

Implicaciones de la vitamina D₃ en la Reproducción Humana

The role of Vitamin D₃ on human reproduction

Vicente López Villaverde, M^a Teresa Hato Castro

Embryocenter . Centro de inseminación y transferencia embrionaria. Sevilla

RESUMEN

Esta revisión bibliográfica ofrece una actualización sobre la implicación de la Vitamina D₃ (VD₃) en el ámbito de la reproducción humana y sintetiza los conocimientos existentes en la bibliografía al respecto. Para ello se han realizado búsquedas en las bases de datos Pubmed y Science Direct, y en base a los estudios y revisiones analizadas, se ha evaluado la influencia de la VD₃ en la fertilidad masculina, femenina y en algunas patologías reproductivas: síndrome de ovario poliquístico (SOP), endometriosis, miomas uterinos , fallos implantatorios y FIV.

(Rev. Iberoam. Fert Rep Hum, 2016; **33**; 9-32 © Revista Iberoamericana de Fertilidad y Reproducción Humana)

Palabras clave: *Vitamina D₃, Reproducción masculina, Reproducción femenina, Síndrome de ovario poliquístico (SOP), Reserva ovárica, Endometriosis, Mioma uterino, Implantación humana, FIV.*

SUMMARY

This literature review aims to offer an update on the role of Vitamin D₃ (VD₃) on human reproduction and summarises the current knowledge regarding VD₃ that can be found on related publications. To this end, the databases Pubmed and Science Direct have been used to search for studies and reviews,

Aceptado: 10 Mayo 2016

Correspondencia: Dr. Vicente López Villaverde

vlopezvilla@embryocenter.es

Embryocenter . Avenida de Cádiz 27/29, 41004. Sevilla

SOLICITUD REIMPRESIÓN: Email: editorialmedica@editorialmedica.com

which have been used to evaluate the influence of VD₃ on male and female fertility, as well as in some female reproductive pathologies: polycystic ovary syndrome (PCOS), endometriosis, uterine leiomyoma, and IVF.

(Rev. Iberoam. Fert Rep Hum, 2016; 33; 9-32 © Revista Iberoamericana de Fertilidad y Reproducción Humana)

Key words: Vitamin D₃, Male reproduction, Female reproduction, polycystic ovary syndrome (PCOS), ovarian reserve, endometriosis, uterine leiomyoma, Human implantation, IVF.

INTRODUCCIÓN

Clásicamente, la deficiencia severa de la Vitamina D₃ (VD₃) era reconocida por su efecto negativo sobre la mineralización ósea (1,2) que se manifestaba clínicamente por el raquitismo en los niños y la osteomalacia en los adultos.

En épocas más recientes, un nuevo y creciente interés ha surgido como consecuencia de que sus bajos niveles en suero se han asociado con otras manifestaciones, no clásicas, como tipos comunes de cáncer, enfermedades alérgicas, infecciones, trastornos autoinmunes, enfermedades cardiovasculares (3-9) e incluso patologías asociadas al proceso reproductivo (10).

Estos aspectos , junto con la elevada prevalencia de su déficit , que fue considerada en la 14^a Reunión de Consenso en Vitamina D como “un importante problema de salud “ (11) y valorada en la actualidad como de epidemia a nivel global (9), ha suscitado un interés creciente que ha multiplicado por 4 los artículos recogidos en los últimos 15 años, no solo desde una perspectiva global, sino también desde un enfoque más particularizado para la salud reproductiva (Figuras 1 y 2) (PubMed 2016)

Sin embargo, los estudios epidemiológicos no han sido homogéneos para definir el límite del déficit; mientras que algunos lo estimaban por debajo de 12 ng/ml, como se estableció en la 14^a Reunión de Consenso en Vitamina D, otros lo hacían siguiendo las recomendaciones de la “Endocrine Society of North America”, en valores de menos de 20 ng/ml, dejando el término de insuficiencia para valores entre 20-30 ng/ml (12). Además, otras variables de confusión, relacionadas con el estilo de vida o la etnia, posiblemente hayan contribuido a distorsionar aún más la magnitud de su prevalencia. En este sentido, Garbedian y colaboradores (13) comentaron que el bajo número de mujeres con deficiencia de VD₃ observado en su estudio (1,2 %) era debido al incremento en el uso de vitaminas prenatales diarias de su muestra poblacional; y respecto a la influencia de la etnia, las mujeres afroamericanas por su color de piel tienen una probabilidad 10 veces superior de ser deficitarias de VD₃ respecto de las caucásicas (14) y 5 veces menos de poseer valores de suficiencia (10 % vs 50 %)(15) .

FIGURA 1

Número de publicaciones sobre VD₃ desde 1927 hasta 2015

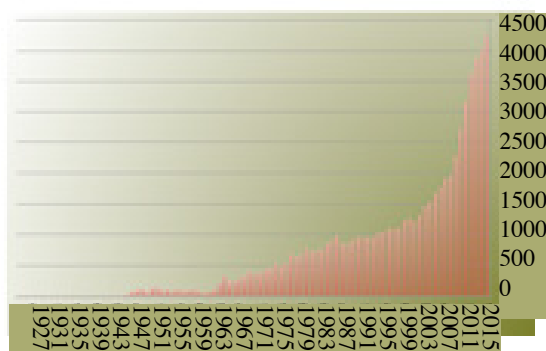
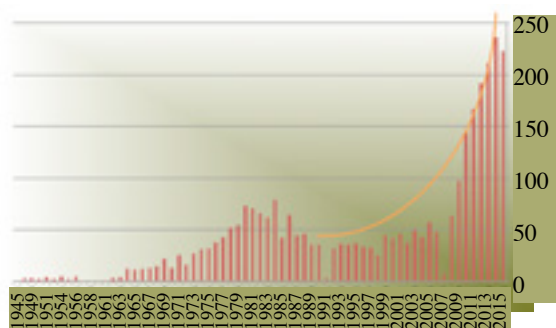


FIGURA 2

Número de publicaciones sobre VD₃ y Reproducción desde 1945 hasta 2015



En la actualidad, se considera deficiencia de VD₃ a niveles inferiores a 20 ng/ml (50 nmol/l) de 25-OH-D₃ e insuficiencia de VD₃ a niveles de 21-29 ng/ml (52,5-72,5 ng/ml) de 25-OH-D₃ en suero (12) .

En el Reino Unido, la “Encuesta sobre Dieta y Nutrición Nacional” objetivó en 2014 que el 28 % de las mujeres entre 19-24 años tenían niveles de 25-OH-D₃ inferiores a 10 ng/ml (16), otro trabajo previo en 2008 había concluido que el 49,5 % de las mujeres embarazadas tenían cifras inferiores a 20 ng/ml (17) .

La acumulación de pruebas de estudios en animales y humanos sugieren que la VD₃ está involucrada en muchas funciones del sistema reproductivo en ambos géneros.

La asociación entre la VD₃ y reproducción fue manifestada en ciertos estudios que observaban una variabilidad estacional en las tasas de embarazo y en la calidad de los embriones obtenidos tras fecundación in vitro (FIV), con valores superiores durante la primavera y más bajos en otoño. Esta variabilidad en la eficacia reproductiva parecía asociarse con el número total de horas de luz (18) ya que en los países nórdicos, donde las tasas de ovulación y la receptividad del endometrio eran inferiores durante los inviernos largos y oscuros, no había diferencia en la frecuencia de las relaciones sexuales ligadas a los periodos de luz/oscuridad que pudieran relacionarse con las tasas de embarazo (19).

Estudios experimentales en ratas hembras demostraron que la deficiencia de VD₃ conducía a una reducción del 75 % en la fertilidad global en comparación con las normales. Este efecto sobre la fertilidad se basaba tanto en la disminución en la impregnación (aproximadamente 50 %), como en el aumento de complicaciones durante el embarazo (20). La inseminación con semen de ratas machos deficientes en VD₃ reducía su fertilidad en un 73 %.

En las mujeres, el estado de VD₃ se ha asociado con el resultado de la FIV, síndrome del ovario poliquístico (SOP), endometriosis, y miomas. En los hombres, el estado de la VD₃ se ha asociado con la calidad del semen, recuento de espermatozoides, motilidad y morfología (22).

Parecería justificado que la conjunción de todos estos factores relacionados con la elevada prevalencia de la deficiencia de VD₃, su papel beneficioso en la reproducción humana y su detección rutinaria creciente por los médicos de atención primaria podría constituir un fuerte argumento para evaluar su estado antes de iniciar un tratamiento de reproducción. Esta fue la hipótesis para el trabajo realizado por Pacis y colaboradores (23) cuya finalidad era esclarecer si resultaba rentable el análisis de los niveles de esta vitamina, o su suplementación, previamente al inicio de cualquier tratamiento de reproducción asistida.

El coste por embarazo por FIV en EEUU, en una mujer con deficiencia de VD₃ para una población con prevalencia de déficit del 65 %, se estimó en unos 42.734 \$, una cifra muy superior a los 31.410 \$ cuando la mujer tenía niveles normales. Estos autores concluyeron que la detección de niveles de VD₃ y su tratamiento antes de las técnicas de FIV podría ser rentable, pero que para afirmarlo se necesitaba más evidencia a pesar de los numerosos estudios evaluados al respecto, como consecuencia de la heterogeneidad en los tamaños muestrales y a las variables involucradas.

Este trabajo de actualización pretende recoger la información existente sobre la influencia de esta deficiencia en el ámbito de la reproducción humana. Para ello han sido revisados hasta junio de 2016, los estudios prospectivos y retrospectivos, realizados in vivo e in vitro, clínicos o no, y disponibles en las bases de datos Pubmed y Science Direct. Se han incluido principalmente artículos en inglés, sin descartar revisiones. Se han buscado términos como “vitamin d” junto con otros como “reproduction”, “fertility”, “ovarian reserve”, “steroidogenesis”, “follicular development”, “conception”, “ivf outcomes”, “follicle”, “PCOS”, “endometriosis”, “implantation”, “receptivity”, “uterine fibroid”, “ART”, etc. Además, se han empleado otros términos como “calcidiol”, “calcitriol” o “hydroxyvitamin d” para hacer referencia a la vitamina D. Por otro lado, se ha buscado bibliografía procedente de las referencias de las publicaciones encontradas. Todos los títulos y resúmenes han sido revisados, y los textos completos en aquellos casos en que la referencia se ha considerado especialmente relevante para esta revisión. Se han excluido cartas a editores, editoriales e informes.

GENERALIDADES SOBRE EL MECANISMO DE ACCIÓN DE LA VITAMINA D₃

El aporte de la vitamina D (VD) es posible hacerlo de dos maneras: como ergocalciferol, o vitamina D₂ (VD₂), y como colecalciferol, o VD₃, que es en realidad una hormona secosteroide. Mientras que la VD₂ es sintetizada en las plantas, hongos y levaduras, a partir del ergosterol, el 80-90 % de la VD₃ se produce en los animales en las células de la epidermis a partir del 7-dehidrocolesterol y en presencia de radiación ultravioleta, que convierte el 7-dehidrocolesterol en VD₃ debido a la pérdida del anillo B de la molécula de colesterol (22, 24, 25). También la dieta es fuente de VD₃, aunque en menor proporción (5-10 %), a través de alimentos, leche, zumo de naranja, aceite de pescado, pescado azul (salmón, sardinas...), o suplementos (25).

El transporte de la VD₃ es posible gracias a su interacción con la proteína de unión a la VD (VDBP o “vitamin D-binding protein”). Para que la VD₃ sea biológicamente activa requiere realizar unas transformaciones previas en el hígado y el riñón. En el hígado, la enzima 25-hidroxilasa, (CYP2R1 o CYP27A1), perteneciente a la familia de los citocromos P450, hidroxila el carbono 25 del 7-dehidrocolesterol y da lugar al calcidiol o 25-hidroxivitamina D₃ (25-OHD₃), que está considerado como el mejor indicador del estado individual de VD por su fácil medición y larga vida de 2-3 semanas en la circulación (26, 27). La CYP27A1 está presente también en los testículos.

La segunda transformación tiene lugar en los túbulos renales distales mediada por la enzima 1α -hidroxilasa, (CYP27B1) que transforma la 25-OH-D3 en calcitriol o 1,25-dihidroxivitamina D3 (1,25-(OH)₂-D3). La enzima 1α -hidroxilasa ha sido hallada también en ovarios, cerebro, mama, próstata, colon, hueso, endotelio, músculos lisos vasculares, páncreas y placenta (22, 24, 27, 28).

La estructura química de la VD₃ en su forma activa (1,25-(OH)₂-D3) recuerda a las hormonas esteroideas y actúa a través su receptor nuclear (VDR), que pertenece a la familia de los receptores hormonales nucleares esteroideos/tiroideos (22, 24, 27, 28, 29). Cuando el calcitriol actúa sobre el VDR, éste sufre una transformación conformacional que le permite a su dominio AF2 ("Activation Function 2" o función de activación 2), unirse a un co-activador. La unión a un co-activador ayuda a que el VDR interacte con el receptor X retinoide α (RXR) de una manera más eficiente formando un heterodímero que le capacita para reconocer y unirse a regiones reguladoras de los genes diana, denominadas elementos de respuesta a la VD₃ (VDRE), sobre los que tiene efecto para realizar su acción genómica (Figura 3A) (22,27,29). Los VDRE pueden encontrarse tanto en regiones proximales al promotor, como en regiones distales e intergénicas, e incluso en intrones de los genes diana (27). Las partes de VDR y RXR que se unen al genoma se cono-

cen como dominios de unión a ADN o DBD y tienen una estructura de dedos de zinc que, cuando se combinan, permiten la unión con diferente especificidad a diversas partes del genoma. La unión al ADN se produce de modo que RXR queda unido por la parte 5' y VDR a la 3'.

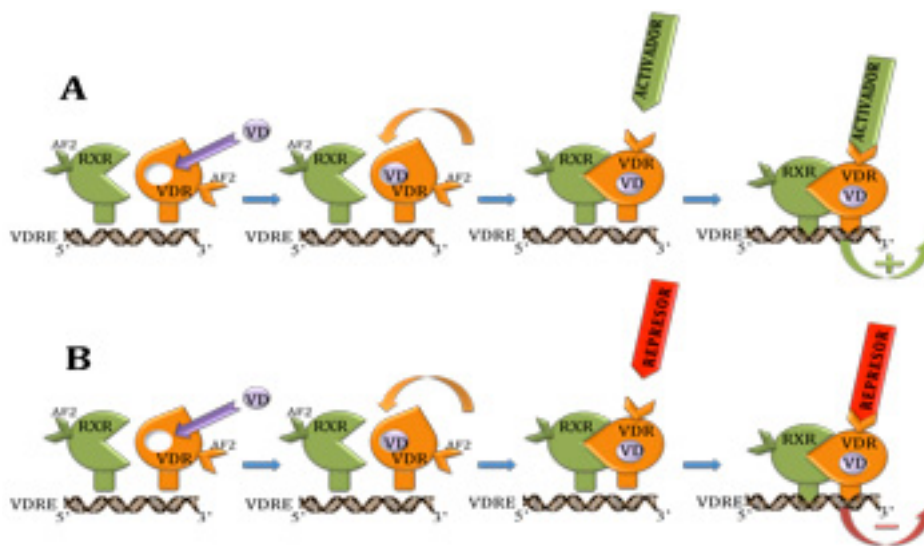
Si la unión tiene lugar con un co-represor en lugar de un co-activador (Figura 3B) se produciría la represión de los genes VDRE. Aún no hay evidencias sobre el mecanismo que conlleva esta represión, aunque hay algunas hipótesis, como por ejemplo que hay un cambio en algunos nucleótidos de la secuencia de VDRE que provocan la preferencia de la unión al co-represor frente a la del co-activador. Sin embargo, aún se requiere más investigación para esclarecer este mecanismo (29).

Dentro de las acciones genómicas de la VD₃, la epigenética también desempeña un potencial papel debido a que las regiones de respuesta a esta vitamina pueden estar accesibles, o no, dependiendo de la metilación y acetilación del genoma (29).

