

Vitamina D libre: una determinación en aumento

Quesada Gómez M¹, Heureux N²

1 Unidad de Gestión Clínica de Endocrinología y Nutrición - Centro de Investigación Biomédica en Red de Fragilidad y Envejecimiento Saludable (CIBERFES) - Instituto Maimónides de Investigación Biomédica de Córdoba (IMIBIC) - Hospital Universitario Reina Sofía - Córdoba (España)

2 DIASource ImmunoAssays - Louvain-la-Neuve (Bélgica)

Resumen

La vitamina D es un concepto familiar para cualquier profesional que trabaje en biología clínica, pero ahora lo es también para una gran parte de la población. Los colosales esfuerzos de investigación desarrollados durante la última década han conducido a una explosión del número de determinaciones solicitadas del metabolito más cualificado para expresar el estado corporal de la vitamina D, 25-OH vitamina D (25-OHD) libre, representa la pequeña fracción no ligada a las proteínas transportadoras. De acuerdo con la hipótesis de la hormona libre, debería ser considerada como la mejor representación del estado corporal de la vitamina D. Lamentablemente, se ha prestado poca atención a esta determinación ya que, hasta hace poco, la comunidad científica solo disponía de métodos indirectos y tediosos para medirla. Hace unos pocos años que se publicó un método de medición directa del 25-OHD libre ya disponible para efectuar estudios de investigación con resultados prometedores.

Palabras clave: cáncer colorrectal, envejecimiento, osteoporosis, gestación, infertilidad, 25-hidroxivitamina D, 25 hidroxivitamina D libre, 1,25-dihidroxivitamina D.

INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas la vitamina D ha suscitado un creciente interés, no solo en el entorno médico, sino también entre la población en general. Inicialmente, la evaluación de la vitamina D era parte de la evaluación del metabolismo óseo cuando, por ejemplo, se sospechaba raquitismo u osteomalacia, o en poblaciones en riesgo de osteoporosis¹. El 25-hidroxivitamina D (25-OHD) es el metabolito circulante de mayor concentración y vida media más larga, y se emplea para monitorizar el estado corporal de la vitamina D, aunque los pacientes con enfermedad renal crónica y sometidos a tratamiento de diálisis también son controlados mediante mediciones de la evaluación de dicho estado². En este caso, además del 25-OHD, también se mide el metabolito activo de la vitamina D, el 1,25-dihidroxivitamina D (1,25-(OH)2D), que se produce principalmente en las células del túbulo proximal de la nefrona.

En el pasado, las mediciones de vitamina D realizadas por los laboratorios era limitadas y casi siempre con fines de investigación. Desde hace unos diez años la situación ha cambiado. La petición de determinaciones ha aumentado drásticamente y en la actualidad se publican cada año más de 4.500 artículos³ sobre vitamina D, habiéndose incluso sensibilizado a la opinión pública general. Esto se debe al conocimiento de la implicación de los metabolitos de la vitamina D en múltiples procesos fisiológicos⁴, a su asociación con diversas patologías y a la divulgación de estudios clínicos, así como a la difusión del concepto de 'vitamina del sol' para la población en general.

En la actualidad, aproximadamente el 90% de las determinaciones solicitadas y realizadas en el laboratorio

se refieren a la forma 25-OHD total. Una concentración por debajo de 20 ng/mL se acepta como deficiencia, y una concentración inferior a 30 ng/mL se considera insuficiente. Los niveles ideales son los superiores a 30 ng/mL, mientras que los de toxicidad se encuentran por encima de 100-150 ng/mL. Este tema es en la actualidad motivo de debate, habiéndose descrito casos reales de intoxicación, principalmente debido a errores de formulación y/o errores en la toma diaria^{5,6}. El 10% restante de las solicitudes de metabolitos de la vitamina D lo son del metabolito activo, el 1,25-(OH)2D, las cuales en su mayor parte son solicitadas por error, por confusión entre ambos metabolitos por el prescriptor⁷. Los resultados de esas pruebas, realizados para evaluar el sistema endocrino de la vitamina D en poblaciones sanas y enfermas, siguen siendo controvertidos, y esto se debe a múltiples razones⁸.

