La deficiencia de vitamina D durante el tercer trimestre del embarazo y su asociación con complicaciones mediadas por la placenta

Autores: Tiphaine Raia-Barjat, Camille Sarkis, Florence Rancon, Lise Thibaudin, Jean-Christophe Gris, Nadia Alfaidy y Céline Chauleur

Fuente de artículo:

Tiphaine Raia-Barjat, C. S.-C. (2021). Vitamin D deficiency during late pregnancy mediates placenta-associated complications. *Scientific Reports*.

ABSTRACTO

Durante el embarazo, la insuficiencia de vitamina D materna podría aumentar el riesgo de preeclampsia. El objetivo del estudio fue evaluar la relación entre el estado de vitamina D y el surgimiento de complicaciones mediadas por la placenta (PMC) en una población de alto riesgo. Se llevó a cabo un estudio prospectivo de cohorte multicéntrico con 200 pacientes embarazadas. El nivel de vitamina D en pacientes con complicaciones mediadas por la placenta fue menor a las 32 semanas en comparación con embarazos sin complicaciones (P = 0,001). A las 32 semanas, el riesgo de desarrollar PMC fue cinco veces mayor en pacientes con deficiencia de vitamina D (RR: 5,14; IC del 95% (1,50-17,55)) en comparación con pacientes con niveles normales de vitamina D. Se observó una considerable relación inversa entre los niveles séricos de 25(OH)D a las 32 semanas y el riesgo posterior de complicaciones mediadas por la placenta (P = 0,001). A las 32 semanas, el nivel de vitamina D en pacientes con complicaciones mediadas por la placenta de inicio tardío fue más bajo que en pacientes con complicaciones de inicio temprano y en pacientes sin complicaciones mediadas por la placenta (P < 0,0001). Estos resultados sugieren que la vitamina D desempeña un papel en el mantenimiento del funcionamiento de la placenta y, por lo tanto, en la prevención del inicio de complicaciones mediadas por la placenta tardías.

INTRODUCCION

Las complicaciones mediadas por la placenta (PMCs) comprenden un conjunto diverso de trastornos multisistémicos. Estas pueden ser de origen materno (preeclampsia (PE), eclampsia, desprendimiento de placenta, síndrome HELLP - hemólisis, elevación de enzimas hepáticas, plaquetas bajas) o de origen feto-placentario (restricción del crecimiento intrauterino (RCIU), muerte fetal intrauterina, abortos espontáneos recurrentes). Son comunes, dado que la PE afecta entre el 2 y el 8% de los embarazos **[1,2]**. La prevalencia de la PE se estima entre el 0,5 y el 1,5% en Francia, y entre el 4 y el 18% en África, dependiendo del grupo étnico **[3]**. Estas condiciones son graves, ya que conllevan un alto índice de morbilidad y mortalidad tanto para la madre como para el feto, y son una de las principales causas de partos prematuros **[4]**. La PE se relaciona con partos prematuros en un 15 a 67% de los casos, RCIU en un 10 a 25%, y mortalidad neonatal en un 1 a 2% de los casos **[5]**. En cuanto a la preeclampsia, se pueden distinguir dos formas: la forma temprana, o "de inicio temprano", que se debe a una anomalía en la placentación con desequilibrio angiogénico, y la forma tardía, o "de inicio tardío", que presenta placentación normal pero anormalidades en el mantenimiento de las funciones de la placenta relacionadas con el riesgo cardiovascular **[6,7]**.

La vitamina D_3 es una prehormona y un micronutriente que también se produce endógenamente cuando la piel se expone a los rayos UV-B. Inicialmente se identificó por su función en enfermedades óseas y el metabolismo del calcio. La vitamina D_3 influye en la regulación génica después de convertirse en 1,25-dihidroxivitamina D_3 (1,25(OH)D), que es el ligando de alta afinidad del receptor nuclear del factor de transcripción de la vitamina D (VDR). El VDR activado por el ligando se une a sitios genómicos accesibles cerca de sus genes diana y modula su transcripción, con posibles consecuencias en varios órganos. Por lo tanto se reconoce actualmente que la vitamina D desempeña una función en varios órganos, especialmente en la placenta **[8]**, al regular la expresión de genes clave asociados al desarrollo **[9-11]**. Durante el embarazo, las concentraciones de 1,25(OH)D tanto en la circulación sistémica materna como en la placenta aumentan. El estado de vitamina D se evalúa mediante los niveles séricos circulantes de 25(OH)D, medidos con un ensayo confiable. Según la Guía de Práctica Clínica de la Sociedad Endocrina, se considera insuficiencia de vitamina D cuando las concentraciones de 25(OH)D se encuentran entre 21-29 ng/ml (525-725 nmol/L) y deficiencia de vitamina D cuando están por debajo de 20 ng/mL (50 nmol/L) **[12]**. Aunque no hay una definición precisa de deficiencia de vitamina D en el embarazo, se recomienda mantener una concentración de 25(OH)D por encima de 20 ng/mL para prevenir el parto prematuro **[13,14]**, según el Instituto de Medicina (IOM). En una amplia cohorte francesa, el 46,5% de las mujeres embarazadas presentaban niveles de 25(OH)D por debajo de 20 ng/mL **[15]**. Durante el embarazo, la insuficiencia de vitamina D materna puede aumentar el riesgo de preeclampsia, parto prematuro **[14]**, restricción del crecimiento intrauterino (RCIU) y diabetes gestacional **[16]**. Es importante destacar que los patrones de desregulación de la vitamina D parecen diferentes en la preeclampsia temprana y tardía **[17]**. Solo dos estudios se centraron en los perfiles de vitamina D en mujeres con alto riesgo de complicaciones mediadas por la placenta **[18,19]**.

El principal objetivo de este estudio fue analizar la relación entre el nivel de vitamina D y la presencia de complicaciones mediadas por la placenta (PMC). Los objetivos secundarios incluyeron: (**1**) evaluar la asociación entre el nivel de vitamina D y la presencia de preeclampsia con o sin restricción del crecimiento intrauterino (RCIU); (**2**) investigar la relación entre el nivel de vitamina D y la presencia de complicaciones mediadas por la placenta en etapas tempranas y tardías.

MÉTODOS

Población de estudio

Nuestro estudio es un estudio ad hoc de una cohorte previamente recopilada del estudio AngioPred **[20]**. El estudio AngioPred es un estudio de cohorte prospectivo multicéntrico que se llevó a cabo en el departamento de Obstetricia y Ginecología de los Hospitales Universitarios de Saint Etienne y Nimes, y en el Laboratorio de Hematología del Hospital Universitario de Nimes. Las pacientes fueron reclutadas entre junio de 2008 y octubre de 2010. Únicamente las pacientes incluidas en el Hospital Universitario de Saint Etienne se sometieron a la medición de vitamina D, lo que corresponde a 182 pacientes de las 200 que formaban la cohorte inicial.