Además de sus acciones genómicas, el calcitriol tiene acciones no genómicas a través de segundos mensajeros cuando se une a receptores diferentes de los VDR (29, 30) Los VDRE se caracterizan porque pueden variar su secuencia ligeramente, lo que podría dar lugar a uniones con afi-

FIGURA 3

Mecanismo de acción de la VD₃ por su unión a VDR. A) la VD₃ se une a VDR y se favorece por un lado la unión a un co-activador y por otro la heterodimerización con RXR, que permite la unión a los VDRE activando sus acciones. B) Si se une un co-represor el resultado es la inhibición de los efectos de los VDRE.



nidad variable, o que el heterodímero, al unirse al ADN, origine diferentes conformaciones que, afectando a la preferencia para acoplarse a diferentes moduladores, alteren la acción final.

Una complejidad adicional es que hay genes que presentan más de un VDRE, por lo que es posible que a ellos puedan unirse varios receptores.

FUNCIONES DE LA VITAMINA D3

(Figura 4)

La acción derivada de la regulación génica positiva sobre la osteopontina, proteína de unión al calcio y receptores de lipoproteínas de baja densidad relacionados con la proteína-5 (LRP5) o negativa sobre el factor anti-osteoclástico osteoprotegerina) (31), a través de la expresión de los VDR, representa a las funciones “clásicas”, más comunes y conocidas de la VD₃, que incluyen la regulación del metabolismo óseo, mineralización y el control de la homeostasis del calcio y del fósforo (22, 32).

Pero la amplia distribución de los VDR en muchos otros tejidos (incluyendo las células endoteliales y las de músculo liso de la pared arterial, las células B pancreáticas, monocitos, queratinocitos y neuronas) ha sugerido que los VDR podrían estar también involucrados en la modulación de múltiples funciones fisiológicas (31, 33), acciones denominadas “no clásicas” que se encuentran en la expresión de genes relacionados con la autoinmunidad, inflamación, proliferación celular, apoptosis, enfermedades degenerativas, metabolismo de la glucosa y estrés oxidativo.

La regulación de la función autoinmune del organismo se

basa en la capacidad para inducir la expresión de genes relacionados con la inmunidad, como los que codifican la catelicidina (potenciadora de la defensa contra infecciones), o para reprimir los que codifican algunas interleucinas (IL) como la IL-17, IL-2 e IL-12 reduciendo el riesgo de padecer procesos inflamatorios y enfermedades autoinmunes (22, 29), como la diabetes mellitus (DM) tipo 1, esclerosis múltiple y artritis reumatoide (33, 34).

La acción antiinflamatoria de la VD₃ se basa en la mitigación de las acciones de NF- κ B y COX2 (factores proinflamatorios) y la inducción de la expresión de enzimas antiinflamatorias como NOX1 (29). Esta propiedad prevendría de enfermedades cardiovasculares e infartos.

Ciertos genes implicados en la diferenciación y apoptosis celular, así como en la génesis tumoral (por ejemplo, la inducción de los supresores de tumores p53 y p21), poseen regiones reguladoras VDRE por lo que los VDR juegan un papel clave en su regulación y un potencial efecto anticancerígeno (24, 27, 29).

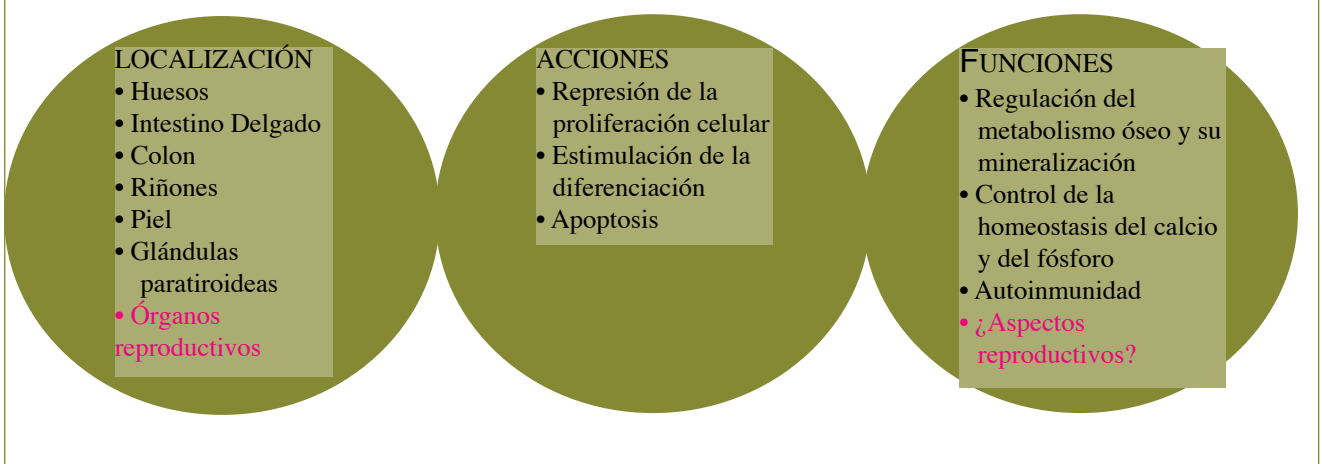
La apoptosis inducida por la VD₃ responde a tres posibles mecanismos (27): a) Inducción de la expresión de Bax y Bad proapoptóticos b) Represión de la expresión de Bcl-2 antiapoptótica, c) Activación de caspasas.

La inducción de principios anticancerígenos como TGF β 2, TIMP2 o TIMP3 por parte de la VD₃, junto con la supresión de la señalización β -catenina, proto-oncogén que se expresa en células de cáncer de colon, y el efecto antiangiogénico protector frente a las metástasis, son argumentos a favor del papel en el tratamiento del cáncer (27, 29).

Los VDR han sido también implicados en la expresión de genes que regulan el metabolismo de la glucosa o asociados

FIGURA 4

Localización, acciones y principales funciones conocidas de la VD₃



a enfermedades cardiovasculares (por ejemplo, la reducción de las concentraciones de homocisteína y la inducción de FOXO3 importante en la prevención del estrés oxidativo (31). Estas acciones genómicas de la VD₃ proporcionan un sustrato patogénico común de vinculación de varias enfermedades degenerativas, tales como la aterosclerosis y la osteoporosis (35). La inducción por parte de la VD₃ del factor klotho (relacionado con el envejecimiento) en el riñón (29) le proporciona la facultad para retrasar la aparición de enfermedades asociadas al envejecimiento.

Otras acciones no clásicas que se han encontrado relacionadas con la VD₃, son la regulación del ciclo del pelo (29), o la modulación del desarrollo embrionario, ya que el receptor VDR se expresa en las células madre y durante el periodo embrionario temprano. La VD₃ induce la expresión de factores de transcripción CDX-2, encargado entre otras acciones de la embriogénesis temprana en ratones. Evolutivamente esta parece ser la función más antigua de la VD₃ por el hecho de que tanto el ligando 1,25-(OH)₂-D₃ como VDR están conservados en especies que no tienen ni huesos (invertebrados) ni pelo (29).

La expresión de VDR también en tejidos reproductivos (ovarios, el útero, placenta, testículos), o relacionados con la reproducción (hipotálamo e hipófisis) ha planteado la posibilidad de que la VD₃ pudiera afectar de manera determinante a la reproducción (24, 25), tanto del hombre como de la mujer.

INFLUENCIA DE LA VITAMINA D3 EN LA FERTILIDAD MASCULINA

La VD₃ ha sido relacionada con aspectos implicados en la reproducción masculina, tales como la calidad seminal y niveles de hormonas sexuales, y con otros relacionados con el estilo de vida y la dieta, o suplementos, que podrían influir en los resultados de las Técnicas de Reproducción Asistida (TRA) (36).

Los VDR se expresan en los testículos humanos, al igual que en los de otros animales (37), tanto a nivel estructural (epidídimo, vesículas seminales y próstata) (38), como a nivel celular (células de Leydig y espermatozoides), indicando una acción de la VD₃ en la formación de éstos o en su regulación. La expresión de los VDR es diferente dentro de los propios espermatozoides y varía dependiendo del grado de madurez y de la morfología (38, 39). Para la mayoría de los estudios resulta evidente su presencia en la región postacrosómica y en el cuello de los espermatozoides maduros (39), y discutible en la pieza intermedia (38).

La VD₃, al regular el metabolismo del calcio y aumentar la concentración de calcio intracelular, afecta a la espermato-

génesis, movilidad, hiperactivación espermática y reacción acrosómica (32, 38, 40).

La expresión disminuida de VDR en los testículos produce efectos negativos en la fertilidad (disminuye la concentración y movilidad espermática en el eyaculado y puede producir ciertas anomalías histológicas), y la suplementación con calcio puede restaurarla (30).

Además del receptor VDR, también se ha estudiado la expresión de las enzimas involucradas en la producción de VD₃, 25-hidroxilasa y 1 α -hidroxilasa. Éstas también se expresan en tejidos reproductivos (vesículas seminales, testículos, epidídimo y próstata) y en células (Leydig, en espermátidas elongadas, espermatoцитos, espermatoгонias y espermatozoides) y su cuantía varía dependiendo del tipo de enzima y de la localización dentro del propio tejido. Blomberg Jensen y colaboradores definieron estas diferencias de expresión y distribución, y estudiaron la concordancia en localización de estas enzimas con la de los VDR (38). Las evidencias indicaban de nuevo que la VD₃ podría afectar al aparato reproductor masculino o ejercer alguna función en él.

Los niveles de expresión de VDR y 24-hidroxilasa (CYP24A1) en los espermatozoides se han relacionado con la calidad seminal y se ha comprobado que hombres con insuficiencia de VD₃ poseen menor movilidad espermática que los que tienen valores normales (41).

Estudios experimentales de la VD₃ en ratas permitieron comprobar que no sólo su deficiencia en machos producía una menor tasa de embarazo, sino que cuando se compensaba la hipocalcemia relacionada con la deficiencia de VD₃, la fertilidad se restauraba solo parcialmente (42), siendo necesario suplementar también con VD₃ para que la fertilidad volviera a la normalidad (41).

En los ratones, la 1,25-(OH)₂-D₃ parece colaborar en la espermatogénesis al incrementar la expresión de determinados genes en las células de Sertoli (37). La ausencia de VDR les conduce a un bajo recuento espermático y motilidad que se normalizan suplementando con calcio y estrógenos (43).

En humanos, la VD₃ es metabolizada en los testículos fetales a lo largo del desarrollo embrionario (41). En un estudio de 1992 se comprobó una relación entre la estacionalidad – diferentes niveles de VD₃ – y la concepción (19) y posteriormente, como ya se expuso, que esta estacionalidad afectaba a la calidad embrionaria y al resultado de TRA (18). Más adelante, al estudiarse los efectos concretos en las características seminales, se comprobó que los niveles de 25-OH-D₃ no se correlacionaban ni con la concentración ni con el recuento espermático mientras que sí lo hacían con

la motilidad y la morfología, tanto en hombres infértiles como en fértiles (41, 44, 45). La salida de colesterol del espermatozoide por la VD₃ favorece la supervivencia espermática (39).

Los niveles séricos de VD₃ guardan relación con los de testosterona, apreciándose un aumento de la testosterona tras la suplementación de VD₃ (46). Esta relación entre los niveles de esta vitamina y de testosterona ha sido confirmada también con posterioridad (47) y se ha comprobado que existe una conexión directa entre los niveles séricos de 25-OH-D₃ y los niveles de testosterona total y su biodisponibilidad (48, 49).

Aunque este aumento en los niveles de testosterona también se ha demostrado en hombres obesos (46), se requieren más estudios para demostrar si ésta podría mejorar las opciones reproductivas de este modo (50).

No se ha encontrado relación entre los niveles de VD₃ séricos y los de estradiol (45, 48), SHBG, LH o FSH (48) o inhibina B (44).

La AMH, aumenta conforme los niveles de VD₃ son más elevados (51). En células del cáncer de próstata se ha observado que el tratamiento in vitro con VD₃ aumenta la expresión de la AMH (52, 53).

Estas relaciones con los niveles hormonales no parecen alterarse por los diferentes polimorfismos en genes relacionados con el metabolismo de la VD₃ (48).

A partir de todas estas observaciones y estudios (figura 5) podemos deducir que los niveles de VD₃ influyen positivamente en la espermatogénesis, maduración y capacidad de

fecundación de los espermatozoides, además de influir en los niveles hormonales de testosterona y la AMH. Otras acciones de la VD₃ podrían regular también la función testicular de manera indirecta.

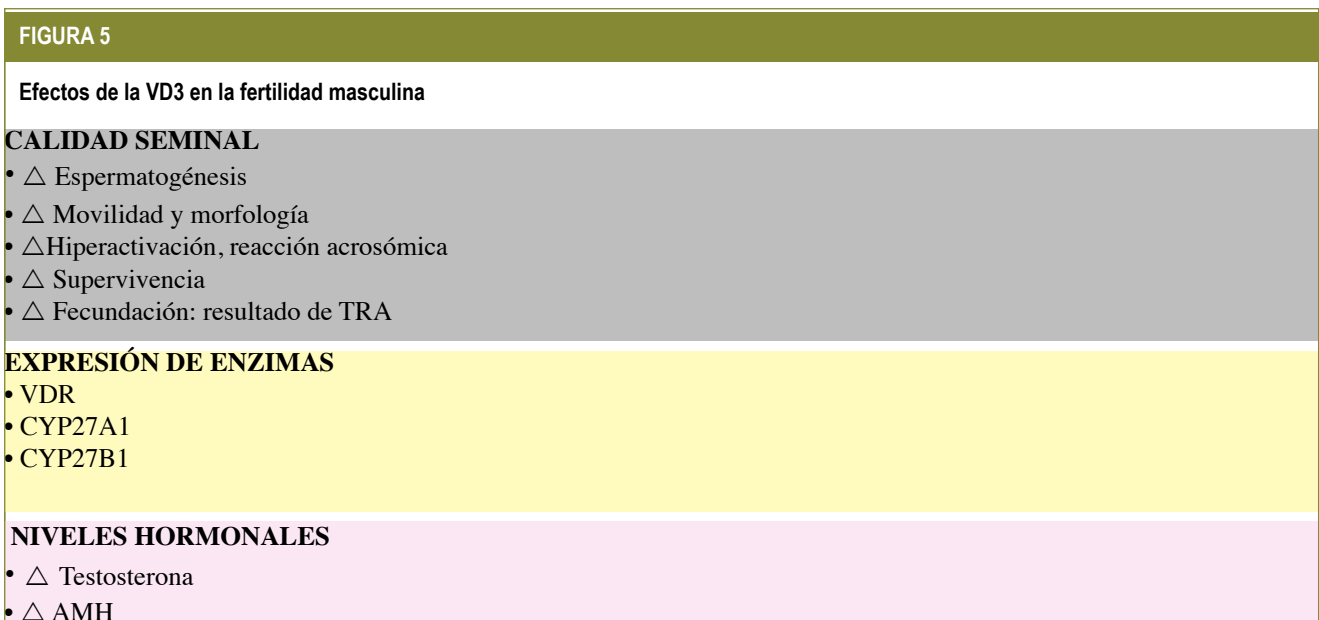
INFLUENCIA DE LA VITAMINA D₃ EN LA FERTILIDAD FEMENINA

A) Influencia de la vitamina D₃ en la reserva ovárica y en el desarrollo folicular (Figura 6)

Diversos estudios han evaluado la correlación entre los niveles de VD₃ con la hormona antimülleriana (AMH) o con la FSH. En 2009, al demostrarse la presencia de un VDRE en el promotor del gen de la AHM, se abrió la posibilidad relacional entre ambas (52).

Un estudio experimental en células de la granulosa de gallina comprobó que a medida que se elevaban los niveles de VD₃, disminuía la expresión del ARNm de la AMH, y aumentaban el ARNm del receptor de la FSH y la proliferación celular (54). Sin embargo, en células de la granulosa humanas, tanto la expresión del ARNm del receptor de la AMH, como la del receptor de FSH disminuyen conforme aumentan los niveles en fluido folicular de 25-OH-D₃. Estos hechos están en consonancia con un estado más avanzado de maduración folicular, en el que disminuye el efecto inhibitorio de la AMH, a la vez que se favorece la fase de independencia de la FSH (28, 55).

