.916
SOFA + Pentraxin-3 (ng/ml)	0.795	0.689	0.901

^a AUC denotes Area Under the Curve ROC; 95% CI Confidence interval at 95%.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0243849.t003>

dose-response trends were found between in-hospital mortality and PTX3. This positive association increased after adjusting for age, sex and immunosuppression: adjusted OR at the highest tertile (ORa T3) for PTX3 = 7.83, 95% CI 1.35–45.49, *P* trend = 0.024. Lactate was the biomarker with highest associations: adjusted OR at the highest tertile (ORa T3) for lactate = 36.47, 95% CI 3.85–345.38, *P* trend <0.001 (Table 5).

Discussion

In our study, we evaluated the prognostic value of PTX3, PCT and CRP in patients with septic shock defined according to Sepsis-3 criteria. Our findings suggest that plasma PTX3 could be a

Table 4. Associations between severity scores and in-hospital mortality.

Severity scores	Cut-off points	Survivors		Non-survivors		OR	(95% CI)	ORa	(95% CI)
		N = 114	N = 25	OR	(95% CI)				
APACHE II (Median)									
Low (reference)	≤ 22	38	6	1.00	--	1.00	--	--	--
High	23+	16	15	5.94	1.95	18.06	6.59	1.82	23.93
APACHE II (Tertiles)									
Low (reference)	≤ 17	23	3	1.00	--	1.00	--	--	--
Medium	18–25	18	8	3.41	0.79	14.72	2.92	0.57	14.94
High	26+	13	10	5.90	1.37	25.36	6.22	1.18	32.67
<i>p</i> linear trend				<i>p</i> = 0.016			<i>p</i> = 0.029		
SAPS II									
High (reference)	≤ 42	36	2	1	--	1	--	--	--
Low	43+	18	19	19	3.98	90.69	23.362	3.972	137.411
SAPS II (Tertiles)									
High (reference)	≤ 35	26	1	1	--	1	--	--	--
Medium	36–56	17	7	10.71	1.21	94.96	11.01	1.13	107.37
Low	57+	11	13	30.73	3.57	264.49	48.67	4.46	530.95
<i>p</i> linear trend				<i>p</i> < 0.001			<i>p</i> = 0.001		
SOFA (Median)									
High (reference)	≤ 10	36	6	1	--	1	--	--	--
Low	11+	18	15	5.00	1.66	15.07	13.10	2.58	66.47
SOFA (Tertiles)									
High (reference)	≤ 8	24	2	1	--	1	--	--	--
Medium	9–12	20	6	3.60	0.65	19.84	2.75	0.41	18.40
Low	13+	10	13	15.60	2.96	82.17	59.80	5.13	696.73
<i>p</i> linear trend				<i>p</i> = 0.001			<i>p</i> = 0.001		

OR_a: Odds ratio adjusted for age, sex and immunosuppression.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0243849.t004>

Table 5. Associations between biomarkers and in-hospital mortality.

Biomarkers	Cut-off points	Survivors		Non-survivors		(95% CI)	OR _a	(95% CI)	CI
		N = 114	N = 25	OR	(95% CI)				
PCT (ng/ml) (Median)									
Low (reference)	≤ 11.80	30	8	1.00	--		1.00	--	
High	11.81+	24	13	2.03	0.72	5.7	2.87	0.86	9.58
PCT (ng/ml) (Tertiles)									
Low (reference)	≤ 4.00	20	5	1.00	--		1.00	--	
Medium	4.01–22.60	15	10	2.67	0.75	9.45	2.31	0.6	8.9
High	22.61+	19	6	1.26	0.33	4.84	1.73	0.39	7.75
<i>p</i> linear trend				<i>p</i> = 0.753			<i>p</i> = 0.422		
CRP (mg/dl) (Median)									
Low (reference)	≤ 22.70	26	12	1.00	--		1.00	--	
High	22.71+	28	9	0.7	0.25	1.92	0.82	0.27	2.46
CRP (mg/dl) (Tertiles)									
Low (reference)	≤ 13.00	17	8	1.00	--		1.00	--	
Medium	13.01–25.00	32	12	0.797	0.273	2.325	0.998	0.311	3.202
High	25.01+	5	1	0.425	0.042	4.263	0.39	0.033	4.65
<i>p</i> linear trend				<i>p</i> = 0.466			<i>p</i> = 0.615		
Lactate (mmol/L) (Median)									
Low (reference)	≤ 24.00	33	6	1.00	--		1.00	--	
High	24.01+	21	15	3.93	1.32	11.73	4.48	1.36	14.75
Lactate (mmol/L) (Tertiles)									
Low (reference)	≤ 18	26	1	1.00	--		1.00	--	
Medium	18.01–32.00	16	7	11.38	1.28	101.22	9.53	1.00	90.40
High	32.01+	12	13	28.17	3.29	240.81	36.47	3.85	345.38
<i>p</i> linear trend				<i>p</i> < 0.001			<i>p</i> < 0.001		
Pentraxin-3 (ng/ml) (Median)									
Low (reference)	≤ 63.80	30	8	1.00	--		1.00	--	
High	63.81+	24	13	2.03	0.72	5.7	2	0.64	6.24
Pentraxin-3 (ng/ml) (Tertiles)									
Low (reference)	≤ 31.90	23	2	1.00	--		1.00	--	
Medium	31.91–116.60	16	9	6.47	1.23	34.01	6.05	1.05	34.93
High	116.61+	15	10	7.67	1.47	39.99	7.83	1.35	45.49
<i>p</i> linear trend				<i>p</i> = 0.015			<i>p</i> = 0.024		

OR_a: Odds ratio adjusted for age, sex and immunosuppression.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0243849.t005>

potential predictor of mortality, having, according to our results, a superior prognostic value compared to PCT and CRP. Our results also support severity scores—classical markers used to predict mortality—as predictors of mortality, particularly SAPS II. This reproducible accuracy of the severity scores supports the validity of our results for PTX3. We also found that PTX3 was elevated and showed a stronger correlation with disease severity, organ dysfunction and other clinical parameters than CRP or PCT in septic shock.

In accordance with a previous study, CRP remained equally high in both survivors and non-survivors [12]. Although PTX3 and CRP belong to the same pentraxin family, PTX3 differs from CRP in terms of gene organization and localisation, ligand recognition, cellular source and inducing signal [7, 8]. PTX3 is an acute phase protein secreted by various cells in response to proinflammatory signals, unlike the short pentraxin CRP, which is produced in

the liver and induced by IL-6. Under normal physiological conditions, plasma PTX3 levels are low (<2 ng/mL) but increase rapidly in sepsis as a result of neutrophil degranulation—up to 100 ng/mL depending on the severity of disease [19]—with levels maintained through *de novo* production by endothelial cells and some monocytic cells [20, 21]. PTX3 increases within 6–8 h of response to infection, compared to 24–30 h for CRP.

The association between PTX3 and the increase in in-hospital mortality remained after adjusting for the main confounding factors, namely age, sex, and immunosuppression, supporting the independence of this association. Moreover, an exposure-response pattern (a dose-response trend) was found, where higher levels were associated with a higher risk of mortality. Patients with high levels (third tertile) had an approximately eight-fold risk of in-hospital mortality compared to patients with lower PTX3 levels. However, the predictive accuracy of a single PTX3 determination, in relation to the AUC determined by the ROC curves, was lower than the severity scores (SAPS II, SOFA, APACHE II), but superior to the classically used biomarkers (CRP, PCT) in predicting the risk of mortality in septic shock patients. The predictive accuracy in relation to severity scores was slightly increased by adding PTX3 to the logistic models. The clinical relevance of this slight increase merits further attention in future studies, to elucidate whether systemic PTX3 levels would have prognostic value and could help to determine the prognosis of patients with septic shock, complementing disease severity classification systems and other biological markers.

Sepsis occurs when the release of proinflammatory mediators in response to an infection extends beyond the boundaries of the local environment, leading to a more generalised response, so it is difficult to describe it with a single measure. The predictive scoring systems used to predict mortality in ICU patients have major limitations, including poor generalisability, deterioration over time and possibly lead-time bias [22–24], and they also tend to be used more in research than in routine clinical practice. For this reason, although PTX3 did not perform as well as severity scores, especially SAPS II, it should not be excluded for use as a predictor of outcome. CRP is sensitive but not very specific, since it is increased in all inflammatory disorders, while PCT differentiates between infectious and non-infectious causes of critical illness better than CRP [25]. Nevertheless, they provide limited information in relation to patient prognosis in critically ill patients [26, 27]. A meta-analysis of 21 studies with a total of 6007 patients concluded that the initial PCT level was of limited prognostic value in patients with sepsis [28]. In another meta-analysis of 25 studies with 2353 patients, Arora et al. found that, in a subgroup of patients with severe sepsis and septic shock, there was no difference in PCT values between survivors and non-survivors on day 1 ($P = 0.062$) [29]. In addition, serum levels may be altered by clinical and demographical conditions [30–32]. Our data showed a significant correlation between PCT and PTX3 at ICU admission, but PCT was not an independent marker for in-hospital mortality, nor was CRP. At ICU admission, the AUC value of a single PTX3 determination was significantly much better than CRP and PCT in predicting in-hospital mortality. Moreover, PTX3 levels correlated better with disease severity and organ dysfunction than PCT or CRP.