Para facilitar el trabajo de investigadores y clínicos se han desarrollado varios ensayos nuevos. El epímero C3, un estéreo-isómero del 25-OHD, ahora se puede medir fácilmente mediante métodos de cromatografía líquida-espectrometría de masas (HPLC-MS/MS), aunque su importancia clínica no se comprende claramente⁹. El 24,25-dihidroxivitamina D (24,25-(OH)2D), que es un catabolito del 25-OHD, también se puede medir por métodos de HPLC-MS/MS, y es útil en el diagnóstico de hipercalcemia infantil idiopática¹⁰. La medición de niveles de 25-OHD biodisponible y libre también se han incorporado como nuevos marcadores del estado de la vitamina D y, aunque el concepto se conoce desde la década de los 80, no se ha estado utilizando habitualmente, debido a la falta de un método adecuado para su cuantificación¹¹.



FISIOLOGÍA DE LA VITAMINA D LIBRE

El 25-hidroxivitamina D libre (25-OHD libre) representa la fracción de 25-OHD que no está unida a proteínas ligadoras de vitamina D. Debido a su naturaleza hidrofóbica, los metabolitos de la vitamina D, especialmente el 25-OHD, se unen a proteínas transportadoras. La principal es la proteína de unión a la vitamina D (VDBP o DBP), también conocida como GC-globulina, la cual se une a todos los metabolitos de la vitamina D pero con mayor afinidad por el 25-OHD, ligando aproximadamente el 90% de su concentración circulante. La albúmina, debido a su alta concentración en sangre, aunque con una afinidad mucho menor que la VDBP por la 25-OHD, se une al 10% restante¹². Una pequeña fracción, que representa menos del 0,1% del total, circula en forma libre, no ligada¹³. La suma del 25-OHD libre y la fracción unida a la albúmina se denomina 25-OHD biodisponible, ya que se cree que el complejo albúmina-25-OHD, de baja afinidad, permite que las moléculas de 25-OHD estén

disponibles fácilmente para producir sus efectos biológicos¹⁴. Sin embargo, este concepto tiende a abandonarse a favor de la hipótesis de la hormona libre (Figura 1).

HIPÓTESIS DE LA HORMONA LIBRE

La hipótesis de la hormona libre establece que la actividad biológica de una hormona se ve afectada por su concentración no ligada a proteína (libre) en lugar de la concentración ligada a proteínas plasmáticas. En 1989, Mendel propuso que esta hipótesis "probablemente sea válida con respecto a todos los tejidos para hormonas tiroideas, cortisol y metabolitos hidroxilados de la vitamina D"¹⁵. Más tarde, Chun *et al.*¹⁶ conjeturaron que "la unión de 25-OHD a VDBP dificulta el aporte de 25-OHD a los tejidos diana, lo que finalmente impide su metabolismo a la forma activa, 1,25-(OH)₂D. Por el contrario, es la forma no ligada y libre la que puede atravesar la membrana celular y, por lo tanto, ejercer las acciones biológicas" (Figura 2).

Figura 1. Vitamina D libre y biodisponible: 25-OH vitamina D libre, biodisponible, y total. Unión de 25-OH vitamina D a albúmina y DBP (proteína transportadora de la vitamina D)