Dado que la AMH experimenta variaciones séricas estacionales proporcionales a las que se producen en la VD₃, y



que la suplementación con VD₃ evita estas variaciones en ambas (51), puede suponerse que hay una correlación entre los niveles séricos de la VD₃ y de la AMH.

La AMH requiere de la fosforilación de un factor conocido como Smad 1/5/8 para realizar sus acciones mediante su unión a su receptor; posteriormente el factor Smad 1/5/8 se dirige hacia el núcleo celular y conlleva la activación de genes encargados de las funciones de la AMH. Se ha comprobado que 1,25-(OH)₂-D₃ impide también esta fosforilación y la localización de Smad 1/5/8 en el núcleo, impidiendo de este modo la acción de la AMH (55).

Curiosamente, en mujeres con SOP, el aporte de VD₃ produce efectos opuestos al producir una disminución de los niveles anormalmente elevados de AMH (28).

La relación entre los niveles séricos de VD₃ y los de FSH urinaria es inversa. Bajos niveles de VD₃ se corresponden con altos de FSH y bajos de AMH, simulando a una baja reserva ovárica. Bajos niveles de VD₃ mantenidos podrían influir en la reserva ovárica predisponiendo a una menopausia temprana (56).

Podríamos deducir que unos mayores niveles de VD₃, al potenciar la maduración folicular, serían útiles en las TRA facilitando la estimulación ovárica controlada (EOC), aunque, en la actualidad, se requieren más estudios sobre la suplementación de VD₃ para estos fines. Una deficiencia en

VD₃, por el contrario, implicaría una menor reserva ovárica (niveles inferiores de AMH y elevados de FSH), y un riesgo implícito de adelanto en la edad de la menopausia.

El papel de la VD₃ en la esteroidogénesis ovárica es, a grandes rasgos, el de estimulador (22). En estudios *in vitro* se ha demostrado que el tratamiento con 1,25-(OH)₂-D₃ aumentaba la expresión de ARNm de algunas isoformas de la 17β-hidroxiesteroide deshidrogenasa (17β-HSD en células del cáncer de próstata, indicando una asociación entre la VD₃ y la síntesis de esteroides (57).

En estudios en humanos se ha demostrado un aumento en la expresión de la 3β-hidroxiesteroide deshidrogenasa (3β-HSD), necesaria para la síntesis de progesterona en células de la granulosa, lo que supone que la esteroidogénesis es potencialmente estimulada por efecto de la VD₃ (55).

La aromatasa, que también experimenta una alteración en la expresión génica durante los tratamientos con VD₃, es tejido dependiente (58). La VD₃ aumenta la expresión de la aromatasa en células del cáncer de mama, mientras que la disminuye en las células del osteosarcoma (59). En células humanas de ovario, la VD₃ estimula la producción de estrógenos, progesterona y proteína de unión al factor de crecimiento insulínico 1 (IGF-1) (60); y en células placentarias, la producción de estrógeno y progesterona (61).

FIGURA 6	
Efectos de la VD ₃ en la reserva ovárica.	
RESERVA OVÁRICA	
Tratamiento <i>in vitro</i> con VD ₃	C. granulosa de gallina ▽ ARNm de la AMH ▽ ARNm del receptor de la FSH
	C. granulosa de humana ▽ ARNm de la AMH ▽ ARNm del receptor de la FSH
Niveles séricos	Correlación sérica entre 25-OH-D ₃ y AMH Relación inversa entre niveles de VD ₃ y dosis eficaz de FSH
Suplementación con VD ₃	▽ Niveles séricos excesivos de AMH en mujeres con SOP
	Controla cambios estacionales de AMH
	No altera niveles séricos de la AMH en mujeres sin SOP con deficiencia en VD ₃

B) Influencia de la vitamina d3 en el síndrome de ovario poliquístico (SOP) (Figura 7)

El Síndrome del Ovario Poliquístico (SOP) es el trastorno endocrino más frecuente en la mujer y la causa más común de infertilidad ovulatoria (62), afectando al 15-18 % de las mujeres en edad reproductiva cuando se usan los criterios de Rotterdam (63).

La relación entre la VD₃ y el fenotipo SOP viene respaldada por un creciente apoyo de publicaciones que refuerzan las implicaciones entre los mecanismos de deficiencia de VD₃ y la resistencia a la insulina, inflamación, dislipidemia y obesidad, es decir, con aquellos fenómenos clínicos y metabólicos que se encuentran comúnmente en el SOP (49, 64, 65, 66) .

B1. Relación de la VD₃ con el índice de masa corporal (IMC), resistencia a la insulina (IR) e hiperandrogenismo

Los niveles séricos de 25-OH-D3 se correlacionan negativamente con el IMC, la obesidad central y las medidas de adiposidad, y esta asociación inversa ha sido recogida tanto en estudios observacionales, como de suplementación.

En un estudio observacional sobre 38 mujeres con SOP, el análisis de regresión multivariante mostró que las bajas concentraciones de 25-OH-D3 estuvieron determinadas por el

grado de adiposidad, permitiéndose hipotetizar que la deficiencia de VD₃ en SOP es consecuencia de la obesidad y que, a través de esta vía, podría agravarse la resistencia a la insulina de forma independiente (67).

Teniendo en cuenta que la VD₃ es una hormona liposoluble, es posible que su secuestro en el tejido adiposo pudiera explicar el aumento de las tasas de deficiencia de VD₃ observado en mujeres con SOP (68), de hecho, los pacientes obesos suelen requerir dosis más altas de VD₃ para tratar esta deficiencia que los que tienen un peso normal (67, 69). Sin embargo, este resultado estaba en consonancia con otros estudios previos, en donde la resistencia a la insulina en SOP era más profunda de lo que el IMC podría predecir (70). En este sentido, ha sido observado que el IMC y la deficiencia de 25-OH-D3 se comportaban como parámetros predictivos independientes tanto del desarrollo folicular como del embarazo en mujeres anovulatorias con SOP tratadas con citrato de clomifeno (71).

Aunque en la actualidad parece aún prematuro establecer relación causal entre la deficiencia de VD₃ y la resistencia a la insulina en estas pacientes con SOP, disponemos de diferentes estudios, como los de Hahn, Li o Panidis, (64, 65, 72) que la refuerzan. En el estudio de Hahn (64), la asociación entre niveles bajos de VD₃ y la IR fue comprobada en 120 mujeres diagnosticadas con SOP. En el de Li (65), las mujeres con SOP y déficit severo de VD₃ presentaban más resistencia a la insulina, independientemente del IMC y la

FIGURA 7

Efectos de la VD3 en el SOP.

	SOP
Hirsutismo e IMC/Hiperandrogenismo	<ul style="list-style-type: none"> • Correlación inversa
Resistencia a insulina (IR)	<ul style="list-style-type: none"> • Correlación inversa • Suplementación VD₃ positiva • △ Receptores de insulina • △ Regulación de genes del metabolismo de la glucosa • Supresión de citoquinas
Fallo de ovulación	<ul style="list-style-type: none"> • △ sRAGE • ▽ HAM • △ Proteínas antiapoptóticas
Irregularidades menstruales	<ul style="list-style-type: none"> • Normalización de los ciclos
Éxito reproductivo	<ul style="list-style-type: none"> • △ Inducción de la ovulación • △ Probabilidad de nacido vivo • ▽ Abortos

relación cintura-cadera (RCC). En el de Panidis, (72) al evaluar a 291 mujeres con SOP y 109 controles, se informó de una asociación inversa entre niveles de 25-OH-D3 con la obesidad y también con un IMC asociado a la IR.

Además de estos estudios observacionales, otros estudios de suplementación con VD₃, han constatado también esta relación ya que la administración de VD₃ mejoraba el IR y reducía los andrógenos en suero (73-75).

Tras una suplementación semanal de 20 000 UI de colecalciferol durante 24 semanas en 57 mujeres con SOP y una media de IMC de 25,4 kg/m², se observó una disminución significativa, en ayunas y tras la estimulación, de las concentraciones de glucosa y péptido C (75).

Estos prometedores resultados, no obstante, no han podido ser confirmados por un estudio controlado con placebo, en el que no se encontró diferencias significativas en la sensibilidad a la insulina después de un período de tratamiento de 2 meses (76). La crítica a este estudio es que las concentraciones de 25-OHD3 tras los suplementos de VD₃ podrían no haber sido suficientes (23,4±6,1 ng/ml).

Los mecanismos por los que la VD₃ guardaría relación con la IR serían:

- a) Estimulación en la expresión de los receptores de insulina, que conlleva un aumento en la capacidad de respuesta a la insulina para el transporte de glucosa y una disminución en la sensibilidad a la insulina (77).
- b) Regulación de más de 300 genes, incluyendo genes implicados en el metabolismo de la glucosa, a través de los complejos de VD₃ unidos a su receptor D/VDR (78).
- c) Supresión de citoquinas (79).

Respecto a la relación entre VD₃ e hiperandrogenismo, disponemos de estudios en los que se demuestra que la deficiencia de VD₃ en pacientes con SOP contribuye a la desregulación hormonal (80). Los bajos niveles de VD₃ se asociaron con un desequilibrio en los marcadores de hiperandrogenismo y se correlacionaron con los niveles de testosterona, dehidroepiandrosterona (DHEAS) y con la relación LH/FSH (64,81).

Aunque en otros trabajos no se observó esta correlación con los niveles de testosterona total, testosterona libre y el índice de andrógenos libres (FAI), sí se mantenía una asociación significativa con los niveles de la SHBG (49).

B2) Relación de la Vitamina D3 con la función ovárica en SOP

Los productos finales de glicación avanzada (AGE) son un

grupo heterogéneo de moléculas proinflamatorias constituido por proteínas, lípidos o ácidos nucleicos altamente reactivos que resultan de la interacción no enzimática entre los azúcares reductores (principalmente glucosa) y sus residuos amino libres (82).

Estos AGEs, tras unirse a receptores de la superficie celular (RAGE), dañan las estructuras celulares a través de la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y la síntesis de citoquinas proinflamatorias (83).

Existen numerosas evidencias al respecto de una asociación entre el sistema AGE-RAGE y ciertos aspectos del SOP, incluida la obesidad (84), IR (85), disfunción de los adipocitos (86) y disfunción de las células de la granulosa (87). Aunque la formación de AGE ocurre lentamente en condiciones fisiológicas, la IR, como un contribuyente importante en la fisiopatología del SOP, podría acelerar la generación de estos compuestos, que al acumularse en la teca y células de la granulosa, acabarían interfiriendo y alterando la función ovárica (87).

El sistema AGE-RAGE podría ser la causa del fallo de la ovulación comúnmente visto en pacientes con SOP (88), al interferir con la acción de la LH y afectar al desarrollo normal del folículo.

Para defenderse del daño generado por estas moléculas, la célula dispone de unas isoformas solubles del receptor de AGE (sRAGE) que son capaces de detectarlos y unirse a ellos para inhibir competitivamente estas interacciones AGE-RAGE. Un aumento en los niveles séricos de sRAGE tendría efectos beneficiosos al suprimir la respuesta inflamatoria (89). Los niveles de sRAGE en líquido folicular de mujeres sometidas a técnicas de FIV ha sido correlacionado positivamente con la dosis necesaria de gonadotropina por ciclo (se necesita menos dosis), número de ovocitos recuperados y niveles de AHM en líquido folicular (90).

El efecto beneficioso de la suplementación de VD₃ sobre la función ovárica pudo observarse en un trabajo que incluía a 67 mujeres, con o sin SOP, diagnosticadas de déficit de VD₃ (25) (Irani et al. 2014). Este estudio demostró que la suplementación de VD₃ en mujeres con SOP aumentó significativamente los niveles de sRAGE en suero y disminuyó, también de manera significativa, las concentraciones séricas, anormalmente elevadas, de AMH. Este cambio, sin embargo, no se produjo en las mujeres sin SOP.

La disminución sérica de los niveles anormalmente elevados de AMH en las pacientes con SOP podría mejorar potencialmente el proceso ovulatorio, al disminuir el nivel de andrógenos intrafoliculares y aumentar la sensibilidad folicular a la FSH (91).

Además de este papel beneficioso sobre la función ovárica,

la VD₃ ejercería otra valiosa función al haber sido involucrada en el desequilibrio entre mecanismos pro y antiapoptóticos descritos en el SOP. La deficiencia de VD₃ podría aumentar las concentraciones de proteínas antiapoptóticas, como la fosfoproteína enriquecida en diabetes (PED/PEA-15) (92), contribuyendo de esta forma al deterioro del mecanismo apoptótico del ovario que conduciría al exceso de folículos.

B3) Relación de la Vitamina D3 con las irregularidades menstruales en SOP

En 1999, un trabajo de suplementación de VD₃ y calcio durante un período de 6 meses en mujeres con SOP, observó la normalización de los ciclos menstruales en 7 de las 9 mujeres oligomenorreicas (93). Estos resultados se confirmaron 10 años después en otro trabajo en el que 60 mujeres con SOP fueron incluidas al azar en tres grupos: suplementados con calcio y VD₃, metformina o ambos (94). Las mujeres en el grupo de combinación de tratamiento demostraron mayor número de folículos dominantes en los 3 meses de seguimiento.

En el estudio ya comentado de Wehr, (49) realizado durante 24 semanas en 57 mujeres con SOP, el 50 % de las mujeres con oligomenorrea normalizaron o mejoraron sus ciclos menstruales después de la suplementación de VD₃ (95).

Por desgracia el número de estudios disponibles para evaluar los efectos beneficiosos de la suplementación con VD₃ en el SOP es limitado.

B4) Relación de la Vitamina D3 con el éxito reproductivo en mujeres con SOP

La inducción de la ovulación constituye la primera aproximación para el tratamiento del SOP relacionado con la infertilidad ovulatoria (96). En un reciente trabajo retrospectivo de Pal y colaboradores (10), en el que se utilizaron muestras sanguíneas almacenadas de 626 mujeres que habían participado en un estudio sobre embarazo en el SOP para la evaluación de los niveles de 25-OH-D₃, se observó:

- La probabilidad de obtener ovulación tras el tratamiento dependió directamente del nivel de VD₃ (deficiencia de VD₃: 68 %; insuficiencia: 77 %; estado normal: 78 % (p=0,050). Las mujeres con deficiencia de VD₃ tuvieron significativamente menos probabilidades de ovular en comparación con aquellas con niveles de 25-OH-D₃ ≥ 20 ng/ml (p=0,006).
- Los niveles séricos de 25-OH-D₃ fueron significativamente mayores en aquellas mujeres que tuvieron un

nacido vivo, respecto de las que no lo lograron (25.34±10.39 ng/ml vs. 23,16±9,71 ng/ml), p=0,046. Por cada 1 ng/ml de aumento de 25-OH-D₃, se incrementaba la probabilidad de nacido vivo en un 2 % (OR 1,02) y estas probabilidades aumentaban progresivamente a partir de niveles de 25-OH-D₃ > 38 ng/ml (OR 1,42 con 38 ng/ml, OR 1,51 con ≥ 40 ng/ml y OR 4,5 con ≥ 45 ng/ml). Esta respuesta demostró ser bidireccional ya que la probabilidad de nacido vivo también disminuía progresivamente a medida que lo hacían los valores plasmáticos de 25-OH-D₃. La proporción de mujeres con insuficiencia de VD₃ (< 30 ng/ml) fue significativamente más alta entre aquellas que no obtuvieron un nacido vivo (75 % vs 63 %, p=0,013) y la probabilidad de lograrlo se reducía en un 44 % para las mujeres con nivel de 25-OH-D₃ <30 ng/ml (OR 0,58).