Our study findings are consistent with previous studies that examined PTX3 as a prognostic marker for sepsis [11–17]. Levels of PTX3 have been correlated with disease severity, organ dysfunction and markers of coagulation activation and, when compared with other biomarkers (e.g. IL-6, TNF α and CRP), have shown a stronger correlation with clinical parameters [33]. In a systematic review and meta-analysis, PTX3 was identified as a marker of sepsis severity and predictor of mortality, but with limited specificity [18]. In a prospective study with 112 patients with septic shock, baseline PTX3 levels were an independent predictor of 28-day mortality, unlike CRP and PCT [17]. In contrast to our study, Mauri et al. reported that, although high PTX3 levels over the first 5 days from onset of sepsis were correlated with poorer

outcomes, the initial PTX3 levels at ICU admission did not differ between survivors and non-survivors [12]. Additionally, Caironi et al., in a large multicentre randomised controlled trial, found that plasma PTX3 concentrations were higher in non-survivors compared to survivors on day 1 and were correlated with severity. While PTX3 levels on day 7 showed a significant predictive value for 90-day mortality, PTX3 levels on day 1, after adjustment for all confounders, were not associated with 90-day mortality in patients with severe sepsis or septic shock [15]. These conflicting outcomes may be due to the heterogeneity of different study subjects. Both studies were designed with patients with severe sepsis and septic shock according to the first criterion of sepsis based on the concept of SIRS. In addition, patients were randomised at enrolment. In contrast, our clinical study was conducted on a homogeneous group of patients who met the updated definition of septic shock. Additionally, the timing of mortality analysis was different (90-day mortality vs. in-hospital mortality), and in both studies, a sandwich ELISA developed in-house was used to determine PTX3 levels.

It should be pointed out that our results are also consistent with recent prospective studies, according to the Sepsis-3 definitions [34–37]. In contrast to our study, Hu et al. reported that PCT is a moderate predictor of 28-day mortality in patients with sepsis and septic shock.

Our results also showed that elevated lactate levels were highly associated with in-hospital mortality in septic shock, in line with other studies [4, 38–41]. Lactate has been widely used as a marker of altered tissue perfusion. Adult patients with septic shock can be identified using the clinical criteria of hypotension requiring the use of vasopressors to maintain mean blood pressure of 65 mmHg or greater and having a serum lactate level greater than 2 mmol/L persisting after adequate fluid resuscitation [2]. However, an elevated lactate level is a sensitive marker for cellular dysfunction in sepsis [42, 43], but is non-specific, since it can be elevated in other types of shock, such as cardiogenic, obstructive or hypovolaemic shock, and can be affected by several factors, such as liver disease [41, 44].

The present study has several advantages. We performed a prospective study with a very homogeneous group of patients who met septic shock criteria in accordance with the latest Sepsis-3 definitions at the time of admission to the ICU. Furthermore, the prognosis was established very promptly because it was based on the fact that blood samples were obtained on ICU admission.

This study also has some limitations, namely that the generalisability of our findings is constrained by the fact that this was a single centre observational study with a small sample size.

Conclusions

In summary, our results support the available published studies suggesting the prognostic value of a single determination of plasma PTX3 as a predictor of hospital mortality in septic shock patients, defined according to the latest Sepsis-3 criteria.

Further multicentre studies with larger sample size are needed in order to generalise these results, elucidating the existence of subgroups of patients with specific characteristics in whom this biomarker could demonstrate higher accuracy in assessing the risk of mortality or increased severity. This would allow us to better understand the predictive potential of PTX3 in comparison to other existing biomarkers such as lactate, PCT or CRP or severity scores.

Supporting information

S1 Fig. ROC curves for severity scores and biomarkers with respect to ‘in-hospital mortality’.

(DOC)

Author Contributions

Conceptualization: B. Suberviola, M. Santibañez.

Data curation: S. Perez-San Martin, B. Suberviola, M. T. Garcia-Unzueta, M. Santibañez.

Formal analysis: M. Santibañez.

Methodology: B. Suberviola.

Writing – original draft: S. Perez-San Martin, B. Suberviola, M. T. Garcia-Unzueta, B. A. Lavin, S. Campos, M. Santibañez.

References

1. Global Sepsis Alliance. WHA Adopts Resolution on Sepsis. <https://www.global-sepsis-alliance.org/news/2017/5/26/wha-adopts-resolution-on-sepsis>. Accessed 15 September 2020.
2. Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M, et al. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA*. 2016; 315:801–10. <https://doi.org/10.1001/jama.2016.0287> PMID: 26903338
3. Fleischmann C, Scherag A, Adhikari NK, Hartog CS, Tsaganos T, Schlattmann P, et al. Assessment of Global Incidence and Mortality of Hospital-treated Sepsis. Current Estimates and Limitations. *Am J Respir Crit Care Med*. 2016; 193:259–72. <https://doi.org/10.1164/rccm.201504-0781OC> PMID: 26414292
4. Rhodes A, Evans LE, Alhazzani W, Levy MM, Antonelli M, Ferrer R, et al. Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for Management of Sepsis and Septic Shock: 2016. *Intensive Care Med*. 2017; 43:304–77.
5. Pierrakos C, Vincent JL. Sepsis biomarkers: a review. *Crit Care*. 2010; 14:R15 <https://doi.org/10.1186/cc8872> PMID: 20144219
6. Henriquez-Camacho C, Losa J. Biomarkers for sepsis. *Biomed Res Int*. 2014; 2014:547818. <https://doi.org/10.1155/2014/547818> PMID: 24800240
7. Garlanda C, Bottazzi B, Bastone A, Mantovani A. Pentraxins at the crossroads between innate immunity, inflammation, matrix deposition, and female fertility. *Annu Rev Immunol*. 2005; 23: 337–66. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.23.021704.115756> PMID: 15771574
8. Mantovani A, Garlanda C, Doni A, Bottazzi B. Pentraxins in innate immunity: from C-reactive protein to the long pentraxin PTX3. *J Clin Immunol*. 2008; 28:1–13. <https://doi.org/10.1007/s10875-007-9126-7> PMID: 17828584
9. Jaillon S, Peri G, Delneste Y, Fréaux I, Doni A, Moalli F, et al. The humoral pattern recognition receptor PTX3 is stored in neutrophil granules and localizes in extracellular traps. *J Exp Med*. 2007; 204:793–804. <https://doi.org/10.1084/jem.20061301> PMID: 17389238
10. Yamasaki K, Kurimura M, Kasai T, Sagara M, Kodama T, Inoue K. Determination of physiological plasma pentraxin 3 (PTX3) levels in healthy populations. *Clin Chem Lab Med*. 2009; 47:471–77. <https://doi.org/10.1515/CCLM.2009.110> PMID: 19327124
11. Muller B, Peri G, Doni A, Torri V, Landmann R, Bottazzi B, et al. Circulating levels of the long pentraxin PTX3 correlate with severity of infection in critically ill patients. *Crit Care Med*. 2001; 29:1404–7. <https://doi.org/10.1097/00003246-200107000-00017> PMID: 11445697
12. Mauri T, Bellani G, Patroniti N, Coppadoro A, Peri G, Cuccovillo I, et al. Persisting high levels of plasma pentraxin 3 over the first days after severe sepsis and septic shock onset are associated with mortality. *Intensive Care Med*. 2010; 36:621–9. <https://doi.org/10.1007/s00134-010-1752-5> PMID: 20119647
13. Bastrup-Birk S, Skjoedt MO, Munthe-Fog L, Strom JJ, Ma YJ, Garred P. Pentraxin-3 serum levels are associated with disease severity and mortality in patients with systemic inflammatory response syndrome. *PLoS One*. 2013; 8:e73119. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073119> PMID: 24039869
14. Uusitalo-Seppala R, Huttunen R, Aittoniemi J, Koskinen P, Leino A, Vahlberg T, et al. Pentraxin 3 (PTX3) is associated with severe sepsis and fatal disease in emergency room patients with suspected infection: a prospective cohort study. *PLoS One*. 2013; 8:e53661. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0053661> PMID: 23341967
15. Caironi P, Masson S, Mauri T, Bottazzi B, Leone R, Magnoli M, et al. Pentraxin 3 in patients with severe sepsis or shock: the ALBIOS trial. *Eur J Clin Invest*. 2017; 73–83. <https://doi.org/10.1111/eci.12704> PMID: 27864924

