

## Original

# Efecto de los niveles deficientes de vitamina D sobre la actividad motora y la salud vascular en ratones de ambos sexos

Julia Martín Virgala<sup>1,5</sup>, Patricia Sosa Calleja<sup>2</sup>, Sara Fernández Villabrille<sup>1,5</sup>, Beatriz Martín Carro<sup>1,5</sup>, Laura Naves Mendivil<sup>1</sup>, Nerea González García<sup>1</sup>, Cristina Alonso Montes<sup>1,5</sup>, Sara Panizo García<sup>1,5</sup>, Natalia Carrillo López<sup>1,5</sup>, María Piedad Ruiz Torres<sup>3,6</sup>, Adriana Dusso<sup>4</sup>, Manuel Naves Díaz<sup>1,5</sup>

<sup>1</sup>Unidad de Gestión Clínica de Metabolismo Óseo. Hospital Universitario Central de Asturias. Universidad de Oviedo. Instituto de Investigación Sanitaria del Principado de Asturias (ISPA). Oviedo, España. <sup>2</sup>Fundación para la Investigación Biomédica. Hospital Universitario de Getafe. Getafe, Madrid, España. <sup>3</sup>Unidad de Fisiología. Departamento de Biología de Sistemas. Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud. Universidad de Alcalá de Henares. Alcalá de Henares, Madrid, España. <sup>4</sup>Division of Endocrinology, Metabolism & Lipid Research. John T. Milliken Department of Internal Medicine. Washington University. St. Louis, EE. UU. <sup>5</sup>Redes de Investigación Cooperativa Orientadas a Resultados en Salud (RICORS) RICORS2040 (RD21/0005/0019). <sup>6</sup>Redes de Investigación Cooperativa Orientadas a Resultados en Salud (RICORS) RICORS2040 (RD21/0005/0023)

## Resumen

**Introducción:** estudios previos muestran que niveles adecuados de calcidiol se asocian con mayor fuerza muscular, mantenimiento de actividades cotidianas y menor progresión de calcificación aórtica. El objetivo de este estudio fue valorar el efecto de la deficiencia de vitamina D sobre la actividad motora y salud vascular en un modelo experimental.

**Material y métodos:** se utilizaron ratones machos y hembras FVB/N de 18 meses. Un grupo recibió dieta sin vitamina D (grupo deficiente,  $n = 20$ ) y otro grupo dieta normal (grupo control,  $n = 17$ ) durante 8 semanas. Para medir la actividad motora se utilizó una varilla de madera fijada a una mesa con una marca a 10 cm del extremo apoyado para indicar la línea de meta. Los ratones se colocaron en el extremo "abierto" de la varilla de espaldas a la meta. Después un proceso de entrenamiento previo, los animales fueron evaluados tres veces midiendo dos parámetros: tiempo de orientación (tiempo necesario para girar 180° desde la posición inicial y mirar hacia el extremo apoyado) y tiempo de transición (tiempo necesario para llegar a la meta). Al sacrificio, se extrajeron sangre y la aorta, donde se midió como marcador de fenotipo vascular la expresión génica de  $\alpha$ -actina y del miR-145. También se cuantificó la expresión génica de Runx2 para valorar el cambio de fenotipo vascular a osteogénico.

**Resultados:** los niveles de calcidiol fueron superiores en el grupo control ( $23,3 \pm 3,9$  vs.  $12,7 \pm 3,1$  ng/mL,  $p < 0,001$ ). Los tiempos de orientación ( $43 \pm 46$  vs.  $15 \pm 21$  segundos,  $p = 0,020$ ) y de transición ( $62 \pm 51$  vs.  $31 \pm 37$  segundos,  $p = 0,041$ ) fueron muy superiores en el grupo deficiente respecto al grupo control, lo que implicaría alteraciones en la actividad motora. A nivel aórtico, la expresión génica de  $\alpha$ -actina y del miR-145 se vieron muy comprometidos en el grupo deficiente como indicativos de un deterioro de la salud vascular. La expresión de Runx2 no se alteró.

**Conclusiones:** estos resultados experimentales confirman resultados clínicos previos donde mantener niveles adecuados de vitamina D previene la pérdida de funcionalidad motora y el daño vascular.

**Palabras clave:**  
Vitamina D.  
Actividad motora. Salud vascular.

Recibido: 28/08/2024 • Aceptado: 18/11/2024

Conflicto de intereses: los autores declaran no tener conflicto de interés.

Inteligencia artificial: los autores declaran no haber usado inteligencia artificial (IA) ni ninguna herramienta que use IA para la redacción del artículo.