Todas las pacientes incluidas presentaban un alto riesgo de ocurrencia o recurrencia de complicaciones mediadas por la placenta (PMC). Los factores de riesgo incluían

diabetes, hipertensión crónica, obesidad, edad materna menor de 18 años o mayor de 38 años, enfermedad renal crónica, lupus eritematoso sistémico, síndrome antifosfolípido, antecedentes familiares de enfermedad cardiovascular o tromboembolismo venoso en familiares de primer grado, trombofilia biológica sin antecedentes personales de tromboembolismo venoso o de PMC, historial de uno o más episodios de PMC o antecedentes personales de tromboembolismo venoso. Los criterios de exclusión fueron los siguientes: embarazos gemelares, pacientes con antecedentes de muerte fetal, RCIU cuya etiología fuera de origen cromosómico, genético o infeccioso, y la presencia de cualquier PMC o tromboembolismo venoso en el momento de la inclusión.

El estudio recibió la aprobación en marzo de 2008 por parte del Comité de Ética y la Junta de Revisión Institucional del Hospital Universitario de Saint Etienne. Está registrado en ClinicalTrials.gov (identificador NCT00695942) y todas las investigaciones clínicas se llevaron a cabo siguiendo los principios de la Declaración de Helsinki de 1996. Todas las mujeres participantes dieron su consentimiento informado antes de ser incluidas en el estudio, antes de las 20 semanas de gestación, mediante consentimiento por escrito. No se disponía de información sobre la suplementación de vitamina D durante el embarazo.

Extracción de sangre

Cada paciente se sometió a una extracción de sangre complementaria a las pruebas de laboratorio convencionales para el monitoreo del embarazo a las 20, 24, 28, 32 y 36 semanas de gestación, lo que resulta en un total de cinco muestras por paciente. Las muestras fueron centrifugadas de inmediato, divididas en alícuotas y almacenadas a -80°C.

Análisis de laboratorio biológico

El análisis de vitamina D solo se puede realizar en una muestra de sangre tomada en tubos secos; esta limitación hizo necesario excluir a todas las pacientes inscritas en el centro de Nimes, ya que sus muestras se habían recogido en tubos anticoagulantes. Los análisis se llevaron a cabo en el laboratorio de bioquímica del hospital universitario de Saint Etienne. El 25(OH)D se cuantificó con el método de quimioluminiscencia de unión competitiva automatizado para 25-OHD de sistemas inmunodiagnósticos (IDS) en el analizador IDS-iSYS (IDS Ltd, Boldon, Reino Unido). Se asignó un valor de 7 ng/mL a cualquier concentración indetectable, lo que corresponde al límite de cuantificación determinado en nuestro laboratorio.

Hemos definido la deficiencia de vitamina D como un nivel de 25(OH)D por debajo de 20 ng/ml y la insuficiencia de vitamina D como un nivel por debajo de 30 ng/ml.

Criterios de evaluación

El resultado principal fue la ocurrencia o recurrencia de cualquier complicación médica grave (PMC) diagnosticada según los siguientes criterios: (**1**) PE con o sin RCIU. La PE se definió de acuerdo con los criterios de la ISSHP (Sociedad Internacional para el Estudio de la Hipertensión en el Embarazo) **[21]**. Se diagnosticaba PE si una mujer previamente normotensa presentaba hipertensión de inicio reciente (>140 mmHg sistólica o >90 mmHg diastólica) después de las 20 semanas de gestación, asociada con proteinuria (proteína/creatinina en orina puntual >30 mg/mmol [0,3 mg/mg] o >300

mg/día o al menos 1 g/L ['2+'] en la prueba de tira reactiva) u otra disfunción orgánica materna (insuficiencia renal, afectación hepática, complicaciones neurológicas, complicaciones hematológicas); (**2**) RCIU sin PE definido por un peso al nacer ≤ al percentil 10 (según la fórmula AUDIPOG) con anomalías en el Doppler umbilical. Esta fórmula calcula el percentil exacto del peso al nacer a partir de la edad gestacional en el momento del nacimiento, el sexo del recién nacido y el peso al nacer **[22]**.

Los resultados secundarios fueron: (**1**) La ocurrencia o recurrencia de una Preeclampsia (PE) con o sin Restricción del Crecimiento Intrauterino (RCIU), como se definió anteriormente; (**2**) La ocurrencia o recurrencia de cualquier complicación médica grave (PMC) temprana definida como aquella que ocurre antes de las 34 semanas, y las PMC tardías definidas como aquellas que ocurren durante o después de las 34 semanas.

Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó utilizando XLSTAT®. Los datos cualitativos se describieron mediante frecuencias absolutas y relativas (expresadas en %). Para las variables cuantitativas, se proporcionaron la media y la desviación estándar. En cuanto a las variables cualitativas, se compararon utilizando la prueba de Chi-cuadrado o la prueba exacta de Fisher en caso de números insuficientes. Para las variables cuantitativas, se empleó la prueba t de Student o, en el caso de que una distribución no es normal, la prueba de Wilcoxon-Mann-Whitney. Se verificó la normalidad de cada variable previamente mediante la prueba de Shapiro-Wilk. Se compararon los promedios de las dosis de vitamina D en cada una de las 5 visitas (20, 24, 28, 32, 36 semanas) entre las pacientes que presentaron una PMC y aquellas que no la presentaron. Además, se estimaron los riesgos relativos (cociente de riesgos) y sus intervalos de confianza del 95% para la asociación entre el nivel de vitamina D y el riesgo de PMC y de preeclampsia. Se utilizaron dos umbrales predefinidos que representan una concentración baja de 25(OH)D, incluyendo <20 y 20-29 ng/mL, para dividir los datos. Se examinó la relación entre cada punto de corte y la complicación mediada por la placenta mediante un análisis de regresión logística multivariable para adaptar posibles factores de confusión relacionados con características maternas relevantes. Se incluyeron solo las variables con una asociación inicial de $P < 0,15$. El valor de corte de vitamina D en plasma para predecir la PMC se determinó en cada etapa gestacional utilizando la curva ROC con cálculo del área bajo la curva e intervalos de confianza del 95% (IC del 95%) (Características del Operador Receptor). El umbral seleccionado en la curva ROC es aquel que representa el mejor equilibrio entre sensibilidad y especificidad. Se comparó el área bajo la curva ROC con el área bajo la primera diagonal, que es 0,5, mediante una prueba de hipótesis. Se establecieron umbrales a las 32 y 36 semanas para predecir la PMC ≥ 34 semanas. Para comparar los niveles de vitamina D entre pacientes con PMC de inicio temprano, PMC de inicio tardío y pacientes sin PMC, se evaluaron las diferencias entre grupos utilizando la prueba de Kruskal-Wallis. Dado que la distribución era sesgada, se realizó una prueba post-hoc de Dunn para analizar las diferencias entre dos grupos. En todos los análisis estadísticos realizados, la significancia del resultado se consideró válida solo para un nivel de riesgo alfa inferior al 5%.

RESULTADOS

Características clínicas

Se incluyeron ciento ochenta y dos pacientes, lo que permitió el análisis de 859 muestras de plasma. Todas las muestras se tomaron antes del inicio de la preeclampsia (PE) o de la restricción del crecimiento intrauterino (RCIU). Cuarenta y tres pacientes desarrollaron una complicación mediada por la placenta (PMC) (23.6%). Las características demográficas y los criterios de inclusión se resumen en la (**Tabla 1**). Casi dos tercios de nuestras pacientes presentaban antecedentes de PMC.