- Las probabilidades de aborto disminuían a medida que aumentaban los niveles de VD₃. Un nivel de 25-OH-D₃ ≥ 38 ng/ml se asoció con un 82 % menos de probabilidades de aborto en comparación con los niveles inferiores (OR 0,18). En base a estos resultados, los autores reafirmaron la relevancia de disponer de unos niveles adecuados de 25-OH-D₃ para el éxito reproductivo en mujeres con SOP tratadas mediante inducción de ovulación. Estos niveles deben ser superiores a los 30 ng/ml que se consideran como normales y proponen niveles de 25-OH-D₃ de ≥ 45 ng/ml como "óptimos" para las mujeres que intentan concebir.

La conclusión de estos autores fue que, dada la relación inversa reconocida entre el IMC y niveles de 25-OH-D₃ en suero, y la mayor carga inflamatoria y metabólica originada por la obesidad, podría argumentarse que el IMC debería tenerse en cuenta a la hora de definir los valores para el estado VD₃. A tal fin, se creó una variable llamada BMI^aD que ajustaba los niveles de 25-OH-D₃ con el IMC. En comparación con la 25-OH-D₃, esta BMI^aD demostró una asociación más robusta con variables hormonales y metabólicas.

C) Influencia de la vitamina d3 en la endometriosis

La endometriosis afecta al 6 %-10 % de las mujeres en edad reproductiva y se considera una enfermedad crónica, benigna y dependiente de los estrógenos que está asociada con dismenorrea, dispareunia, dolor pélvico crónico e infertilidad (97).

Los efectos pleiotrópicos de la VD₃ en distintas vías fisiológicas le otorgan importantes propiedades antiinflamatorias, inmunomoduladoras y antiproliferativas, que pueden jugar un papel central en la patogénesis y tratamiento de la

endometriosis como enfermedad compleja (98). El endometrio humano está incluido entre aquellos lugares extrarenales capaces de convertir la VD₃ en su forma activa porque la enzima 1 α -hidroxilasa, que cataliza la síntesis de 1,25-(OH)₂-D₃, se expresa tanto en el endometrio eutópico como en el ectópico (99).

La posible relación entre la endometriosis y la VD₃ fue informada por primera vez por Hartwell, al observar mayores niveles séricos de 1,25-(OH)₂-D₃ y niveles similares de 25-OH-D₃ en un pequeño grupo de mujeres con endometriosis respecto del grupo control (100).

Somigliana (101) corroboró esta relación al comprobar en 87 mujeres con endometriosis y 53 controles, que los niveles de 25-OH-D₃ se incrementaron significativamente en el suero de mujeres con endometriosis, independientemente de la estacionalidad, la edad y la terapia, con diferencias más llamativas en los estadios avanzados.

Sin embargo, otras investigaciones no sólo no han confirmado estos resultados, sino que han llegado a conclusiones opuestas (102-104). Entre ellas destaca el estudio de Harris (104), el mayor estudio de cohortes y prospectivo realizado hasta la fecha, con 1385 casos de endometriosis confirmada laparoscópicamente, recogidos desde 1991 a 2005, en 70 556 mujeres americanas. En él se observó que el nivel plasmático de 25-OH-D₃ se asociaba inversamente con la presencia de endometriosis.

Las mujeres situadas en el quintil más alto de nivel de VD₃ tenían un riesgo 24 % inferior de endometriosis que aquellas situadas en el quintil más bajo (RR:0,76). El contraste con los trabajos anteriores podría ser explicado por la heterogeneidad, naturaleza y pequeño tamaño muestral de los estudios previos.

La posible implicación del estrés oxidativo en la fisiopatología de la endometriosis motivó la evaluación de la influencia de agentes antioxidantes, como las vitaminas A y E, sin que se demostrase una asociación con la endometriosis (105). Por desgracia, pocos estudios han examinado la relación entre la dieta y la endometriosis, y, como consecuencia, la influencia de los niveles de VD₃.

En el primer artículo científico que abordó la relación entre dieta y endometriosis (106), tras evaluar a 504 mujeres de edades comprendidas entre los 20 y los 65 años, no encontró ninguna asociación entre ingesta de alimentos ricos en calcio (leche o queso) y riesgo de endometriosis. Posteriormente Trabert (107), aunque observó una asociación inversa no significativa entre estos alimentos y el consumo de calcio con la endometriosis, no la halló para la VD₃.

Sin embargo, en el estudio prospectivo de Harris (104), las mujeres consumidoras de más de 3 porciones de alimentos

lácteos por día, respecto de las que consumían 2 o menos, tenían mayores niveles plasmáticos de 25-OH-D₃ y un 18 % menos probabilidades de ser diagnosticadas de endometriosis (RR:0,82).

C1) Influencia inmunomoduladora y antiproliferativa de la VD₃ en la endometriosis.

Optimizar la respuesta inmunológica es fundamental para el reconocimiento y eliminación de los fragmentos endometriales vertidos hacia el peritoneo que pudieran favorecer la endometriosis.

La VD₃ tiene teóricamente un papel esencial en esta respuesta inmune ya que promueve el cambio de las respuestas proinflamatorias de tipo Th1, hacia una inmunidad antiproliferativa Th2, mediante la inhibición de la secreción de IL-12, IL-2, factor de necrosis tumoral (TNF) e interferón, por células T, macrófagos, y células dendríticas (108,109).

Aunque la endometriosis es tratada como un proceso invasivo benigno, que tiende a progresar y recidivar, las mujeres con endometriosis tienen el doble de riesgo de desarrollar cáncer de ovario, un riesgo que se multiplica por 4 si además sufren de infertilidad (110). La VD₃ ha demostrado poseer actividad antineoplásica, actuando como un factor de transcripción en los mecanismos centrales de la tumorigénesis (crecimiento, diferenciación celular y apoptosis) (111) y capacidad para inhibir las metaloproteinasas y la angiogénesis (112-115). Estos efectos antiproliferativos han sido demostrados en el cáncer de colon, mama, próstata y páncreas (116-120).

Sin embargo, el potencial efecto antiproliferativo/antineoplásico de la 1,25-(OH)₂-D₃ en las lesiones del endometrio actualmente sigue siendo especulativo.

Es posible que el papel inmunomodulador de la VD₃ en la endometriosis, en caso de existir, sea local, autocrino y/o paracrino, a nivel de los focos de endometriosis o de las lesiones. En un estudio experimental en ratas a las que se les había inducido endometriosis, se observó que aquellas que habían sido tratadas con VD₃ redujeron en un 48,8 % el tamaño de la lesión (121).

Aunque no se ha encontrado asociación entre los diferentes polimorfismos de VDR y el aumento en la susceptibilidad a la enfermedad (122), los polimorfismos séricos de la proteína transportadora VDBP sí podrían suponer otro elemento relacional entre la VD₃ y la endometriosis.

La VDBP, o componente (Gc) específico de grupo, es reconocido como un importante transportador plasmático de la VD₃ y de sus metabolitos, y es el precursor de la Gc-proteína derivada del factor de activación de macrófagos

(GcMAF), que puede activar la función depuradora de los macrófagos sin iniciar la respuesta inflamatoria (123, 124).

Niveles de VDBP significativamente más altos han sido observados en mujeres con endometriosis en comparación con los controles (125).

Es posible que la incapacidad para activar suficientemente la función fagocítica en mujeres con endometriosis, debido a polimorfismos específicos en DBP (Gc2) pudiera permitir la implantación del tejido endometrial en la cavidad peritoneal y explicar los niveles superiores de macrófagos y de citoquinas (IL-1 β , TNF- α y factor de crecimiento endotelial vascular) en el líquido peritoneal, en comparación con los controles, al no inhibirse la capacidad implantatoria.

En un estudio coreano que usó técnicas proteómicas en muestras de orina de mujeres con y sin endometriosis, una de las 22 manchas de expresión diferencial de proteínas fue identificada como DBP urinaria. Esta DBP urinaria corregida para la expresión de creatinina (DBP-Cr) estaba significativamente más elevada en mujeres con endometriosis (126). A pesar de que la DBP-Cr urinaria mostró un valor limitado como marcador diagnóstico para la endometriosis (sensibilidad 58 %, especificidad 76 %), los niveles urinarios elevados de DBP en estas mujeres fortalecen la asociación sugerida entre DBP y la patogénesis de la endometriosis, y la posicionan como un nuevo biomarcador en la endometriosis.

C2) Papel de la VD₃ en el tratamiento de la infertilidad asociada a la endometriosis.

Los defectos implantatorios por alteraciones en la receptividad endometrial son uno de los mecanismos, junto con la distorsión anatómica, modificaciones en la función peritoneal, ambiente folicular y foliculogénesis, que explican la infertilidad asociada a la endometriosis (127).

Los metabolitos de la VD₃ han sido implicados en los mecanismos de implantación endometrial tanto en modelos animales como en humanos. La baja expresión de las integrinas $\alpha v \beta 3$, biomarcadores conocidos de la ventana de implantación, ha sido descrita en la mitad de las mujeres con endometriosis y podría explicar la alta tasa de fracaso de las TRA en esta población (128).

Se cree que el papel de la 1,25-(OH)₂-D₃ en implantación probablemente se deba a su capacidad para la activación transcripcional directa del gen HOXA10, un potente estimulador de la $\alpha v \beta 3$ (129), que induce la diferenciación de las células endometriales a deciduales (130). Los pacientes con raquitismo por incapacidad de convertir la 25-OH-D₃ a 1,25-(OH)₂-D₃, tienen una decidualización defectuosa

(131) y, experimentalmente, se ha demostrado que el tratamiento con 1,25-(OH)₂-D₃ induce decidualización en el útero de rata (132).

El HOXA10 se expresa cíclicamente en el endometrio de adultos en respuesta a estrógenos y progesterona y regula la receptividad del endometrio durante la ventana de implantación (133). La menor expresión de genes en el HOXA10 en el endometrio eutópico y ectópico de endometriosis podría estar asociada tanto a su patogénesis, como a la infertilidad derivada (134).

El inconveniente de realizar un tratamiento con VD₃ es la hipercalcemia asociada, pero ésta puede evitarse con el uso de los análogos de los VDR. El elocalcitol (1- α -fluoro-25-hidroxi-16,23E-dieno-26,27-bishomo-20-epicolecalciferol), es un agonista con baja respuesta calcémica y propiedades bien definidas, antiproliferativas y antiinflamatorias, que se ha estudiado en patologías inflamatorias crónicas (135) y comprobado su eficacia en la hiperplasia benigna de próstata.

Este agonista inhibe la respuesta inflamatoria por la vía de la unión al factor nuclear kappa-beta ($\kappa\beta$), que se activa constitucionalmente en las células de endometriosis. Esta vía también se ha implicado en la producción de IL-8, dando como resultado el reclutamiento de macrófagos y NK (136). Experimentalmente, el elocalcitol administrado en ratas a dosis de 100mg/kg una vez al día, fue capaz de reducir el peso total de la lesión endometriósica hasta en un 70 %, e inhibir el reclutamiento de macrófagos en el peritoneo (137).

C3) Papel de la VD₃ en el dolor pélvico asociado a la endometriosis.

La endometriosis es la causa más común de dolor pélvico crónico en las mujeres en edad fértil que implica importantes repercusiones tanto físicas como de relación social (138, 139).

La reducción del dolor asociado a la endometriosis, por parte de la 1,25-(OH)₂-D₃ ha sido explicada por los siguientes mecanismos:

- 1) Por su acción sobre el endometrio: a) disminuyendo la síntesis de prostaglandinas (por supresión de la ciclooxigenasa 2), e inactivándolas a través de la regulación de la 15-deshidrogenasa hidroxiprostaglandina (24), b) bloqueando la producción de citoquinas inflamatorias a través de la activación de p38 (140).
- 2) Por su capacidad para reducir la angiogénesis in vivo (141). La génesis de fibras nerviosas, por un proceso de neuroangiogénesis iniciado en los focos de endo-

FIGURA 8

Efectos de la VD3 en las mujeres con endometriosis

ENDOMETRIOSIS		
APROXIMACIONES A LA PATOGENIA	APROXIMACIONES TERAPÉUTICAS	APROXIMACIONES AL DIAGNÓSTICO
Correlación inversa VD ₃	INFERTILIDAD △HOXA10 → △integrinas αvβ3	DBP como biomarcador
Influencia inmunomoduladora	DOLOR PÉLVICO • ▽ Prostaglandinas • Efectos antiinflamatorios • ▽ Angiogénesis	
Influencia antiproliferativa	AGONISTAS DE VDR Elocalcitol	

metriosis y en las lesiones locales (142), propagaría los estímulos dolorosos a múltiples segmentos de la médula espinal originando síndromes de dolor tales como el síndrome de vejiga dolorosa y síndrome del intestino irritable.

Un estudio doble ciego aleatorizado en 40 mujeres (20 con endometriosis y 20 controles) durante un período de estudio de 60 días, concluyó con una reducción del 41 % en la puntuación media del dolor ($p < 0,01$) en el grupo que fue tratado con una única dosis oral de colecalciferol (300 000 UI/ml) 5 días antes de la menstruación esperada (143). La mayor reducción de las puntuaciones de dolor ($r: -0,76; p < 0,01$) fue observada en mujeres con dolor .

D) Implicaciones de la vitamina d3 en los miomas (Figura 9)

El mioma uterino es la tumoración pélvica más frecuente en la mujer , afectando al 15-30 % de las que se encuentran en edad reproductiva (144). Es más prevalente (entre 3 y 9 veces) entre la población de etnia negra que en la caucasiana (145), y menos entre las europeas que entre las americanas (146).

Es de destacar que, respecto de las mujeres caucásicas, la afroamericanas tienen más prevalencia de miomas múltiples (73 % vs. 45 %) (147), hasta 10 veces más probabilidad de ser deficitarias de VD₃ (14) y 5 veces menos de poseer valores de suficiencia (10 % vs 50 %) (15). Una causa de la

falta de VD₃ podría estar en la pigmentación negra de su piel, ya que ésta disminuye la absorción de los rayos UV del sol y contrarresta la eficacia de la principal fuente de VD₃, que es la exposición solar. Por otra parte, la intolerancia a la lactosa en los afroamericanos es más prevalente y consumen menos leche, que podría ser otro factor para explicar los bajos los niveles de VD₃.

A la luz de los conocimientos actuales, podemos concluir que la deficiencia de VD₃ es un factor de riesgo para el desarrollo de leiomioma uterino, ya que ha sido demostrado que las mujeres con fibromas uterinos tienen niveles séricos más bajos de VD₃ que las mujeres sanas y que estos niveles están inversamente correlacionados con el tamaño del leiomioma (148). Además, el miometrio de los miomas uterinos expresa niveles reducidos de VDR en comparación con el miometrio sano adyacente (149) .

Los polimorfismos en los genes implicados en el metabolismo de la VD₃ y en la pigmentación de la piel también han sido estudiados con esta finalidad y dos polimorfismos de un solo nucleótido han sido significativamente asociados con el leiomioma uterino (150), uno relacionado con la síntesis del colesterol (DHCR7) y otro con la síntesis de melamina, ASIP (Agouti-signaling protein).

Los mecanismos por los que la VD₃ sería protectora frente a la aparición de miomas, podrían resumirse en:

a) Control del proceso de remodelación: Los leiomiomas se caracterizan por un aumento en la proliferación celular y

un excesivo depósito de matriz extracelular (ECM). La ECM debe sufrir una degradación como mecanismo fisiológico para su reparación y remodelación, de tal forma que la interrupción de este proceso conduce a la patología. Las metaloproteinasas de la matriz (MMPs) son las principales enzimas implicadas en este proceso de degradación, que a su vez están reguladas por los inhibidores tisulares de las metaloproteinasas de la matriz (TIMPs). La VD₃ reduce significativamente el nivel de actividad de las metaloproteinasas MMP-2 y MMP-9 y aumenta los niveles de VDR y TIMP-2 de manera dependiente de la concentración (151).

b) Efecto antiproliferativo: Ya comentado en el apartado de la endometriosis, este efecto se basa en la presencia de VDRE en las regiones promotoras de los genes CDKI (inhibidores de la ciclina dependiente de quinasa) con capacidad para detener el ciclo celular en la fase G1. Se ha demostrado que el perfil de expresión de estos VDRE se desregula en los leiomiomas uterinos y esta anomalía podría jugar un papel funcional en la proliferación celular. La inhibición del crecimiento podría seguir vías tales como la regulación a la baja del antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA), de la CDK1 y de la supresión de la expresión y actividad de la catecol-O-metiltransferasa (COMT) en células del leiomioma (152), una enzima esencial en el metabolismo de los estrógenos.

c) Efecto apoptótico: la 1,25-(OH)₂-D₃ puede aumentar la expresión de proteínas proapoptóticas Bax y Bad, activar directamente la vía de las caspasas y regular a la baja la BCL-2 antiapoptótica (153).

d) Actividad antifibrótica: la VD₃ suprime el efecto de TGF-β₃ (proteína que induce la fibrosis) en células humanas de leiomioma y reduce la expresión de los receptores de estrógenos ER-α y de progesterona PR-A y PR-B, que están regulados al alza en los miomas (154).