Martín Virgala J, Sosa Calleja P, Fernández Villabrille S, Martín Carro B, Naves Mendivil L, González García N, Alonso Montes C, Panizo García S, Carrillo López N, Ruiz Torres MP, Dusso A, Naves Díaz M. Efecto de los niveles deficientes de vitamina D sobre la actividad motora y la salud vascular en ratones de ambos sexos. Rev Osteoporos Metab Miner 2024;16(4):133-139

DOI: 10.20960/RevOsteoporosMetabMiner.00060

## Correspondencia:

Manuel Naves Díaz. Unidad de Gestión Clínica de Metabolismo Óseo. Hospital Universitario Central de Asturias. Avenida de Roma, s/n. 33011 Oviedo  
e-mail: mnaves.huca@gmail.com

## INTRODUCCIÓN

El sistema endocrino de la vitamina D modula la expresión de más del 3 % de todos los genes del organismo, por lo que regula diferentes procesos fisiológicos en otros órganos y sistemas como, por ejemplo, el músculo (1). En los últimos años se ha hecho hincapié en mantener un estado adecuado de vitamina D para optimizar la fuerza muscular con objeto de reducir caídas y fracturas en población envejecida (2-4).

La vitamina D estimula la absorción de calcio del intestino y mantiene los niveles séricos de calcio que se requieren para el mantenimiento de la función muscular (5). Varios estudios *in vivo* sugieren el papel de la vitamina D en la regulación de la masa muscular y su función. Estudios observacionales demuestran que la deficiencia de vitamina D en personas de edad avanzada está asociada con una masa y fuerza muscular reducidas (6-8), un rendimiento físico más bajo (6,9), y un mayor riesgo de caídas (10). Además, un metaanálisis de 17 ensayos clínicos mostró que la suplementación con vitamina D en sujetos con niveles basales de calcidiol inferiores a 10 ng/mL tuvo un efecto positivo en la fuerza muscular de la cadera (11). Los estudios descritos anteriormente sugieren que la vitamina D puede afectar la masa muscular y su función; sin embargo, no está claro si la vitamina D desempeña un papel directo o indirecto.

En los últimos años, se le ha dado cada vez más importancia a la conversión local de calcidiol a calcitriol, el metabolito de la vitamina D más activo, que se sintetiza principalmente en el riñón a través de su precursor el calcidiol (5). Esta síntesis local se ha demostrado en varios tipos de células como en osteoblastos (12-15) y monocitos (16), lo que refuerza la importancia de alcanzar unos niveles adecuados de calcidiol en el organismo.

El sistema endocrino de la vitamina D también regula el sistema cardiovascular (17). De hecho, datos de nuestro grupo, en una cohorte de población general no seleccionada, han mostrado que los niveles adecuados de calcidiol se asocian no solo a una mayor fuerza muscular y mantenimiento de actividades cotidianas, sino también una menor progresión de calcificación aórtica (18,19).

Por tanto, el objetivo de este estudio fue valorar el efecto de la deficiencia de vitamina D sobre la actividad motora y salud vascular en un modelo experimental. Este tipo de estudios permite, con mayor precisión, limitar y controlar los posibles sesgos existentes e inherentes a los estudios epidemiológicos.

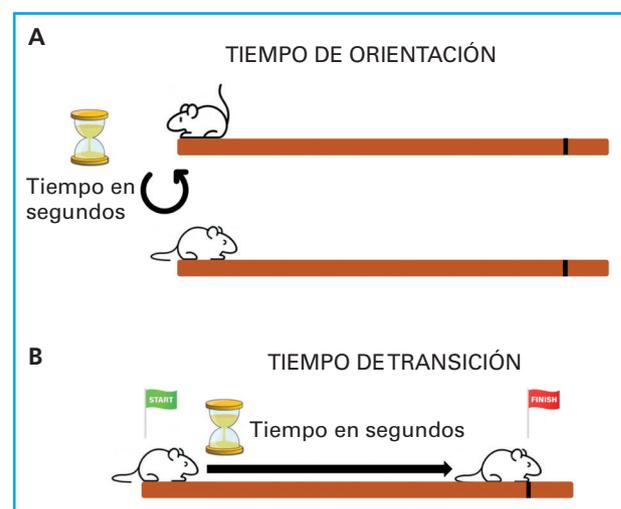
## MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron machos y hembras de la cepa de ratones FVB/N de 18 meses de edad. Un grupo recibió die-

ta deficiente en vitamina D (Teklad 2014, Vitamin D omitted, Envigo, España) (grupo deficiente,  $n = 20$ ) y otro grupo se mantuvo con dieta normal (Teklad 2014, scratch versión, Envigo) (grupo control,  $n = 17$ ) durante 8 semanas.

Para inducir la expresión de CYP24A1 o 1- $\alpha$  hidroxilasa renal con el objetivo de acelerar el catabolismo de las reservas endógenas de calcidiol y calcitriol, los animales recibieron desde el inicio de las dietas inyecciones intraperitoneales de 3 ng de 19-nor-1,25-dihidroxitamina D2 (paricalcitol; Zemplar, amablemente proporcionado por Abbott, hoy AbbVie, Lake Bluff, IL, USA) los días 1, 3, 5, 8, 10 y 12, siguiendo el protocolo utilizado por otros autores para acelerar el catabolismo de la vitamina D (20).