16. Kim SB, Lee KH, Lee JU, Ann HW, Ahn JY, Jeon YD, et al. Long Pentraxin 3 as a predictive marker of mortality in severe septic patients who received successful early goal-directed therapy. *Yonsei Med J.* 2017; 58:370–9. <https://doi.org/10.3349/ymj.2017.58.2.370> PMID: 28120568
17. Jie H, Li Y, Pu X, Ye J. Pentraxin 3, a Predictor for 28-Day Mortality in Patients With Septic Shock. *Am J Med Sci.* 2017; 353:242–6. <https://doi.org/10.1016/j.amjms.2017.01.003> PMID: 28262210
18. Lee YT, Gong M, Chau A, Wong WT, Bazoukis G, Wong SH, et al. Pentraxin-3 as a marker of sepsis severity and predictor of mortality outcomes: A systematic review and meta-analysis. *J Infect.* 2018; 76:1–10. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2017.10.016> PMID: 29174966
19. Daigo K, Hamakubo T. Host-protective effect of circulating pentraxin 3 (PTX3) and complex formation with neutrophil extracellular traps. *Front Immunol.* 2012; 3:378. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00378> PMID: 23248627
20. Lee GW, Lee TH, Vilcek J. TSG-14, a tumor necrosis factor- and IL-1-inducible protein, is a novel member of the pentaxin family of acute phase proteins. *J Immunol.* 1993; 150:1804–12. PMID: 7679696
21. Alles VV, Bottazzi B, Peri G, Golay J, Introna M, Mantovani A. Inducible expression of PTX3, a new member of the pentraxin family, in human mononuclear phagocytes. *Blood.* 1994; 84:3483–93. PMID: 7949102
22. Patel PA, Grant BJ. Application of mortality prediction systems to individual intensive care units. *Intensive Care Med.* 1999; 25:977–82. <https://doi.org/10.1007/s001340050992> PMID: 10501755
23. Nassar AP Jr, Mocelin AO, Nunes AL, Giannini FP, Brauer L, Andrade FM, et al. Caution when using prognostic models: a prospective comparison of 3 recent prognostic models. *J Crit Care.* 2012; 27:423.e1. <https://doi.org/10.1016/j.jccr.2011.08.016> PMID: 22033059
24. Salluh JI, Soares M. ICU severity of illness scores: APACHE, SAPS and MPM. *Curr Opin Crit Care.* 2014; 20(5):557–565. <https://doi.org/10.1097/MCC.000000000000135> PMID: 25137401
25. van Engelen TSR, Wiersinga WJ, Scicluna BP, van der Poll T. Biomarkers in Sepsis. *Crit Care Clin.* 2018; 34:139–52. <https://doi.org/10.1016/j.ccc.2017.08.010> PMID: 29149935
26. Silvestre J, Póvoa P, Coelho L, Almeida E, Moreira P, Fernandes A et al. Is C-reactive protein a good prognostic marker in septic patients?. *Intensive Care Med.* 2009; 35:909–13. <https://doi.org/10.1007/s00134-009-1402-y> PMID: 19169668
27. Kibe S, Adams K, Barlow G. Diagnostic and prognostic biomarkers of sepsis in critical care. *J Antimicrob Chemother.* 2011; 66 Suppl2:ii33–40. <https://doi.org/10.1093/jac/dkq523> PMID: 21398306
28. Liu D, Su L, Han G, Yan P, Xie L. Prognostic Value of Procalcitonin in Adult Patients with Sepsis: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS One.* 2015; 10:e0129450. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0129450> PMID: 26076027
29. Arora S, Singh P, Singh PM, Trikhya A. Procalcitonin Levels in Survivors and Nonsurvivors of Sepsis: Systematic Review and Meta-Analysis. *Shock.* 2015; 43:212–21. <https://doi.org/10.1097/SHK.0000000000000305> PMID: 25423128
30. Becker KL, Snider R, Nysten ES. Procalcitonin assay in systemic inflammation, infection, and sepsis: clinical utility and limitations. *Crit Care Med.* 2008; 36:941–52. <https://doi.org/10.1097/CCM.0B013E318165BABB> PMID: 18431284
31. Schuetz P, Bretscher C, Bernasconi L, Mueller B. Overview of procalcitonin assays and procalcitonin-guided protocols for the management of patients with infections and sepsis. *Expert Rev Mol Diagn.* 2017; 17:593–601. <https://doi.org/10.1080/14737159.2017.1324299> PMID: 28443360
32. Samsudin I, Vasikaran SD. Clinical Utility and Measurement of Procalcitonin. *Clin Biochem Rev.* 2017; 38:59–68. PMID: 29332972
33. Porte R, Davoudian S, Asgari F, Parente R, Mantovani A, Garlanda C, et al. The Long Pentraxin PTX3 as a Humoral Innate Immunity Functional Player and Biomarker of Infections and Sepsis. *Front Immunol.* 2019 Apr 12; 10:794. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00794> PMID: 31031772
34. Hu C, Zhou Y, Liu C, Kang Y. Pentraxin-3, procalcitonin and lactate as prognostic markers in patients with sepsis and septic shock. *Oncotarget.* 2017; 9:5125–36. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.23701> PMID: 29435167
35. Hamed S, Behnes M, Pauly D, Lepiorz D, Barre M, Becher T, et al. Pentraxin-3 Predicts Short- and mid-term mortality in patients with sepsis and septic shock during intensive care treatment. *Clin Lab.* 2018; 64:999–1011. <https://doi.org/10.7754/Clin.Lab.2018.180116> PMID: 29945330
36. Song J, Park DW, Moon S, Cho HJ, Park JH, Seok H, et al. Diagnostic and prognostic value of interleukin-6, pentraxin 3, and procalcitonin levels among sepsis and septic shock patients: a prospective controlled study according to the Sepsis-3 definitions. *BMC Infect Dis.* 2019; 19:968. <https://doi.org/10.1186/s12879-019-4618-7> PMID: 31718563
37. Song J, Moon S, Park DW, Cho HJ, Kim JY, Park J, et al. Biomarker combination and SOFA score for the prediction of mortality in sepsis and septic shock: A prospective observational study according to

- the Sepsis-3 definitions. *Medicine (Baltimore)*. 2020; 99(22):e20495. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000020495> PMID: 32481464
38. Casserly B, Phillips GS, Schorr C, Dellinger RP, Townsend S, Osborn TM, et al. Lactate measurements in sepsis-induced tissue hypoperfusion: results from the Surviving Sepsis Campaign database. *Crit Care Med* 2015; 43:567–73. <https://doi.org/10.1097/CCM.0000000000000742> PMID: 25479113
 39. Haas SA, Lange T, Saugel B, Petzoldt M, Fuhrmann V, Metschke M, et al. Severe hyperlactatemia, lactate clearance and mortality in unselected critically ill patients. *Intensive Care Med* 2016; 42:202–10. <https://doi.org/10.1007/s00134-015-4127-0> PMID: 26556617
 40. Arnold RC, Shapiro NI, Jones AE, Schorr C, Pope J, Casner E et al. Multicenter study of early lactate clearance as a determinant of survival in patients with presumed sepsis. *Shock*. 2009; 32:35–9. <https://doi.org/10.1097/shk.0b013e3181971d47> PMID: 19533847
 41. Nguyen HB, Rivers EP, Knoblich BP, Jacobsen G, Muzzin A, Ressler JA, et al. Early lactate clearance is associated with improved outcome in severe sepsis and septic shock. *Crit Care Med*. 2004; 32:1637–42. <https://doi.org/10.1097/01.ccm.0000132904.35713.a7> PMID: 15286537
 42. Levy B, Gibot S, Franck P, Cravoisy A, Bollaert PE. Relation between muscle Na+K+ ATPase activity and raised lactate concentrations in septic shock: a prospective study [published correction appears in *Lancet*. 2005 Jul 9–15;366(9480):122]. *Lancet*. 2005; 365: 871–75. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)71045-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)71045-X) PMID: 15752531
 43. Garcia-Alvarez M, Marik P, Bellomo R. Sepsis-associated hyperlactatemia. *Crit Care*. 2014; 18: 503. <https://doi.org/10.1186/s13054-014-0503-3> PMID: 25394679
 44. Rivers EP, Elkin R, Cannon CM. Counterpoint: should lactate clearance be substituted for central venous oxygen saturation as goals of early severe sepsis and septic shock therapy? *No. Chest*. 2011; 140: 1408–13. <https://doi.org/10.1378/chest.11-2563> PMID: 22147818



Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

www.elsevier.es/eimc



Original article

Vitamin D binding protein, but not vitamin D or vitamin D-related peptides, is associated with septic shock mortality



Borja Suberviola^{a,*}, Bernardo Alio Lavin^b, Andrés Fernando Jimenez^a, Sonia Perez-San Martin^b, Maite Garcia-Unzueta^b, Miguel Santibañez^c

^a Intensive Care Department, University Hospital Marqués de Valdecilla-IDIVAL, Avenida de Valdecilla SN 39008, Santander, Spain

^b Department of Clinical Biochemistry, University Hospital Marqués de Valdecilla-IDIVAL, Avenida de Valdecilla SN 39008, Santander, Spain

^c Health Research Institute Valdecilla-IDIVAL, University of Cantabria, School of Nursing, Avenida de Valdecilla s/n 39008, Santander, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 26 April 2018

Accepted 17 June 2018

Available online 20 November 2018

Keywords:

Vitamin D

Vitamin D-binding protein

Cathelicidin

Defensin

Sepsis

Mortality

ABSTRACT

Background: The aim of this study was to assess the prognostic value of vitamin D, vitamin D binding protein (VDBP) and vitamin D-related peptides in septic shock patients in relation to hospital mortality.