Por todo esto, la VD₃ podría ser considerada como una opción terapéutica a largo plazo para el tratamiento eficaz, seguro y no quirúrgico de los miomas uterinos.

E) Influencia de la vitamina d3 en la implantación y en la inmunotolerancia materna (Figura 10)

El papel de la VD₃ como modulador potencial de la respuesta inmune durante el embarazo ya se postuló por primera vez hace más de 50 años, con referencia específica a la implantación (155).

Durante el embarazo, la decidua se transforma en una interfase privilegiada donde ocurre una regulación inmunológica con mecanismos propios y diferentes a los que tienen lugar fuera de ella. La VD₃ podría ser un elemento regulador clave de esta función inmune, ya que, tanto la decidua como la placenta son dos localizaciones principales donde se sintetiza 1,25-(OH)₂-D₃, la forma activa de la VD₃ (156).

En la actualidad, la VD₃ se postula como un sólido candidato para prevenir eventos adversos gestacionales ya que desde el inicio de la gestación, los tejidos de la placenta/decidua tienen potencial para generar cantidades significativas de 1,25-(OH)₂-D₃ (expresan tanto VDR como CYP27B1)

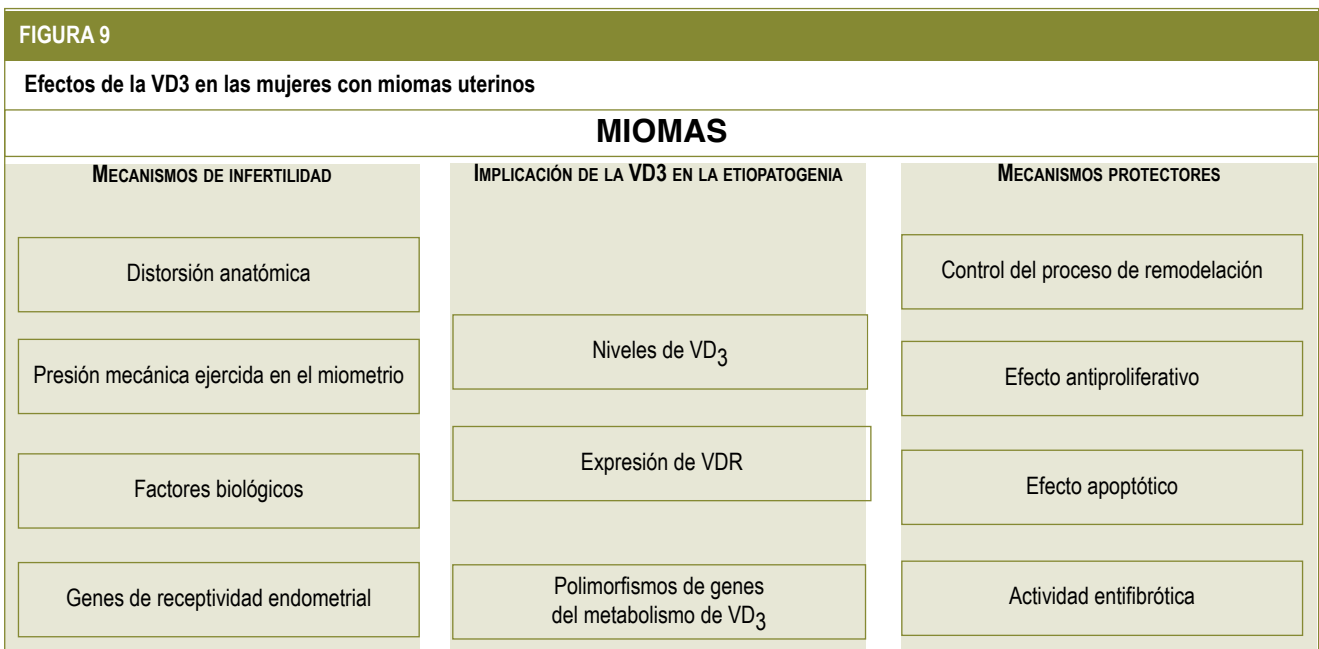
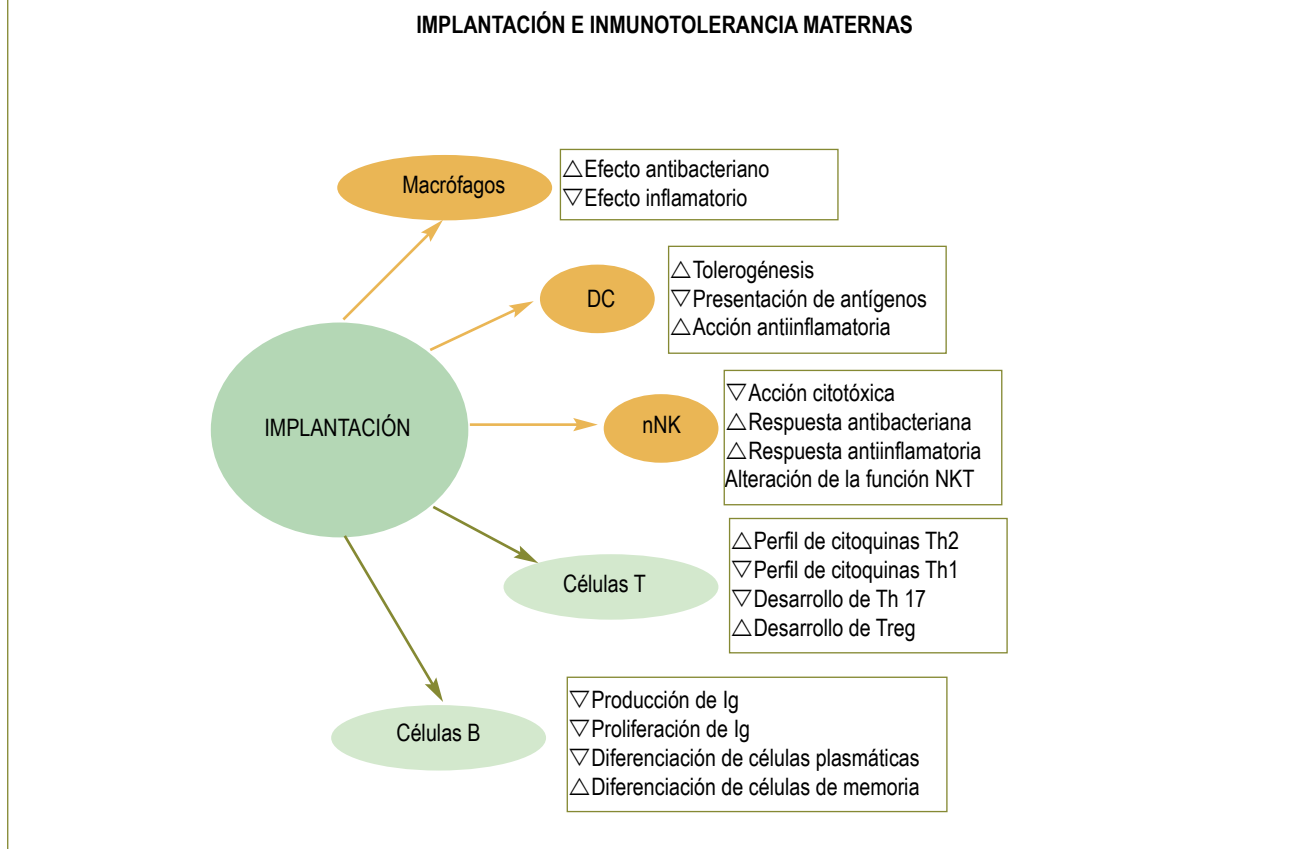


FIGURA 10

Efectos de la VD3 en la implantación e inmunotolerancia materna



y disminuir la expresión de la enzima catabólica, CYP24A1 (157). Esta circunstancia y el hecho de que su utilidad no parece centrarse exclusivamente en funciones de mineralización fetal (el aporte de calcio al feto no se altera en la deficiencia de VD₃ (158) y la mineralización de los huesos fetales se produce relativamente al final del embarazo (159), sostienen la hipótesis de que su función inicial es inmunomoduladora para la aceptación del embarazo.

En un estudio transversal retrospectivo de 133 mujeres diagnosticadas de pérdida recurrente del embarazo (160), se observó que 63 de cada 133 mujeres (47,4 %) tenían hipovitaminosis D (menos de 30 ng/ml) y que los niveles de células NK y su citotoxicidad eran significativamente superiores en este grupo respecto del grupo con niveles normales de VD₃.

Otro estudio que evaluó el efecto del tratamiento con VD₃ en el trofoblasto de gestantes del primer trimestre con respuesta inflamatoria inducida por anticuerpos antifosfolípidos, informó que el tratamiento con VD₃ mejoraba la

respuesta inflamatoria al disminuir los niveles de IL-8 (161).

Su papel en la receptividad endometrial fue tratado en un trabajo que estudió los niveles de VD₃ en 99 receptoras de ovocitos donados que tuvieron transferencia embrionaria (162). Las receptoras con niveles de VD₃ insuficientes (< 30 ng/ml) tuvieron una tasa de nacidos vivos del 31 % frente al 59 % obtenido en las receptoras con niveles normales. Dado que se trataba de receptoras de ovocitos, la disminución en las tasas de embarazo se atribuyó a la alteración en la receptividad del endometrio. Estos resultados, sin embargo, no pudieron ser confirmados en un estudio retrospectivo (163) realizado en 529 ciclos de FIV con transferencia de embriones propios en estadio de blastocisto.

La VD₃ ha demostrado su influencia en los dos brazos del sistema inmunitario, es decir, tanto en la inmunidad innata (macrófagos, células dendríticas, leucocitos NK), como en la adaptativa o adquirida (linfocitos) (164).

A) Efectos sobre macrófagos: La VD₃ potencia el efecto antibacteriano y disminuye el componente inflamatorio.

Las células deciduales no son capaces de expresar CYP27B1, pero poseen gran capacidad de producción de 1,25-(OH)₂-D₃ y de inducción de proteínas antibacterianas (catelicidina (165), β-defensinas (166) y hepcidina (167)). Los macrófagos deciduales, que representan el 80 % de las células inmunes deciduales, por el contrario, sí expresan el gen CYP27B1 y receptores VDR (98), de aquí que parezca probable que los macrófagos deciduales desempeñen un papel significativo en la generación localizada de 1,25-(OH)₂-D₃ (168).

La demostración de que la activación intracrina de VD₃ en los monocitos estimula la expresión de las proteínas antibacterianas (169) presentes en la decidua, han permitido concluir que niveles bajos de 25-OH-D₃ séricos, al disminuir la actividad antibacteriana de los monocitos, podrían incrementar el riesgo de infección, o que, por el contrario, la administración de suplementos de VD₃ a individuos deficitarios de VD₃ ayudaría a proteger contra la infección (170).

Comparando las poblaciones de leucocitos durante el primer y segundo trimestre del embarazo, se observó una disminución significativa en el número de macrófagos a expensas de los M1 proinflamatorios y citotóxicos, ya que el subconjunto de M2 (CD163+CD206+) con función activa de inmunotolerancia (171) (Kwan et al. 2014), aumentaba. Esta polarización hacia un subtipo de macrófagos M2 también ha sido observado en las placentas normales a término en relación con las de las mujeres con embarazos complicados por parto prematuro y preeclampsia.

Tal comportamiento no se ha producido en animales deficitarios para CYP27B1, ya que en estos casos lo observado ha sido un notable aumento de la actividad proinflamatoria en la placenta (172).

B) Efecto sobre las células dendríticas (DC): La VD₃ produce en ellas un fenotipo menos agresivo y más tolerogénico.

La 1,25-(OH)₂-D₃ ha demostrado en estudios in vitro que inhibe la diferenciación y la maduración de las DC a través de su unión al VDR (173), produciendo un fenotipo más inmaduro (174). Este fenotipo es el que se encuentra en la decidua durante el 1er y 2º trimestre y se caracteriza por ser más tolerogénico, por disminuir tanto la capacidad de presentación de antígenos como de de citoquinas inflamatorias (IL12) y por incrementar la producción de citoquinas antiinflamatorias (IL-10) (175). Una sobreabundancia de DC deciduales ha sido observada en casos de preeclampsia (176) y de abortos recurrentes (177), sugiriendo que las DC pueden estar implicadas en la etiología de algunos acontecimientos adversos en el embarazo. La existencia de un sis-

tema activo para la VD₃ intracrina en las DC justificaría que las variaciones en 25-OH-D₃ materna podrían afectar su funcionalidad y reclutamiento.

C) Efecto sobre las células NK uterinas (uNK)/deciduales: La VD₃ parece potenciar el efecto de las uNK para favorecer la adecuada invasión trofoblástica.

Las células NK expresan ARNm para VDR y CYP27B1 (178) y el tratamiento, con 25-OH-D₃ o con 1,25-(OH)₂-D₃ ha demostrado que promueve respuestas antibacterianas y antiinflamatorias (165). Las citoquinas IFNγ e IL2 que aumentan la actividad NK citotóxica, son inhibidas por los precursores de la VD₃ y la 1,25-(OH)₂-D₃ (179).

Las uNK del embarazo precoz y del endometrio no gestante son distintas entre sí y, a su vez, de las NK de sangre periférica, poseyendo las uNK una disminución de su capacidad citotóxica respecto a las periféricas (180, 181).

La prominencia de las células uNK en la época de la implantación y placentación temprana (llegan a representar el 70 % de la población decidual estromal de células inmunes) (182), ha sugerido que podrían desempeñar un papel fundamental en el éxito del establecimiento del embarazo.

Las células uNK tienen un papel fundamental en la remodelación de las arteriolas espirales (183) y en la regulación de la invasión del trofoblasto extraveloso en la decidua basal, a través de la producción de citoquinas y quimioquinas locales (184). Dado que la deficiencia de VD₃ tanto en los seres humanos (185) como en ratones (186) se ha relacionado con la preeclampsia, es posible especular que esta deficiencia produjese alteraciones en las células uNK que condujeran a una incompleta transformación de las arteriolas espirales o al fracaso de la invasión trofoblástica extravelosa responsables de la hipoperfusión placentaria.

Un subtipo de células NK que se acumulan en la decidua son las células T asesinas naturales CD1d-reactivas (NKT), cuya activación en ratones induce el parto prematuro y pérdidas tempranas hasta la mitad de la gestación (187). Variaciones del estado sérico de la VD₃ (25-OH-D₃ en suero materno) ha demostrado en ratones que produce alteraciones en la función de células NKT en el útero y en su descendencia (188).

D) Efectos sobre las células T: la VD₃ altera el fenotipo de las células T y conduce a procesos que favorecen la inmunotolerancia.

En 1986 (189) se constató que las células T expresan VDR, con niveles que aumentan a medida que las células T proliferan.

Estas observaciones que enlazan la VD₃ con el sistema inmune adaptativo motivaron que los estudios iniciales de la VD₃ y las células T se centraran en las respuestas antipro-

liferativas (189, 190). Sin embargo, ahora está claro que la VD₃ también influye en el fenotipo de las células T, promoviendo el paso del perfil Th1 de citoquinas al Th2 (191) limitando el potencial daño tisular asociado a la excesiva respuesta celular inmune Th1 y favoreciendo el paso a un fenotipo Th2 más humoral.