Al final de la última semana de tratamiento con la dieta deficiente o no en vitamina D, para medir la actividad motora se utilizó una varilla de madera (60 cm largo y 28 mm diámetro) fijada a una mesa 60 cm por encima de una superficie acolchada, con una marca a 10 cm del extremo apoyado para indicar la línea de meta (21). Los ratones se colocaron en el extremo "abierto" de la varilla de espaldas a la meta (Fig. 1). Dos semanas antes de la realización del estudio de actividad motora, se realizó un proceso de entrenamiento, aclimatando a los animales a la varilla y poniendo en la meta una golosina para premiar el esfuerzo. En el momento del estudio, los animales fueron evaluados tres veces midiendo dos parámetros: tiempo de orientación (tiempo necesario para girar 180° desde la posición inicial y mirar hacia el extremo apoyado) y tiempo de transición (tiempo necesario para llegar a la meta). Si un ratón se caía dos veces durante los tiempos de orientación o transición, se le sumaba al



**Figura 1.** Esquema para representar la actividad motora. A. El tiempo de orientación es el tiempo en segundos que el animal emplea, en darse la vuelta en la varilla, para cambiar la dirección de la marcha. B. El tiempo de transición representa el tiempo en segundos que tarda en recorrer la varilla hasta la línea de meta.

tiempo empleado 25 segundos. El tiempo que se le daba a cada ratón para realizar el total de la prueba era de 2 minutos. Al sacrificio, se extrajeron sangre y el tejido aórtico que se mantuvieron a -80 °C hasta su procesamiento.

Para las determinaciones bioquímicas en suero se utilizaron kits específicos Quanti-Chrom™ (Bioassay Systems, Hayward, CA, USA) para BUN, Ca y P. Para el resto de los marcadores bioquímicos se utilizaron kits de ELISA específico: PTH (Immutopics, Inc., San Clemente, CA, USA), FGF23 intacta (Immutopics) y calcidiol (Immunodiagnostic Systems Ltd, Scottsdale, AZ, USA).

No se incluyeron las aortas de los animales en parafina para mirar la existencia de calcificaciones, ya que el ratón no es un buen modelo para ver calcificaciones (22), salvo que sean mutantes ApoE (23). Además, en nuestro caso se trataba de ratones con función renal normal por lo que encontrar calcificaciones a este nivel y aunque los ratones fueran envejecidos, no tenía mucho fundamento.

El ARN total de riñón y aorta se extrajo utilizando el reactivo TRI (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) y se retrotranscribieron 2 µg de ARN total a ADNc utilizando el kit de transcripción inversa de alta capacidad (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA). La expresión de los genes en aorta ( $\alpha$ -actina, Runx2 y microARN (miR)-145) y en riñón (1- $\alpha$  hidroxilasa y 25- $\alpha$  hidroxilasa) se realizó mediante PCR (qPCR) utilizando ensayos prediseñados (Applied Biosystems) en un equipo Stratagene Sistema QPCR Mx3005P (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Todas las reacciones fueron realizadas por triplicado. La expresión genética relativa se cuantificó mediante el método  $\Delta\Delta CT$  utilizando como gen constitutivo GAPDH y U6 en el caso del microRNA (Applied Biosystems) y se expresaron con unidades relativas (U.R.) (24).

## ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis de los datos se llevó a cabo utilizando la versión 25.0 de SPSS para Windows. Las variables cuanti-

tativas se analizaron mediante t de Student utilizando el punto de corte  $p < 0,05$  para resaltar las diferencias estadísticamente significativas.

## RESULTADOS

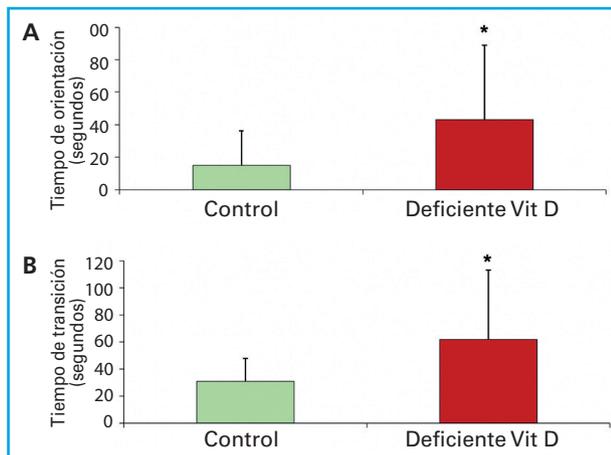
A nivel bioquímico no hubo diferencias entre los ratones que recibieron la dieta deficiente y normal en vitamina D ni en la función renal medida por BUN, ni en los niveles séricos de calcio, fósforo, PTH o FGF23 (Tabla I). Como era de esperar, los niveles de calcidiol fueron significativamente superiores en el grupo que recibió la dieta normal en vitamina D que en los que recibieron la dieta deficiente en vitamina D ( $23,3 \pm 3,9$  vs.  $12,7 \pm 3,1$  ng/mL,  $p < 0,001$ ) (Tabla I).