Methods: This is a single-center, prospective, observational study that included all consecutive patients meeting criteria for septic shock who were admitted to the ICU. VDBP, 25-hydroxy vitamin D, 1,25-dihydroxy vitamin D, cathelicidin and beta-defensin levels were determined in blood samples obtained on admission to the ICU.

Results: Seventy-five patients were studied. The best area under the curve (AUC) for prediction of in-hospital mortality was for VDBP (0.78), with a negative predictive value of 85.45% for the optimal cut-off point. VDBP was also the only variable that had a statistically significant association with a higher risk of in-hospital mortality, regardless of other assessed variables and pre-determined confounders: adjusted odds ratio of 5.20 (95% confidence interval: 1.21–22.36). When restricted to patients with vitamin D insufficiency ($n=54$), the AUC was 0.77, and the adjusted OR 12.22 (95% CI: 1.46–102.14; $p=0.021$) for in-hospital mortality.

Conclusions: VDBP levels showed a statistically significant association with in-hospital mortality, supporting the clinical utility of VDBP as a good prognostic marker in septic shock patients. Vitamin D and vitamin D-related peptides are not associated with in-hospital mortality. These results should be confirmed in a multicentre study with a larger sample size.

© 2018 Published by Elsevier España, S.L.U.

La proteína transportadora de vitamina D, pero no la vitamina D ni los péptidos derivados de ella se asocia con la mortalidad de los pacientes en *shock séptico*

RESUMEN

Introducción: El objeto de este estudio fue evaluar el valor pronóstico de la vitamina D, la proteína transportadora de la vitamina D (PTVD) y de los péptidos derivados de la vitamina D en relación a la mortalidad hospitalaria de los pacientes en *shock séptico*.

Métodos: Se trata de un estudio prospectivo unicéntrico observacional que incluyó consecutivamente a todos los pacientes que ingresan en la UCI en *shock séptico*. Los valores de la PTVD, 25-hydroxy vitamina D, 1,25-dihydroxy vitamina D, catelicidina y beta-defensina se cuantificaron en muestras sanguíneas extraídas en el momento del ingreso en la UCI.

Palabras clave:

Vitamina D

Proteína transportadora de la vitamina D

Catelicidina

Defensina

Sepsis

Mortalidad

Abbreviations: VDBP, vitamin D binding protein; AUC, area under the curve; ICU, intensive care unit; 25(OH)D, 25-hydroxy vitamin D; 1,25(OH₂D), 1,25-dihydroxyvitamin D; ROC, receiver operating characteristic; SOFA, Sequential Organ Failure Assessment; APACHE, acute physiology and chronic health evaluation.

* Corresponding author.

E-mail address: bsuberviola@yahoo.es (B. Suberviola).

<https://doi.org/10.1016/j.eimc.2018.06.011>

0213-005X/© 2018 Published by Elsevier España, S.L.U.

Resultados: Se incluyeron un total de 75 pacientes. La mejor área bajo la curva (AUC) para la predicción de mortalidad hospitalaria fue para la PTVD (0,78), con un valor predictivo negativo del 85,45% para el punto de corte óptimo. La PTVD fue además la única variable asociada estadísticamente con un mayor riesgo de mortalidad hospitalaria independientemente de las otras variables evaluadas y de los factores de confusión preestablecidos: *odds ratio* ajustada 5,20 (intervalo de confianza [IC] 95%: 1,21-22,36). Cuando el estudio se focalizó en los pacientes con insuficiencia de vitamina D (N = 54), el AUC fue de 0,77 y la *odds ratio* ajustada de 12,22 (IC 95%: 1,46-102,14; p = 0,021) en relación a la mortalidad hospitalaria.

Conclusiones: Los valores sanguíneos de la PTVD se asociaron de forma estadísticamente significativa con la mortalidad hospitalaria, apoyando la potencial utilidad clínica de la PTVD como un buen marcador pronóstico en los pacientes en *shock séptico*. La vitamina D y los péptidos derivados de ella no relacionaron con la mortalidad hospitalaria. Estos resultados deben ser confirmados en un estudio multicéntrico con mayor número de pacientes.

© 2018 Publicado por Elsevier España, S.L.U.

Background

There is increasing evidence regarding the pivotal role played by vitamin D in health and disease. Although the primary and most well-known function of vitamin D is to maintain calcium and phosphorus homeostasis, and promote bone mineralization, there is a body of literature focusing on the pleiotropic effects of the vitamin, such as immune modulation, endothelial and mucosal functions, and glucose metabolism. Thus, vitamin D deficiency has been associated with myocardial infarction, diabetes, autoimmune disease, chronic obstructive pulmonary disease, neoplasm, tuberculosis, and increased mortality in the general population.¹

Recent studies in critically-ill patients have suggested that vitamin D deficiency may be associated with sepsis development and poorer outcomes.^{2–5} However, the exact mechanism explaining this association is still unclear. Vitamin D has autoimmune activity, but also acts as an intermediary in the generation of antimicrobial peptides (cathelicidins and defensins) by monocytes/macrophages.⁶ Moreover, some other components of the vitamin D axis, such as vitamin D binding protein (VDBP), have anti-inflammatory and immunomodulatory functions that may affect these outcomes.⁷

The aim of this study was to assess the prognostic value of vitamin D, VDBP and vitamin D-related peptides in septic shock patients in relation to hospital mortality.

Materials and methods

Study design and setting

We conducted a single-center prospective observational study in a 30-bed adult intensive care unit (ICU) at Marques de Valdecilla University Hospital in Spain, between April 2015 and April 2016. Eligible patients were all consecutive adult patients, aged 18 or older and admitted to ICU with septic shock according to the Third International Consensus Definitions.⁸ We excluded patients under 18 years of age, as well as individuals with recent cardiac arrest or with withdraw of life sustaining decision and patients without septic shock at the time of admission to the ICU but who developed such problem during admission. Clinical and demographic characteristics of all patients, including age, gender, immunosuppression (AIDS, neutropenia [neutrophil count < 1 × 10⁹/L], exposure to glucocorticoids [>0.5 mg/kg for >30 d] and/or immunosuppressive or cytotoxic medications, solid organ transplantation, allogeneic or autologous stem cell transplantation, hematological malignancy, or solid tumor), Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II score at 24 h and Sequential Organ Failure Assessment score at admission were recorded (Table 1). The local ethics committee

(CEIC Cantabria 2014.159) approved this study, and informed consent was obtained for all patients.

Assay methods

A single blood sample was performed coinciding with the first clinical extraction for clinical purposes at the moment of admittance of the patient in the ICU. Serum and plasma samples were collected in the appropriate way for the different assays and aliquots for this specific study were stored at –80 °C until assayed. 25-hydroxy vitamin D (25(OH)D) and 1,25-dihydroxyvitamin D (1,25(OH)₂D) levels were measured by automated competitive chemiluminescence assay (Liaison XL, DiaSorin Inc, Stillwater MN USA). Our laboratory is DEQAS (Vitamin D External Quality Assessment Scheme) certified for both parameters. Vitamin D deficiency and insufficiency were defined as serum 25(OH)D levels less than 15 ng/mL and 30 ng/mL respectively. 1,25-dihydroxyvitamin D (1,25(OH)₂D) levels were measured by radioimmunoassay (DiaSorin Inc, Stillwater MN USA). VDBP, Cathelicidin (LL-37) and β-defensin-2 levels were measured by ELISA using the following commercial kits: Quantikine Human Vitamin D Binding Protein (R&D Systems Europe, Abingdon, UK), HK321 Human LL-37 (Hycult Biotech, Uden, Netherlands) and human β-defensin-2 (Alpha Diagnostic International, San Antonio, TX, USA), respectively.

Statistical analysis

Categorical and discrete variables were expressed as counts (percentage); continuous variables such as Vitamin D, VDBP, and related peptides were expressed as median and interquartile ranges. Statistical differences between groups were assessed with the Chi-square test, using Yates' correction or Fisher's exact test as appropriate, for categorical variables. The Mann–Whitney *U* test was used for biomarkers, while the Student *t*-test was used for the rest of the continuous variables.

To compare the predictive value of Vitamin D, VDBP, and related peptides, receiver operating characteristic (ROC) curves were constructed and the area under the curve (AUC) was determined. To estimate the strength and independence of associations, Vitamin D, VDBP, and related peptides were divided into dichotomous variables according to median, and adjusted odds ratios (OR) with their 95% confidence interval (CI) for 'in-hospital mortality' were calculated using unconditional logistic regression.

The level of statistical significance was set at 0.05, and all tests were two-tailed. SPSS statistical software package 19.0 (SPSS, Inc., Chicago, IL) was used for all statistical analyses.

Table 1
Baseline characteristics of the study population.