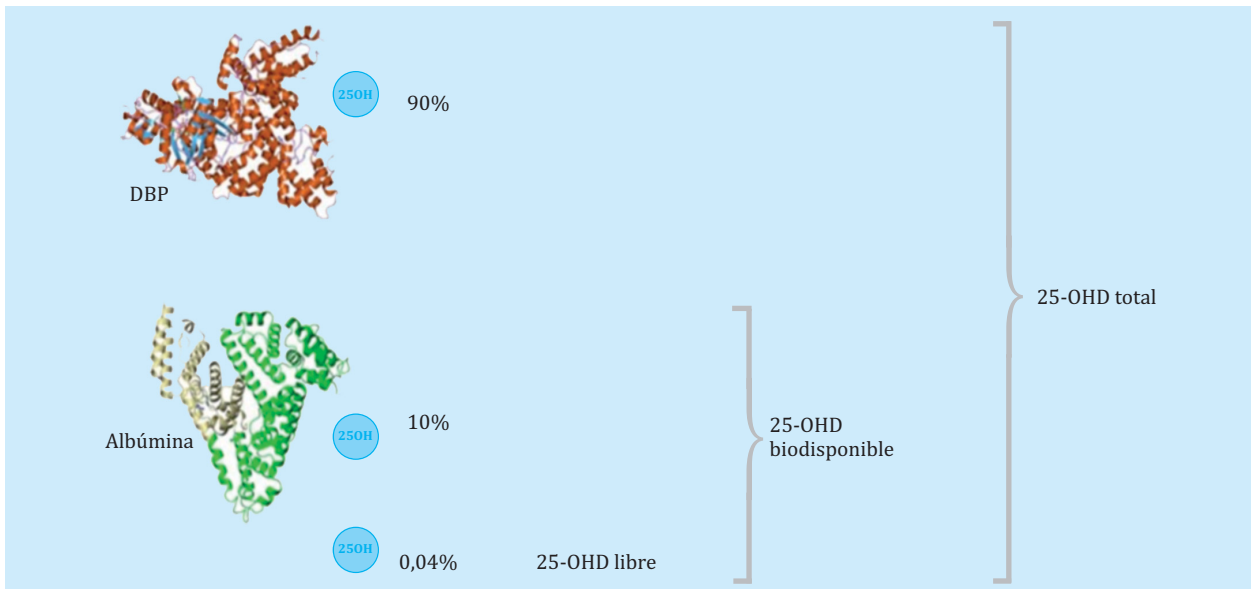
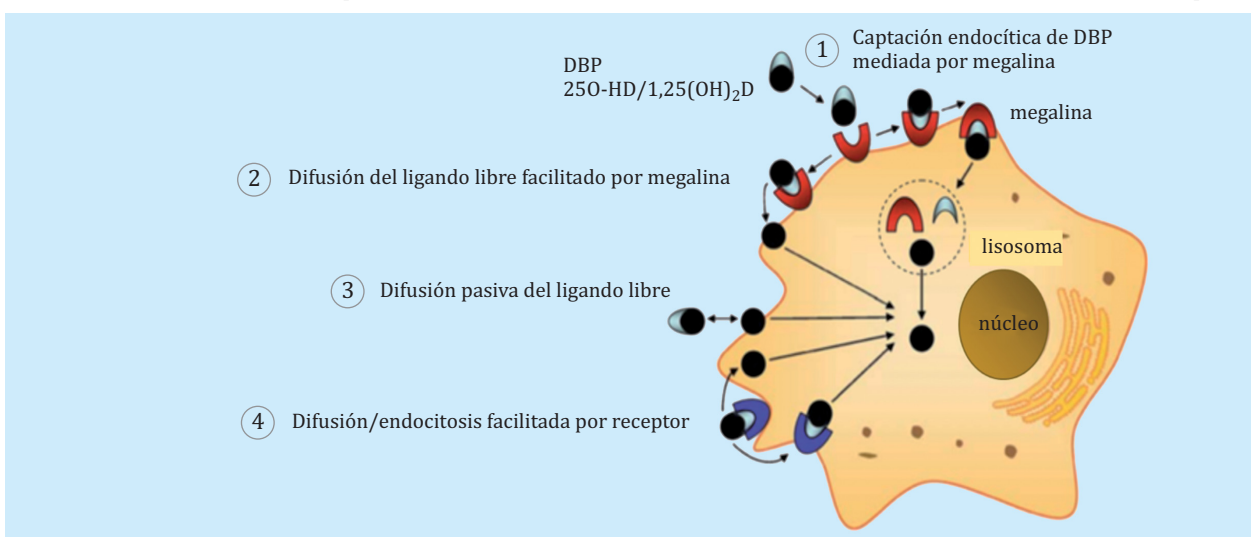