Tabla 1. Características de las pacientes y criterios de inclusión

	Total N = 182	PMC N = 43	Sin PMC N = 139	*P*
Edad (años)	32 ± 5,0	32 ± 5,3	32,1 ± 5,1	0,9
Número de partos/embarazos	1,3 ± 0,9	1,2 ± 0,8	1,3 ± 1,0	0,73
IMC (Kg/m ^{2})	25,3 ± 6,6	25,2 ± 7,5	25,4 ± 6,4	0,71
Tabaquismo	22 (12,4)	4 (9,5)	18 (13,2)	0,52
Diabetes	6 (3,3)	3 (7)	3 (2.2)	0,13
Nefropatía	4 (2.2)	1 (2.3)	3 (2.2)	0,96
Hipertensión	17 (9,4)	3 (7)	14 (10,2)	0,53
Lupus	12 (6,6)	5 (11,6)	7 (5.1)	0,14
Síndrome antifosfolípido	4 (2.2)	1 (2.3)	3 (2.2)	0,96
Historia personal de VTE	35 (19,2)	10 (23,3)	25 (18,1)	0,46
Historia personal de PMC	119 (65,4)	24 (55,8)	95 (69,3)	0,10
Historia familiar de VTE o PMC	38 (21,1)	8 (18,6)	30 (21,9)	0,64

Variables categóricas reportadas como frecuencia (porcentaje) y variables continuas reportadas como media ± desviación estándar.

IMC índice de masa corporal, **VTE** tromboembolismo venoso, **PMC** complicación mediada por la placenta.

Relación entre el estado de vitamina D y el surgimiento de complicaciones mediadas por la placenta

Los niveles de vitamina D fueron similares a las 20, 24 y 28 semanas en pacientes con y sin complicaciones mediadas por la placenta (PMC). Los niveles de vitamina D en pacientes con PMC fueron más bajos a las 32 semanas (P = 0.001), sin embargo alcanzarían la significancia estadística a las 36 semanas (**Fig. 1**), si el muestreo fuera suficientemente representativo en esta etapa gestacional. De hecho, en la semana 36, la falta de significancia estadística probablemente se debió al menor número de pacientes, debido a partos prematuros.

A las 32 semanas, el riesgo promedio de desarrollar complicaciones mediadas por la placenta (PMC) fue cinco veces mayor en pacientes con deficiencia de vitamina D en comparación con aquellas con niveles normales de vitamina D (RR: 5.14, IC del 95%: 1.50-17.55). Después de adecuar por lupus, diabetes y antecedentes personales de PMC, el riesgo promedio de PMC en mujeres con 25(OH)D < 20 ng/mL fue 15.45 veces mayor que en mujeres con 25(OH)D ≥ 30 ng/mL (RR: 14.45, IC del 95%: 1.83-114.28). A las 36 semanas, el aumento del riesgo no fue significativo (**Tabla 2**).

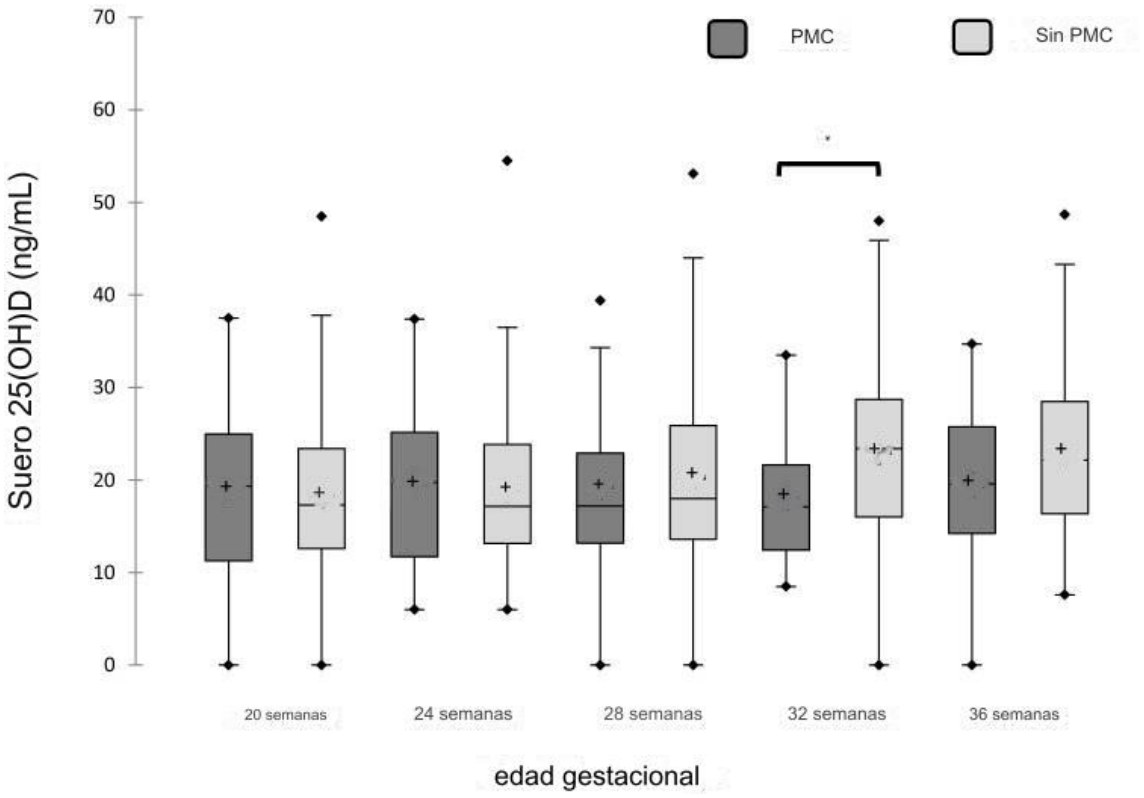

Figura 1.

Evolución del perfil de vitamina D durante el embarazo según la presencia de cualquier complicación mediada por la placenta (PMC).

Las cruces rojas representan los promedios. Las barras horizontales centrales son las medianas. Los límites inferiores y superiores de los cuadros son el primer y tercer cuartil. Los puntos indican el mínimo y el máximo para cada caso.

PMC: complicación mediada por la placenta *** P** = 0.001.

Tabla 2. Estado de vitamina D materna entre las semanas 32 y 36 de gestación y riesgo de complicaciones mediadas por la placenta en mujeres con alto riesgo.