Characteristics	Overall population n = 75	Survivors n = 54	Non-survivors n = 21	p value
Age (years), MD (IQR)	64 (49–74)	63 (47.2–70)	71 (59.5–76.5)	0.12
Male sex, n (%)	53 (70.7)	37 (68.5)	16 (76.2)	0.58
Immunosuppression, n (%)	25 (33.3)	14 (25.9)	11 (52.4)	0.05
Charlson score, MD (IQR)	4 (2–6.6)	3.9 (1.1–6.4)	5.6 (3.4–7.2)	0.28
Source of infection, n (%)				
Lung	31 (41.3)	22 (40.7)	9 (42.9)	
Abdomen	24 (32)	15 (27.8)	9 (42.9)	
Urinary tract	9 (12)	9 (16.7)	0 (0)	0.05
Skin-soft tissues	5 (6.7)	5 (9.3)	1 (4.8)	
Catheter	3 (4)	2 (3.7)	1 (4.8)	
Others	3 (4)	1 (1.9)	1 (4.8)	
Nosocomial infection, n (%)	45 (60)	33 (61.1)	12 (57.1)	0.79
APACHE II, MD (IQR)	22 (15–28)	19.5 (14–25.2)	25 (22–30)	0.006
SAPS II, MD (IQR)	42 (32–63)	36 (29.5–50.2)	61 (53.5–69)	<0.001
SOFA, MD (IQR)	10 (7–13)	9 (7–12)	14 (10–17.5)	<0.001
Organ dysfunction (number), MD (IQR)	3 (2–4)	2 (1–3.2)	4 (3–5)	<0.001
Mechanical ventilation, n (%)	39 (52)	19 (35.2)	20 (95.2)	<0.001
ARDS, n (%)	11 (14.7)	3 (5.6)	8 (38.1)	<0.001
CVVHDF, n (%)	11 (14.7)	4 (7.4)	7 (33.3)	0.009
Bacteraemia, n (%)	23 (30.7)	15 (27.8)	8 (38.1)	0.41
SvcO ₂ (%)	73 (61.4–78.6)	72.7 (62.1–78.7)	74.2 (60–78.6)	0.99
Lactate (mmol/L), MD (IQR)	2.7 (1.3–4.6)	2.1 (1–3.5)	4.6 (2.7–8.5)	<0.001
PCT (ng/ml), MD (IQR)	11.8 (1.5–40.6)	9.6 (1.3–51.3)	12.9 (3.7–24.7)	0.50
CRP (mg/dl), MD (IQR)	22.8 (11.1–25)	23 (11.1–25)	20.8 (8.4–25)	0.59
25(OH) vitamin D status:				0.87
Sufficiency (≥ 30 ng/ml), n (%)	4 (5.3)	3 (5.6)	1 (4.8)	
Insufficiency (30–15 ng/ml), n (%)	17 (22.7)	13 (24.1)	4 (19)	
Deficiency (≤ 15 ng/ml), n (%)	54 (72)	38 (70.4)	16 (76.2)	
25(OH) vitamin D (ng/ml), MD (IQR)	9.8 (5.0–17.1)	10.7 (5.5–17.1)	8.6 (4.4–16.7)	0.65
1,25(OH) vitamin D (pg/ml), MD (IQR)	19 (10–34)	19.5 (10.7–38.6)	19 (7.5–23.5)	0.49
VDBP (ng/ml), MD (IQR)	144,393 (91397–187991)	155,067 (127411–206900)	85,572 (62973–147691)	<0.001
Cathelicidin (pg/ml), MD (IQR)	1.3 (0.7–2.0)	1.3 (0.8–2.1)	0.94 (0.4–1.7)	0.05
Beta-defensin (pg/ml), MD (IQR)	464 (222–1193)	470 (203–1193)	410 (235.5–1801.5)	0.57
ICU mortality, n (%)	18 (24)	–	–	–
Hospital mortality, n (%)	21 (28)	–	–	–
ICU stay (days), MD (IQR)	4.9 (2.9–9.9)	5.9 (2.9–9.9)	4.9 (1.9–9.9)	0.10

Apache II: Acute Physiology and Chronic Health disease Classification System II; SAPS: Simplified Acute Physiology Score; SOFA: Sequential Organ Failure Assessment; ARDS: acute respiratory distress syndrome; CVVHDF: continuous venovenous hemodiafiltration; SvcO₂: central venous oxygen saturation; PCT: procalcitonin; CRP: C reactive protein; VDBP: vitamin D binding protein. MD (IQR); median (interquartile range), *p* results based on Mann–Whitney *U* test.

Results

Study population

Seventy-five septic shock patients were included in the study (53 men and 22 women) with a median age at admission of 64 years (Table 1). At ICU admission, median APACHE II, SOFA and SAPS II scores were 22, 10 and 42, respectively. Lungs were the most frequent source of infection. The ICU mortality rate was 24% and the hospital mortality rate was 28%. Non-survivors were more severely ill, as reflected by significantly higher severity scores and higher number of organ dysfunctions on ICU admission; mechanical ventilation and hemodiafiltration were also required in a higher percentage of cases compared to survivors. No significant differences were observed between hospital survivors and non-survivors with respect to serum 25(OH)D, 1,25(OH)2D, cathelicidin and defensin levels, or with respect to 25(OH)D sufficiency, deficiency or insufficiency.

Among the prognostic factors studied, VDBP achieved the best rate for prediction of in-hospital mortality (AUC=0.78). The optimal cut-off point was set at 92,826 ng/ml. According to this cut-off point, sensitivity was 60.00% and positive predictive value was 63.16%. Of the other measurements, cathelicidin (pg/mL) and 1,25(OH)2D (pg/mL) had the highest AUC values (0.63 and 0.57, respectively) (Table 2).

VDBP was the only variable that was statistically significantly associated with a higher risk of in-hospital mortality. This association was independent of the pre-established confounders (adjusted

OR 5.20, 95% CI 1.21–22.36), *p*=0.027 (Table 3), although, when liver failure was added, the association decreased slightly (adjusted OR including also hepatic failure 3.86, 95% CI 0.84–17.81), *p*=0.083. When restricted to patients with vitamin D insufficiency (*n*=54), the predictive ability was rather similar (AUC=0.77), and an adjusted OR of 12.22 was found (95% CI 1.46–102.14), *p*=0.021 when adjusting for the pre-established confounders, that yielded statistical significance even including also hepatic failure as a confounding variable: adjusted OR including also hepatic failure. 9.46 (95% CI 1.04–85.47), *p*=0.046 (data not shown).

Discussion

Our results show that in patients with septic shock, VDBP values are better predictors of survival than vitamin D, cathelicidin and defensin. Thus VDBP values seem to have an inverse relation with respect to mortality, regardless of the vitamin D or vitamin D-related peptide levels.

In addition to transporting vitamin D₃, VDBP has multifunctional properties: as well as macrophage activation, it enhances the leukocyte chemotactic activity of activated complement peptides and influences macrophage chemotaxis, and may also act through excessive globular actin scavenging.^{7,9,10} Thus, in critically-ill trauma patients, Dahl et al. found that low serum VDBP was associated with a higher risk of respiratory failure and sepsis development.¹¹ Similarly, Jeng et al. compared a group of critically-ill subjects admitted to ICU with and without sepsis, and healthy controls. VDBP levels were significantly lower in subjects

Table 2

AUC and optimal cut-off points with their corresponding validity indexes and predictive values for VitD and related biomarkers in relation to 'in hospital mortality'.

	AUC ^a	(CI	95%)	CUT-OFF	Se (%)	Sp (%)	J (%)	LR+	1/LR–	PV+ (%)	PV– (%)
25(OH) vitamin D (ng/ml)	0.53	0.39	0.68	≤8.96	57.1	59.3	16.4	1.40	1.38	35.3	78.0
1,25 (OH) vitamin D (pg/ml)	0.57	0.43	0.71	≤26.0	81.0	42.6	23.5	1.41	2.24	35.4	85.2
Vitamin D binding protein (ng/ml)	0.78	0.66	0.90	≤92,826.0	60.0	87.0	47.0	4.63	2.18	63.2	85.5
Cathelicidin (pg/ml)	0.63	0.49	0.78	≤1.05	61.9	72.2	34.1	2.23	1.90	46.4	83.0
Beta-defensin (pg/ml)	0.45	0.31	0.60	≤2676.50	90.5	11.1	1.6	1.02	1.17	28.4	75.0

^a AUC denotes Area Under Curve ROC for VitD and related biomarkers in relation to 'in hospital mortality' considering an inverse relation (the lower value of each biomarker, the higher risk of mortality). Cut-off denotes the optimal cut-off points considering as bad prognostic a value ≤the optimal value that maximizes the Youden index for a ratio 'false negatives cost'/false positives'= 3 and for the sample prevalence of 'in-hospital mortality'. Se denotes Sensitivity. Sp denotes Specificity. J denotes Youden index. LR denotes Likelihood Ratios. PV denotes Predictive Values for sample prevalence (27.03%).

Table 3

Crude and adjusted odds ratios (OR) for vitamin D, Vitamin D binding protein, and related peptides, in relation to 'in hospital mortality' in critically ill patients.