Figura 2. Mecanismos de transporte: Mecanismos mediados por receptor de membrana e independientes de receptor para la captación celular de vitamina D. Los metabolitos de la vitamina D se unen a la DBP en suero y líquido extracelular. La entrada a la célula de metabolitos de vitamina D puede ocurrir a través de uno de los mecanismos diferentes de los cuatro descritos en el esquema



Esta hipótesis de la hormona libre ha sido validada clínicamente para las hormonas tiroideas, con la aparición de ensayos para las T3 y T4 libres. Estos ensayos han reemplazado en la práctica a la mayoría de las determinaciones de T3 y T4 totales que se efectuaban previamente en laboratorios clínicos¹⁷. La historia es similar, aunque en menor medida, para la testosterona y el cortisol¹⁸. Para la vitamina D la situación es algo diferente, ya que el metabolito medido (25-OHD) no es la forma hormonalmente activa (lo es el 1,25-(OH)2D). No obstante, como explicaron previamente Chun *et al.*¹⁶, la conversión de 25-OHD en 1,25-(OH)2D, y, en consecuencia, la actividad biológica de la vitamina D, está muy influenciada por la concentración de 25-OHD libre en el plasma.

MÉTODOS PARA LA MEDICIÓN DE 25-OHD LIBRE

Históricamente se han medido los metabolitos 25-OHD y 1,25-(OH)2D libres mediante ultrafiltración centrífuga y diálisis en equilibrio usando el metabolito tritado, que constituye el inmunoensayo clásico para la medición de las concentraciones totales. Se han empleado ecuaciones simples para calcular la concentración de hormona libre¹⁹ y, aunque estos métodos proporcionan resultados fiables, son extremadamente complicados de montar, además de precisar mucho tiempo y un gran volumen de muestra, además de requerir la manipulación de material marcado con tritio y/o carbono-14. Por lo tanto, a lo largo del tiempo se han desarrollado otros métodos de cuantificación los cuales se basan en la medición del metabolito total de la vitamina D y las concentraciones de proteína ligadora, empleando las constantes de afinidad relacionadas²⁰. Mientras que en los laboratorios clínicos la cuantificación de albúmina y 25-OHD total forman parte de los análisis de rutina, la cuantificación de VDBP se basa en kits para uso tan solo en investigación (*Research Use Only, RUO*), habitualmente no validados. Los ensayos que emplean anticuerpos monoclonales han demostrado ser poco fiables, ya que no miden por igual los diferentes polimorfismos de VDBP. Sin embargo, los ensayos y las técnicas que emplean inmunodifusión radial usando anticuerpos policlonales producen excelentes resultados²⁰. Como en las diferentes muestras de suero a evaluar se encuentran formas diferentes de VDBP, y, aunque esto todavía es motivo de debate dado que estas diferentes formas tienen diferentes coeficientes de unión para 25-OHD, el cálculo de cada muestra debería incluir, idealmente, el genotipado del paciente para emplear el coeficiente apropiado²¹. En la práctica clínica esto se hace muy excepcionalmente (Figura 3).