Suero 25(OH)D (ng/mL)	Número de pacientes	Número de PMC	Razón de riesgo no ajustado	Intervalo de confianza 95%	Razón de riesgo ajustada [a]	Intervalo de confianza 95%
32 semanas						
< 20	73	25	5.14	1,50-17,55	14.45	1,83–114,28
20-29	67	11	2.46	0,67–9,03	3.67	0,64–21,10
≥ 30	30	2	Referencia		Referencia	
36 semanas						
< 20	67	16	1,85	0,71–4,80	1,66	0,54–5,10
20-29	59	11	1,45	0,53–3,93	1,54	0,50–4,76
≥ 30	31	4	Referencia		Referencia	

[a] Complicación mediada por la placenta (PMC)

Un análisis multivariado ajustado por lupus, diabetes y antecedentes personales de PMC, en cada concentración de 25OHD en suero.

Efectivamente, como se muestra en la (**Figura 2**), se evidenció una relación inversa significativa entre los niveles de 25(OH)D en suero a las 32 semanas y el riesgo posterior de complicaciones mediadas por la placenta (PMC) (P = 0.001).

Las curvas ROC se utilizaron para calcular los valores de umbral que presentan la mejor sensibilidad y especificidad para predecir las complicaciones mediadas por la placenta (PMC) a las 32 y 36 semanas. El área bajo la curva (AUC) fue de 0.67 (IC del 95%: 0.56-0.78) a las 32 semanas (P = 0.002) y 0.6 (0.47-0.72) a las 36 semanas (P = 0.14). A las 32 semanas, el valor umbral de vitamina D fue de 22.9 ng/mL con una sensibilidad del 84.2%, especificidad del 54.3%, valor predictivo positivo del 35.2% y valor predictivo negativo del 92.1%. A las 36 semanas, el valor umbral de vitamina D fue de 15.9 ng/mL con una sensibilidad del 41.9%, especificidad del 77.0%, valor predictivo positivo del 31.0% y valor predictivo negativo del 84.3% (**Fig. 3a y 3b**). En la práctica, los valores de vitamina D analizados a las 32 semanas superiores a 22.9 ng/ml tenían la capacidad de descartar el desarrollo posterior de PMC con una excelente capacidad de diferenciación.

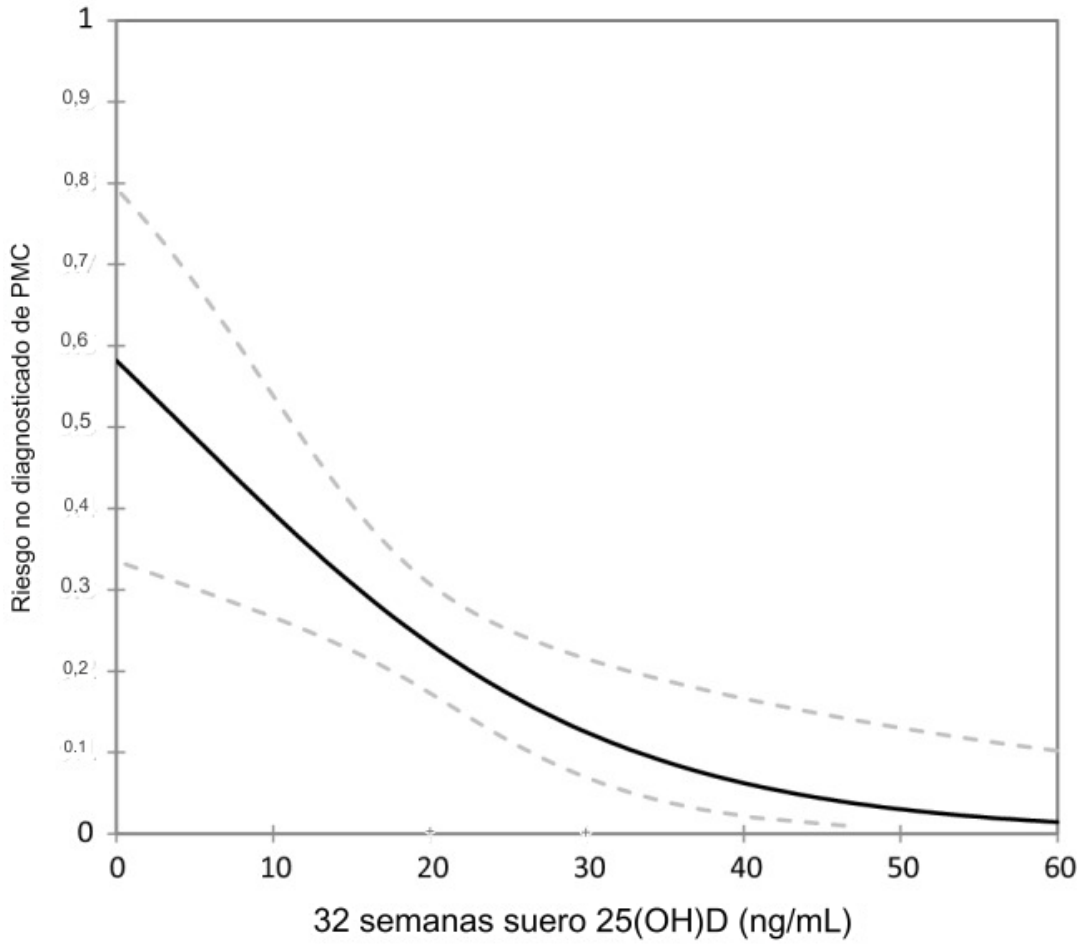

Figura 2.

Asociación dosis-respuesta entre la concentración de 25-hidroxivitamina D en suero materno a las 32 semanas y el riesgo de complicaciones mediadas por la placenta derivado de un modelo de regresión logística (P = 0.001).

La línea sólida representa la estimación puntual, y las líneas punteadas representan los intervalos de confianza del 95%.

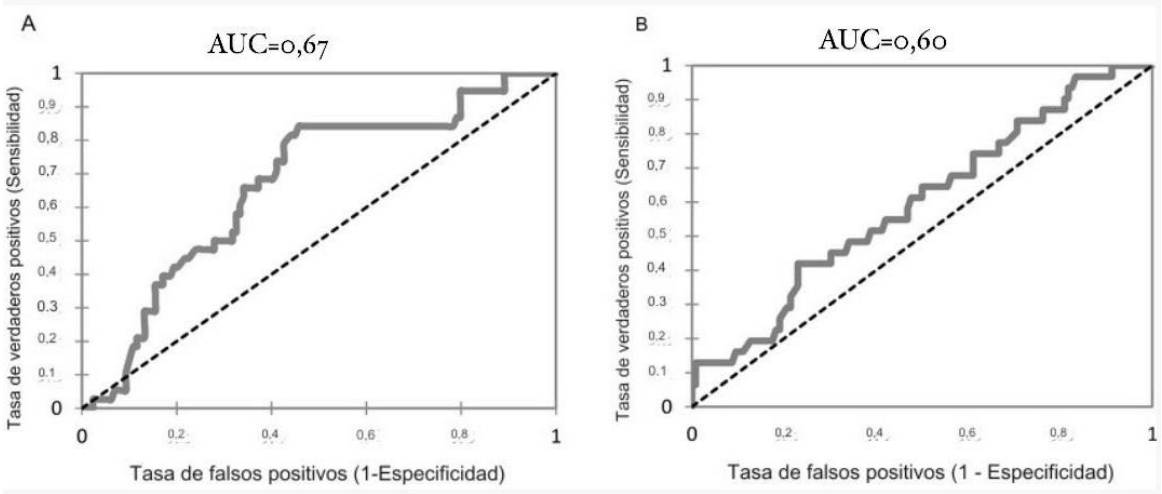

Figura 3.