Biomarkers	Cut-off point	'In-hospital mortality'										
		NO (n)	YES ^a (n)	ORc ^b	(95% CI)	ORa ^c	(95% CI)	ORa2 ^d	(95% CI)			
25(OH) vitamin D (ng/ml) (ref) ^e	9.81+	28	9	1	–	1	–	1	–	1	–	
25(OH) vitamin D	≤9.80	26	12	1.44	0.52	3.97	1.36	0.33	5.63	1.44	0.34	6.00
1,25 (OH) vitamin D (pg/ml) (ref)	19.01+	27	8	1	–	1	–	1	–	1	–	
1,25 (OH) vitamin D	≤19.00	27	13	1.63	0.58	4.55	1.22	0.25	5.97	1.21	0.25	6.00
Vitamin D binding protein (ng/ml) (ref)	144,394.00+	32	5	1	–	1	–	1	–	1	–	
Vitamin D binding protein	≤144,393.00	22	15	4.36	1.38	13.76	5.20	1.21	22.36	3.86	0.84	17.81
Cathelicidin (pg/ml) (ref)	1.302+	29	8	1	–	1	–	1	–	1	–	
Cathelicidin	≤1.301	25	13	1.89	0.67	5.28	1.78	0.47	6.74	1.43	0.35	5.80
Beta-defensin (pg/ml) (ref)	465.00+	27	10	1	–	1	–	1	–	1	–	
Beta-defensin	≤464.00	27	11	1.1	0.4	3.02	0.78	0.19	3.30	0.73	0.17	3.15

^a Number of non-survivals.

^b ORc denotes Crude OR. CI denotes confidence interval.

^c OR refers to OR adjusted for 1,25 (OH) vitamin D, Vitamin D binding protein and Cathelicidin when appropriate (as continuous variables), sex, age, immunosuppression status, and Charlson index, Apache II score and total volume of fluid resuscitation during first 24 ICU hours as continuous variables.

^d OR refers to OR adjusted also for hepatic failure in addition to the above variables.

^e VitD, Vitamin D binding protein and related peptides levels divided in two categories according to Median. The reference category included the highest level category.

with sepsis compared to those without sepsis. This effect was not present for 25(OH)D and cathelicidin.¹² In addition to these studies, our present study shows that, in septic shock patients, VDBP is a potential predictor of hospital mortality. Patients with low VDBP levels on admission to ICU had a six-fold higher risk of a poorer outcome. This association was not affected by the levels of other components of the vitamin D axis, or by the volume of fluid resuscitation before blood sampling. However, we must emphasize the effect that liver dysfunction presents on the association between VDBP and mortality. Although the strength of association between VDBP and in-hospital mortality (adjusted OR 3.45) remained the highest of all the studied factors, even higher than for the association of hepatic failure itself with mortality (adjusted OR 2.52), the significant association between VDBP and mortality was lost after adjusting by liver dysfunction, probably as a consequence of the limited sample size. This fact should be taken into account in future studies and in particular in clinical trials that about vitamin D supplementation in patients with sepsis are being carried out.

It has been shown that vitamin D status is associated with differential metabolic profiles during critical illness.¹³ In sepsis, in particular, it could be intimately associated with prognosis and vitamin D administration might be associated with a reduction in mortality.^{14,15} Braun et al.³ observed ICU preadmission 25(OH)D deficiency to be strongly associated with the risk of death in critical illness. They obtained 25(OH)D samples up to a year prior to ICU admission, potentially detracting from their predictive power at the time of critical illness. To resolve this limitation, the same group performed a follow-up study⁴ that examined 25(OH)D levels around the time of critical care initiation and observed a similar association. The time span from measurement to ICU admission was relatively long (14 days). More recently, Parekh observed in both, clinical and murine experimental models, vitamin D deficiency to be associated with more severe cases of sepsis and higher

mortality risk.¹⁶ In both cases, their analysis did not include information about the potential dilutional effect related to vigorous fluid resuscitation at the time of critical illness. In contrast, in our study, septic shock patients with decreased vitamin D levels demonstrated no pre-significant differences in hospital mortality. In our case, 25(OH)D levels were measured upon admission to the ICU, and results were adjusted for volume of fluid resuscitation in the patient. No differences were found for in-hospital mortality according to the 25(OH)D values. Evidently, these results may be affected by the small sample size. However, Barnett et al., in a population of 486 critically-ill patients, found no significant differences in in-hospital mortality either.¹⁷ Similarly, Azim et al. did not find a causal association between vitamin D deficiency and mortality.¹⁸ Finally, focused exclusively in critically ill patients with sepsis, both Nguyen et al. and Su et al. found no association between 25(OH)D serum levels and mortality.^{19,20} In our opinion, this discrepancy in results justifies a study that conclusively elucidates the impact of serum 25(OH)D at ICU admission on in-hospital mortality.

With respect to vitamin D related peptides, there is no doubt about the important role that both play in the immune response to the infection.²¹ However, their role in sepsis is still to be clarified. In our study, neither cathelicidin nor beta-defensin-2 levels predicted mortality, although there was a trend toward increased mortality with lower cathelicidin. The data in this regard are scarce but seem to follow the line of the results obtained in our study. Leaf et al. in 121 critically ill patients (14% with septic shock) observed low cathelicidin levels to be associated with 4 fold-higher risk of 90 day-mortality.²² Similarly, in the study published by Leow et al. in patients admitted with severe community acquired pneumonia lower values of serum cathelicidin showed a nonsignificant trend to an association with higher 30-day mortality.²³ All these results appear to be consistent with research showing that cathelicidin

supplementation is protective in murine models of sepsis²⁴ but it requires more powerful studies to confirm this assumption.

Among the limitations of our study, it must be acknowledged that the generalizability of our findings is limited by the fact that this was a single center observational study with a small sample size. A second limitation is that we did not evaluate VDBP polymorphisms. These polymorphisms result in effects on both VDBP concentrations and functional consequences, including susceptibility to infection.²⁵ Finally, our study lacks a control ICU group without sepsis to be compared with in order to obtain more conclusive results.

Conclusions

In conclusion, based on our results, VDBP could be a marker of septic shock prognosis, with better accuracy than vitamin D and vitamin D-related antimicrobial peptides. Vitamin D and peptides are not associated with septic shock mortality.

Ethics approval and consent to participate

The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki and was approved by the ethics committee of University Hospital Marqués de Valdecilla (CEIC Cantabria 2014.159).

Availability of data and materials

The dataset used and analyzed during the current study is available from the corresponding author on reasonable request.

Author contributions

Study concept and design: BS, MTGU, MS.
 Acquisition of the data: BS, AFJ, BAL, SPSM.
 Analysis and interpretation of the data: BS, MS.
 Drafting of the manuscript: BS, MS.
 Critical revision of the manuscript for important intellectual content: MTGU.
 Statistical expertise: MS.

Authors' information

Not applicable.

Consent for publication

No individual patient data were reported.

Funding sources

None.

Competing interest

The authors declare that they have no competing interests.