Al estudiar los parámetros de actividad muscular, se pudo objetivar que los tiempos de orientación ( $43 \pm 46$  vs.  $15 \pm 21$  segundos,  $p = 0,020$ ) y de transición ( $62 \pm 51$  vs.  $31 \pm 37$  segundos,  $p = 0,041$ ) fueron superiores significativamente en el grupo con dieta deficiente en vitamina D respecto a los que tomaron la dieta normal (Fig. 2). El tiempo mínimo empleado por los ratones para realizar la orientación fue de 2 segundos y para realizar la transición fue de 6 segundos. En ambos casos, el tiempo máximo empleado fue de 120 segundos. El 35 % de los ratones del grupo con dieta deficiente no fueron capaces de finalizar el recorrido, mientras que este porcentaje fue del 17,6 % en los que recibieron la dieta normal en vitamina D.

A nivel aórtico, la expresión génica de  $\alpha$ -actina, marcador de fenotipo vascular, se vio muy comprometida en el grupo que recibió la dieta deficiente en vitamina D ( $2,05 \pm 1,48$  vs.  $0,98 \pm 0,51$  U.R.,  $p = 0,041$ ). La expresión de miR-145, principal miR que regula el fenotipo contráctil también mostró un comportamiento similar al de la  $\alpha$ -actina, mostrando un claro descenso en la expresión de este miR en los ratones que recibieron la dieta deficiente ( $1,70 \pm 1,72$  vs.  $0,76 \pm 0,34$  U.R.,  $p = 0,048$ ). La expresión de Runx2 no se encontró alterada (Fig. 3).

Tabla I. Marcadores bioquímicos del estudio experimental en ratones con dieta normal y deficiente en vitamina D

Marcadores bioquímicos	Grupo dieta normal (n = 17)	Grupo dieta deficiente (n = 20)	Valor de p
BUN (mg/dL)	23,2 ± 4,5	22,7 ± 3,8	0,846
Calcio (mg/dL)	9,1 ± 0,6	8,9 ± 0,8	0,563
Fósforo (mg/dL)	5,3 ± 1,2	5,4 ± 1,3	0,929
PTH (pg/mL)	173 ± 58	202 ± 104	0,513
FGF23 (pg/mL)	239 ± 124	288 ± 58	0,398
Calcidiol (ng/mL)	23,3 ± 3,9	12,7 ± 3,1	< 0,001



**Figura 2.** Tiempo de orientación (A) y tiempo de transición (B) utilizados para medir la actividad motora en una varilla de madera en los grupos de ratones con dieta deficiente y no deficiente en vitamina D. \* $p < 0,05$  respecto al grupo control (grupo con dieta normal en vitamina D).

A nivel renal, la expresión génica de 1- $\alpha$  hidroxilasa y 25- $\alpha$  hidroxilasa no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre los animales con deficiencia o sin deficiencia de vitamina D, si bien en el caso de la 1- $\alpha$  hidroxilasa, el grupo deficiente en vitamina D tuvo un descenso en su expresión génica del 39 % ( $1,83 \pm 2,19$  vs.  $3,00 \pm 4,77$  U.R.,  $p = 0,413$ ). Este descenso fue del 23 % para la 25- $\alpha$  hidroxilasa ( $1,60 \pm 2,39$  vs.  $2,08 \pm 2,00$  U.R.,  $p = 0,586$ ).

## DISCUSIÓN

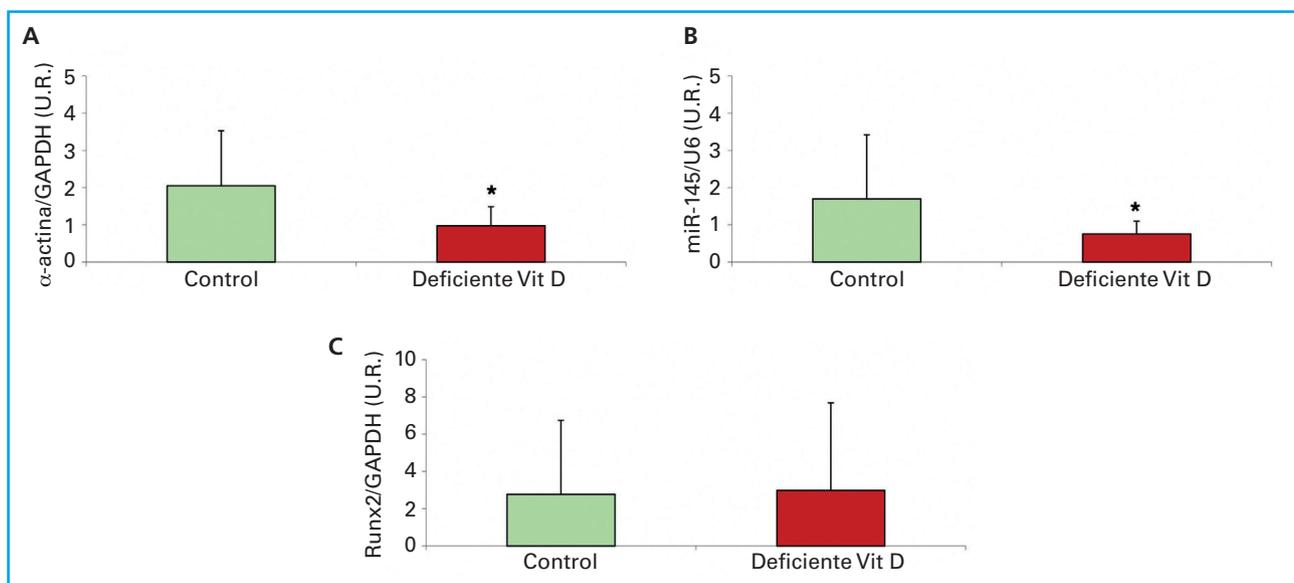
Estos resultados experimentales confirman resultados clínicos previos, donde mantener niveles adecuados de

vitamina D previene la pérdida de funcionalidad motora y el daño vascular.