En el año 2017 se desarrolló un nuevo método directo y se puso a disposición de la comunidad científica. La cantidad de 25-OHD libre se mide mediante el ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA; del inglés, *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*). La separación de las formas libre y unida, así como la captura de la primera, se consigue mediante el uso de un anticuerpo monoclonal (anti-25-OHD), alterando lo menos posible

el equilibrio entre ambas formas²², habiéndose validado la precisión, sensibilidad, exactitud y especificidad del ensayo. Por otro lado, esta metodología genera resultados similares a los obtenidos mediante ultrafiltración centrífuga y se ha empleado con éxito en muchos estudios clínicos. El ensayo obtuvo el marcado de Conformidad Europea (CE) de la Unión en el 2018, lo cual permite su uso en laboratorios de diagnóstico *in vitro* (IVD; del inglés, *In-Vitro Diagnostic*).

25-OHD LIBRE EN ESTUDIOS CLÍNICOS

Recientemente, Tsuprykov *et al.*²³ publicaron un método de medición directa para los 25-OHD libre y total, en una cohorte de 297 mujeres caucásicas sanas embarazadas (la edad gestacional varió desde la semana cuarta hasta la cuadragésima), junto con el 25-OHD total, y otros parámetros (Tabla 1). El 25-OHD libre se correlacionó mejor que la total con diversos parámetros, por lo que se concluyó que la monitorización óptima del estado de vitamina D en mujeres embarazadas debería consistir en mediciones de 25-OHD libre al comienzo y al final del embarazo.

El mismo año, Franasiak *et al.* estudiaron el 25-OHD libre en un pequeño grupo de pacientes infértiles²⁴. El 25-OHD libre fue calculado usando los datos de DBP obtenidos con un ensayo basado en anticuerpos, y mostró diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de infértiles y control (6,3±2,9 pg/mL vs. 4,3±1,8 pg/mL), diferencias que no se observaron para el 25-OHD total (30,3±9,8 ng/mL vs. 28,9±8,7 ng/mL). Estos resultados se explican por la menor concentración de DBP en el grupo infértil, que influye en el equilibrio entre las formas libre y unida de 25-OHD. Aunque estos datos solo representaban un estudio piloto, concluyeron que la cuantificación de 25-OHD total puede ser engañosa al evaluar el estado de la vitamina D en situaciones de infertilidad.

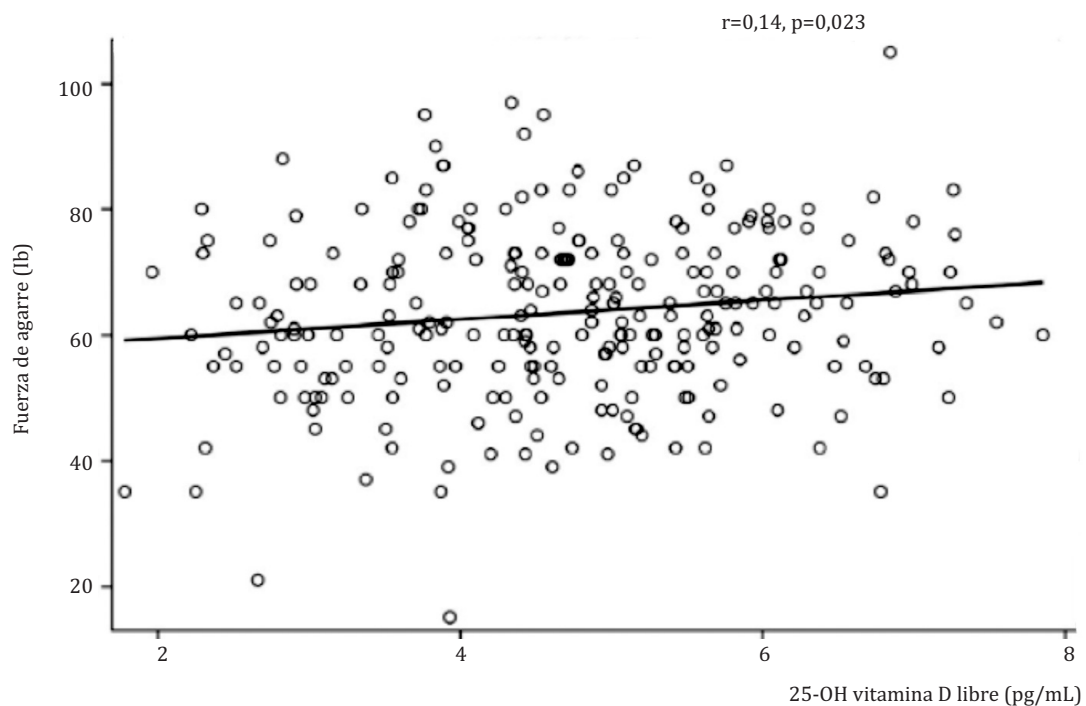
El 25-OHD libre también se ha estudiado en mujeres ancianas afroamericanas sanas mayores de 60 años²⁵, analizando la relación entre el rendimiento físico y la prevención de la osteoporosis con vitamina D en esta población. Se trata de un estudio de 3 años de duración, aleatorizado, doble ciego, controlado con placebo, que examinó el efecto de la vitamina D sobre el rendimiento físico y la pérdida ósea en 260 mujeres. El 25-OHD libre predijo significativamente la fuerza de prensión en un modelo de regresión lineal (R²=0,02; F=5,22, coeficiente de regresión [β]=1,52; p=0,023), sugiriendo que para cada incremento de 1 pg/mL de 25-OHD libre se producía un aumento en la fuerza de prensión de 1,52 lb, no encontrándose esta asociación para el 25-OHD total. Estos resultados sugieren la utilidad de 25-OHD libre como predictor del rendimiento físico con el envejecimiento de las mujeres afroamericanas. La asociación de 25-OHD libre con medidas del rendimiento de las extremidades superiores e inferiores respalda el examen adicional del papel del 25-OHD libre de suero en el rendimiento físico para prevenir la fragilidad y las fracturas en adultos mayores (Figura 4).