References

- Adams JS, Hewison M. Update in vitamin D. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010;95:471–8.
- Moromizato T, Litonjua AA, Braun AB, Gibbons FK, Giovannucci E, Christopher KB. Association of low serum 25-hydroxyvitamin D levels and sepsis in the critically ill. *Crit Care Med.* 2014;42:97–107.
- Braun A, Chang D, Mahadevappa K, Gibbons FK, Liu Y, Giovannucci E, et al. Association of low serum 25-hydroxyvitamin D levels and mortality in the critically ill. *Crit Care Med.* 2011;39:671–7.
- Braun AB, Gibbons FK, Litonjua AA, Giovannucci E, Christopher KB. Low serum 25-hydroxyvitamin D at critical care initiation is associated with increased mortality. *Crit Care Med.* 2012;40:63–72.
- Lee P, Eisman JA, Center JR. Vitamin D deficiency in critically ill patients. *N Engl J Med.* 2009;360:1912–4.
- Watkins RR, Yamshchikov AV, Lemonovich TL, Salata RA. The role of vitamin D deficiency in sepsis and potential therapeutic implications. *J Infect.* 2011;63:321–6.
- Chishimba L, Thickett DR, Stockley RA, Wood AM. The vitamin D axis in the lung: a key role for vitamin D-binding protein. *Thorax.* 2010;65:456–62.
- Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M, et al. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA.* 2016;315:801–10.
- Meier U, Gressner O, Lammert F, Gressner AM. Gc-globulin: roles in response to injury. *Clin Chem.* 2006;52:1247–53.
- Lee P. Vitamin D metabolism and deficiency in critical illness. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2011;25:769–81.
- Dahl B, Schiødt FV, Ott P, Wiens F, Lee WM, Balko J, et al. Plasma concentration of Gc-globulin is associated with organ dysfunction and sepsis after injury. *Crit Care Med.* 2003;31:152–6.
- Jeng L, Yamshchikov AV, Judd SE, Blumberg HM, Martin GS, Ziegler TR, et al. Alterations in vitamin D status and anti-microbial peptide levels in patients in the intensive care unit with sepsis. *J Transl Med.* 2009;7:28.
- Lasky-Su J, Dahlin A, Litonjua AA, Rogers AJ, McGeachie MJ, Baron RM, et al. Metabolome alterations in severe critical illness and vitamin D status. *Crit Care.* 2017;21:193.
- Putzu A, Belletti A, Cassina T, Clivio S, Monti G, Zangrillo A, et al. Vitamin D and outcomes in adult critically ill patients. A systematic review and meta-analysis of randomized trials. *J Crit Care.* 2017;38:109–14.
- Amrein K, Schnedl C, Holl A, Riedl R, Christopher KB, Pachler C, et al. Effect of high-dose vitamin D3 on hospital length of stay in critically ill patients with vitamin D deficiency: the VITDAL-ICU randomized clinical trial. *JAMA.* 2014;312:1520–30.
- Parekh D, Patel JM, Scott A, Lax S, Dancer RC, D'Souza V, et al. Vitamin D deficiency in human and murine sepsis. *Crit Care Med.* 2017;45:282–9.
- Barnett N, Zhao Z, Koyama T, Janz DR, Wang CY, May AK, et al. Vitamin D deficiency and risk of acute lung injury in severe sepsis and severe trauma: a case-control study. *Ann Intensive Care.* 2014;4:5.
- Azim A, Ahmed A, Yadav S, Baronia AK, Gurjar M, Godbole MM, et al. Prevalence of vitamin D deficiency in critically ill patients and its influence on outcome: experience from a tertiary care centre in North India (an observational study). *J Intensive Care.* 2013;1:14.
- Nguyen HB, Eshete B, Lau KH, Sai A, Villarin M, Baylink D. Serum 1,25-dihydroxyvitamin D: an outcome prognosticator in human sepsis. *PLOS ONE.* 2013;8:e64348.
- Su LX, Jiang ZX, Cao LC, Xiao K, Song JP, Li H, et al. Significance of low serum vitamin D for infection risk, disease severity and mortality in critically ill patients. *Chin Med J (Engl).* 2013;126:2725–30.
- Martin L, van Meegeren A, Doemming S, Schuerholz T. Antimicrobial peptides in human sepsis. *Front Immunol.* 2015;6:404.
- Leaf DE, Croy HE, Abrahams SJ, Raed A, Waikar SS. Cathelicidin antimicrobial protein, vitamin D, and risk of death in critically ill patients. *Crit Care.* 2015;10:80.
- Leow L, Simpson T, Cursons R, Karalus N, Hancox RJ. Vitamin D, innate immunity and outcomes in community acquired pneumonia. *Respirology.* 2011;16:611–6.
- Cirioni O, Ghiselli R, Tomasinsig L, Orlando F, Silvestri C, Skerlavaj B, et al. Efficacy of LL-37 and granulocyte colony-stimulating factor in a neutropenic murine sepsis due to *Pseudomonas aeruginosa*. *Shock.* 2008;30:443–8.
- Malik S, Fu L, Juras DJ, Karmali M, Wong BY, Gozdzik A, et al. Common variants of the vitamin D binding protein gene and adverse health outcomes. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 2013;50:1–22.

CERTIFICADO DE PARTICIPACIÓN

Las Sociedades Científicas:

Asociación Española de Biopatología Médica - Medicina de Laboratorio (AEBM-ML)
Asociación Española del Laboratorio Clínico (AEFA)

CERTIFICAN QUE:

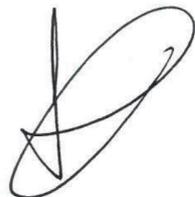
**S. PÉREZ SAN MARTÍN, B.A. LAVÍN GÓMEZ, S. DÍEZ ESPIGA, M.
ITURRALDE ROS, M. ORTIZ ESPEJO, A. MOYANO MARTÍNEZ, A.M.
PADILLA JIMÉNEZ, M.T. GARCÍA UNZUETA**

han realizado la presentación oral de la comunicación con título:

PENTRAXINA-3, NUEVO MARCADOR EN LA SEPSIS

en el **XIII Congreso Nacional del Laboratorio Clínico**,
celebrado en Sevilla del 23 al 25 de octubre de 2019.

Y para que conste se expide el presente certificado en Sevilla,
a 25 de octubre de 2019.



Santiago Prieto Menchero
Presidente AEBM-ML



Rafael Calafell Clar
Presidente AEFA

CERTIFICADO DE PARTICIPACIÓN

La Presidenta del Comité Científico del
XIV Congreso Nacional del Laboratorio Clínico

CERTIFICA QUE:

**S. PEREZ SAN MARTIN, B.A. LAVIN GOMEZ, M.T. GARCÍA UNZUETA,
A. BERJA MIGUEL, C. FERNÁNDEZ SOBALER, B. SUBERVIOLA
CAÑAS**

han presentado el PÓSTER con título:

**ESTUDIO DE LA CONCENTRACIÓN DE VITAMINA D LIBRE EN
PACIENTES CON SHOCK SEPTICO**

en el **XIV Congreso Nacional del Laboratorio Clínico**,
celebrado en formato virtual del 8 al 14 de noviembre de 2020.

Y para que conste se expide el presente certificado en Madrid,
a 14 de noviembre de 2020.

Dra. María Orera Clemente
Presidenta del Comité Científico

CERTIFICADO DE PARTICIPACIÓN

La Presidenta del Comité Científico del
XIV Congreso Nacional del Laboratorio Clínico

CERTIFICA QUE:

**S. PEREZ SAN MARTIN, B.A. LAVÍN GÓMEZ, M.T. GARCÍA UNZUETA,
A. BERJA MIGUEL, C. FERNÁNDEZ SOBALER, B. SUBERVIOLA
CAÑAS**

han presentado el PÓSTER con título:

**¿PENTRAXINA 3, MEJOR MARCADOR PRONÓSTICO QUE LA
PROCALCITONINA Y LA PCR EN SHOCK SÉPTICO?**

en el **XIV Congreso Nacional del Laboratorio Clínico**,
celebrado en formato virtual del 8 al 14 de noviembre de 2020.

Y para que conste se expide el presente certificado en Madrid,
a 14 de noviembre de 2020.

DOCUMENTO FIRMADO DIGITALMENTE

Dra. María Orera Clemente
Presidenta del Comité Científico

0341



CERTIFICADO DE PARTICIPACIÓN

Las Sociedades Científicas:

Asociación Española de Biopatología Médica - Medicina de Laboratorio (AEBM-ML)
Asociación Española del Laboratorio Clínico (AEFA)

CERTIFICAN QUE:

**S. PÉREZ SAN MARTÍN, N. FAÑANÁS RODRÍGUEZ, B.A. LAVÍN
GÓMEZ, A.R. GUERRA RUIZ, A.M. PADILLA JIMÉNEZ, M.T. GARCÍA
UNZUETA, A. BERJA MIGUEL**

han presentado el poster con título:

**ALTERACIÓN DEL METABOLISMO FOSFOCÁLCICO EN PACIENTES
CON SHOCK SÉPTICO**

en el **XIII Congreso Nacional del Laboratorio Clínico**,
celebrado en Sevilla del 23 al 25 de octubre de 2019.

Y para que conste se expide el presente certificado en Sevilla,
a 25 de octubre de 2019.

Santiago Prieto Menchero
Presidente AEBM-ML

Rafael Calafell Clar
Presidente AEFA

CONTENTS

Cited in: *Biological Abstract—Elsevier* *BIOBASE/Current Awareness in Biological Sciences—Chemical Abstracts—Current Contents/Life Sciences—EMBASE/Excerpta Medica—Index Medicus—MEDLINE—Current Clinical Chemistry—Hypomedicus—PASCALM—Reference Update—Current Clinical Cancer—Scopus*. Full text available on ScienceDirect®

Special Issue
EuroMedLab 2019

Advanced technologies, including new biomarker discovery	S1
Analytical technologies and applications	S13
Atherosclerosis, including lipids and other risk markers	S76
Audit	S85
Autoimmune diseases, including allergy	S87
Bioinformatics, including data management	S109
Biomarkers in cancer	S116
Bone metabolism	S161
Cardiovascular diseases, including cardiac markers	S170
Case report	S199
Clinical Studies - Outcomes	S260
Diabetes, obesity, metabolic syndrome	S268
Education and Training in Laboratory Medicine	S311
Endocrinology, not including diabetes	S317
Evidence based medicine, including Guidelines	S349
Gastrointestinal diseases, including hepatic and pancreatic diseases	S355
Haematology, including haemostasis	S379
Inflammation, vascular biology, endothelium, and oxidative stress	S434
Inherited disorders, metabolic disorders and rare diseases	S448
Kidney diseases	S460
Laboratory and sports medicine	S493
Laboratory management, accreditation, quality assurance	S497
Microbiology - Infectious diseases	S533
Molecular diagnostics, including epigenetics	S563
Neonatal and paediatric laboratory medicine, including prenatal testing	S584
Neurological diseases	S604
Nutrition, including vitamins and trace elements	S619
Personalised medicine, including pharmacogenetics	S640
Point of care testing, critical care, emergency medicine	S643
Total testing process, including standardisation, preanalytical process	S673
Toxicology, including therapeutic drug monitoring	S711
Other	S730
Symposia	S733
Opening Lecture – Sunday, 19 May 2019	S761
Educational workshop	S763



CLINICA CHIMICA ACTA

International Journal of
Clinical Chemistry and
Diagnostic Laboratory Medicine

Special Issue
EuroMedLab 2019


International Federation
of Clinical Chemistry
and Laboratory Medicine

The Official Journal of the International
Federation of Clinical Chemistry
and Laboratory Medicine (IFCC).