Curvas de característica operativa del receptor (ROC) de vitamina D para la complicación mediada por la placenta (**A**) a las 32 semanas (**B**) a las 36 semanas.

AUC es el área bajo la curva de la característica operativa del receptor.

Relación entre el nivel de vitamina D y la ocurrencia de preeclampsia

A las 36 semanas, el 22.2% (2/9) de las pacientes con niveles muy bajos de vitamina D (<12 ng/ml) desarrollaron preeclampsia, mientras que el 0% (0/27) de las pacientes con niveles normales de vitamina D presentaron preeclampsia (P = 0.02). En las 32 semanas, los valores de riesgo relativo no se vieron significativamente afectados por los niveles de vitamina D (**Tabla 3**). Después de realizar un ajuste estadístico por lupus, diabetes y antecedentes personales de complicaciones mediadas por la placenta, tanto a las 32 semanas como a las 36 semanas, el aumento en el riesgo no fue significativo.

Tabla 3. Estado de la vitamina D materna entre las semanas 32 y 36 de gestación y el riesgo de preeclampsia en mujeres con alto riesgo

Suero 25(OH)D (ng/mL)	Número de pacientes	Número de preeclampsia	Razón de riesgo no ajustado	Intervalo de confianza 95%	Razón de riesgo ajustado [a]	Intervalo de confianza 95%
32 semanas						
< 20	61	13	2,88	0,81–10,27	4.41	0,78–25,06
20-29	60	4	0,90	0,21–3,95	1.28	0,21–7,90
≥ 30	27	2	Referencia		Referencia	
36 semanas						
< 20	62	8	3.61	0,68–19,35	1,45	0,41–5,17
20-29	52	4	1,67	0,24–10,74	1.20	0,31–4,59
≥ 30	28	1	Referencia		Referencia	

[a] Análisis multivariado ajustado por lupus, diabetes y antecedentes personales de complicaciones mediadas por la placenta (PMC), en cada nivel de concentración de 25OHD en suero.

Relación entre el estado de vitamina D y la ocurrencia de complicaciones mediadas por la placenta, tanto en etapas tempranas como tardías

A las 32 semanas, el nivel de vitamina D de las pacientes con complicaciones mediadas por la placenta de inicio tardío fue inferior al de las pacientes con complicaciones de inicio temprano y al de las pacientes sin complicaciones mediadas por la placenta ($P < 0.0001$) (**Tabla 4**). No se observaron diferencias significativas en los otros períodos del embarazo.

Tabla 4. Niveles de 25(OH)D en suero materno (ng/mL) de acuerdo al inicio de las complicaciones mediadas por la placenta (PMC)

Etapa gestacional	Sin PMC N = 139	PMC < 34 semanas N = 13	PMC ≥ 34 semanas N = 29	Valor *p* de la prueba de Kruskal-Wallis	Análisis post hoc de Dunn
20 semanas	18,43 ± 7,85	17,83 ± 7,10	20,17 ± 9,87	0,71	0,42[a] ; 0,95[a] ; 0,59
24 semanas	18,99 ± 8,3	18,78 ± 6,76	19,98 ± 9,34	0,91	0,66*; 0,88b ; 0,89
28 semanas	20,38 ± 8,63	18,35 ± 5,53	19,89 ± 9,34	0,80	0,59[a] ; 0,64[b] ; 0,95
32 semanas	23,06 ± 8,72	24,76 ± 6,51	15,36 ± 4,61	< 0,0001	< 0,0001 [a] ; 0,37[b] ; 0.001

Variables continuas reportadas como media ± desviación estándar. Comparación entre sin PMC y PMC > 34 semanas.
PMC: complicación mediada por la placenta**.**
[a] Sin PMC vs. PMC < 34 semanas
[b] PMC < 34 semanas vs. PMC > 34 semanas

DISCUSIÓN

La deficiencia de vitamina D en suero a las 32 semanas fue un factor de riesgo independiente y significativo para las complicaciones mediadas por la placenta (PMC) durante los embarazos estudiados. Las pacientes con deficiencia de 25(OH)D tienen un riesgo cinco veces mayor de desarrollar PMC, principalmente las de inicio tardío más allá de las 34 semanas. Se observó una relación dosis-respuesta entre las concentraciones de vitamina D materna a las 32 semanas y el riesgo posterior de desarrollar cualquier tipo de PMC.

La mayoría de los estudios han descrito el estado de vitamina D en la población general y no en poblaciones de alto riesgo. Varios estudios han analizado la relación entre la deficiencia de vitamina D en el primer trimestre del embarazo y la aparición posterior de preeclampsia. Se observó que las pacientes que desarrollaron preeclampsia tenían niveles más bajos de vitamina D a las 14 semanas. Se identificó una relación dosis-efecto entre la concentración de vitamina D y el riesgo de preeclampsia, con el riesgo duplicándose para un umbral de 20 ng/mL. Se encontró que un aumento en la concentración de 25(OH)D de al menos 12 ng/mL, independientemente del estado de vitamina D en el primer trimestre, fue un factor protector contra la ocurrencia de preeclampsia **[23]**. De igual manera, se observó que las mujeres con suficiencia de vitamina D durante el tercer trimestre y en ambos (el primer y tercer trimestre) tuvieron un riesgo significativamente menor de preeclampsia **[24]**.

Otros estudios evaluaron el estado de vitamina D durante el segundo trimestre. La deficiencia de vitamina D antes de las 22 semanas fue un factor de riesgo independiente y significativo para la preeclampsia. Se ha destacado una relación dosis-efecto entre la concentración de 25(OH)D antes de las 22 semanas y el riesgo de preeclampsia. Después de ajustar por factores de confusión (etnia, estación del año, IMC, nivel socioeconómico, edad gestacional), una concentración inferior a 20 ng/mL puede duplicar el riesgo de desarrollar preeclampsia, y una concentración por debajo de 15 ng/mL se asocia con un riesgo cinco veces mayor de preeclampsia. Durante el parto, las pacientes con preeclampsia tenían un nivel sérico un 15% más bajo que el grupo de control. Estos resultados se presentaron a pesar de la suplementación de vitamina D, tres meses antes del parto para el 93% de las pacientes y durante el período periconcepcional para el 46% de las pacientes **[25]**. Otro estudio de casos y controles encontró que la concentración de 25(OH)D en la mitad del embarazo (entre las 18 y 20 semanas) era más baja en mujeres que posteriormente desarrollaron una preeclampsia grave. Una concentración inferior a 20 ng/mL se asoció con un aumento cinco veces mayor en el riesgo de preeclampsia grave en comparación con una concentración superior a 28 ng/mL **[26]**.