Por un lado, hemos objetivado en ratones envejecidos cómo la falta de vitamina D condiciona la movilidad tanto el orientarse como realizar un determinado recorrido. Hace unos años, nuestro grupo publicó un artículo en población general describiendo cómo los niveles deficientes de vitamina D se asociaban con una menor fuerza de agarre en las manos, pero también una mayor dificultad para realizar actividades de la vida diaria lo que parece corroborarse con los datos de este estudio experimental (18).

La deficiencia de vitamina D es común en personas mayores y puede contribuir a un deterioro muscular mediante lo que se denomina sarcopenia (25,26). Todo ello lleva aparejado una serie de efectos devastadores con un incremento en la necesidad de atención de las personas mayores y un aumento de la morbimortalidad (25). Por otra parte, no debemos olvidar que las personas mayores corren un mayor riesgo de sufrir deficiencia de vitamina D debido a factores intrínsecos relacionados con la edad como cambios en la síntesis de vitamina D o exposición reducida a la luz solar (27). Si bien, un reciente metaanálisis cuestiona la utilidad de los suplementos de vitamina D para reducir el riesgo de caídas, disminución de la densidad mineral ósea (DMO) y fracturas, existen suficientes argumentos que evidencian la importancia de la vitamina D sobre la salud muscular y ósea (28).

Aunque sigue siendo controvertido si el receptor de la vitamina D (VDR) se expresa en el músculo, hay autores que han encontrado niveles significativamente más altos de VDR en el músculo de ratones jóvenes, lo que respalda un efecto predominante-



**Figura 3.** Expresión génica relativa de  $\alpha$ -actina (A); miR-145 (B) y Runx2 (C) en las aortas de ratones con dieta normal y deficiente en vitamina D. \* $p < 0,05$  respecto al grupo control (grupo con dieta normal en vitamina D).

mente pleiotrópico en este tejido (29-31). Además, se conoce que la expresión de VDR en el músculo disminuye con la edad (32,33), interpretando los autores que el sistema musculoesquelético es más vulnerable a los niveles bajos de vitamina D en el anciano. El músculo esquelético parece constituir un importante lugar de almacenamiento de vitamina D, pudiendo volver a difundirse a la circulación o posiblemente a zonas adyacentes siguiendo señales específicas (34,35).

No fuimos capaces de apreciar un descenso en los niveles de expresión de  $1-\alpha$  hidroxilasa a nivel renal en los ratones deficientes de vitamina D, si bien hubo una tendencia a un descenso probablemente debido a la falta del sustrato calcidiol para su conversión a la forma metabólicamente más activa o calcitriol. Por otro lado, no debemos olvidar que el músculo expresa la enzima  $1-\alpha$  hidroxilasa, lo que facilitaría la síntesis local del calcitriol (30,36,37), sobre todo en los ratones con niveles adecuados de calcidiol.

Si bien el ratón no es un buen modelo para estudiar la calcificación vascular por la resistencia que poseen a calcificar, sí que hemos objetivado modificaciones a nivel molecular que indican una alteración a nivel vascular. Los importantes descensos (más del 50 %) en la expresión del marcador más específico de fenotipo contráctil en los ratones deficientes en vitamina D,  $\alpha$ -actina, podrían indicar que aparecen señales de una transformación de fenotipo vascular a otro fenotipo óseo, si bien los niveles de Runx2 no se vieron incrementados. Por otro lado, es interesante destacar la importante bajada en la expresión del miR-145, principal miR regulador del fenotipo vascular. Hay evidencias, recientemente publicadas por nuestro grupo, que indican que en el proceso de cambio de fenotipo vascular a óseo el primer cambio a nivel molecular que se produce es la pérdida del miR-145, con anterioridad a los descensos de  $\alpha$ -actina o el aumento de los depósitos intracelulares de calcio (38).

Por tanto y como hemos objetivado, mantener niveles adecuados de miR-145 parece fundamental para mantener una salud vascular adecuada. De entre los inductores de la expresión del miR-145 se encuentra la vitamina D. De hecho, se ha descrito que miR-145 media los efectos antiproliferativos y reguladores de genes de la vitamina D, por lo que sugieren su utilidad para el pronóstico y desarrollo de estrategias terapéuticas para el tratamiento del cáncer gástrico (39). Recientemente, nuestro grupo publicó un artículo donde en células de músculo liso vascular la administración de vitamina D pudo prevenir las reducciones en el contenido aórtico de miR-145 y  $\alpha$ -actina inducidas por la uremia, reduciendo las alteraciones en contractilidad vascular y diferenciación osteogénica (40).