Figura 3. Cálculo de 25-OH de vitamina D libre. BC: coeficiente de unión. DBP: proteína transportadora de la vitamina D

$$25\text{-OHD libre} = \frac{25\text{-OHD total}}{BC \text{ albúmina} \times [\text{albúmina}] + BC \text{ DBP} \times [\text{DBP}]}$$

Tabla 1. Correlación de metabolitos de vitamina D 25-OH vitamina D total de, 25-OH vitamina D libre y 1,25(OH)₂ vitamina D con parámetros de la gestación y otros parámetros bioquímicos. En negrita, los resultados estadísticamente significativos

Parámetro	Total 25(OH)D (ng/mL)	25(OH)D libre (pg/mL)	1,25(OH) ₂ D total (pg/mL)
Edad gestacional (días)	p=0,957	p=0,003	p<0,001
Edad materna (años)	p<0,001	p<0,001	p=0,564
PTH (pg/mL)	p<0,001	p=0,010	p=0,014
Calcio (mmol/L)	p=0,238	p=0,006	p<0,001
Fosfato (mmol/L)	p=0,119	p=0,920	p=0,867
Fosfatasa alcalina (µg/mL)	p=0,037	p<0,001	p<0,001
Albumina (g/dL)	p=0,101	p=0,010	p<0,001
LDL (mg/dL)	p=0,527	p<0,001	p<0,001
Urea (mg/dL)	p=0,860	p=0,028	p<0,001
Adiponectina (µg/mL)	p=0,302	p=0,009	p=0,001
Sodio (mmol/L)	p=0,335	p=0,505	p=0,588
Vitamina B12 (pg/mL)	p=0,055	p<0,001	p<0,001
TSH (uU/mL)	p=0,319	p=0,089	p=0,816
Tiroxina libre (ng/dL)	p=0,183	p=0,033	p<0,001
Triiodotironina (pg/mL)	p=0,028	p=0,001	p=0,401
HDL (mg/dL)	p=0,001	p=0,449	p<0,001
Cociente LDL/HDL	p=0,161	p=0,003	p<0,001
Vitamina B6 (ng/mL)	p=0,024	p<0,001	p<0,001
Zinc (µmol/L)	p=0,822	p=0,090	p<0,001
Hemoglobina (g/dL)	p=0,382	p=0,065	p<0,001
Hematias (10 ⁶ /µL)	p=0,841	p=0,313	p=0,002
Leucocitos (10 ³ /µL)	p=0,789	p=0,024	p<0,001