Un estudio reciente realizado por Baca et al. investigó la relación entre la concentración de 25(OH)D materna y la gravedad de la preeclampsia. Se demostró que a medida que aumentaba el nivel de 25(OH)D, disminuía el riesgo de preeclampsia, con un umbral de 20 ng/mL. El riesgo ajustado de preeclampsia fue de 2.4 (IC del 95%: 1.2-4.8), 1.1 (IC del 95%: 0.69-1.7) y 1.3 (IC del 95%: 0.89-1.8) respectivamente para niveles de 25(OH)D por debajo de 10 ng/mL, entre 10 y 19.9 ng/mL y entre 20 y 29.9 ng/mL en comparación con pacientes con niveles por encima de 30 ng/mL. Se observó una asociación similar en relación con la preeclampsia grave. En este estudio, el análisis categorial sugirió que el impacto de la disminución del nivel de vitamina D fue significativo por debajo de 10 ng/mL en comparación con pacientes con niveles ≥ 30 ng/mL **[27]**. Otro estudio demostró que las pacientes con niveles de 20 ng/mL o más antes de las 26 semanas presentaban una reducción del 40% en el riesgo de preeclampsia grave en comparación con pacientes con niveles por debajo de 20 ng/mL **[28]**. Otros estudios investigaron esta relación con el riesgo de desarrollar preeclampsia grave **[29,30]**.

Los estudios en poblaciones de alto riesgo son muy escasos. Las pacientes de alto riesgo con niveles de 25(OH)D < 12 ng/mL tenían un riesgo 2.4 veces mayor de presentar preeclampsia temprana (< 35 semanas) en comparación con pacientes con niveles de 25(OH)D ≥ 30 ng/mL (ajustando por factores de confusión: IMC y raza). Es importante destacar que las mujeres con preeclampsia previa tenían concentraciones basales más bajas de 25(OH)D que las mujeres con hipertensión crónica **[19]**. Este estudio respalda nuestros resultados, sin embargo, a diferencia de nuestro estudio, no evaluó el estado de vitamina D al final del embarazo. Otro estudio no encontró diferencias significativas en las concentraciones de 25(OH)D entre el grupo con preeclampsia y el grupo sin preeclampsia a pesar de que el 80% de las pacientes presentaban deficiencia de vitamina D. En nuestro estudio, hemos destacado la asociación entre la deficiencia de vitamina D y las complicaciones mediadas por la placenta (PMC). Esta asociación con el estado de vitamina D parece ser más relevante al final del embarazo (a las 32 semanas y 36 semanas) en una población de alto riesgo **[18]**. Nuestro estudio también consideró el riesgo de restricción del crecimiento intrauterino (RCIU), a diferencia de la mayoría de los estudios. Por lo tanto, la deficiencia de vitamina D a las 32 semanas se relaciona con

el riesgo de preeclampsia y también de RCIU. El último metaanálisis de Cochrane indica que la insuficiencia de vitamina D materna podría aumentar el riesgo de preeclampsia [16]. Proponemos que la suplementación con vitamina D puede disminuir el riesgo de preeclampsia en comparación con la ausencia de intervención o placebo, y además enfatizamos que la suplementación en la etapa avanzada del embarazo podría ser beneficiosa.

Durante el embarazo, la vitamina D cumple tres roles principales. En primer lugar, estimula la absorción de calcio, un proceso crucial para la formación mineral ósea del feto durante el último trimestre. En segundo lugar, la vitamina D contribuye a la tolerancia del feto, que se comporta como un aloinjerto durante el embarazo [31]. Por último el papel de la vitamina D es importante en la participación de numerosas regulaciones a nivel de la transcripción génica [32]. Aunque la asociación no implica causalidad, existen varios mecanismos biológicos plausibles que podrían respaldar la influencia de la vitamina D en la preeclampsia. Por ejemplo, se sugiere que un defecto en la implantación placentaria podría resultar en una disminución en la perfusión de la placenta, lo que a su vez podría provocar la producción de sustancias responsables de anomalías en el endotelio [34,35]. Se ha observado que la vitamina D mejora la función endotelial al favorecer la proliferación, migración y formación de estructuras tubulares [36]. Además, se ha demostrado que la forma activa de la vitamina D regula la expresión de genes implicados en la invasión e implantación placentaria, así como en la angiogénesis [37,38]. De igual manera, se ha encontrado evidencia de que los metabolitos de la vitamina D protegen a las células endoteliales contra el estrés oxidativo y reducen los efectos de la exposición a factores asociados con la preeclampsia [39,40]. De igual manera, se ha demostrado que la vitamina D podría regular la expresión del gen del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), que está implicado en la regulación de la proteinuria en la preeclampsia [41]. Una respuesta inmune inapropiada entre la madre y su feto puede influir en un defecto en la implantación. Por lo tanto, las funciones inmunomoduladoras de la vitamina D parecen ser relevantes; la deficiencia de vitamina D podría agravar una respuesta inflamatoria que ya se encuentra presente [42,43]. La suplementación con vitamina D mejora la conformidad, elasticidad y grosor de la capa media e íntima de las estructuras vasculares [44]. Además, la deficiencia de vitamina D también podría ser responsable de un aumento en la presión arterial al influir en el sistema renina-angiotensina-aldosterona [45]. Nuestro estudio sugiere una posible función de la vitamina D, especialmente hacia el final del embarazo, a través de las vías fisiopatológicas mencionadas anteriormente. La vitamina D podría regular especialmente el mantenimiento de las funciones de la placenta. Dado que se cree que las funciones de la placenta se ven afectadas por una participación primaria de las células placentarias durante las complicaciones mediadas por la placenta (PMC) de inicio temprano y por una participación secundaria debido a disfunciones de las células sanguíneas periféricas y vasculares en las PMC de inicio tardío, lo que sugiere que la vitamina D podría ejercer su efecto principalmente a través de sus efectos sistémicos, no directamente en la placenta [45].

Nuestro estudio presenta algunas limitaciones. A pesar de ser un estudio multicéntrico, solo se pudo evaluar los niveles de vitamina D en pacientes de un único centro. Además, no se examinaron todos los factores determinantes de las concentraciones de vitamina D, como la variación estacional, y no se realizaron análisis de sangre del cordón

umbilical. Utilizamos el método de quimioluminiscencia de unión competitiva automatizado de sistemas inmunodiagnósticos (IDS) para medir la vitamina D en el analizador IDS-iSYS, el cual no es el método de referencia para el análisis de vitamina D **[46]**. Aunque en un estudio comparativo el IDS-iSYS mostró una buena correlación con métodos establecidos como la cromatografía líquida-tandem de espectrometría de masas (LC-MS/MS) y un ensayo inmunoquímico enzimático IDS (IDS-EIA), es importante tener en cuenta esta diferencia **[47]**. Sin embargo, la fortaleza de nuestro estudio radica en la investigación realizada en una población de embarazadas de alto riesgo. Se trata de un estudio prospectivo con dosificaciones repetidas a lo largo del embarazo. Hasta la fecha, es el único estudio que ha considerado el historial de las complicaciones mediadas por la placenta (PMC) como un factor determinante de la vitamina D materna.