Existe un tercer grupo de células Th que es influido por la VD₃, son las células Th17, que secretan IL17. Niveles elevados de células Th17 deciduales se han reportado en abortos espontáneos (192) y aumentos en el ratio de Th1/Th2 en la decidua de abortos espontáneos recurrentes (193). La exposición a la 1,25-(OH)₂-D₃ in vitro suprime el desarrollo de células Th17 (194) y la expresión de la IL17 (IL17A) (195).

No todas las respuestas inmunes de las células T a la VD₃ están restringidas a las células Th, sino que éstas también incluyen acciones potenciadoras sobre el desarrollo de células T reguladoras (Treg) (196), un grupo de células T CD4+ que inhiben la proliferación de otras células CD4+. Esta particularidad ha sido propuesta como un potencial mecanismo de efectos beneficiosos de la VD₃ en enfermedades autoinmunes y en el rechazo del injerto-huésped (197). Para estimular el desarrollo de estas Treg, la 1,25-(OH)₂-D₃ puede actuar directamente sobre los VDR de células que expresan CD4+ (198).

La 1,25-(OH)₂-D₃ estimula la producción de células T CD4+ CD25+ FoxP3+, a través de una vía mediada por la indolamina 2,3- dioxigenasa, IDO (199) que está implicada en el proceso de inmunotolerancia.

E) Efectos sobre las células B. La VD₃ puede suprimir la proliferación (200) y producción de inmunoglobulinas (Ig) (201) en células B con VDR expresado, e inhibir la diferenciación de células plasmáticas y de células de memoria (202) representando un potencial papel beneficioso en los trastornos relacionados con células B, como ocurre en el lupus eritematoso sistémico. Las células B secretoras de IL10, denominadas células B10, han sido vinculadas a la protección contra la enfermedad autoinmune (203). Hasta el momento, la función de estas células específicamente dentro de la decidua sigue siendo poco clara.

Podemos, por lo tanto, resumir que la VD₃ en el sistema inmunológico favorece la tolerogénesis y optimiza las condiciones para la implantación, al disminuir la acción citotóxica e inflamatoria, y por consiguiente, los riesgos de rechazo.

F) Influencia de la vitamina d3 en los resultados de la FIV

Una variabilidad significativa en las tasas de fertilización y calidad embrionaria, con mejores resultados en primavera

y peores en otoño, fue relacionada con las horas de luz recibidas, en un trabajo de Rojansky (18) que incluyó 1074 ciclos FIV en 657 mujeres

Sin embargo la relación entre VD y los resultados de FIV, evaluada en múltiples estudios, ha concluido con resultados contradictorios

En 2010, Ozkan (204) obtuvo mayores índices de implantación y de embarazos por embrión transferido, en las mujeres que tenían niveles más elevados de VD₃. Las pacientes con niveles elevados de VD tuvieron 4 veces más posibilidades de éxito que las que tenían bajos niveles. Por cada incremento de 1 ng/ml de 25 OH-D en líquido folicular aumentaba la posibilidad de embarazo en un 6 %.

En 2012, Rudick (205) obtuvo resultados similares en un grupo con 188 mujeres y concluyó que las mujeres con niveles adecuados de VD tenían 4 veces más posibilidades de un resultado exitoso. En 2014, este autor publicó mayores tasas de embarazo en receptoras de ovocitos cuando presentaban valores de ≥ 30 ng/mL, sugiriendo que el efecto beneficioso se obtenía a través del endometrio y no por el folículo o por el ovocito (164).

Sin embargo estas conclusiones no fueron corroboradas en un estudio similar de Fabris (206) ya que los resultados en las receptoras fueron similares independientemente del nivel de VD.

En el estudio de Estes (207), que incluyó a 2688 parejas antes de su primer ciclo FIV, se encontraron niveles inferiores de VDBP en el líquido folicular de las mujeres que habían tenido éxito en el tratamiento. Pero los niveles de 25OH-D no guardaron relación el éxito de la FIV.

Esta falta de correlación entre niveles de 25 OH-D y el resultado de la FIV también fue obtenida en el trabajo de Aleyasin (208) y corroborada en el de Firouzabadi (209), en el que en 221 mujeres tratadas durante 2010 y 2011, no se encontró correlación entre los niveles séricos o foliculares de VD con los índices de fertilización, implantación o embarazo clínico.

Por último, Anifandis (210), obtuvo resultados negativos para la VD₃ ya que sus niveles elevados se asociaron a peores resultados en FIV. La calidad embrionaria y las tasas de embarazo clínico fueron inferiores en mujeres con niveles > 30 ng/mL de 25OH-D.

CONCLUSIONES:

El estudio de la VD₃ es un tema de actualidad que ha sido considerado como un importante problema de salud. Además de sus funciones clásicas, ampliamente estudiadas, esta

hormona secosteroide presenta otras “no clásicas” entre las que merece un lugar privilegiado la reproductiva.

Aunque no disponemos de la suficiente evidencia para evaluar su eficacia terapéutica, los estados carenciales parecen estar asociados con la patología reproductiva humana.

Su implicación en la fertilidad masculina se basa en su correlación positiva con la calidad seminal, aunque también aquí, se desconocen los efectos de su suplementación.

El déficit crónico de VD₃ parece estar asociado a un deterioro en la reserva ovárica. La suplementación con VD₃ en los estados carenciales podría ser de utilidad para optimizar la reserva ovárica y mejorar la estimulación ovárica en TRA.

En mujeres con SOP, los niveles séricos de VD₃ disminuyen significativamente cuando está presente la obesidad. El tratamiento hasta conseguir niveles normales mejora la resistencia a la insulina, el estrés celular y los niveles séricos anormalmente elevados de AMH, favoreciendo el proceso ovulatorio y la eficacia de las técnicas de estimulación ovárica. En el SOP, los niveles séricos deben ser superiores a los 30 ng/ml. Valores de 25-OH-D₃ ≥ 45 ng/ml son considerados “óptimos” para las mujeres que intentan concebir.

Aunque las primeras publicaciones encontraron niveles elevados de VD₃ en mujeres con endometriosis, en la actualidad se considera que la suplementación con VD₃, o sus análogos, en la endometriosis mejora la clínica de dolor, aumenta la posibilidad de embarazo y previene la actividad invasiva del tejido endometriósico en los estados carenciales.

La deficiencia de VD₃ es un factor de riesgo para el desarrollo de leiomioma uterino. Niveles elevados de VD₃ son protectores frente a esta patología y la administración de VD₃ podría ser contemplada como una opción terapéutica para esta patología.

La VD₃ ha demostrado su influencia tanto en la inmunidad innata, como en la adaptativa o adquirida. Su acción en el sistema inmunológico favorece la tolerogénesis, y optimiza las condiciones para la implantación al disminuir la acción citotóxica e inflamatoria.

La implicación de la VD₃ en el resultado de la FIV es actualmente controvertida.

BIBLIOGRAFÍA

1. Holick, M.F. Vitamin D deficiency. *New England Journal of Medicine* 2007; 357:266–281.
2. Holick, M.F. & Chen, T.C. Vitamin D deficiency: a worldwide problem with health consequences. *American Journal of Clinical Nutrition* 2008; 87:1080S–1086S.
3. Hyppönen, E. et al. Intake of vitamin D and risk of type 1 diabetes: a birth-cohort study. *Lancet* 2001; 358:1500–1503.
4. Cannell, J.J. et al. Epidemic influenza and vitamin D. *Epidemiology and Infection* 2006; 134:1129–1140.
5. Munger, K.L. et al. Serum 25-hydroxyvitamin D levels and risk of multiple sclerosis. *Journal of the American Medical Association* 2006; 296:2832–2838.
6. Grant, W.B. & Mohr, S.B. Ecological studies of ultraviolet B, vitamin D and cancer since 2000. *Annals of Epidemiology* 2009; 19:446–4548.
7. Brehm, J.M. et al. Serum vitamin D levels and severe asthma exacerbations in the Childhood Asthma Management Program study. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2010; 126:52–58e55.
8. Zittermann, A., Gummert, J.F. & Borgermann, J. The role of vitamin D in dyslipidemia and cardiovascular disease. *Current Pharmaceutical Design* 2011; 17:933–942.
9. Tamblyn, J.A. et al. Immunological role of vitamin D at the maternal-fetal interface. *Journal of Endocrinology* 2015; 224:R107–R121.
10. Pal, L. et al. Vitamin D status relates to reproductive outcome in women with Polycystic Ovary Syndrome: secondary analysis of a multicenter randomized controlled trial. *J Clin Endocrinol Metab* 2016 May 17; jc20154352. [Epub ahead of print]
11. Henry, H.L. et al. 14th Vitamin D Workshop consensus on vitamin D nutritional guidelines. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 2010; 121:4–6.
12. Holick, M.F. et al. Evaluation, treatment, and prevention of vitamin D deficiency: an endocrine society clinical practice guideline. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2011; 96:1911–1930.
13. Garbedian, K. et al. Effect of vitamin D status on clinical pregnancy rates following in vitro fertilization. *Canadian Medical Association Journal* 2013; 1(2):E77–E82.
14. Nesby-O’Dell, S. et al. Hypovitaminosis D prevalence and determinants among African American and white women of reproductive age: third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988–1994. *The American Journal of Clinical Nutrition* 2002; 76:187–192.
15. Baird, D.D. et al. Vitamin D and the risk of uterine fibroids. *Epidemiology* 2013; 24(3):447–453.22.
16. Public Health England and Food Standards Agency. National Diet and Nutrition Survey. Headline results from years 1, 2 and 3 (combined) of the Rolling Programme (2008/2009–2010/2011) 2014. Available at: <https://www.gov.uk>.
17. Gale, C.R. et al. Maternal vitamin D status during pregnancy and child outcomes. *European Journal of Clinical Nutrition* 2008; 62(1):68–77.
18. Rojansky, N., Benschushan, A. & Meirsdorf, S. Seasonal variability in fertilization and embryo quality rates in women undergoing IVF. *Fertility and Sterility* 2000; 74(3):476–481.
19. Rojansky, N., Brzezinski, A. & Schenker, J.G. Seasonality in human reproduction: an update. *Human Reproduction* 1992; 7(6):735–745.
20. Panda, D.K. et al. Targeted ablation of the 25-hydroxyvitamin D 1α-hydroxylase enzyme: Evidence for skeletal, reproductive, and immune dysfunction. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2001; 98(13):7498–7503.
21. Uhland, A.M., Kwiecinski, G.G. & DeLuca, H.F. Normalization of serum calcium restores fertility in vitamin D - deficient male rats. *Journal of Nutrition* 1992; 122(6):1338–1344.
22. Anagnostis, P., Karras, S. & Goulis, D.G. Vitamin D in human reproduction: A narrative review. *International Journal of Clinical Practice* 2013; 67(3):225–235.
23. Pacis, M.M. et al. Vitamin D and assisted reproduction: should vitamin D be routinely screened and repleted prior to ART? A systematic review. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 2015; 32:323–335.
24. Sayegh, L., Fuleihan, G.E.H. & Nassar, A.H. Vitamin D in endometriosis: A causative or confounding factor? *Metabolism* 2014; 63:32–41.
25. Irani, M. et al. Vitamin D increases serum levels of the soluble receptor for advanced glycation end products in women with PCOS. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2014; 99(5):886–890.

26. R. Vieth. Vitamin D supplementation, 25-hydroxyvitamin D concentrations, and safety *Am. J. Clin. Nutr.* 1999; 69:842–856.
27. Brakta, S. et al. Role of Vitamin D in uterine fibroid biology. *Fertility and Sterility* 2015; 104(3):698–706.
28. Irani, M. & Merhi, Z. Role of vitamin D in ovarian physiology and its implication in reproduction: a systematic review. *Fertility and Sterility* 2014; 102(2).
29. Haussler, M.R. et al. Molecular mechanisms of vitamin D action. *Calcified Tissue International* 2012; 92(2):77–98.
30. Blomberg Jensen, M. & Dissing, S. Non-genomic effects of vitamin D in human spermatozoa. *Steroids* 2012; 77(10):903–909.
31. Haussler, M.R. et al. Vitamin D receptor (VDR)-mediated actions of 1 α ,25(OH) $_2$ vitamin D $_3$: Genomic and non-genomic mechanisms. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism* 2011; 25:543–559.
32. Lerchbaum, E. & Obermayer-Pietsch, B. Vitamin D and fertility: a systematic review. *European Journal of Endocrinology* 2012; 166:765–778.
33. Nagpal, S., Na, S. & Rathnachalam, R. Noncalcemic actions of Vitamin D Receptor ligands. *Endocrine Reviews* 2005; 26(5):662–687.
34. Mora, J.R., Iwata, M. & von Andrian, U.H. Vitamin effects on the immune system: vitamins A and D take centre stage. *Nature Reviews Immunology* 2010; 8(9):685–698.
35. Anagnostis, P. et al. Atherosclerosis and osteoporosis: age-dependent degenerative processes or related entities? *Osteoporosis International* 2009; 20:197–207.
36. Paes de Almeida Ferreira Braga, D. et al. Food intake and social habits in male patients and its relationship to intracytoplasmic sperm injection outcomes. *Fertility and Sterility* 2012; 97(1):53–59.
37. Hirai, T. et al. Effect of 1,25-dihydroxyvitamin D on testicular morphology and gene expression in experimental cryptorchid mouse: testis specific cDNA microarray analysis and potential implication in male infertility. *The Journal of Urology* 2009; 181(3):1487–92.
38. Blomberg Jensen, M. et al. Vitamin D receptor and vitamin D metabolizing enzymes are expressed in the human male reproductive tract. *2010;25(5):1303–1311.*
39. Aquila, S. et al. Human sperm anatomy: ultrastructural localization of 1 α ,25- *Journal of Anatomy* 2008;25:555–564.
40. Pludowski, P. et al. Vitamin D effects on musculoskeletal health, immunity, autoimmunity, cardiovascular disease, cancer, fertility, pregnancy, dementia and mortality — A review of recent evidence. *Autoimmunity Reviews* 2013; 12(10):976–989.
41. Blomberg Jensen, M. Vitamin D and male reproduction. *Nature Reviews* 2014;10:175–186.
42. Blomberg Jensen, M. Vitamin D metabolism, sex hormones, and male reproductive function. *Reproduction* 2012;144:135–152.
43. Kinuta, K. et al. Vitamin D is an important factor in estrogen biosynthesis of both female and male gonads. *Endocrinology* 2000;141(4):1317–1324.
44. Blomberg Jensen, M. et al. Vitamin D is positively associated with sperm motility and increases intracellular calcium in human spermatozoa. *Hum Reprod.* 2011 Jun;26(6):1307–17.
45. Rafu-Hansen, C.H. et al. Are serum levels of vitamin D associated with semen quality? Results from a cross-sectional study in young healthy men. *Fertility and Sterility* 2011; 95(3):1000–1004.
46. Pilz, S. et al. Effect of vitamin D supplementation on testosterone levels in men. *Hormone and Metabolic Research* 2011; 43(3):223–225.
47. Nimptsch, K. et al. Association between plasma 25-OH vitamin D and testosterone levels in men. *Clinical Endocrinology* 2012; 77(1):106–112.
48. Rafiq, R. et al. Associations of vitamin D status and vitamin D-related polymorphisms with sex hormones in older men. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 2015; S0960-0760(15):30139-4
49. Wehr, E. et al. Association of hypovitaminosis D with metabolic disturbances in polycystic ovary syndrome. *European Journal of Endocrinology* 2009; 161:575–582.
50. Buhling, K.J. & Laakmann, E. The effect of micronutrient supplements on male fertility. *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology* 2014; 26:199–209.
51. Dennis, N.A. et al. The level of serum Anti-Müllerian Hormone correlates with Vitamin D status in men and women but not in boys 2012 97(7):2450–2455.
52. Malloy, P.J. et al. Interaction of the vitamin D receptor with a vitamin D response element in the Müllerian-inhibiting substance (MIS) promoter: regulation of MIS expression by calcitriol in prostate cancer cells 2009; 150(4):1580–1587.
53. Krishnan, A. V et al. Novel pathways that contribute to the anti-proliferative and chemopreventive activities of calcitriol in prostate cancer. *Steroid Biochemistry & Molecular Biology* 2007; 103:694–702.
54. Wojtusik, J. & Johnson, P.A. Vitamin D regulates anti-müllerian hormone expression in granulosa cells of the Hen. *Biology of Reproduction* 2012; 86(3(91)):1–7.
55. Merhi, Z., Doswell, A., et al. Vitamin D alters genes involved in follicular development and steroidogenesis in human cumulus granulosa cells. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2014; 99(6):E1137–E1145.
56. Jukic, A.M.Z., Steiner, A.Z. & Baird, D.D. Association between serum 25-hydroxyvitamin D and ovarian reserve in pre-menopausal women. *Menopause* 2015;22(3):312–316.
57. Wang, J.-H. & Tuohimaa, P. Regulation of 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2, type 4 and type 5 by calcitriol, LXR agonist and 5 β -dihydrotestosterone in human prostate cancer cells. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 2007; 107:100–105.
58. Shahrokhi, S.Z., Ghaffari, F. & Kazerouni, F. Role of vitamin D in female Reproduction. *Clinica Chimica Acta* 2016; 455:33–38.
59. Krishnan, A. V et al. Tissue-selective regulation of aromatase expression by calcitriol: implications for breast cancer therapy. *Endocrinology* 2010; 151(1):32–42.
60. Parikh, G. et al. Vitamin D regulates steroidogenesis and Insulin-like Growth Factor Binding Protein-1 (IGFBP-1) production in human ovarian cells. *Hormone and Metabolic Research* 2010; 42,pp.754–757.
61. Barrera, D. et al. Estradiol and progesterone synthesis in human placenta is stimulated by calcitriol. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 2007; 103:529–532.
62. Azziz, R. et al. The androgen excess and PCOS society criteria for the polycystic ovary syndrome: the complete task force report. *Fertility and Sterility* 2009; 91(2):456–488.
63. March, W.A. et al. The prevalence of polycystic ovary syndrome in a community sample assessed under contrasting diagnostic criteria. *Human Reproduction* 2010; 25(2):544–551.
64. Hahn, S. et al. Low serum 25-hydroxyvitamin D concentrations are associated with insulin resistance and obesity in women with polycystic ovary syndrome. *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes* 2006;114(10):577–583.
65. Li, H.W.R. et al. Vitamin D deficiency is common and associated with metabolic risk factors in patients with polycystic ovary syndrome. *Metabolism* 2011; 60(10):1475–1481.
66. Krul-Poel, Y.H.M. et al. The role of vitamin D in metabolic disturbances in polycystic ovary syndrome: a systematic review. *European Journal of Endocrinology* 2013; 169:853–865.
67. Muscogiuri, G. et al. Low levels of 25(OH)D and insulin-resistance: 2 unrelated features or a cause-effect in PCOS? *Clinical Nutrition* 2012; 31(4):476–480.
68. Wortsman, J. et al. Decreased bioavailability of vitamin D in obesity.