Figura 4. Relación entre el 25-OHD libre y la fuerza de prensión²⁶

Otra aplicación, en Oncología, fue propuesta por el grupo de Yang²⁶. El objetivo de este estudio fue evaluar exhaustivamente el valor pronóstico de la VDBP, el 25-OHD total y el libre y su biodisponible en pacientes con cáncer colorrectal en los estadios I-III. Los resultados mostraron que la elevación de 25-OHD libre y su biodisponible se asoció significativamente con una mejor supervivencia a los 5 años, tras la realización de un análisis estadístico univariado. Al completar el estudio efectuando un análisis multivariado de Cox, también encontraron que los niveles altos de 25-OHD libre (HR=0,442; IC 95%=0,238-0,819; p<0,010) podría identificarse como factor independiente para predecir una mejor supervivencia. En conclusión, el estudio sugirió que niveles más altos de 25-OHD libre y biodisponible se asociaban a una mayor supervivencia en los pacientes con cáncer colorrectal en los estadios I-III. Además, el 25-OHD libre podría considerarse como un biomarcador de pronóstico independiente para supervivencia. Más recientemente se han publi-

cado muchos otros artículos incluyendo revisiones y estudios clínicos, que destacan la importancia del 25-OHD libre²⁷.

CONCLUSIÓN

Aunque el concepto de hormona libre y su importancia fisiológica y clínica se conoce desde hace mucho tiempo, el metabolito 25-OHD libre todavía es un tema relativamente nuevo de investigación. La ausencia de un procedimiento de medición directa ha sido probablemente una de las razones para explicar esta situación. Con el inmunoensayo directo ya disponible, la cantidad de estudios está creciendo rápidamente y las posibles aplicaciones clínicas están apareciendo en la literatura. El verdadero potencial de este parámetro todavía tiene que establecerse en la práctica clínica habitual, a través de estudios clínicos más amplios en áreas relevantes, principalmente en el embarazo, la fertilidad, las enfermedades renal y hepática, así como en los pacientes críticos.

►► **Conflicto de intereses:** Nicolas Heureux trabaja para DÍASource ImmunoAssays. José Manuel Quesada Gómez declara no tener conflicto de interés