En conclusión, las pacientes con deficiencia de vitamina D a las 32 semanas presentan un mayor riesgo de desarrollar complicaciones mediadas por la placenta. Esta deficiencia influye principalmente las PMC tardías después de las 34 semanas. Estos resultados sugieren una asociación entre el estado de vitamina D y el mantenimiento del funcionamiento de la placenta, y por lo tanto, con la prevención del inicio de las PMC tardías. Hasta la fecha, son escasos los estudios que han evaluado la suplementación de vitamina D y su relación causal con la preeclampsia en poblaciones de alto riesgo, y mucho menos el riesgo de retraso del crecimiento intrauterino (RCIU). Actualmente, existen varios estudios en curso que deberían aclarar este tema en un futuro cercano.

Referencias

1. Duley L. The global impact of pre-eclampsia and eclampsia. *Semin. Perinatol.* 2009; **33:130**–137. doi: 10.1053/j.semperi.2009.02.010. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
2. Ananth CV, Keyes KM, Wapner RJ. Pre-eclampsia rates in the United States, 1980–2010: age-period-cohort analysis. *BMJ.* 2013; **347:f6564**. doi: 10.1136/bmj.f6564. [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
3. Askie LM, Duley L, Henderson-Smart DJ, Stewart LA. Antiplatelet agents for prevention of pre-eclampsia: a meta-analysis of individual patient data. *Lancet.* 2007; **369:1791**–1798. doi: 10.1016/S0140-6736(07)60712-0. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
4. Khan KS, Wojdyla D, Say L, Gülmezoglu AM, Van Look PFA. WHO analysis of causes of maternal death: a systematic review. *Lancet.* 2006; **367:1066**–1074. doi: 10.1016/S0140-6736(06)68397-9. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
5. Chang J, Elam-Evans LD, Berg CJ, Herndon J, Flowers L, Seed KA, et al. Pregnancy-related mortality surveillance–United States, 1991–1999. *MMWR Surveill. Summ.* 2003; **52:1**–8. [PubMed] [Google Scholar]
6. Steegers EAP, von Dadelszen P, Duvekot JJ, Pijnenborg R. Pre-eclampsia. *Lancet (London, England).* 2010; **376:631**–644. doi: 10.1016/S0140-6736(10)60279-6. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
7. Ives CW, Sinkey R, Rajapreyar I, Tita ATN, Oparil S. Preeclampsia-pathophysiology and clinical presentations: JACC state-of-the-art review. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2020; **76:1690**–1702. doi: 10.1016/j.jacc.2020.08.014. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
8. Wagner CL, Hollis BW. The implications of vitamin D status during pregnancy on mother and her developing child. *Front. Endocrinol. (Lausanne).* 2018; **9:500**. doi: 10.3389/fendo.2018.00500. [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
9. Simner CL, Ashley B, Cooper C, Harvey NC, Lewis RM, Cleal JK. Investigating a suitable model for the study of vitamin D mediated regulation of human placental gene expression. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* 2020; **199:105576**. doi: 10.1016/j.jsbmb.2019.105576. [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]

10. Schulz EV, Cruze L, Wei W, Gehris J, Wagner CL. Maternal vitamin D sufficiency and reduced placental gene expression in angiogenic biomarkers related to comorbidities of pregnancy. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* 2017; **173:273**–279. doi: 10.1016/j.jsbmb.2017.02.003. [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
11. Ekström L, Storbjörk L, Björkhem-Bergman L. Genetic expression profile of vitamin D metabolizing enzymes in the first trimester. *Horm. Metab. Res.* 2016; **48:834**–839. doi: 10.1055/s-0042-119040. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
12. Holick MF, Binkley NC, Bischoff-Ferrari HA, Gordon CM, Hanley DA, Heaney RP, et al. Evaluation, treatment, and prevention of vitamin D deficiency: an Endocrine Society clinical practice guideline. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2011; **96:1911**–1930. doi: 10.1210/jc.2011-0385. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
13. Institute of Medicine (US) Committee to Review Dietary Reference Intakes for Vitamin D and Calcium. Dietary Reference Intakes for Calcium and Vitamin D [Internet]. Ross AC, Taylor CL, Yaktine AL, Del Valle HB, éditeurs. Washington (DC): National Academies Press (US); 2011 [PubMed]
14. McDonnell SL, Baggerly KA, Baggerly CA, Aliano JL, French CB, Baggerly LL, et al. Maternal 25(OH)D concentrations ≥40 ng/mL associated with 60% lower preterm birth risk among general obstetrical patients at an urban medical center. *PLoS One.* 2017; **12:e0180483**. doi: 10.1371/journal.pone.0180483. [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
15. Courbebaisse M, Souberbielle J-C, Baptiste A, Taieb J, Tsatsaris V, Guibourdenche J, et al. Vitamin D status during pregnancy and in cord blood in a large prospective French cohort. *Clin. Nutr.* 2019; **38:2136**–2144. doi: 10.1016/j.clnu.2018.08.035. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
16. Palacios C, Kostiuk LK, Peña-Rosas JP. Vitamin D supplementation for women during pregnancy. *Cochrane Database Syst. Rev.* 2019; **7:CD0088873**. [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar]
17. Martin CB, Oshiro BT, Sands LD, Kabir S, Thorpe D, Clark TC, et al. Vitamin-D dysregulation in early- and late-onset preeclampsia: a gestational-age matched study. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* 2020; **203:105729**. doi: 10.1016/j.jsbmb.2020.105729. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
18. Shand AW, Nassar N, Von Dadelszen P, Innis SM, Green TJ. Maternal vitamin D status in pregnancy and adverse pregnancy outcomes in a group at high risk for pre-eclampsia. *BJOG.* 2010; **117:1593**–1598. doi: 10.1111/j.1471-0528.2010.02742.x. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
19. Gernand AD, Simhan HN, Baca KM, Caritis S, Bodnar LM. Vitamin D, pre-eclampsia, and preterm birth among pregnancies at high risk for pre-eclampsia: an analysis of data from a low-dose aspirin trial. *BJOG.* 2017; **124:1874**–1882. doi: 10.1111/1471-0528.14372. [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
20. Raia-Barjat T, Prieux C, Gris J-C, Chapelle C, Laporte S, Chauleur C. Angiogenic factors for prediction of preeclampsia and intrauterine growth restriction onset in high-risk women: AngioPred study. *J. Matern. Fetal. Neonatal. Med.* 2019; **32:248**–257. doi: 10.1080/14767058.2017.1378325. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
21. Tranquilli AL, Dekker G, Magee L, Roberts J, Sibai BM, Steyn W, et al. The classification, diagnosis and management of the hypertensive disorders of pregnancy: a revised statement from the ISSHP. *Pregnancy Hypertens.* 2014; **4:97**–104. doi: 10.1016/j.preghy.2014.02.001. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
22. Mamelle N, Munoz F, Grandjean H. Fetal growth from the AUDIPOG study. I. Establishment of reference curves. *J. Gynecol. Obstet. Biol. Reprod. (Paris).* 1996; **25:61**–70. [PubMed] [Google Scholar]
23. Bärebring L, Bullarbo M, Glantz A, Leu Agelii M, Jagner Å, Ellis J, et al. Preeclampsia and blood pressure trajectory during pregnancy in relation to vitamin D status. *PLoS ONE.* 2016; **11:e0152198**. doi: 10.1371/journal.pone.0152198. [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]