W395

Influence of immunoassay use in the determination of vitamin D

R. Lahoz Alonso, S. Górriz Pintado, J.P. Sánchez Marín, M.P. Calmarza Calmarza, S. Izquierdo Álvarez
Bioquímica Clínica, Hospital Universitario Miguel Servet, Zaragoza, Spain

Background-aim

The main circulating storage form of vitamin D is 25-hydroxyvitamin D (25(OH)D). It is present in the blood in very high concentrations with respect to the active form with a half-life of 2 to 3 weeks, being the analyte chosen for the determination of the status of vitamin D. But the methods for its measurement present problems of precision, reproducibility and standardization.

The aim of this study is to compare the values of 25(OH)D measured by IDS-iSYS 25 VitD (Vitro) and Alinity i 25-OH Vitamin D (Abbott).

Methods

Transversal descriptive observational study of 25(OH)D concentrations measured by both methods, grouping patients according to vitamin D supplementation. The results were analyzed by Bland-Altman analysis, Passing-Bablok regression, concordance correlation coefficient (CCC) and kappa (k). The statistical analysis was performed with Medcalc version 13.3.3.0.

Results

The serum samples of 184 patients were analyzed (68.5%women, 31.5%men, mean age: 58.5 ± 3.1 years). 52.7% received vitamin D supplements, with an average value of 125.9 ± 21.7 nmol/L (Vitro) and 146.4 ± 28.9 nmol/L (Abbott); in the group of patients without supplementation were 68.3 ± 11.6 and 73.2 ± 17.2 nmol/L, respectively.

The Bland-Altman analysis showed greater bias in the supplemented group.

Regarding the Passing-Bablok regression, we found proportional differences in the group under treatment. In the Cusum Test we obtained $p < .05$, rejecting the hypothesis of linearity between the methods.

The CCC in the supplemented group was 0.91 (95%CI 0.88–0.93), while for the untreated group it was 0.89 (95%CI 0.87–0.921).

Using the value of 50 nmol/L as the cutoff point, considering values below this pathological, we obtain a $k = 0.8$ in both groups.

Conclusions

In this study, we obtained lower concentrations of 25(OH)D in the Vitro test compared to Abbott. The CCC results of the supplemented group indicate a moderate agreement between methods, being in the group without supplement low. In spite of this, after evaluating the agreement in the evaluation of the vitamin D status by means of k, we obtain that this is excellent.

In conclusion, the tests present proportional errors, but this has no clinical relevance since both classify patients in the same way according to their vitamin D levels.

doi:10.1016/j.cca.2019.03.1316

W396

Vitamin D status and its association with season and hospital mortality in septic shock patients

S. Pérez San Martín, A.R. Guerra-Ruiz, B.A. Lavín Gómez, M. Iturralde Ros, A. Maiztegi Azpitarte, B. Suberviola Cañas, M.T. García Unzueta
Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, Spain

Background-aim

Vitamin D has a potential role in the regulation of inflammation and protection from infection. Recent studies in critically-ill patients that vitamin D deficiency may be associated with sepsis development and poorer outcomes.

The aim of this study was to evaluate the prevalence of vitamin D deficiency and the correlation between serum 25-hydroxyvitamin D (25(OH) D) and hospital mortality and blood culture positivity.

Methods

In a Single-centre prospective observational study that included all consecutive adult patients meeting criteria for septic shock who were admitted to the ICU. Serum samples were collected on the day of ICU admission.

Serum 25(OH)D levels were measured by a automated competitive chemiluminescence assay (Liaison System XL, Diasorin), according to the manufacturer's instructions. Serum samples were stored at -70°C and all analyses were performed at the same time.

Results

Seventy-five septic shock patients were included in the study (53 men and 22 women) with a median age at admission of 64 years.

A median 25(OH)D level of 9.0ng/mL (5.0–15.0) was found. The majority of patients were Vitamin D deficient (<20 ng/mL, 82.8%) or insufficient ($\epsilon 20$ and $\delta 30$, 14.6%), with normal 25(OH) D level (>30 ng/ml) present in only 2.6%, according to the recommendations of the Endocrine Society.

25(OH) D levels were significantly lower in winter compared to summer ($p = .006$).

There was no significant association between 25(OH) D and blood culture positivity ($p = .24$) or nosomial infection ($p = .38$).

There was no significant association between ICU length of stay and 25(OH) D level ($p = .20$) neither vitamin D status ($p = .88$).

The ICU mortality rate was 24% and the hospitality rate was 28%. No significant differences of 25(OH) D levels were found between hospital survivors and non-survivors ($p = .61$).

Conclusions

In septic shock patients, low vitamin D levels are highly prevalent and vitamin D status exhibits a strong seasonal variation, but these low vitamin D levels are not associated with bacteraemia, in-hospital mortality or ICU length of stay.

doi:10.1016/j.cca.2019.03.1317



CERTIFICADO DE PARTICIPACIÓN

La Presidenta del Comité Científico del
XII Congreso Nacional del Laboratorio Clínico

CERTIFICA QUE:

S. Pérez San Martín, A.R. Guerra Ruiz, B.A. Lavín Gómez, C. Fernández Sobaler, A. Berja Miguel, B. Paule, M.T. García Unzueta

han presentado el póster con título:

**MARCADORES DE SEPSIS EN RELACIÓN CON LA VITAMINA D Y
PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS VITAMINA D DEPENDIENTES EN
PACIENTES SÉPTICOS**

en el **XII Congreso Nacional del Laboratorio Clínico**,
celebrado en Bilbao del 24 al 26 de octubre de 2018

Y para que conste se expide el presente certificado en Bilbao,
a 26 de octubre de 2018.

Dra. María Luisa Hortas Nieto
Presidenta del Comité Científico



CERTIFICADO PARTICIPACIÓN

El Presidente del Comité Científico de la **XXV Reunión Científica de la Sociedad Andaluza de Análisis Clínicos**, y el Presidente de la SANAC

CERTIFICAN QUE:

S. Pérez San Martín, N. Fañanas Rodríguez, L. Gómez Fernández, A. Moyano Martínez, M. Rodríguez Bárcena, S. Díez Espiga

han presentado la comunicación **poster**:

ESTATUS DE LA VITAMINA D E INFLUENCIA DE LA ESTACIONALIDAD EN PACIENTES SÉPTICOS”

en la **XXV Reunión Científica de la Sociedad Andaluza de Análisis Clínicos y Medicina del Laboratorio**, celebrada en Huelva del 8 al 10 de marzo de 2018.

Y para que así conste se expide el presente certificado en Huelva, a 10 de marzo de 2018.

DOCUMENTO FIRMADO DIGITALMENTE

Dr. Manuel Rodríguez Espinosa
Presidente del Comité Científico

Dr. Cristóbal Avivar Oyonarte
Presidente de la SANAC



XI CONGRESO NACIONAL
DEL LABORATORIO CLÍNICO

15 al 17 NOVIEMBRE 2017



LABCLIN
Málaga

CERTIFICADO PARTICIPACIÓN

La Presidenta del Comité Científico del
XI Congreso Nacional del Laboratorio Clínico

CERTIFICA QUE:

**S. Pérez San Martín, B.A. Lavín Gómez, A. Ruiz Guerra, B. Suberviola Cañas,
M.T. García Unzueta, C. Fernandez Sobaler, A. Berja Miguel, J. Martínez
García**

han presentado el póster con título:

**EFEECTO PROTECTOR DE LA VDBP EN PACIENTES CON SCHOCK
SÉPTICO**

en el **XI Congreso Nacional del Laboratorio Clínico**, celebrado en Málaga del 15 al 17
de noviembre de 2017

Y para que conste se expide el presente certificado en Málaga,
a 15 de noviembre de 2017.

Dra. María Luisa Hortas Nieto
Presidenta del Comité Científico

DOCUMENTO FIRMADO DIGITALMENTE



XI CONGRESO NACIONAL
DEL LABORATORIO CLÍNICO

15 al 17 NOVIEMBRE 2017



LABCLIN
Málaga

CERTIFICADO PARTICIPACIÓN

La Presidenta del Comité Científico del
XI Congreso Nacional del Laboratorio Clínico

CERTIFICA QUE:

**S. Pérez San Martín, B.A. Lavín Gómez, A. Ruiz Guerra, B. Suberviola Cañas,
M.T. García Unzueta, C. Fernandez Sobaler, A. Berja Miguel, J. Martínez
García**

han presentado el póster con título:

**EFEECTO PROTECTOR DE LA VDBP EN PACIENTES CON SCHOCK
SÉPTICO**

en el **XI Congreso Nacional del Laboratorio Clínico**, celebrado en Málaga del 15 al 17
de noviembre de 2017

Y para que conste se expide el presente certificado en Málaga,
a 15 de noviembre de 2017.

Dra. María Luisa Hortas Nieto
Presidenta del Comité Científico

DOCUMENTO FIRMADO DIGITALMENTE