Como ya han señalado otros autores (41), hay varios mecanismos que ayudan a comprender los vínculos entre la deficiencia de vitamina D y enfermedades

cardiovasculares. La deficiencia de vitamina D conduce a la estimulación de la transcripción del gen PTH, lo que a su vez promueve la hipertrofia de miocitos y mecanismos inflamatorios que involucran a células del músculo liso vascular en su desarrollo. El sistema endocrino de la vitamina D también induce la supresión de procesos inflamatorios, lo que se ha establecido como un mecanismo patogénico clave en la aterosclerosis, pudiendo ejercer un efecto antiproliferativo sobre la hipertrofia y proliferación de las células del miocardio, originando daño cardíaco (41).

Como posibles limitaciones del estudio no podemos olvidar que la dificultad de extrapolar los resultados de un modelo en roedores al humano, sin embargo, creemos que estos resultados confirman los observados en estudios clínicos, con la ventaja en el modelo animal de tener más controlados los posibles sesgos de confusión inherentes a los estudios con pacientes. Del mismo modo, el modelo del ratón no es el más adecuado para estudiar el proceso de calcificación vascular al ser un modelo resistente a la misma. No obstante, los resultados encontrados sí nos muestran alteraciones a nivel vascular que podrían indicar ese cambio de fenotipo vascular que pudiera ser el inicio del proceso de calcificación vascular.

Como conclusiones de este trabajo, podemos afirmar que el déficit de vitamina D en un modelo de ratón envejecido fue capaz de alterar la funcionalidad motora de los animales y que a nivel vascular estas alteraciones motoras se vieron acompañadas de cambios en el fenotipo vascular con una pérdida clara tanto de la  $\alpha$ -actina, principal proteína contráctil de las células de músculo liso vascular de las aortas, y del miR-145, principal miR que regula el fenotipo vascular.