24. Benachi A, Baptiste A, Taieb J, Tsatsaris V, Guibourdenche J, Senat M-V, et al. Relationship between vitamin D status in pregnancy and the risk for preeclampsia: a nested case-control study. *Clin. Nutr.* 2020; **39:440**–446. doi: 10.1016/j.clnu.2019.02.015. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
25. Bodnar LM, Catov JM, Simhan HN, Holick MF, Powers RW, Roberts JM. Maternal vitamin D deficiency increases the risk of preeclampsia. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2007; **92:3517**–3522. doi: 10.1210/jc.2007-0718. [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
26. Baker AM, Haeri S, Camargo CA, Espinola JA, Stuebe AM. A nested case-control study of midgestation vitamin D deficiency and risk of severe preeclampsia. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2010; **95:5105**–5109. doi: 10.1210/jc.2010-0996. [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
27. Baca KM, Simhan HN, Platt RW, Bodnar LM. Low maternal 25-hydroxyvitamin D concentration increases the risk of severe and mild preeclampsia. *Ann. Epidemiol.* 2016; **26:853**–857.e1. doi: 10.1016/j.annepidem.2016.09.015. [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
28. Bodnar LM, Simhan HN, Catov JM, Roberts JM, Platt RW, Diesel JC, et al. Maternal vitamin D status and the risk of mild and severe preeclampsia. *Epidemiology.* 2014; **25:207**–214. doi: 10.1097/EDE.0000000000000039. [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
29. Robinson CJ, Wagner CL, Hollis BW, Baatz JE, Johnson DD. Association of maternal vitamin D and placenta growth factor with the diagnosis of early onset severe preeclampsia. *Am. J. Perinatol.* 2013; **30:167**–172. [PubMed] [Google Scholar]
30. Robinson CJ, Alanis MC, Wagner CL, Hollis BW, Johnson DD. Plasma 25-hydroxyvitamin D levels in early-onset severe preeclampsia. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 2010; **203**(366):e1–6. [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar]
31. Karras SN, Wagner CL, Castracane VD. Understanding vitamin D metabolism in pregnancy: from physiology to pathophysiology and clinical outcomes. *Metab. Clin. Exp.* 2018; **86:112**–123. doi: 10.1016/j.metabol.2017.10.001. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
32. Al-Garawi A, Carey VJ, Chhabra D, Mirzakhani H, Morrow J, Lasky-Su J, et al. The role of vitamin D in the transcriptional program of human pregnancy. *PLoS One.* 2016; **11:e0163832**. doi: 10.1371/journal.pone.0163832. [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
33. Roberts JM, Gammill HS. Preeclampsia: recent insights. *Hypertension.* 2005; **46:1243**–9. doi: 10.1161/01.HYP.0000188408.49896.c5. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
34. Redman CW, Sacks GP, Sargent IL. Preeclampsia: an excessive maternal inflammatory response to pregnancy. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1999; **180:499**–506. doi: 10.1016/S0002-9378(99)70239-5. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
35. Cantorna MT, Zhu Y, Froicu M, Wittke A. Vitamin D status, 1,25-dihydroxyvitamin D3, and the immune system. *Am. J. Clin. Nutr.* 2004; **80:1717S**–S1720. doi: 10.1093/ajcn/80.6.1717S. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
36. von Versen-Höynck F, Brodowski L, Dechend R, Myerski AC, Hubel CA. Vitamin D antagonizes negative effects of preeclampsia on fetal endothelial colony forming cell number and function. *PLoS ONE.* 2014; **9:e98990**. doi: 10.1371/journal.pone.0098990. [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
37. Daftary GS, Taylor HS. Endocrine regulation of HOX genes. *Endocr. Rev.* 2006; **27:331**–355. doi: 10.1210/er.2005-0018. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
38. Evans KN, Bulmer JN, Kilby MD, Hewison M. Vitamin D and placental-decidual function. *J. Soc. Gynecol. Investig.* 2004; **11:263**–271. doi: 10.1016/j.jsgi.2004.02.002. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
39. Uberti F, Lattuada D, Morsanuto V, Nava U, Bolis G, Vacca G, et al. Vitamin D protects human endothelial cells from oxidative stress through the autophagic and survival pathways. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2014; **99:1367**–1374. doi: 10.1210/jc.2013-2103. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]

40. Brodowski L, Burlakov J, Myerski AC, von Kaisenberg CS, Grundmann M, Hubel CA, et al. Vitamin D prevents endothelial progenitor cell dysfunction induced by sera from women with preeclampsia or conditioned media from hypoxic placenta. *PLoS ONE.* 2014; **9:e98527**. doi: 10.1371/journal.pone.0098527. [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]

41. Cardús A, Parisi E, Gallego C, Aldea M, Fernández E, Valdivielso JM. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 stimulates vascular smooth muscle cell proliferation through a VEGF-mediated pathway. *Kidney Int.* 2006; **69:1377**–1384. doi: 10.1038/sj.ki.5000304. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]

42. Tamblyn JA, Susarla R, Jenkinson C, Jeffery LE, Ohizua O, Chun RF, et al. Dysregulation of maternal and placental vitamin D metabolism in preeclampsia. *Placenta.* 2017; **50:70**–77. doi: 10.1016/j.placenta.2016.12.019. [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]

43. Müller K, Diamant M, Bendtzen K. Inhibition of production and function of interleukin-6 by 1,25-dihydroxyvitamin D3. *Immunol. Lett.* 1991; **28:115**–120. doi: 10.1016/0165-2478(91)90108-M. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]

44. Braam LAJLM, Hoeks APG, Brouns F, Hamulyák K, Gerichhausen MJW, Vermeer C. Beneficial effects of vitamins D and K on the elastic properties of the vessel wall in postmenopausal women: a follow-up study. *Thromb. Haemost.* 2004; **91:373**–80. doi: 10.1160/TH03-07-0423. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]

45. Guo F, Zhang B, Yang H, Fu Y, Wang Y, Huang J, et al. Systemic transcriptome comparison between early- And late-onset pre-eclampsia shows distinct pathology and novel biomarkers. *Cell Prolif.* 2020; **2:e12968**. [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar]

46. Sempos CT, Vesper HW, Phinney KW, Thienpont LM, Coates PM. Vitamin D Standardization Program (VDSP). Vitamin D status as an international issue: national surveys and the problem of standardization. *Scand J. Clin. Lab. Invest. Suppl.* 2012; **243:32**–40. [PubMed] [Google Scholar]

47. Cluse ZN, Fudge AN, Whiting MJ, McWhinney B, Parkinson I, O'Loughlin PD. Evaluation of 25-hydroxy vitamin D assay on the immunodiagnostic systems iSYS analyser. *Ann. Clin. Biochem.* 2012; **49:159**–165. doi: 10.1258/acb.2011.011018. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]