- The American Journal of Clinical Nutrition 2000; 72:690–693.
69. Aguirre Castaneda, R. et al. Response to Vitamin D3 supplementation in obese and non-obese caucasian adolescents. *Hormone Research in Paediatrics* 2012;78(4):226–231.
 70. Dunaif, A. et al. Profound peripheral insulin resistance, independent of obesity, in polycystic ovary syndrome. *Diabetes* 1989; 38(9):1165–1174.
 71. Ott, J. et al. Parameters for calcium metabolism in women with polycystic ovary syndrome who undergo clomiphene citrate stimulation: a prospective cohort study. *European Journal of Endocrinology* 2012; 166:897–902.
 72. Panidis, D. et al. Serum parathyroid hormone concentrations are increased in women with Polycystic Ovary Syndrome. *Clinical Chemistry* 2005; 51(9):1691–1697.
 73. Belenchia, A.M. et al. Correcting vitamin D insufficiency improves insulin sensitivity in obese adolescents: a randomized controlled trial. *The American Journal of Clinical Nutrition* 2013; 97:774–781.
 74. Kotsa, K. et al. Role of vitamin D treatment in glucose metabolism in polycystic ovary syndrome. *Fertility and Sterility* 2009; 92(3):1053–1058.
 75. Wehr, E., Pieber, T.R. & Obermayer-Pietsch, B. Effect of vitamin D3 treatment on glucose metabolism and menstrual frequency in polycystic ovary syndrome women: a pilot study. *Journal of Endocrinological Investigation* 2011; 34(10):757–763.
 76. Ardabili, H.R., Gargari, B.P. & Farzadi, L. Vitamin D supplementation has no effect on insulin resistance assessment in women with polycystic ovary syndrome and vitamin D deficiency. *Nutrition Research* 2012;32(3):195–201.102.
 77. Maestro, B. et al. Identification of a Vitamin D response element in the human insulin receptor gene promoter. *Steroid Biochemistry & Molecular Biology* 2003; 84:223–230.
 78. Kim, J.J. et al. Vitamin D deficiency in women with polycystic ovary syndrome. *Clinical and Experimental Reproductive Medicine* 2014;41(2):80–85.
 79. Teegarden, D. & Donkin, S.S. Vitamin D: emerging new roles in insulin sensitivity. *Nutrition Research Reviews* 2009; 22:82–92.
 80. Kozakowski, J., Kapuscinska, R. & Zgliczynski, W. Associations of vitamin D concentration with metabolic and hormonal indices in women with polycystic ovary syndrome presenting abdominal and gynoidal type of obesity. *Ginekologia Polska* 2014; 85(10):765–770.
 81. Yildizhan, R. et al. Serum 25-hydroxyvitamin D concentrations in obese and non-obese women with polycystic ovary syndrome. *Archives of Gynecology and Obstetrics* 2009; 280(4):559–563.
 82. Goh, S.-Y. & Cooper, M.E. The role of advanced glycation end products in progression and complications of diabetes. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2008; 93(4):1143–1152.
 83. Wautier, M.-P. et al. Activation of NADPH oxidase by AGE links oxidant stress to altered gene expression via RAGE. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism* 2001; 280.pp.E685–E694.
 84. Vazzana, N. et al. Endogenous secretory RAGE in obese women: association with platelet activation and oxidative stress. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2012; 97(9):E1726–E1730.
 85. Unoki, H. & Yamagishi, S. Advanced glycation end products and insulin resistance. *Current Pharmaceutical Design* 2008; 14(10):987–989.
 86. Jia, X. et al. Methylglyoxal mediates adipocyte proliferation by increasing phosphorylation of Akt1. *PLoS ONE* 2012; 7(5), p.e36610.
 87. Diamanti-Kandarakis, E. et al. Immunohistochemical localization of advanced glycation endproducts (AGEs) and their receptor (RAGE) in polycystic and normal ovaries. *Histochemistry and Cell Biology* 2007; 127(6):581–589.
 88. Diamanti-Kandarakis, E. et al. Interference of AGE-RAGE signaling with steroidogenic enzyme action in human ovarian cells. In *Proceedings of the Endocrine Society's 95th Annual Meeting and Expo* 2013. pp. 15–18.
 89. Merhi, Z. Advanced glycation end products and their relevance in female reproduction. *Human Reproduction* 2014;29(1):135–145.
 90. Merhi, Z., Irani, M., et al. Follicular fluid soluble receptor for advanced glycation end-products (sRAGE): a potential indicator of ovarian reserve. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2014; 99(2):E226–E233.
 91. Chang, H. et al. Antimüllerian hormone inhibits follicle-stimulating hormone-induced adenylyl cyclase activation, aromatase expression, and estradiol production in human granulosa-lutein cells. *Fertility and Sterility* 2013; 100(2):585–592.e1.
 92. Savastano, S. et al. Serum 25-Hydroxyvitamin D levels, phosphoprotein enriched in diabetes gene product (PED/PEA-15) and leptin-to-adiponectin ratio in women with PCOS. *Nutrition & Metabolism* 2011; 8(84):1–8. Available at: <http://www.nutritionandmetabolism.com/content/8/1/84>.
 93. Thys-Jacobs, S. et al. Vitamin D and calcium dysregulation in the polycystic ovarian syndrome. *Steroids* 1999; 64:430–435.
 94. Rashidi, B. et al. The effects of calcium-vitamin D and metformin on polycystic ovary syndrome: a pilot study. *Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology* 2009;48(2):142–147.
 95. Wehr, E., Trummer, O., et al. Vitamin D-associated polymorphisms are related to insulin resistance and vitamin D deficiency in polycystic ovary syndrome. *European Journal of Endocrinology* 2011; 164:741–749.
 96. Vause, T.D. et al. Ovulation induction in polycystic ovary syndrome. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Canada* 2011; 33(1):12.
 97. Eskenazi, B. & Warner, M.L. Epidemiology of endometriosis. *Obstetrics and Gynecology Clinics of North America* ;1997 24(2):235–258.
 98. Liu, P.T. et al. Toll-like receptor triggering of a vitamin D-mediated human antimicrobial. *Science*. 2006 Mar 24;311(5768):1770-3. Epub 2006 Feb 23.
 99. Viganò, P. et al. Cycling and early pregnant endometrium as a site of regulated expression of the vitamin D system. *Journal of Molecular Endocrinology* 2006; 36:415–424.101.
 100. Hartwell, D. et al. Vitamin D metabolites-relation to age, menopause and endometriosis. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation* 1990;50(2):115–121.
 101. Somigliana, E. et al. Vitamin D reserve is higher in women with endometriosis. *Human Reproduction* 2007; 22(8):2273–2278.
 102. Agic, A. et al. Relative expression of 1,25-dihydroxyvitamin D3 receptor, vitamin D 1 α hydroxylase, vitamin D 24-hydroxylase, and vitamin D 25-hydroxylase in endometriosis and gynecologic cancers. *Reproductive Sciences* 2007; 14(5):486–497.
 103. Borkowski, J. et al. Serum and peritoneal evaluation of vitamin D-binding protein in women with endometriosis. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej* 2008; 62:103–109.
 104. Harris, H.R. et al. Dairy-food, calcium, magnesium, and vitamin D intake and endometriosis: a prospective cohort study. *American Journal of Epidemiology* 2013;177(5):420–430.
 105. Jackson, L.W. et al. Oxidative stress and endometriosis. *Human Reproduction* 2014;20(7):2014–2020.
 106. Parazzini, F. et al. Selected food intake and risk of endometriosis. *Human Reproduction* 2004; 19(8):1755–1759.
 107. Trabert, B. et al. Diet and risk of endometriosis in a population-based case-control study. *British Journal of Nutrition* 2011; 105(3):459–467.
 108. D' Ambrosio, D. et al. Inhibition of IL-12 production by 1,25-Dihydroxyvitamin D3 – Involvement of NF- κ B downregulation in transcriptional repression of the p40 gene. *Journal of Clinical Investigation* 1998; 101:252–262.
 109. Long, K.Z. & Santos, J.I. Vitamins and the regulation of the immune response. *Pediatric Infectious Disease Journal* 1999; 18(3):283–290.

110. Oral, E. et al. Prevalence of endometriosis in malignant epithelial ovary tumours. *Obstetrics & Gynecology* 2003; 109:97– 101.
111. Vuolo, L. et al. Vitamin D and cancer. *Frontiers in Endocrinology* 2012; 3:1– 13.
112. Iseki, K. et al. Inhibition of angiogenesis as a mechanism for inhibition by 1 α -hydroxyvitamin D₃ and 1,25-dihydroxyvitamin D₃ of colon carcinogenesis induced by azoxymethane in wistar rats. *International Journal of Cancer* 1999; 81:730– 733.
113. Mantell, D.J. et al. 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ inhibits angiogenesis in vitro and in vivo. *Circulation Research* 2000; 87:214– 221.
114. Chung, I. et al. Differential antiproliferative effects of calcitriol on tumor-derived and matrigelderived endothelial cells. *Cancer Research* 2006; 66(17):8565– 8573.
115. Seubwai, W. et al. Overexpression of Vitamin D Receptor indicates a good prognosis for cholangiocarcinoma. *Cancer* 2007; 109(12):2497– 2505.
116. Akhter, J. et al. Vitamin D₃ analog, EB1089, inhibits growth of subcutaneous xenografts of the human colon cancer cell line, LoVo, in a nude mouse model. *Diseases of the Colon & Rectum* 1997;40(3):317– 321.
117. Abe-Hashimoto, J. et al. Antitumor effect of 22-oxa-calcitriol, a non-calcemic analogue of calcitriol, in athymic mice implanted with human breast carcinoma and its synergism with Tamoxifen. *Cancer Research* 1993; 53:2534– 2537.
118. Polek, T.C. et al. Novel nonsteroidal vitamin D receptor modulator inhibits the growth of LNCaP xenograft tumors in athymic mice without increased serum calcium. *Prostate* 2001; 49(3):pp.224– 233.
119. Kawa, S. et al. Inhibitory effect of 22-oxa-1,25-dihydroxyvitamin D₃ on the proliferation of pancreatic cancer cell lines. *Gastroenterology*; 1996 110:1605– 1613.
120. Kawa, S. et al. Vitamin D analogues up-regulate p21 and p27 during growth inhibition of pancreatic cancer cell lines. *British Journal of Cancer* 1997; 76(7):884– 889.
121. Abbas, M.A. et al. Regression of endometrial implants treated with vitamin D₃ in a rat model of endometriosis. *European Journal of Pharmacology* 2013; 715:72– 75.
122. Vilarino, F.L. et al. Analysis of vitamin D receptor gene polymorphisms in women with and without endometriosis. *Human Immunology* 2011; 72:359– 363.
123. Daiger, S.P., Mel, S.S. & Cavalli-Sforza, L.L. Group-Specific component (Gc) proteins bind Vitamin D and 25-hydroxyvitamin D. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1975; 72(6):pp.2076– 2080.
124. Ravnsborg, T. et al. The glycosylation and characterization of the candidate Gc macrophage activating factor. *Biochimica et Biophysica Acta* 2010; 1804:909– 917.
125. Faserl, K. et al. Polymorphism in Vitamin D-Binding Protein as a genetic risk factor in the pathogenesis of endometriosis. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2011; 96(1):233– 241.
126. Cho, S. et al. Urinary vitamin D-binding protein is elevated in patients with endometriosis. *Human Reproduction* 2012; 27(2):515– 522.
127. The Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Endometriosis and infertility: a committee opinion. *Fertility and Sterility* 2012; 98(3):591– 598.
128. Donaghy, M. & Lessey, B.A. Uterine receptivity: alterations associated with benign gynecological disease. *Seminars in Reproductive Medicine* 2007; 25(6):461– 475.
129. Taylor, H.S. et al. HOX gene expression is altered in the endometrium of women with endometriosis. *Human Reproduction* 1999; 14(5):1328– 1331.
130. Du, H. et al. Direct regulation of HOXA10 by 1,25-(OH)₂ D₃ in human myelomonocytic cells and human endometrial stromal cells. *Molecular Endocrinology* 2016; 19(9):2222– 2233.
131. Glorieux, F.H., Arrabian, A. & Delvin, E.E. Pseudo-vitamin D deficiency: absence of 25-hydroxyvitamin D 1 α -hydroxylase activity in human placenta decidual cells. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 1995; 80(7):2255– 2258.
132. Halloran, B.P. & DeLuca, H.F. Effect of vitamin D deficiency on fertility and reproductive capacity in the female rat. *Journal of Nutrition* 1980; 110(8):1573– 1580.
133. Taylor, H.S. et al. HOXA10 is expressed in response to sex steroids at the time of implantation in the human endometrium. *Journal of Clinical Investigation* 1998; 101:1379– 1384.
134. Deng, K.X. et al. Expression and significance of HOXA10 gene in the eutopic and ectopic endometrium of endometriosis. *Zhonghua fu chan ke za zhi* 2011; 56(11):813– 816.
135. Adorini, L. et al. Inhibition of prostate growth and inflammation by the vitamin D receptor agonist BXL-628 (elocalcitol). *Steroid Biochemistry & Molecular Biology* 2007;103:689– 693.
136. Guo, S.W. Nuclear factor-kappaB (NF-kappaB): an unsuspected major culprit in the pathogenesis of endometriosis that is still at large? *Gynecologic and Obstetric Investigation* 2006; 63(2):71– 97.
137. Mariani, M. et al. The selective vitamin D receptor agonist, elocalcitol, reduces endometriosis development in a mouse model by inhibiting peritoneal inflammation. *Human Reproduction* 2012; 27(7):2010– 2019.
138. Milingos, S. et al. Endometriosis in patients with chronic pelvic pain: is staging predictive of the efficacy of laparoscopic surgery in pain relief? *Gynecologic and Obstetric Investigation* 2006; 62(1):48– 54.
139. Simoens, S., Hummelshoj, L. & D' Hooghe, T. Endometriosis: cost estimates and methodological perspective. *Human Reproduction Update* 2007;13(4):395– 404.
140. Krishnan, A. V & Feldman, D. Mechanisms of the anti-cancer and anti-inflammatory actions of vitamin D. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*; 2011 51:311– 336.
141. Trump, D.L., Deeb, K. & Johnson, C.S. Vitamin D: Considerations in the continued development as an agent for cancer prevention and therapy. *Cancer* 2010; 16(1):1– 9.
142. Stratton, P. & Berkley, K.J. Chronic pelvic pain and endometriosis: translational evidence of the relationship and implications. *Human Reproduction Update* 2011;17(3):327– 346.
143. Lasco, A., Catalano, A. & Benvenega, S. Improvement of primary dysmenorrhea caused by a single oral dose of vitamin D: results of a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Archives of internal medicine* 2012; 172(4):366– 367.
144. Frederick, J. et al. Intramyometrial vasopressin as a haemostatic agent during myomectomy. *British Journal of Obstetrics and Gynaecology* 1994; 101(5):453– 457.
145. Buttram, V.C.J. Uterine leiomyomata-aetiology, symptomatology and management. *Progress in clinical and biological research* 1986; 225:275– 296.
146. Heinemann, K. et al. Benign gynecological tumors: estimated incidence results of the German cohort study on women's health. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* 2003; 107:78– 80.
147. Baird, D.D. et al. High cumulative incidence of uterine leiomyoma in black and white women: Ultrasound evidence. *The American Journal of Obstetrics & Gynecology* 2003;188(1):100– 107.
148. Sabry, M. et al. Serum vitamin D₃ level inversely correlates with uterine fibroid volume in different ethnic groups: a cross-sectional observational study. *International Journal of Women's Health* 2013; 5:93– 100.
149. Halder, S.K., Goodwin, J.S. & Al-Hendy, A. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ reduces TGF- β 3-induced fibrosis-related gene expression in human uterine leiomyoma cells. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2011; 96(4):754– 762.
150. Wise, L.A. et al. Polymorphisms in Vitamin D related genes and risk of uterine leiomyomata. *Fertility and Sterility* 2014; 102(2):503– 510.