## AGRADECIMIENTOS

Este estudio ha sido financiado por el Instituto de Salud Carlos III (ISCIII)-Fondo de Investigación Sanitaria (PI16/00637, PI17/00715, PI17/00384 y PI19/00532), Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER), Plan de Ciencia, Tecnología e Innovación 2013-2017 y 2018-2022 del Principado de Asturias (GRUPIN14-028, IDI-2018-000152, IDI-2021-000080, IDE/2024/000706), Fundación Renal Ínigo Álvarez de Toledo (FRIAT), Retic REDinREN del ISCIII (RD16/0009/0017 y RD16/0009/0018) y RICORS2040 (Kidney Disease; RD21/0005/0019 y RD21/0005/0023). Sara Panizo García y Natalia Carrillo López son investigadoras postdoctorales Miguel Servet. Cristina Alonso Montes es investigadora postdoctoral del Instituto de Investigación Sanitaria del Principado de Asturias. Julia Martín Vírjala y Beatriz Martín Carro son investigadoras postdoctorales por RICORS2040 (Kidney Disease; RD21/0005/0019). Sara Fernández Villabrille es investigadora predoctoral Severo Ochoa del Principado de Asturias. Nerea González García es investigadora predoctoral PFIS asociada al proyecto PI22/00195.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Casado E, Quesada JM, Naves M, Peris P, Jódar E, Giner M, et al. Recomendaciones de la SEIOMM en la prevención y tratamiento del déficit de vitamina D. *Rev Osteoporos Metab Miner* 2021;13:84-97. DOI: 10.4321/S1889-836X2021000200007
2. Morgan KT. Nutritional determinants of bone health. *J Nutr Elder* 2008;27:3-27. DOI: 10.1080/0161639360802059670
3. Lips P, van Schoor NM. The effect of vitamin D on bone and osteoporosis. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2011;25:585-91. DOI: 10.1016/j.beem.2011.05.002
4. Bischoff-Ferrari HA. Relevance of vitamin D in muscle health. *Rev Endocr Metab Disord* 2012;13:71-7. DOI: 10.1007/s11154-011-9200-6
5. Lips P. Vitamin D physiology. *Prog Biophys Mol Biol* 2006;92:4-8. DOI: 10.1016/j.pbiomolbio.2006.02.016
6. Tieland M, Brouwer-Brolsma EM, Nienaber-Rousseau C, van Loon LJ, de Groot LC. Low vitamin D status is associated with reduced muscle mass and impaired physical performance in frail elderly people. *Eur J Clin Nutr* 2013;67:1050-5. DOI: 10.1038/ejcn.2013.144
7. Bischoff HA, Stahelin HB, Urscheler N, Ehrensam R, Vonthein R, Perrig-Chiello P, et al. Muscle strength in the elderly: Its relation to vitamin D metabolites. *Arch Phys Med Rehabil* 1999;80:54-8. DOI: 10.1016/S0003-9993(99)90307-6
8. Zamboni M, Zoico E, Tosoni P, Zivelonghi A, Bortolani A, Maggi S, et al. Relation between vitamin D, physical performance, and disability in elderly persons. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2002;57:M7-11. DOI: 10.1093/gerona/57.1.M7
9. Wicherts IS, van Schoor NM, Boeke AJ, Visser M, Deeg DJ, Smit J, et al. Vitamin D status predicts physical performance and its decline in older persons. *J Clin Endocrinol Metab* 2007;92:2058-65. DOI: 10.1210/jc.2006-1525
10. Snijder MB, van Schoor NM, Pluijm SM, van Dam RM, Visser M, Lips P. Vitamin D status in relation to one-year risk of recurrent falling in older men and women. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;91:2980-5. DOI: 10.1210/jc.2006-0510
11. Stockton KA, Mengersen K, Paratz JD, Kandiah D, Bennell KL. Effect of vitamin D supplementation on muscle strength: A systematic review and meta-analysis. *Osteoporos Int* 2011;22:859-71. DOI: 10.1007/s00198-010-1407-y
12. Howard GA, Turner RT, Sherrard DJ, Baylink DJ. Human bone cells in culture metabolize 25-hydroxyvitamin D3 to 1, 25-dihydroxyvitamin D3 and 24, 25-dihydroxyvitamin D3. *J Biol Chem* 1981;256:7738-40. DOI: 10.1016/S0021-9258(18)43337-6
13. van Driel M, Koedam M, Buurman CJ, Hewison M, Chiba H, Uitterlinden AG, et al. Evidence for auto/paracrine actions of vitamin D in bone: 1αhydroxylase expression and activity in human bone cells. *FASEB J* 2006;20:2417-9. DOI: 10.1096/fj.06-6374fje
14. Atkins GJ, Anderson PH, Findlay DM, Welldon KJ, Vincent C, Zannettino AC, et al. Metabolism of vitamin D3 in human osteoblasts: Evidence for autocrine and paracrine activities of 1α, 25-dihydroxyvitamin D3. *Bone* 2007;40:1517-28. DOI: 10.1016/j.bone.2007.02.024
15. van der Meijden K, Lips P, van Driel M, Heijboer AC, Schulten EA, den Heijer M, et al. Primary human osteoblasts in response to 25-Hydroxyvitamin D3, 1, 25-Dihydroxyvitamin D3 and 24R, 25-Dihydroxyvitamin D3. *PLoS ONE* 2014;9:e110283. DOI: 10.1371/journal.pone.0110283
16. Bacchetta J, Sea JL, Chun RF, Lisse TS, Wesseling-Perry K, Gales B, et al. Fibroblast growth factor 23 inhibits extrarenal synthesis of 1,25-dihydroxyvitamin D in human monocytes. *J Bone Miner Res* 2013;28:46-55. DOI: 10.1002/jbmr.1740
17. Wang Y, DeLuca HF. Is the vitamin D receptor found in muscle? *Endocrinology* 2011;152(2):354-63. DOI: 10.1210/en.2010-1109
18. Gómez Alonso C, Díaz López JB, Rodríguez Rebollar A, Martínez Arias L, Martín Virgala J, Martín Carro B, et al. Niveles de calcidiol y mantenimiento de la función muscular, capacidad funcional y densidad mineral ósea en población española no seleccionada. *Rev Osteoporos Metab Miner* 2019;11:6-11. DOI: 10.4321/s1889-836x2019000100002
19. Naves Díaz M, Cabezas Rodríguez I, Barrio Vázquez S, Fernández E, Díaz López JB, Cannata Andía JB. Low calcidiol levels and risk of progression of aortic calcification. *Osteoporos Int* 2012;23:1177-82. DOI: 10.1007/s00198-011-1550-0
20. Stavenuiter AWD, Arcidiacono MV, Ferrantelli E, Keuning ED, Vila Cuenca M, ter Wee PM, et al. A novel rat model of vitamin D deficiency: safe and rapid induction of vitamin D and calcitriol deficiency without hyperparathyroidism. *Biomed Res Int* 2015;2015:604275. DOI: 10.1155/2015/604275
21. Alcalde-Estévez E, Sosa P, Asenjo-Bueno A, Plaza P, Valenzuela PL, Naves-Díaz M, et al. Dietary phosphate restriction prevents the appearance of sarcopenia signs in old mice. *J Cachexia Sarcopenia Muscle* 2023;14:1060-74. DOI: 10.1002/jcsm.13194
22. Lau WL, Linnes M, Chu EY, Foster BL, Bartley BA, Somerman MJ, et al. High phosphate feeding promotes mineral and bone abnormalities in mice with chronic kidney disease. *Nephrol Dial Transpl* 2013;28:62-9. DOI: 10.1093/ndt/gfs333
23. Nakashima Y, Plump AS, Raines EW, Breslow JL, Ross R. ApoE-deficient mice develop lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1994;14:133-40. DOI: 10.1161/01.ATV.14.1.133
24. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>(Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001;25:4028. DOI: 10.1006/meth.2001.1262
25. Sohl E, van Schoor NM, de Jongh RT, Visser M, Deeg DJ, Lips P. Vitamin D status is associated with functional limitations and functional decline in older individuals. *J Clin Endocrinol Metab* 2013;98:E1483-90. DOI: 10.1210/jc.2013-1698
26. Visser M, Deeg DJ, Lips P. Low vitamin D and high parathyroid hormone levels as determinants of loss of muscle strength and muscle mass (sarcopenia): the Longitudinal Aging Study Amsterdam. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:5766-72. DOI: 10.1210/jc.2003-030604
27. Girgis CM. Vitamin D and muscle function in the elderly: the elixir of youth? *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2014;17:546-50. DOI: 10.1097/MCO.0000000000000104
28. Bolland MJ, Grey A, Avenell A. Effects of vitamin D supplementation on musculoskeletal health: a systematic review, meta-analysis, and trial sequential analysis. *Lancet Diabetes Endocrinol* 2018;6:847-58. DOI: 10.1016/S2213-8587(18)30265-1
29. Choi M, Park H, Cho S, Lee M. Vitamin D3 supplementation modulates inflammatory responses from the muscle damage induced by high-intensity exercise in SD rats. *Cytokine* 2013;63:27-35. DOI: 10.1016/j.cyto.2013.03.018
30. Srikuea R, Zhang X, Park-Sarge OK, Esser KA. VDR and CYP27B1 are expressed in C2C12 cells and regenerating skeletal muscle: potential role in suppression of myoblast proliferation. *Am J*