Bibliografía

- Lips P, van Schoor NM. The effect of vitamin D on bone and osteoporosis. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2011;25:585-91.
- Al-Badr W, Martin KJ. Vitamin D and kidney disease. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2008;3:1555-60.
- Búsqueda en el PubMed realizada el 1 de marzo de 2018, con la palabra clave 'Vitamin D'.
- Feldman D, Pike JW, Bouillon R, Edward Giovannucci E, Goltzman D, Hewison M (eds.). *Vitamin D. Volume 1: Biochemistry, Physiology and Diagnostics.* London; Elsevier Academic Press; 2018.
- Benhamou CL, Souberbielle JC, Cortet B, Fardellone P, Gauvain JB, Thomas T, et al. La vitamine D chez l'adulte: recommandations du GRIO. *Presse Med.* 2011;40:673-82.
- Lee JP, Tansey M, Jetton JG, Krasowski MD. Vitamin D toxicity: a 16-year retrospective study at an Academic Medical Center. *Lab Med.* 2018;49:123-9.
- Dale JC. Common Test-Ordering Errors Part 1: Misordered Tests, <http://www.mayomedicallaboratories.com/articles/hotspots/2010-04borderingtests-pt1.html>, consultada el 26 de abril de 2017.
- Lucas RM, Gorman S, Black L, Neale RE. Clinical, research, and public health implications of poor measurement of vitamin D status. *J AOAC Int.* 2017; 100:1225-9.
- Bailey D, Veljkovic K, Yazdanpanah M, Adeli K. Analytical measurement and clinical relevance of vitamin D(3) C3-epimer. *Clin Biochem.* 2013;46:190-6.
- Kaufmann M, Morse N, Molloy BJ, Cooper DP, Schlingmann KP, Molin A, et al. Improved screening test for idiopathic infantile hypercalcemia confirms residual levels of serum 24,25-(OH)2 D3 in affected patients. *J Bone Miner Res.* 2017;32:1589-96.
- Chun RF, Nielson CM. Free Vitamin D: concepts, assays, outcomes, and prospects. In: Feldman D, Pike JW, Bouillon R, Edward Giovannucci E, Goltzman D, Hewison M (eds.). *Vitamin D. Volume 1: Biochemistry, Physiology and Diagnostics.* London: Elsevier Academic Press; 2018. p. 925-37.
- Pop LC, Shapses SA, Chang B, Sun W, Wang X. Vitamin D-Binding Protein in healthy pre- and postmenopausal women: relationship with estradiol concentrations. *Endocr Pract.* 2015; 21:936-42.
- 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.
- Hewison M. Ligand regulation and nuclear receptor action. In: Bunce CM, Campbell MJ (eds). *Nuclear Receptors. Current Concepts and Future Challenges.* Dordrecht: Springer Netherlands; 2010. p. 381-417.
- Mendel CM. The free hormone hypothesis: a physiologically based mathematical model. *Endocr Rev.* 1989;10: 232-74.
- 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;144:132-7.
- Shepherd HG. Practical clinical laboratory assessment of thyroid function today. *Lab Med.* 1974;5:9-12.
- Faix JD. Principles and pitfalls of free hormone measurements. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2013;27: 631-45.
- Bikle DD, Halloran BP, Gee E, Ryzen E, Haddad JG. Free 25-hydroxyvitamin D levels are normal in subjects with liver disease and reduced total 25-hydroxyvitamin D levels. *J Clin Invest.* 1986; 78:748-52.
- Nielson CM, Jones KS, Bouillon R, Chun RF, Jacobs J, Wang Y, et al. Role of assay type in determining free 25-hydroxyvitamin D levels in diverse populations. *N Engl J Med.* 2016;374:1695-6.
- Johnsen MS, Grimnes G, Figenschau Y, Torjesen PA, Almås B, Jorde R. Serum free and bio-available 25-hydroxyvitamin D correlate better with bone density than serum total 25-hydroxyvitamin D. *Scand J Clin Lab Invest.* 2014;74:177-83.
- Heureux N, Lindhout E, Swinkels L. A direct assay for measuring free 25-hydroxyvitamin D. *J AOAC Int.* 2017; 100:1318-22.
- Tsuprykov O, Buse C, Skoblo R, Haq A, Hoher B. Reference intervals for measured and calculated free 25-hydroxyvitamin D in normal pregnancy. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2018;181:80-7.
- Franasiak J, Shapses S, Sun W, Scott R, Wang X. Vitamin D binding protein is lower in infertile patients compared to fertile controls: a case control study. *Fertil Res Pract.* 2017;3:14.
- Dhaliwal R, Mikhail M, Usera G, Stolberg A, Islam S, Ragolia L, et al. The relationship of Physical performance and Osteoporosis prevention with vitamin D in older African Americans (PODA). *Contemp Clin Trials.* 2018;65:39-45.
- Yang L, Chen H, Zhao M, Peng P. Prognostic value of circulating vitamin D binding protein, total, free and bioavailable 25-hydroxy vitamin D in patients with colorectal cancer. *Oncotarget.* 2017;8:40214-21.
- Heureux N. Vitamin D testing-where are we and what is on the horizon? *Adv Clin Chem.* 2017;78:59-101.