151. Halder, S.K., Osteen, K.G. & Al-Hendy, A. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 reduces extracellular matrix-associated protein expression in human uterine fibroid cells. *Biology of Reproduction* 2013; 89(6),pp.1– 13.
152. Sharan, C. et al. Vitamin D inhibits proliferation of human uterine leiomyoma cells via catechol-Omethyltransferase. *Fertility and Sterility* 2011; 95(1):247– 253.
153. Ylikomi, T. et al. Antiproliferative action of vitamin D. *Vitamins & Hormones* 2002; 64:357– 406.
154. Al-Hendy, A. et al. 1,25-dihydroxyvitamin D3 regulates expression of sex steroid receptors in human uterine fibroid cells. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2015; 100(4):572– 582.
155. Chambon, Y. Synergic acyion of Vitamin D and of progesterone in obtaining ovum implantation in the castrated pregnant rabbit. *Comptes rendus des séances de la Société de biologie et de ses filiales* 1951; 145(13-14):955– 959.
156. Gray, T.K., Lester, G.E. & Lorenc, R.S. Evidence for extra-renal 1-alpha-hydroxylation of 25-hydroxyvitamin D3 in pregnancy. *Science* 1979; 204(4399):1311– 1313.
157. Zehnder, D. et al. The ontogeny of 25-hydroxyvitamin D3 1-alpha-hydroxylase expression in human placenta and decidua. *American Journal of Pathology* 2002; 161(1):105– 114.
158. Halloran, B.P. & DeLuca, H.F. Calcium transport in small intestine during early development: role of Vitamin D. *American Journal of Physiology* 1980; 239(6):473– 479.
159. Evans, K.N. et al. Vitamin D and placental-decidual function. *Journal of the Society for Gynecologic Investigation* 2004; 11(5):263– 271.
160. Ota, K. et al. Vitamin D deficiency may be a risk factor for recurrent pregnancy losses by increasing cellular immunity and autoimmunity. *Human Reproduction* 2014; 29(2):208– 219.
161. Gysler, S.M. et al. Vitamin D reverses aPL-induced inflammation and LMWH-induced sFlt-1 release by human trophoblast. *American Journal of Reproductive Immunology* 2015; 73(3):242– 250.
162. Rudick, B.J. et al. Influence of vitamin D levels on in vitro fertilization outcomes in donorrecipient cycles. *Fertility and Sterility* 2014; 101(2):447– 452.
163. Franasiak, J.M. et al. Vitamin D levels do not affect IVF outcomes following the transfer of euploid blastocysts. *The American Journal of Obstetrics & Gynecology* 2015; 212:315.e1– 315.e6.
164. Hewison, M. Vitamin D and innate adaptive immunity. *Vitamins & Hormones* 2011; 86:23– 62.
165. Evans, K.N. et al. Effects of 25-hydroxyvitamin D3 and 1,25-dihydroxyvitamin D3 on cytokine production by human decidual cells. *Biology of Reproduction* 2006; 75:816– 822.
166. Liu, P.T. et al. Convergence of IL-1b and VDR activation pathways in human TLR2/1-induced antimicrobial responses. *PLoS ONE* 2009; 4(6), p.eS810.
167. Bacchetta, J. et al. Suppression of iron-regulatory hepcidin by Vitamin D. *Journal of the American Society of Nephrology* 2014; 25:564– 572.
168. Kachkache, M. et al. Uterine cells other than stromal decidual cells are required for 1,25-dihydroxyvitamin D, production during early human pregnancy. *Federation of European Biochemical Societies* 1993; 333(1, 2):83– 88.
169. Wang, T.-T. et al. Cutting edge: 1,25-dihydroxyvitamin D3 is a direct inducer of antimicrobial peptide gene expression. *The Journal of Immunology* 2004; 173:2909– 2912.
170. Adams, J.S. et al. Vitamin D-directed rheostatic regulation of monocyte antibacterial responses. *The Journal of Immunology* 2009; 182(7):4289– 4295.
171. Kwan, M. et al. Dynamic changes in maternal decidual leukocyte populations from first to second trimester gestation. *Placenta* 2014; 35:1027– 1034.
172. Liu, N.Q. et al. Vitamin D and the regulation of placental inflammation. *The Journal of Immunology* 2011; 186:5968– 5974.
173. Griffin, M.D. et al. Dendritic cell modulation by 1a,25-dihydroxyvitamin D3 and its analogs: A vitamin D receptor-dependent pathway that promotes a persistent state of immaturity in vitro and in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2001; 98(12):6800– 6805.
174. Kämmerer, U. et al. Unique appearance of proliferating antigen-presenting cells expressing DCSIGN (CD209) in the decidua of early human pregnancy. *American Journal of Pathology* 2003; 162(3):887– 896.
175. Laskarin, G. et al. Antigen-presenting cells and materno-fetal tolerance: an emerging role for dendritic cells. *Am J Reprod Immunol* 2007 Sep;58(3):255-67
176. Huang, S.J. et al. Pre-eclampsia is associated with dendritic cell recruitment into the uterine decidua. *The Journal of Pathology* 2008; 214(3):328– 336.
177. Askelund, K. et al. CD83(+)dendritic cells in the decidua of women with recurrent miscarriage and normal pregnancy. *Placenta* 2004; 25(2-3):140– 145.
178. Morán-Auth, Y. et al. Vitamin D status and gene transcription in immune cells. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 2013; 136:83– 85.
179. Leung, K.H. Inhibition of human natural killer cell and lymphokine-activated killer cell cytotoxicity and differentiation by vitamin D3. *Scandinavian Journal of Immunology* 1989; 30(2):199– 208.
180. Hanna, J. et al. CXCL12 expression by invasive trophoblasts induces the specific migration of CD16- human natural killer cells. *Chemokines* 2003; 102(5):1569– 1577.
181. Lash, G.E. et al. Regulation of extravillous trophoblast invasion by uterine natural killer cells is dependent on gestational age. *Human Reproduction* 2010; 25(5):1137– 1145.
182. Bulmer, J.N., Williams, P.J. & Lash, G.E. Immune cells in the placental bed. *The International Journal of Developmental Biology* 2010; 54(2-3):281– 294.
183. Robson, A. et al. Uterine natural killer cells initiate spiral artery remodeling in human pregnancy. *The FASEB Journal* 2012; 26:4876– 4885.
184. Lash, G.E. et al. Regulation of extravillous trophoblast invasion by uterine natural killer cells is dependent on gestational age. *Human Reproduction* 2010; 25(5):1137– 1145.
185. Bodnar, L.M., Catov, J.M., et al. Maternal Vitamin D deficiency increases the risk of preeclampsia. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2007; 92(9):3517– 3522.
186. Liu NQ, Ouyang Y, Bulut Y, Lagishetty V, Chan SY, Hollis BW, Wagner C, Equils O, Hewison M. Dietary vitamin D restriction in pregnant female mice is associated with maternal hypertension and altered placental and fetal development. *Endocrinology* 2013; 154(7):2270– 2280.
187. Boyson JE, Nagarkatti N, Nizam L, Exley MA, Strominger JL. Gestation stage-dependent mechanisms of invariant natural killer T cell-mediated pregnancy loss. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2006; 103(12):4580– 4585.
188. Yu, S. & Cantorna, M.T. Epigenetic reduction in iNKT cells following in utero vitamin D deficiency in mice. *The Journal of Immunology* 2011; 186(3):1384– 1390.
189. Nunn JD, Katz DR, Barker S, Fraher LJ, Hewison M, Hendy GN, O'Riordan JL. Regulation of human tonsillar T-cell proliferation by the active metabolite of vitamin D3. *Immunology* 1986; 59:479– 484.
190. Karmali R, Hewison M, Rayment N, Farrow SM, Brennan A, Katz DR, O'Riordan JL. 1,25(OH)2D3 regulates c-myc mRNA levels in tonsillar T lymphocytes. *Immunology* 1991; 74:589– 593.
191. Boonstra A, Barrat FJ, Crain C, Heath VL, Savelkoul HF, O'Garra A.. 1α ,25-dihydroxyvitamin D3 has a direct effect on naive CD4+ T cells to enhance the development of Th2 cells. *The Journal of Immunology* 2001; 167:4974– 4980.

192. Saito S, Umekage H, Sakamoto Y, Sakai M, Tanebe K, Sasaki Y, Morikawa H. Increased T-helper-1-type immunity and decreased T-helper-2-type immunity in patients with preeclampsia. *American Journal of Reproductive Immunology* 1999; 41(5):297–306.
193. Piccinni MP1, Beloni L, Livi C, Maggi E, Scarselli G, Romagnani S. Defective production of both leukemia inhibitory factor and type 2 T-helper cytokines by decidual T cells in unexplained recurrent abortions. *Nat Med.* 1998 Sep;4(9):1020-4.
194. Palmer MT, Lee YK, Maynard CL, Oliver JR, Bikle DD, Jetten AM, Weaver CT. Lineage-specific effects of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on the development of effector CD4 T cells. *The Journal of Biological Chemistry* 2011; 286(2):997–1004.
195. Daniel C, Sartory NA, Zahn N, Radeke HH, Stein JM. Immune modulatory treatment of trinitrobenzene sulfonic acid colitis with calcitriol is associated with a change of a T Helper (Th)1/Th17 to a Th2 and regulatory T cell profile. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 2008; 324(1):23–33.
196. Gorman S, Kuritzky LA, Judge MA, Dixon KM, McGlade JP, Mason RS, Finlay-Jones JJ, Hart PH. Topically applied 1,25-dihydroxyvitamin D3 enhances the suppressive activity of CD4+ CD25+ cells in the draining lymph nodes. *The Journal of Immunology* 2007;179:6273–6283.
197. Spach KM, Nashold FE, Dittel BN, Hayes CE. IL-10 signaling is essential for 1,25-dihydroxyvitamin D3-mediated inhibition of experimental autoimmune encephalomyelitis. *The Journal of Immunology* 2006; 177:6030–6037.
198. Jeffery LE, Burke F, Mura M, Zheng Y, Qureshi OS, Hewison M, Walker LS, Lammis DA, Raza K, Sansom DM. 1,25-dihydroxyvitamin D3 and IL-2 combine to inhibit T cell production of inflammatory cytokines and promote development of regulatory T cells expressing CTLA-4 and FoxP3. *The Journal of Immunology* 2009; 183:5458–5467.
199. Correale J, Ysraelit, M.C. & Gaitán, M.I. Immunomodulatory effects of Vitamin D in multiple sclerosis. *Brain: a journal of neurology* 2009; 132:1146–1160.
200. Shiozawa K, Shiozawa S, Shimizu S, Fujita T. 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 inhibits pokeweed mitogen-stimulated human B cell activation: an analysis using serum-free culture conditions. *Immunology* 1985; 56:161–167.
201. Provvedini DM, Tsoukas CD, Defetos LJ, Manolagas SC. 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3-binding macromolecules in human B lymphocytes: effects on immunoglobulin production. *The Journal of Immunology* 1986; 136(8):2734–2740.
202. Chen S, Sims GP, Chen XX, Gu YY, Chen S, Lipsky PE. Modulatory effects of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on human B cell differentiation. *The Journal of Immunology* 2007; 179:1634–1647.
203. Matsushita T, Yanaba K, Bouaziz JD, Fujimoto M, Tedder TF. Regulatory B cells inhibit EAE initiation in mice while other B cells promote disease progression. *The Journal of Clinical Investigation* 2008;118(10):3420–3430.
204. Ozkan S, Jindal S, Greenfield K, Shu J, Zeitlian G, Hickmon C, Pal L. Replete vitamin D stores predict reproductive success following in vitro fertilization. *Fertil Steril* 2010;94:1314–9.
205. Rudick, B.; Ingles, S.; Chung, K.; Stanczyk, F.; Paulson, R.; Bendikson, K. Characterizing the influence of vitamin D levels on IVF outcomes. *Hum. Reprod.* 2012; 27, 3321–3327.
206. Fabris A, Pacheco A, Cruz M, Puente JM, Fatemi H, García-Velaco JA. Impact of circulating levels of total and bioavailable serum vitamin D on pregnancy rate in egg donation recipients. *Fertil Steril* 2014;102:1068-12.
207. Estes SJ, Ye B, Qiu W, Cramer D, Hornstein MD, Missmer SA. A proteomic analysis of IVF follicular fluid in women ≤ 32 years old. *Fertil Steril* 2009;92:1569–78.
208. Aleyasin A, Hosseini MA, Mahdavi A, Safdarian L, Fallahi P, Mohajeri MR, Abbasi M, Esfahani F. Predictive value of the level of vitamin D in follicular fluid on the outcome of assisted reproductive technology. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* 2011; 159: 132–137.
209. Firouzabadi RD, Rahmani E, Rahsepar M, Firouzabadi MM. Value of follicular fluid vitamin D in predicting the pregnancy rate in an IVF program. *Arch Gynecol Obstet.* 2014 Jan;289(1):201-6.
210. Anifandis GM, Dafopoulos K, Messini CI, Chalvatzas N, Liakos N, Pournaras S, et al. Prognostic value of follicular fluid 25-OH vitamin D and glucose levels in the IVF outcome. *Reprod Biol Endocrinol* 2010;8:91.