- Physiol Cell Physiol 2012;303:C396-C405. DOI: 10.1152/ajpcell.00014.2012
31. Stratos I, Li Z, Herlyn P, Rotter R, Behrendt AK, Mittlmeier T. Vitamin D increases cellular turnover and functionally restores the skeletal muscle after crush injury in rats. *Am J Pathol* 2013;182:895-904. DOI: 10.1016/j.ajpath.2012.11.006
  32. Bischoff HA, Borchers M, Gudat F, Duermueller U, Theiler R, Stahelin HB, et al. In situ detection of 1,25-dihydroxyvitamin D3 receptor in human skeletal muscle tissue. *Histochem J* 2001;33:19-24. DOI: 10.1023/A:1017535728844
  33. Montero-Odasso M, Duque G. Vitamin D in the aging musculoskeletal system: an authentic strength preserving hormone. *Mol Aspects Med* 2005;26:203-19. DOI: 10.1016/j.mam.2005.01.005
  34. Abboud M, Puglisi DA, Davies BN, Rybchyn M, Whitehead NP, Brock KE, et al. Evidence for a specific uptake and retention mechanism for 25-Hydroxyvitamin D (25OHD) in skeletal muscle cells. *Endocrinology* 2013;154:3022-30. DOI: 10.1210/en.2012-2245
  35. Girgis CM, Mokbel N, Minn Cha K, Houweling PJ, Abboud M, Fraser DR, et al. The vitamin D receptor (VDR) is expressed in skeletal muscle of male mice and modulates 25-hydroxyvitamin D (25OHD) uptake in myofibers. *Endocrinology* 2014;155:3227-7. DOI: 10.1210/en.2014-1016
  36. Girgis CM, Clifton-Bligh RJ, Mokbel N, Cheng K, Gunton JE. Vitamin D signaling regulates proliferation, differentiation, and myotube size in C2C12 skeletal muscle cells. *Endocrinology* 2014;155:347-57. DOI: 10.1210/en.2013-1205
  37. Ceglia L, Niramitmahapanya S, Morais MD, Rivas DA, Harris SS, Bischoff-Ferrari H, et al. A randomized study on the effect of vitamin D3 supplementation on skeletal muscle morphology and vitamin D receptor concentration in older women. *J Clin Endocrinol Metab* 2013;98:E1927-E35. DOI: 10.1210/jc.2013-2820
  38. Fernández Villabrille S, Martín Carro B, Martín Virgala J, Alonso Montes C, Fernández Fernández A, Martínez Salgado C, et al. Phosphorus may induce phenotypic transdifferentiation of vascular smooth muscle cells through the reduction of microRNA-145. *Nutrients* 2023;15:2918. DOI: 10.3390/nu15132918
  39. Chang S, Gao L, Yang Y, Tong D, Guo B, Liu L, et al. MiR-145 mediates the antiproliferative and gene regulatory effects of vitamin D3 by directly targeting E2F3 in gastric cancer cells. *Oncotarget* 2015;6:7675-85. DOI: 10.18632/oncotarget.3048
  40. Carrillo López N, Panizo S, Arcidiacono MV, de la Fuente S, Martínez Arias L, Ottaviano E, et al. Vitamin D treatment prevents uremia-induced reductions in aortic microRNA-145 attenuating osteogenic differentiation despite hyperphosphatemia. *Nutrients* 2022;14:2589. DOI: 10.3390/nu14132589
  41. Wang TJ, Pencina MJ, Booth SL, Jacques PF, Ingelsson E, Lanier K, et al. Vitamin D deficiency and risk of cardiovascular disease. *Circulation* 2008;117:503-11. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.107.706127